

---

---

Soumis le : 10/07/2014

Forme révisée acceptée le 18/12/2015

Email de l'auteur correspondant :

kallel@mailcity.com

---

---

---

---

**Nature & Technologie**

---

---

# Mise en évidence pour la première fois de la pathogénie des nématodes entomopathogènes du genre *Heterorhabditis* sur les œufs de criquets

Mariem Tabib, Sadreddine Kallel

Institut National Agronomique de Tunisie (INAT) - 43, Avenue Charles Nicolle, 1082 Tunis-Mahrajène, Tunisie, [kallel@mailcity.com](mailto:kallel@mailcity.com)

---

## Abstract

This study has shown entomopathogenic nematodes, such as *Heterorhabditis*, can be an antagonist of locusts, *Locusta migratoria*. Pathogenicity of some populations of *Heterorhabditis* isolated from eggs of *Schistocerca* and *Locusta* were studied in females, males, larvae and locusts eggs. First report of entomopathogenic nematodes and insect eggs interaction was demonstrated by observations and histological slides of cricket eggs.

*Keywords:* *Heterorhabditis*; *Locusta migratoria*; ovicide; entomopathogenic nematode; locust egg.

---

## Résumé

Cette étude a permis de montrer que les nématodes entomopathogènes, tels que *Heterorhabditis*, peuvent être des antagonistes du criquet *Locusta migratoria*. La pathogénie de quelques populations d'*Heterorhabditis* isolées sur les œufs de *Schistocerca* et *Locusta* à partir du sol a été étudiée sur les femelles, les mâles, les larves et les œufs de criquet. L'observation et l'histologie des œufs de criquet a permis, pour la première fois, d'élucider l'interaction de ces nématodes entomopathogènes avec les œufs d'insecte.

*Mots clé :* *Heterorhabditis*; *Locusta migratoria*; ovicide; nématode entomopathogène; criquet

---

## 1. Introduction

Pour réduire le stock et l'utilisation des insecticides de synthèse dans les différents pays, la lutte préventive est mise en place. Elle consiste d'altérer la tendance évolutive d'une situation acridienne avant d'en subir les effets néfastes [1]. Elle reste essentiellement fondée pour les locustes sur la surveillance des aires grégarigènes, en dehors des zones de culture, de façon à intervenir précocement et efficacement sur les premières concentrations de criquets et éviter une invasion généralisée [2]. Certes, l'utilisation des insecticides chimiques continuera d'être un élément important dans la lutte contre les locustes migrants et les insectes d'une manière générale, mais il faudra en diminuer l'impact nocif sur l'environnement par l'utilisation d'autres méthodes plus respectueuses de l'environnement telle que la lutte biologique. La lutte biologique doit être utilisée dans les

foyers grégarigènes, juste avant le départ des invasions, contre les adultes, les larves et dans les sites de ponte contre les œufs (oothèques) [3].

L'inventaire des ennemis naturels des acridiens a mis en évidence la grande diversité des taxons impliqués, leurs modes d'action et leurs impacts sur les acridiens. Ils agissent sur la mortalité immédiate (Prédateurs) ou différée (Parasites et Parasitoïdes, Champignons pathogènes, Protozoaires), sur la fécondité des femelles (Nématodes) ainsi que sur le temps de développement larvaire, les capacités de vol et les activités alimentaires de l'acridien [4]. Les travaux sur les antagonistes des œufs de cet insecte sont par contre très rares. Les parasites des locustes peuvent être des acariens ectoparasites tel que *Trombidium parasitica* [5]. *Eutrombidium sp.* est observé notamment chez *Locusta migratoria*. Les parasitoïdes tel que *Stomorphina lunata* (Tachinidae) et *Chortophila cana* (Antomyiidae), diptères sont signalés par Chopard [6]. Plusieurs protozoaires parasitent les adultes des acridiens.

Les microsporidies tel que *Nosema marrocanus* provoquent un taux de parasitisme qui peut atteindre 6.2% [7]. Les bactéries et les virus inventoriés chez les locustes sont résumés dans les travaux d'Uvarov [8,9], *Bacillus thuringiensis* [10], *Bacillus subtilis* [11], *Pseudomonas fluorescens* [12], *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus* et *Staphylococcus aureus* [13] ont été testés avec succès sur les locustes. Les travaux menés depuis une quinzaine d'années ont montré que seul un petit nombre de champignons entomopathogènes affecte les acridiens, deux genres sont particulièrement promoteurs, *Beauveria* et *Metarhizium*. Le taux de mortalité des adultes de *Schistocerca gregaria* inoculés par *Metarhizium flavoviride* peut atteindre 70 à 90% et les criquets meurent au bout d'une ou deux semaines après le traitement [14]. Des études menées au laboratoire montrent que ce champignon se caractérise par une sélectivité élevée par rapport aux criquets [15]. Une souche locale de *Metarhizium sp* (Metschikoff, Sorokin) efficace contre les larves et les adultes du criquet sénégalais a été testée contre les œufs de l'espèce. Les résultats montrent que le *Metarhizium sp.* accélère l'éclosion de l'œuf par la croissance des hyphes qui exercent une poussée sur l'enveloppe chorionique et provoquent son éclatement. La zone micropylaire est plus sensible à l'action du champignon car les canaux hypopylaire facilitent l'entrée de l'eau et des spores du *Metarhizium sp.* [16]. Parmi les nématodes, les Mermithidae et les Steinernematidae (=Neoplectanidae) ont fait l'objet de tentatives d'utilisation pratique [5, 17]. Les nématodes du genre *Mermis* peuvent parasiter les larves L3 et L5 de certaines locustes [18, 19].

Les nématodes entomopathogènes parasites obligatoires letaux des insectes appartiennent aux familles des *Steinernematidae* et des *Heterorhabditidae*. L'étude de la biologie de des ces invertébrés a mis en évidence la présence de bactéries symbiotiques localisées dans le tube digestif des larves infestantes du nématode. Ces bactéries symbiotiques appartiennent à la famille des Entérobacteries, bacilles gram négatif [20]. Les études de gnotoxénie et la caractérisation taxonomiques des deux partenaires de la symbiose ont révélé la spécificité étroite des associations. En effet, dans la plupart des cas, la reproduction des nématodes n'est optimale qu'avec le symbiote naturel. Ainsi, les bactéries du genre *Xenorhabdus* sont spécifiquement associées aux *Steinernematidae*, et celles du *Photorhabdus* aux *Heterorhabditidae* [20]. Les deux genres bactériens sont proches aussi bien au niveau phylogénétique que biologique avec quelques particularités phénotypiques qui permettent de les distinguer facilement, comme par exemple la bioluminescence chez les *Photorhabdus*.

Une stratégie prometteuse, encore à ses débuts, est de traiter précocement, avant le déclenchement des invasions, via une approche du type lutte biologique. En effet, des produits alliant des agents de contrôle chimique et biologique (la microsporidie, *Nosema locustae* ou le

champignon entomopathogène, *Metarhizium flavoviride*) ont fait leur preuve au laboratoire et sur le terrain en Afrique, Australie, Chine et Madagascar et promettent d'être particulièrement utiles pour traiter les environnements sensibles, tels que les habitats humides favorables à la ponte et à la multiplication de *L. migratoria* [21].

Ce travail vise à étudier l'interaction entre le nématode entomopathogène (EPN) et l'œuf de criquet, le cycle de vie du nématode et caractériser l'efficacité des nématodes entomopathogènes du genre *Heterorhabditis* sur les œufs, les larves et les adultes du criquet migrateur, *Locusta migratoria migratoria*.

## 2. Matériel et Méthodes

Les EPN du genre *Heterorhabditis* sont obtenus à partir de sols prélevés dans la région de Chott Mariem (Sousse) et ayant servi comme substrat pour les pontes de locustes de l'élevage de l'Institut Supérieur Agronomique de Chott Mariem (ISACM). Les EPN piégés par les œufs de criquets *Locusta migratoria* sont maintenus en élevage. Une population de nématodes isolée HIW présente les caractères de *H. indicus* [22], la population CMW prélevé sur un autre sol ressemble à *H. argentinensis* [23]. La population HLAB est obtenue directement d'œufs isolés d'oothèques de *Schistocerca gregaria* et a été identifiée par les caractères morphologiques et par caractérisation moléculaire comme étant une espèce de nématode proche de *H. bacteriophora* [24].

Les œufs de criquet proviennent d'un élevage de *Locusta migratoria* maintenu au Laboratoire de physiologie et physiopathologie des insectes de l'INAT depuis 2006. Les criquets sont élevés à raison d'une centaine d'individus par cage. Les cages sont en bois grillagé de 50 x 50 x 50 cm et équipées chacune d'un pondoir rempli de sable périodiquement humidifié. L'élevage est soumis à des conditions standards (une température de 27 à 32°C, une humidité de 70% et une photopériode de 12h/12h). Les insectes reçoivent quotidiennement une alimentation constituée de bouquets de gazon et servis dans un petit pot rempli d'eau pour ralentir leur flétrissement avec parfois un supplément de feuilles de chou. Chaque cage dispose d'un pondoir rempli de sable stérile et imbibé d'eau (70% HR). La stérilisation du sol se fait par un autoclavage à 120°C pendant 20minutes. Les œufs sont obtenus à partir des oothèques récoltées des pondoirs et préalablement lavées à l'eau pour être débarrassées du bouchon spumeux et des particules du sol à l'aide de pinces souples qui seront utilisées pour le reste des autres essais.

La multiplication des nématodes est effectuée sur des œufs séparés en boîtes de Pétri. Des œufs de *L. migratoria migratoria* ont été lavés puis placés dans des boîtes de Pétri de 50 mm de diamètre tapissées de papier-

filtre humidifié. La désinfection des œufs d'insectes provenant de l'élevage est effectuée par un passage successif dans une solution de 7 pour mille dihydrosulfate de streptomycine pendant 30 minutes, dans une solution à 1 pour mille de chlorure mercurique pendant 30 minutes puis trois passages dans de l'eau stérile. Une solution de 1 ml d'eau distillée contenant la suspension de nématodes à tester (CMW, HIW), a été appliquée à l'aide d'une micropipette. Les boîtes sont ensuite incubées à la température du laboratoire. L'infection est contrôlée après 10 jours par l'observation de l'éclatement des œufs sous l'effet des nématodes. Le repiquage de ces derniers est réalisé toutes les 2 semaines.

### 2.1. Effet des deux populations d'*Heterorhabditis* (CMW et HIW) sur les oothèques au niveau du sable des pondoirs

L'essai consiste à prendre 12 cages, dont chacune contient 10 mâles et 10 femelles de criquets matures sexuellement. Les cages sont réparties ainsi : 4 cages pour le témoin, 4 cages pour le traitement CMW et 4 cages pour le traitement HIW.

Un pondoir rempli de sable stérile et imbibé d'eau (70% HR) a été introduit dans chaque cage. Au niveau de chaque pondoir, nous avons ajouté 10 ml de la suspension du nématode à tester à la dose de 20 000 nématodes/10ml d'eau distillée. Les pondoirs témoins reçoivent la même quantité d'eau (10 ml).

Les suspensions testées (20 000 nématodes/10ml) ont été déterminées suite à des comptages à la loupe binoculaire. Il s'agit de prendre 1 ml de cette suspension, la mettre sur une lame de Peters et faire ensuite le comptage à l'aide d'un compteur et sous loupe binoculaire (Fig. 18). ? Les œufs témoins et traités ont été incubés à une température de 31°C pendant toute l'expérimentation. Le taux d'éclosion des œufs du criquet migrateur a été évalué après 30 jours.

L'essai consiste à suivre la mortalité des adultes de criquets dans chaque cage de répétition de chaque traitement (témoin, CMW et HIW), quotidiennement après avoir fait la répartition des adultes et les traitements. Chaque individu mort est mis dans une boîte de Pétri contenant une quantité d'eau distillée de l'ordre de 1ml pour détecter les nématodes qui l'auraient infecté.

L'observation de nématodes est effectuée sous loupe binoculaire. Un tableau de comparaison est dressé pour montrer si la mort des femelles est due à une infection par les nématodes ou bien si c'est une mortalité naturelle. Cet essai a duré 1 mois avec le remplacement quotidien des adultes morts qu'ils soient mâles ou femelles et 15 jours sans remplacement jusqu'à la mort de tous les adultes femelles.

### 2.2. Cycle biologique des *Heterorhabditis* sur les œufs du criquet

Quinze œufs de criquets utilisés âgés de 14 jours de la ponte désinfectés sont placés dans une boîte de Pétri de

50 mm de diamètre tapissée de papier filtre humidifié. Une suspension de nématodes à étudier de 1ml par boîte est par la suite appliquée à l'aide d'une pipette Pasteur. Pour chaque population de nématodes (HLAB, HIW, CMW), 10 boîtes de pétri sont inoculées. Chaque 24h, une dizaine d'œufs sont prélevés, lavés dans de l'eau distillée et disséqués, sous loupe binoculaire, dans un verre de montre contenant de l'eau physiologique. Les différents stades de développement du nématode sont dénombrés.

L'observation de l'interaction des populations de nématodes avec l'œuf d'insecte a été effectuée grâce aux techniques histologiques. L'essai consiste à prendre 20 œufs de criquet migrateur, *L. migratoria migratoria*, les laver et les placer dans des boîtes de Pétri de 50 mm de diamètre, tapissées de papier-filtre humidifié. Une solution d'eau distillée contenant la suspension de nématodes désirée (1000 nématodes/ml/boîte) est versée dans chacune des boîtes afin de suivre l'effet des nématodes sur les œufs isolés de criquet migrateur. Ainsi la fixation est observée au bout de 10 jours (période d'infection des œufs par les nématodes).

Les œufs d'insectes de chaque lot (Témoin, œufs traités par CMW et HIW) sont prélevés, fixés par la Navachine (Solution d'acide chromique à 1%, Formaldéhyde, Acide acétique, Eau 30:4:2:64 v/v) rincés et déshydratés avant l'inclusion à la paraffine. Pour l'observation en microscopie photonique, les coupes longitudinales ou transversales de 14 à 20 µm d'épaisseur sont colorées à la solution d'hématoxyline contrastée au picro-indigo-carmin [25] avant d'être montées entre lames et lamelles dans du baume de Canada. L'observation des différentes coupes histologiques a été réalisée sous microscope orthoplan LEITZ.

### 2.3. Analyse statistique

La comparaison de la mortalité des insectes adultes et l'éclosion des œufs du criquet en rapport avec les différentes populations de nématode et le témoin a été effectuée avec l'analyse de la variance puis la comparaison multiple de moyenne par le test de Student et Neuman et Keuls et le test de Dunnett au seuil  $\alpha=0,05$ . Avant analyse, les données brutes des populations ont été testées pour la stabilité de la variance. La transformation de variable utilisée est  $\log_{10}(X+1)$  pour les valeurs et  $\text{Arctang}(X)$  pour les rapports pour stabiliser les variances lorsque le test de Levene n'est pas vérifié.

## 3. Résultats

### 3.1. Effet de l'infestation du sable des pondoirs par les deux populations d'*Heterorhabditis* (CMW et HIW) sur les adultes de *L. migratoria*

Dans les cages équipées en pondoirs infestés par les deux souches de nématodes, une mortalité plus élevée des femelles que dans les cages témoins est décelée. Un grand

nombre de ces femelles sont brunes foncées et montrent un ovipositeur qui reste ouvert après la mort contrairement aux autres et à celles qui récupérées mortes des cages témoins montrent un ovipositeur normal et une coloration brune claire (fig. 1). Les nématodes émergent de l'ovipositeur lorsque les cadavres sont placés dans l'eau. La dissection des individus dans de l'eau montre la présence de nématode dans les cadavres des femelles dont l'ovipositeur reste ouvert. Par contre, les autres cadavres et ceux des témoins en sont dépourvus.

La viabilité des femelles du criquet pondant dans les pondoires infestés par les nématodes est fortement affectée. La mortalité naturelle des femelles ne dépasse pas les 5% lorsqu'un remplacement des individus morts a été effectué afin de maintenir la densité de la population, de la ponte et du sex-ratio identique entre les différents traitements. La mortalité de femelles associées aux bacs de sable témoin est similaire à la mortalité naturelle observée dans les bacs infestés par les nématodes entomopathogènes. L'effet sur la mortalité des femelles des deux populations de nématodes HIW et CMW est plus important que la mortalité naturelle de ces dernières. La comparaison de mortalité de femelles montre que la population CMW est plus virulente que la population HIW. En effet, la mortalité durant tout l'essai est beaucoup plus importante pour la population CMW que pour celle de HIW. Lorsqu'on effectue le remplacement des individus morts, la mortalité liée à la population de CMW est double à celle de HIW (fig. 2) ; lorsqu'aucun remplacement n'est effectué, cette mortalité dépasse 90% durant la fin de l'essai alors que ce pourcentage est moins important et ne dépasse pas 70% pour la souche HIW (fig. 2).

L'infestation du sable avec les populations d'*Heterorhabditis sp.*, CMW et HIW, provoque une mortalité très élevée des femelles qui atteint 100% vers la fin de l'essai, alors que les populations d'insectes témoins montrent des taux de mortalité qui ne dépassent pas 25% même à la fin de l'essai. Au début de l'essai, lorsqu'un remplacement des individus morts est effectué, aucune différence significative (selon le test de Dunnett à la probabilité égale 0,05) n'a été observée entre les proportions de femelles mortes pour la population HIW et le témoin. La mortalité des populations de criquet dont l'oviposition a été effectuée dans les bacs infestés par CMW est en moyenne le double que celle observée sur HIW. La mortalité de 100 % est obtenue 5 jours et 10 après l'arrêt du remplacement des individus mort pour CMW et HIW respectivement (fig. 3).

Chez les mâles, la mortalité est naturelle aussi bien dans les cages témoins que dans les cages à pondoires infestés par les deux populations de nématodes. En effet, l'examen des cadavres ne montre aucune infestation. Le taux de mortalité des adultes mâles avec remplacement des adultes morts est significativement similaire selon le test de Student Newman et Keuls à la probabilité 0,05 et ne dépasse pas 15% dans toutes les cages. A la fin de l'essai (sans remplacement des adultes morts) le taux de mortalité se rapproche de 50% dans tous les cas. Il n'y a pas de

différence significative selon le test de Dunnett à la probabilité 0,05 entre les différents taux de mortalité des différents traitements par les nématodes et le témoin. Les nématodes n'affectent pas la viabilité des mâles (fig. 4).

Nous pouvons conclure d'après la comparaison entre les taux de mortalité des adultes mâles et femelles que les nématodes s'attaquent essentiellement aux femelles au moment où ces dernières enfoncent leur abdomen dans le sable infecté par les nématodes pour y pondre.

### 3.2. Effet de l'infestation du sable des pondoires par les deux populations d'*Heterorhabditis* (CMW et HIW) sur l'éclosion des œufs de *L. migratoria*

L'objectif de cette expérience est de suivre les effets des deux souches de nématodes sur l'éclosion de *L. migratoria migratoria*. Le nombre moyen de larves néonates est largement plus élevé pour le témoin que les traitements réalisés avec les deux nématodes. Le nombre moyen de 110 larves/femelle pour le lot témoin contre 5 et 2 larves respectivement pour HIW et CMW (fig.5). Les nématodes entomopathogènes affectent significativement la viabilité des embryons qui se répercute sur les nombres de larves néonates. La dose de nématodes utilisée de 20000 nématodes/pondoire est largement suffisante pour obtenir une diminution de la fécondité par rapport au témoin entre 95,5% et 98% respectivement pour les deux souches HIW et CMW. Il est également à noter que ce pourcentage est plus important pour les œufs infestés par la souche CMW que pour la souche HIW (fig. 5).

Le suivi de l'émergence quotidienne des larves néonates montre clairement deux vagues d'éclosion, une première importante entre 16 et 21 jours et une deuxième ponte moins importante entre 21 et 31 jours. Les nématodes entomopathogènes CMW et HIW diminuent fortement ces deux vagues d'éclosions soit une diminution de 86% par rapport au témoin (fig. 6).

L'infection du sable des pondoires par les deux populations d'*Heterorhabditis* (CMW et HIW) agit également sur la mortalité des larves néonates du criquet migrateur (fig. 7). Deux vagues de mortalité sont observées chez le lot témoin, une première vague qui s'achève au dixième jour de l'éclosion et une deuxième qui prend la relève en rapport avec les deux vagues d'éclosion (Figure 7). Chez les témoins, le taux de mortalité des larves de criquet ne dépasse pas 30% au bout de 7 jours après l'éclosion pour le premier cycle de ponte et 38% pour le deuxième cycle de ponte. Les nématodes affectent la viabilité des larves d'insectes, le taux de mortalité atteint 100% après 7 jours de l'éclosion pour le premier cycle de ponte et après 13 jours pour le deuxième cycle de ponte pour les larves issues des pondoires infestés par la souche CMW. Ce taux de mortalité est atteint après 2 et 3 jours pour les traitements par HIW (fig. 7).

Ces résultats montrent que les deux populations de nématodes (HIW et CMW) affectent les différents stades

de développement de l'insecte en commençant par l'infection létale des femelles lors de l'oviposition, puis la mortalité embryonnaire dans les oothèques et larvaire.

### 3.3. Cycle biologique des *Heterorhabditis* sur les œufs du criquet

L'infestation débute après trois jours d'incubation et la dégradation de l'embryon s'observe après 5 jours. Après 7 jours, 70 % des œufs d'insecte sont infectés par les nématodes (fig. 8). L'éclatement des œufs d'insecte commence dès le 7<sup>ème</sup> jour d'inoculation pour HIW et du 8<sup>ème</sup> jour pour HLAB et CMW.

La pénétration des larves J3 à l'intérieur des œufs d'insecte est maximale pour les trois populations de nématodes au quatrième jour d'inoculation. Les larves L4 paraissent un jour après soit à 5 jours d'incubation avec un nombre plus important chez les populations CMW et HIW que chez HLAB. Les hermaphrodites paraissent au cinquième jour par contre la première génération d'adultes gonochoriques apparaissent après une semaine (fig. 9). Les femelles sont ovipares et aucune *endotokia matricida* n'a été observée.

### 3.4. Histologie de la pathogénie des deux souches d'*Heterorhabditis* (CMW et HIW) sur les œufs isolés

Cette étude a pour but d'élucider la relation entre les œufs de criquet et les populations de nématodes entomopathogènes. A la loupe, après 10 jours d'incubation l'œuf d'insecte se déchire (fig. 10 A) dans une zone dense en bactéries mutualistes des EPN. Autour de l'œuf, les nématodes sont très actifs et se multiplient intensément avec une abondance d'œufs de nématode autour de la coque de l'œuf d'insecte (fig. 10 A). L'observation des coupes histologiques des œufs infestés par les nématodes *Heterorhabditis* (CMW et HIW) sous microscope optique a montré que le nématode se multiplie dans l'interface située entre le chorion et la cuticule de l'œuf (fig. 10 B), les œufs pondus par les femelles du nématode reste à l'extérieur et entourent l'œuf du criquet (fig. 10 C et E). Les nématodes maintiennent une relation avec l'œuf d'insecte seulement de trophisme. En effet, les nématodes traversent la région du chorion et s'attaquent à la couche superficielle du vitellus des œufs d'insectes (fig. 10 E). La bactérie mutualiste paraît rester à l'extérieur de l'œuf d'insecte (fig. 10 D).

L'absence d'individu de nématodes à l'intérieur de l'œuf pourrait être expliquée par la forte pression osmotique existant au niveau des plaques vitellines qui risque de faire éclater les nématodes.

## 4. Discussion

*Heterorhabditis* et leur bactéries mutualistes sont des pathogènes létaux des insectes. Jusqu'à nos jours, toutes les études de pathogénie de ces nématodes ont été effectuées sur les larves ou chenilles, rarement sur les nymphes et les adultes d'insectes et jamais sur les œufs. La modélisation du cycle biologique de ces nématodes a été effectuée sur les chenilles de *Galleria mellonella*. *Heterorhabditis indicus* peut s'attaquer aux Lépidoptères, Coléoptères et Thysanoptères. *H. argentinensis* peut s'attaquer aux Coléoptères. A l'inverse, très peu d'études ont été réalisées sur l'action des nématodes entomopathogènes vis-à-vis des Orthoptères. Seule l'action de *Steinernema scapterisci* (Nematoda: Steinernematidae) sur la Courtilière ou " taupe-grillon ", *Scapteriscus* sp. [26] et *Steinernema carpocapsae*, *S. feltiae*, *Heterorhabditis indica* et *H. bacteriophora* sur les nymphes de *Schistocerca gregaria* [27] et sur le grillon, *Gryllus bimaculatus* [28] ont été étudiées. Cette étude montre pour la première fois que les EPN peuvent être pathogènes sur les œufs des criquets.

L'ensemble des processus qui préparent et conduisent au dépôt des œufs dans le sol constitue la ponte ou l'oviposition. Elle se déroule en quatre étapes : la recherche d'un site de ponte, le forage du trou de ponte, le dépôt des œufs et la matière spumeuse (oothèque) et le damage et le balayage du sol [29]. La recherche et le choix du site de ponte constituent un préalable au cours duquel la reproduction assure des meilleures conditions de conservation des œufs et de développement des embryons [30]. Une fois l'endroit propice trouvé, la femelle enfonce son oviscapte dans le sol et fait un trou en allongeant son abdomen. Les ovocytes arrivés à maturation dans les ovarioles passent très peu de temps dans les oviductes. C'est au cours de leur émission hors des tractus génitaux qu'ils sont fécondés pour devenir des œufs qui seront immédiatement déposés dans le trou de ponte selon un arrangement particulier grâce à une pièce sclérifiée : le guide de l'œuf [31]. Les œufs sont groupés dans le sol sous la forme d'une oothèque [32]. C'est au cours de l'oviposition que les femelles s'infectent par les nématodes EPN et leurs bactéries mutualistes, ce qui cause une létalité élevée des femelles et celles-ci meurent avec l'ovipositeur ouvert.

L'embryogenèse se réalise aux dépens des réserves vitellines accumulées pendant la vitellogenèse qui renferment tous les éléments nutritifs indispensables à l'embryon. L'embryogenèse nécessite également des échanges respiratoires et l'absorption de l'eau [33]. Les nématodes entomopathogènes avec leurs bactéries associés dégradent le vitellus, ce qui a pour conséquence d'arrêter l'embryogenèse et la mort de l'embryon. Ceci pourrait expliquer la faible fécondité des femelles après éclosion.

L'éclosion se produit en fin de développement. La larve se dégage par secousses. À ce moment, elle est encore enveloppée d'une cuticule avec de fines ornements en

écailles qui facilitent la reptation jusqu'à la surface du sol. La larve se débarrasse rapidement de cette peau au cours d'une mue intermédiaire, libérant ainsi ses appendices [29 et 34]. Au cours de cette migration, les larves s'infectent par les nématodes EPN et leurs bactéries pathogènes, ce qui explique leur forte mortalité.

La pathogénie des EPN sur les œufs de criquet paraît différente de celle sur les fausses teignes, *Galleria mellonella*. D'après Forst et Neelson [20], le nématode permet d'introduire la bactérie mutualiste, pour la protéger du système de défense des larves d'insectes ou de la chenille de *G. mellonella*. Dans ce cas, le rôle est inverse, la bactérie permet de dégrader les téguments de l'œuf pour que le nématode pénètre à l'intérieur et se nourrit du vitellus de l'œuf. D'après Burnell et Stocks [35], le passage de la larve L3 quiescente ou DJ (*dauer juvenile*) à la forme adulte (hermaphrodite) dure 3 jours sur *G. mellonella*, cette durée est de 5 jours sur les œufs de criquet.

La constitution biochimique de l'œuf semble être un milieu propice pour le développement des larves L3 ou IJ (*infective juvenile*). En effet, l'œuf de criquet est centrolécithe, c'est à dire riche en vitellus. Il présente une forte teneur en lécithine, qui est un lipide de la classe des phosphoacylglycérols. Généralement, cette substance est utilisée comme un émulsifiant nutritif pour l'élevage en masse des Nématodes entomopathogènes [30]. De plus, quelques études antérieures menées pour élucider la nature de l'activité enzymatique de *Xenorhabdus* et *Photorhabdus*, peuvent soutenir ces résultats. Elles ont mis en évidence la production de lécithinases par les colonies cultivées sur gélose complétée avec du jaune d'œuf (30% de lécithine). Les lécithinases, d'après ces chercheurs, assurent la sécrétion du phosphate au profit des bactéries, et jouent un rôle important dans le pouvoir pathogène contre les insectes [37 et 38].

Les deux populations d'*Heterorhabditis* ont été identifiées sur les œufs isolés de *L. migratoria*, HIW comme *H. indica* et CMW comme *H. argentinensis*. La population obtenue à partir d'œufs isolés d'oothèques de *Schistocerca gregaria*, HLAB, est identifiée comme *H. bacteriophora*. L'action oophage des trois espèces est similaire. L'espèce *H. bacteriophora* est cosmopolite [35]. L'espèce *H. argentinensis* a été identifiée par Stocks [23] en Argentine, ce taxon paraît conspécifique à *H. bacteriophora* [39]. Alors que *H. indica* a été isolée par plusieurs auteurs dans les pays subtropicaux et tropicaux [40] et paraît plus thermotolérante [41] que les autres espèces étudiées et serait une meilleure candidate pour son utilisation comme agent de lutte biologique contre les locustes.

Ces nématodes entomopathogènes et leurs bactéries associées s'attaquant aux œufs de criquets paraissent une voie d'avenir pour la lutte contre le criquet migrateur, *Locusta migratoria*, et le criquet pèlerin, *Schistocerca gregaria*, en les utilisant comme moyen de lutte dans les sites de ponte au niveau des aires de reproduction de ces

insectes. En effet, plusieurs chercheurs ont montré que les femelles pondent toujours aux mêmes endroits [42, 43]. Pendant les invasions des criquets, le fléau est énorme et les dégâts causés sont considérables. La lutte chimique devient donc une nécessité impérieuse. Pour sauvegarder l'environnement de l'utilisation d'importantes quantités d'insecticides dans la lutte anti-acridienne, de nouvelles stratégies de lutte préventive sont proposées dans les aires grégariques et plus précisément dans les foyers grégariques où les sites de ponte sont très limités avec une condensation de la population larvaire grégariante et des femelles mûres [44]. Parmi ces méthodes, on note celles qui utilisent les parasites et les parasitoïdes qui peuvent être des insectes, acariens et nématodes. Parmi les parasitoïdes oophages, les hyménoptères scélionides sont les seuls connus comme parasitoïdes vrais d'embryons de locustes [29]. Dans le présent travail, lorsque nous avons étudié l'efficacité de ces deux souches de nématodes sur les oothèques du criquet migrateur après avoir infesté le sable des pondoirs par 10 ml d'une solution à la dose de 2000 Né/ml, nous avons enregistré une diminution de la ponte d'environ 95% pour HIW et 98% pour CMW par rapport au témoin non traité. Si nous comparons ces résultats à ceux signalés au Mali, dans le Delta central du Niger, par Popov et collaborateurs [29] qui ont relevé sur 553 pontes du criquet migrateur une mortalité d'environ 13% par le seul fait des attaques par les scélionides, nous pouvons dire que l'action des nématodes (CMW et HIW) sur la ponte de ce criquet est de loin plus efficace. En plus de la virulence de ces nématodes vis-à-vis des oothèques du criquet migrateur, au moment de l'acte de ponte, 70 à 90% des femelles de ce locuste sont respectivement affectées par les deux souches de nématodes (HIW et CMW) présentes dans le sable des pondoirs infestés à la dose de 2000 Né/ml et finissent par mourir. De même, au moment de l'éclosion des rares œufs (5 à 2%) qui ont échappé aux attaques des nématodes présents dans le sable des pondoirs infestés, les larves néonates sont affectées par les deux souches de nématodes et succombent au bout de 9 à 16 jours pour HIW et 7 à 13 pour CMW, selon le cycle de ponte (premier ou second). Les adultes et les larves des acridiens affrontent plusieurs prédateurs et de parasitoïdes qui peuvent être des insectes [4]. Comme ils peuvent être attaqués par des champignons des genres *Metarhizium* et *Beauveria* [45]. *Metarhizium* fut le seul champignon commercialisé et appliqué contre les larves et les adultes des criquets mais son utilisation est restée limitée en rapport avec sa mauvaise adaptation aux conditions naturelles du Sahara et les difficultés de localisation des pullulations larvaires et des ailés [46]. Cependant, la virulence des deux souches des nématodes, CMW et HIW que nous venons de mettre en évidence contre les œufs, les larves et les adultes femelles de *L. migratoria* pourrait ouvrir de nouveaux horizons dans la lutte préventive anti-acridienne sachant que les sites de pontes, relativement faciles à être repérés dans les foyers grégariques, regroupent à la fois les

femelles mûres en quête de pondre, les oothèques et les larves néonates.

## 5. Références

- [1] Launois-luong M. H., Launois M. et Rachidi T., 1988. La lutte chimique contre le criquet du sahel. Collection Acridologie Opérationnelle n°3, CIRAD/PRIFAS, Montpellier, 43 p.
- [2] Allal-Benfekih L., 2006. Recherches quantitatives sur le criquet migrateur *Locusta migratoria* (Orth. Oedipodinae) dans le Sahara algérien. Perspectives de lutte biologique à l'aide de microorganismes pathogènes et de peptides synthétiques. Thèse pour obtenir le grade de Docteur de l'université de Limoges. Discipline / Spécialité : Biologie-Sciences-Santé/ Ecologie. Faculté de Sciences et Techniques Laboratoire UMR INRA 1061. Institut National Agronomique d'El Harrach. 140 p.
- [3] Dhoubi M.H., 1991. L'invasion acridienne en Tunisie et les moyens mis en oeuvre pour la combattre. La lutte anti-acridienne. Ed. Aupelf-UREF, John Libbey Eurotext, Paris, 53-69.
- [4] Greathead D.J., Kooyman C., Launois-Luong M.H. et Popov G.B., 1994. Les ennemis naturels des criquets du Sahel. Collection Acridologie Opérationnelle n°8. Département de Formation en Protection des Végétaux (DFPV). 85p.
- [5] Doumandji S. et Doumandji-Mitiche B., 1994.- Criquets et sauterelles (acridologie). Ed. Off. Pub. Univ., Alger, 99 p.
- [6] Chopard L., 1938. La biologie des Orthoptères. Encyclopédie entomologique, Ed. Paul Lechevalier, Paris, 511 p.
- [7] Launois-luong M. H. et Popov G. B., 1992. *Schistocerca gregaria* (Forskål, 1775) (Acrididea- Cyrtacanthacridinae). Ed. CIRAD- PRIFAS, ISBN, Paris, 45 p.
- [8] Uvarov, B. P., 1966. Grasshoppers and locusts: a handbook of general acridology Vol. 1. Anatomy, Physiology, Development, Phase Polymorphism, Introduction to Taxonomy Cambridge Univ. Press, Cambridge, 481p.
- [9] Uvarov, B. P., 1977. Grasshoppers and locusts: a handbook of general acridology Vol. 2. Behaviour, ecology, biogeography, population dynamics. Centre of Overseas Pest Research , London, 613p.
- [10] Song L., M. Gao, S. Dai, Y. Wu, D. Yi, R. Li, 2008. Specific activity of a *Bacillus thuringiensis* strain against *Locusta migratoria manilensis*. *Journal of Invertebrate Pathology* 98(2): 169-176.
- [11] Benfekih, L., Petit, D. et Doumandji-Mitiche, B. 2007. Vers une nouvelle approche d'utilisation des bactéries en lutte anti-acridienne : Premiers résultats sur l'effet de *Bacillus subtilis* sur *Locusta migratoria*. 17ème Conférence de l'Association Africaine des Entomologistes, 11-15 juin 2007, Université Cheikh Anta Diop de Dakar, Dakar-Fann, Sénégal.
- [12] Ghania T., A. Benrima et B. Doumandji Mitche, 2000. *Pseudomonas fluorescens* histological effects on the structure of locust pilgrim alimentary canal *Schistocerca gregaria*. Seventh Arab Congress of Plant Protection, 22-26 october 2000, Amman, Jordan.
- [13] Brookman J. L., A. F. Rowley et N. A. Ratcliffe, 1989. Studies on nodule formation in Locusts following Injection of Microbial Products. *Journal of Invertebrate Pathology* 53: 315-323.
- [14] Moore D, Reed M, Le Patourel G, Abraham Y. J. & Prior C. (1992) Reduction of feeding by the Desert Locust, *Schistocerca gregaria*, after infection with *Metarhizium flavoviride*. *Journal of Invertebrate Pathology* 60: 304-307.
- [15] Prior C. , M. Carey, Y. J. Abraham, D. Moore et R. P. Bateman, 1995. Development of a bioassay method for the selection of entomopathogenic fungi virulent to the desert locust, *Schistocerca gregaria* (Forskål). *Journal of Applied Entomology* 119: 567-573.
- [16] Toure M. et M. Ndiaye , 1997. Mécanisme d'infection et effet de la colonisation des œufs de Criquet sénégalais : *Oedaleus senegalensis* (Krauss, 1877) par un champignon hyphomycète : *Metarhizium* sp. in : New strategies in locust control (eds S. Krall, R. Peveling, D. Ba Diallo) Washington, USA, 113-136.
- [17] Van Sambeek J. et Wiesner A., 1999. Successful parasitisation of locusts by entomopathogenic nematodes is correlated with inhibition of insect phagocytes. *Journal of Invertebrate Pathology*, 73(2): 154-161.
- [18] Latchininsky A.V. et Launois-Luong M.H. 1992. Le criquet marocain, *Doclostaurus maroccanus* (Thunb, 1815) dans la partie orientale de son aire de distribution. Etude monographique relative à l'Ex. URSS et aux pays proches. CIRAD-GERDAT-PRIFAS : Montpellier/VIZR St-Petersbourg-XIX, 270 p
- [19] Baker G. L. et Capinera J. L., 1997. Nematodes and nematomorphs as control agents of grasshoppers and locusts. *Memoirs of the Entomological Society of Canada* 171: 157-211.
- [20] Forst S. et Neelson K., 1996. Molecular Biology of the Symbiotic-Pathogenic Bacteria *Xenorhabdus* spp. And *Photorhabdus* spp. *Microbiological Reviews*, 60(1): 21-43.
- [21] Chapuis M. P., 2006. Génétique des populations d'un insecte pullulant, le criquet migrateur, *Locusta migratoria*. Thèse de doctorat, Discipline : Biologie des populations et écologie ENSA Montpellier, France 72 p.
- [22] Poinar G. O. Jr., Karunakar G. K. et David H., 1992. *Heterorhabditis indicus* n. sp. (Rhabditida: Nematoda) from India: separation of *Heterorhabditis* spp. by infective juveniles. *Fundamental and Applied Nematology* 15(5): 467-472.
- [23] Stock S.P. 1993. A new species of the genus *Heterorhabditis* Poinar, 1976 (Nematoda: Heterorhabditidae) parasitizing *Graphognathus* sp. Larvae (Coleoptera: Curculionidae) from Argentina. *Research and Reviews in Parasitology*, 53 (3-4): 103-107.
- [24] Poinar, G.O.J. (1975). Description and biology of a new insect parasitic rhabditoid *Heterorhabditis bacteriophora* new genus new species Rhabditida Heterorhabditidae new family. *Nematologica* 21: 463-470.
- [25] B'Chir, M. M. 1979. Contribution à l'étude morphologique, anatomique, bioécologique de quelques espèces du genre *Aphelenchoidea* (Nematoda : Aphelenchoidea). Thèse Doctorat d'état. Uni. Tech. Languedoc, Montpellier 206 pp.
- [26] Nguyen K. B. et Smart G. C., JR, 1990. *Steinernema scapterisci* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae). *Journal of Neatology* 22(2): 187-199.
- [27] Mahar, A. N., Jan, N. D., Gowen, S. R., Hague, N. G. M., Al-Siyabi, A. A. et Mahar, A. Q., 2006. A comparative study on the effectiveness of laboratory bioassays of entomopathogenic nematodes against desert locust nymphs *Schistocerca gregaria* (Acrididae: Orthoptera). *Pakistan Journal of Nematology* 24: 151-161.
- [28] Mahar A. N., Jan N. D., Mahar A. Q. et Gowen S. R., 2012. Biocontrol of black cricket, *Gryllus bimaculatus* (Orthoptera: Gryllidae) nymphs with entomopathogenic nematodes. *Pakistan Journal of Nematology* 30 (1): 27-40.
- [29] Popov G.B., M.H. Launois-Luong et J. Van Der Well, 1990. Les oothèques des criquets du Sahel. Collection Acridologie Opérationnelle n/7.
- [30] Remaudière G., 1954. Étude écologique de *Locusta migratoria migratorioides* Rch. et Frm. (Orth. Acrididae) dans la zone d'inondation du Niger en 1950, 248 p., 64 fig., 48 photos.
- [31] Launois M. 1972. Contribution à l'étude du fonctionnement ovarien du Criquet Migrateur, *Locusta migratoria capita* Saussure dans la nature. *Annales de Zoologie et Ecologie Animale* 72(5): 55-116.
- [32] Abdellaoui K., 2009. Contribution à l'étude des effets de l'acide gibbérique, hormone végétale de croissance, sur la physiologie du développement et de la reproduction du criquet migrateur asiatique *Locusta migratoria migratoria* Linné, 1758 (Orthoptera, Acrididae). Thèse de Doctorat en Sciences Agronomiques, spécialité : Protection des Plantes et Environnement. Université de Sousse. 270 p.
- [33] Raccaud-Schoeller J., 1980. Les Insectes, Physiologie, Développement. Paris, France : Masson. 288 p.
- [34] Benkenana N., 2006. Etude biosystématique et quelques aspects bio-écologiques des espèces acridiennes d'importance

- économique de la région de Constantine (Dissertation). Université Mentouri, ConstantineAlgérie .169 p.
- [35] Burnell, A. M. et Stock S. P., 2000. *Heterorhabditis*, *Steinernema* and their bacterial symbionts — lethal pathogens of insects. *Nematology* 2: 31-42.
- [36] Friedman, M. J., Langston S. E. et Pollitt S., 1989. Mass production in liquid culture of insect-killing nematodes. International Patent Application, WO 89/04602.
- [37] Gaugler R. (2002). Entomopathogenic nematology. CAB International, Wallingford, UK 388 p.
- [38] Thaler J.O., Duvic B., Givaudan A., et Boemare N., 1998. Isolation and Entomotoxic properties of the *Xenorhabdus nematophilus* F1 Lecithinase. *Applied and Environmental Microbiology* 64(7): 2367–2373.
- [39] Adams, B.J., Burnell, A.M. & Powers, T.O. (1998). A phylogenetic analysis of the genus *Heterorhabditis* (Nemata: Rhabditidae) based on internal transcribed spacer 1 DNA sequence data. *Journal of Nematology* 30: 22-39.
- [40] Stack C.M., Easwaramoorthy S.G., Metha U. K., Downes M. J. , Griffin C.T. et A. M. Burnell, 2000, Molecular characterisation of *Heterorhabditis indica* isolates from India, Kenya, Indonesia and Cuba. *Nematology*, 2(5): 477-487.
- [41] Ehlers R.U., I. Niemann, S. Hollmer, O. Strauch, D. Jende, M. Shanmugasundaram, U.K. Mehta, S.K. Easwaramoorthy and A. Burnell (2000). Mass production potential of the bacteriohelminthic biocontrol complex *Heterorhabditis indica* - *Photorhabdus luminescens*. *Biocontrol Science and Technology* 10: 607-616
- [42] Pener M.P. et Yerushalmi Y., 1998. The physiology of locust phase polymorphism: an update. *Journal of Insect Physiology* 44: 365-377.
- [43] Rai M.M., Hassanali A., Saini R.K., Odongo H. et Kahoro H., 1997. Identification of components of the oviposition aggregation pheromone of the gregarious desert locust, *Schistocerca gregaria* (Forsk.). *Journal Insect Physiology* 43(1): 83-87.
- [44] Lecoq M., 2004. Vers une solution durable au problème du criquet pèlerin. *Sécheresse* 15(3): 1-8.
- [45] Halouane F., Benzara A., Doumandji-Mitiche B. and Bouhacein M., 2001. Effet de deux entomopathogènes, *Beauveria bassiana* et *Metarhizium flavoviride* (Hyphomycètes, Deuteromycotina) sur l'hémogramme des larves de 5ème stade et des adultes de *Locusta migratoria migratorioides* (Orthoptera: Acrididae). *Journal of Orthoptera Research* 10(2): 331-334.
- [46] PAN (Pesticide Action Network), Africa, 2007. Le *Metarhizium*, method biologique de lute contre les criquets. <http://www.pan-afrique.org>.