

Action des Nématodes Entomopathogènes du genre *Heterorhabditis* sur les oeufs de criquet, *Locusta migratoria* (L.) (Orthoptera : acrididae)

M. AMMAR¹, S. KALLEL²

¹Unité de Protection intégrée des cultures-Institut National Agronomique de Tunisie, 43 Avenue Charles Nicolle, 1082 Tunis-Mahrajène, Tunisie

kallel@mailcity.com

Soumis le 01 / 09 / 2014

Accepté le 02 / 01 / 2016

RESUME

Les nématodes entomopathogènes (EPN) ont été décelés pour la première fois sur les œufs de criquets. Quelques populations d'*Heterorhabditis* isolées sur les œufs de *Schistocera gregaria* Forsskål, de *Locusta migratoria* L. (Orthoptera : Acrididae) et sur les chenilles de *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera : Pyralidae) ont été isolées. La pathogénie des populations du nématode isolées sur les œufs est plus importante que celle sur les chenilles. A l'inverse la pathogénie des EPN isolée sur les chenilles est plus importante sur les chenilles de l'insecte modèle. Les potentialités biochimiques des nématodes entomopathogènes et de leurs bactéries symbiontes en rapport avec l'activité protéolytique et chitinase ont été étudiées. Les bactéries mutualistes des nématodes isolées sur les œufs de criquet montrent une importante activité protéolytique.

Mots Clés : *Heterorhabditis*, nématode entomopathogène, œuf, criquet, *Locusta migratoria*

ABSTRACT

EFFECT OF ENTOMOPATHOGENIC NEMATODE, HETERORHABDITIS ON EGGS, LOCUSTA MIGRATORIA (L.)

Effect of entomopathogenic nematode, *Heterorhabditis* on eggs locust, *Locusta migratoria* (L.) First report of entomopathogenic nematodes have been detected in locusts eggs. Some *Heterorhabditis* populations isolated on eggs of *Schistocera gregaria* Forsskål, of *Locusta migratoria* L. (Orthoptera : Acrididae) and caterpillars of *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera : Pyralidae) were isolated. Nematode populations isolated from insect eggs are more aggressive on locust eggs than those obtained by greater wax moth traps. Pathogenesis on nematodes isolated on caterpillar larvae bait, is greater on *Galleria mellonella*, insect model of EPN, than those bait by locust eggs. Biochemical potential of EPN and their symbiotic bacteria is related on proteolytic and kinetics activity. Mutualistic bacteria of nematode isolated on locust eggs show a significant proteolytic activity.

Keywords : *Heterorhabditis*, entomopathogenic nematode, Egg, locust, *Locusta migratoria*

INTRODUCTION

La recherche sur les nématodes entomopathogènes (EPN) est largement focalisée sur deux familles de nématodes de rhabditides : Les Steinernematidae Chitwood et Chitwood, 1937 et les Heterorhabditidae Poinar, 1976. Ces nématodes se conservent dans le sol et sont des candidats intéressants pour la lutte biologique contre plusieurs insectes d'importance économique telle que les Lépidoptères, Diptères et Coléoptères. Les EPN sont les seuls rhabditides qui interagissent avec des espèces de bactéries mutualistes. Ces entérobactéries tuent les insectes et dégradent leur tissu. Les EPN sont strictement isolés sur les larves d'insectes et leur cycle biologique est modélisé sur les chenilles de *Galleria mellonella* (Burnell et Stock, 2000). Plusieurs auteurs (Miduturi *et al.*, 1996 ; Lortkipanidze *et al.*, 2010) ont utilisé les chenilles de cet insecte comme un moyen de piégeage de ces nématodes du sol (insect trap). Le cycle biologique des EPN débute par des larves de troisième stade quiescentes *dauer juvenile* ou DJ qui se trouvent dans le sol en quête de larves d'insecte. Les DJ de Steinernematidae pénètrent par les ouvertures naturelles des larves d'insectes par contre les DJ des Heterorhabditidae arrivent à déchirer la membrane intersegmentaire de l'insecte grâce à sa dent dorsale. Une fois à l'intérieur de l'insecte, la larve L3 du nématode ensemence ses tissus par les bactéries mutualistes ce qui provoque une septicémie de l'insecte et une toxémie fatale (Burnell et Stock, 2000). Les Steinernematidae et les Heterorhabditidae véhiculent deux genres d'entérobactéries différentes *Xenorhabdus* et *Photorhabdus* respectivement (Forst et Neelson, 1996).

Ce travail vise à élucider pour la première fois l'interaction entre les nématodes entomopathogènes (EPN) et les œufs de criquets. Cette étude a également tenté de déterminer la pathogénie des nématodes entomopathogènes du genre *Heterorhabditis* sur les œufs du criquet migrateur, *Locusta migratoria*, en comparaison avec celle sur l'insecte modèle des EPN, *Galleria mellonella*. Les mécanismes biochimiques interférant dans la pathogénie de ces nématodes sur les œufs d'insecte sont mis en évidence.

MATERIEL ET METHODES

MATERIEL BIOLOGIQUE

Les EPN du genre *Heterorhabditis* sont obtenus à partir de sols prélevés dans la région de Chott Mariem (Sousse : Tunisie) et ayant servi comme substrat pour les pontes de locustes de l'élevage de l'Institut Supérieur Agronomique de Chott Mariem (ISACM). Une première population HLAB (*Heterorhabditis* du laboratoire) isolée en 2008 des oothèques de *Schistocerca gregaria* est maintenue dans les conditions du laboratoire de nématologie de l'Institut National Agronomique de Tunisie (INAT) sur les œufs de criquet. Les deux sols obtenus ultérieurement de Chott Mariem (HI et CM) sont déposés séparément dans des récipients en plastique avec un couvercle de 12 cm de hauteur et présentant une base circulaire de 11cm de diamètre. Les sols sont par la suite humidifiés et déposés sur un papier filtre de 13 cm de diamètre préalablement humidifié et recevant soit des œufs de criquets soit des chenilles de *Galleria mellonella*. Ces dernières sont maintenues à proximité du substrat en les emprisonnant grâce à des anneaux de 6 cm de diamètre et de 1 cm de hauteur recouvert en haut par une moustiquaire à 1 mm de maille. Les EPN piégés par les œufs de criquets et par les cadavres de chenilles de *G. mellonella* sont maintenus en élevage. Ainsi, deux populations d'EPN sont obtenues à partir de cadavres de chenilles de *G. mellonella* (CMG et HIG) et trois populations de nématodes sont isolées des œufs de *Locusta migratoria* (HLAB, CMW et HIW). 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, ensuite dans une solution de 1 pour mille de chlorure mercurique pendant 30 minutes puis trois passages dans l'eau stérile. Les nématodes piégés par les œufs ou les chenilles d'insectes sont repiqués et maintenus en élevage sur le même hôte en boîte de Pétri de 90 mm de diamètre tapissées de papier-filtre humidifié de 85 mm de diamètre et après une désinfection identique à celle utilisée pour les œufs d'insecte.

Les chenilles de *G. mellonella* proviennent d'une infestation spontanée de quelques cadres issus d'une ruche d'abeille et placées à l'obscurité dans une boîte cartonnée au laboratoire.

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/ 24h). 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 choux. 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.

Identification des différentes populations d'*Heterorhabditis*

A partir des cinq populations d'EPN (HLAB, HIW, HIG, CMW et CMG) datées d'un mois environ après inoculation, les individus émergents des cadavres de *G. mellonella* ou des œufs de criquets, ont été d'abord fixés à chaud séparément dans des cupules remplies d'une solution I composée de 10 ml de formol (40 %), 3 ml d'acide propionique et 1ml de glycérine mélangés dans 86 ml d'eau distillée. Ces cupules sont placées pendant 48 heures dans un dessiccateur contenant lui-même la solution I, qui constitue ainsi un milieu de stockage du matériel fixé. Elles sont ensuite placées durant 24 heures dans un dessiccateur contenant de l'alcool, maintenu à une température de 40°C, après quoi le fixateur I est remplacé par une solution II (15 ml de glycérine pour 85 ml d'alcool 96°). Les nématodes seront ainsi prêts pour le montage après l'évaporation totale de l'alcool.

Les nématodes fixés sont montés entre lame et lamelle et observés au microscope OLYMPUS C X 40. Les caractéristiques morphométriques sur une vingtaine de larves juvéniles infestantes IJ sont mesurées sous microscope à l'aide d'une camera OLYMPUS DP25 couplée au logiciels Cell A version 3.2. La longueur (L), la largeur (W), la distance partie antérieure-pore excréteur (EP), la distance partie antérieure-anneau nerveux (NR), la longueur de l'œsophage (ES) et la longueur de la queue (T)

sont mesurées pour chaque spécimen de larve IJ. Les ratios : $a = L/W$, $b = L/ES$, $c = L/T$, $E\% = EP/T * 100$ et $D\% = EP/ES * 100$ sont calculés selon Nguyen et Smart (1996). La clé de détermination des espèces est également celle de Nguyen et Smart (1996).

Effet des différentes souches d'*Heterorhabditis* sur l'éclosion des œufs de criquet.

Vingt œufs de *Locusta migratoria* ont été placés dans des boîtes de Pétri de 90 mm de diamètre tapissées de papier-filtre humidifié de 85 mm de diamètre entre deux couches fines de sable stérilisé. La stérilisation se fait par un autoclavage à 120°C pendant 20 minutes. Une solution de 1ml d'eau distillée contenant la suspension de nématodes désirée, a été appliquée à l'aide d'une pipette. Les suspensions testées (0, 100, 1000, 5000 et 10000 nématodes/ml/boîte) ont été déterminées suite à deux comptages à la loupe binoculaire. Les boîtes de Pétri ont été incubées, par la suite, dans une étuve à une température de 23°C pendant toute l'expérimentation. Le taux d'éclosion des œufs du Criquet migrateur a été évalué tous les 7 jours et sur une période de 35 jours. Chaque essai a été répété 5 fois.

Agressivité des différentes souches d'*Heterorhabditis* sur les œufs de criquet

Le même protocole expérimental a été suivi mais en plaçant les œufs de *Locusta migratoria* sur un milieu Nutrient Agar (Biokar Diagnostics BK185HA-500g). Le milieu de culture est préparé en faisant bouillir 16 g de Nutrient Broth et 12 g d'agar dans un litre d'eau distillée puis il est stérilisé en l'autoclavant à 120°C pendant 20 minutes. Le nombre d'œufs infestés a été évalué à sept jours d'intervalle jusqu'à 35 jours.

Agressivité des différentes souches d'EPN sur *G. mellonella*

Quinze chenilles de fausse teigne, *G. mellonella*, sont déposées dans des boîtes de Pétri de 90 mm, sur un disque de papier humidifié de 85 mm de diamètre. Une suspension de 5000 nématodes/ml est appliquée sur le papier. Le témoin reçoit un millilitre d'eau distillée sur le papier filtre. Chaque traitement est répété cinq fois. Les boîtes de Pétri ont été conservées à une température de 23°C à l'obscurité pendant

toute l'expérimentation. Les chenilles mortes sont dénombrées quotidiennement. Elles sont ensuite prélevées et nettoyées à l'eau distillée, puis incubées pendant un jour à température ambiante dans les boîtes de Pétri. Ensuite, chaque larve est broyée grâce à un broyeur (Cyclotec 1093 Sample Mill) et le nombre de larves de nématodes par chenille est évalué sous loupe binoculaire.

Activité enzymatique des *Heterorhabditis* et de leurs symbiotes

Les enzymes protéolytiques et chitinolytiques jouent un rôle critique dans la virulence du complexe *Heterorhabditis-Photorhabdus luminescens*. La chitinase permet la dégradation chimique des plaques de chitine formant les téguments de l'œuf de l'insecte qui pourrait être produite par la bactérie mutualiste ou par le nématode lui-même. Les protéases pourront servir dans la dissolution du ciment entre les plaques de chitines de l'œuf. Les solutions à étudier sont les homogénats des cinq souches de nématodes entomopathogènes et leurs bactéries associées. Les nématodes sont prélevés dans de l'eau distillée à l'aide d'une pipette Pasteur à partir des boîtes de Pétri et déposés dans des tubes Eppendorf.

Les bactéries mutualistes sont obtenues en ensemencant 10000 nématodes /ml sur un milieu Nutrient Agar (NA) constitué de 12 g d'agar et de 16 g de Nutrient Broth par litre. Après un mois, les bactéries mutualistes sont prélevées sur la surface du milieu Nutrient Agar sans les nématodes associés et déposées dans de l'eau distillée à l'intérieur d'un tube Eppendorf. Ces homogénats ont été congelés puis broyés pour être centrifugés à 3000 tours/minute pendant 15 minutes. Le surnageant de chaque solution est récupéré, puis conservé au congélateur jusqu'à son emploi (Ammar, 1983).

L'activité protéolytique est révélée après l'hydrolyse de la caséine (*Sigma-Casein from bovine milk*, C7078-500G) par la trypsine (*Sigma-Trypsin from bovine pancreas*, 93610-1G). Des volumes de 15 µl de la solution de trypsine (5mg/ml) considérée comme témoin et des différentes solutions étudiées (les cinq souches de *Heterorhabditis* et leurs bactéries symbiotiques) sont déposées sur les plaques de caséine, après un temps d'incubation de 24h à 30°C. Après 48h d'incubation, les plages transparentes sur les plaques après révélation à l'acide trichloracétique à 2 % sont

le résultat de la réaction protéolytique de l'enzyme (trypsine) sur la protéine (caséine). La surface hydrolysée est en rapport avec la quantité d'enzyme utilisée.

Les plaques de caséine sont formées par un mélange de la caséine à 1 % avec de l'agar à 2 % dans l'eau distillée. Ce mélange, volume à volume, porté à 90°C au bain-marie et 25 ml de ce mélange sont coulés dans une boîte de Pétri. Après refroidissement, les plaques de couleur jaunâtre sont essorées par plusieurs rondelles de papier Wattman. La formation de plages translucides, après fixation à l'acide trichloracétique, prouve la lyse de la caséine (Ammar, 1983).

L'activité chitinase a été révélée par des zones de lyse sur des plaques de chitine. La chitine (*Sigma-Chitin azure*, C3020-100MG) est mélangée dans l'eau (1mg/ml) en passant cinq fois par un homogénéisateur manuel (VWR scientifique), comme il a été décrit par la méthode de Roberts et Selitrennikoff (1988). La solution de chitine est diluée avec un volume égal de 1,6 % (p/v) Nutrient Agar. L'agar est ajouté à 2 % (p/v), la solution est stérilisée à l'autoclave, et des volumes de 10 ml d'agar sont versés dans des boîtes de Pétri. Après la solidification de l'agar, des disques de papier blanc de 6 cm de diamètre (0,25 pouces) (baril) sont placés sur l'agar pour sécher la plaque. Un volume de 30 µl des homogénats de nématodes et des bactéries mutualistes préparés précédemment et des échantillons de chitinase (*Sigma-Chitinase for Streptomyces griseus*, C6137) qui ont servi de témoin sont ajoutés ensemble à chaque plaque puis incubée à 35°C pendant 48h. Après une incubation pendant 48h à 35°C, l'action de l'enzyme est observée.

Analyses statistiques

Les données chiffrées sont analysées par le logiciel SPSS® 16.0.

Les caractères morphométriques mesurés sur les populations d'*Heterorhabditis*, HLAB, CMW, CMG, HIW et HIG ont servi pour la comparaison avec ceux des espèces validées par Nguyen et Smart en 1996. La moyenne des différents caractères morphométriques des IJ et des mâles des différentes populations du nématode ainsi que celle des différentes espèces valides d'*Heterorhabditis* sont soumises à la classification hiérarchique ascendante en utilisant la règle d'agrégation « plus proches

voisins» et la mesure des distances selon le carrée de la distance euclidienne. La comparaison des différentes populations sur la base des différents caractères morphométriques mesurés sur les IJ est effectuée grâce à une analyse de la variance (ANOVA) suivie d'une comparaison multiple de moyennes selon le test de Student-Newman et Keuls à la probabilité p-value = 0,05. La comparaison de l'éclosion des œufs et l'agressivité sur les œufs du criquet et sur les chenilles de la fausse teigne des différentes populations de nématode a été effectuée par le test de Student-Newman et Keuls au seuil p-value = 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.

RESULTATS

IDENTIFICATION DES DIFFERENTES SOUCHES DE *HETERORHABDITIS*

La comparaison des différents isolats sur la base des critères morphologiques, mesurés sur les larves IJ (Figure.1), montre que les isolats HLAB s'apparente avec l'espèce *Heterorhabditis bacteriophora* (Poinar), HIW et HIG présentent les caractères de *H. indicus* (Poinar, Karunakar

et David). L'analyse hiérarchique ascendante par utilisation de deux méthodes d'agréations associées à deux mesures des distances n'a pas permis d'identifier les espèces d'*Heterorhabditis* des populations CMW et CMG. Ces isolats apparaissent dans un groupe d'espèces d'*Heterorhabditis* différent de ceux des trois autres isolats. Les isolats prélevés sur le sol CM piégés par des œufs de criquets et des chenilles de *G. mellonella* sont proches et présentent pour les IJ des caractères de *H. marelatus* (Liu and Berry), *H. zealandica* (Poinar) et *H. argentinensis* (Stock).

Les caractères morphométriques de la population HLAB coïncident avec les limites de l'holotype de référence *H. bacteriophora* (Tableau I). La souche HIW coïncide avec les mesures de *H. indicus*. Par contre, la population HIG présente les ratios D % et E % légèrement plus élevé que la limite de HIW et *H. indicus*. La population CMW présente un pore excréteur (EP) significativement plus bas que celui de CMG. La souche CMG a une queue (T) plus effilée que CMW. Les coefficients D % et E % de la population CMW sont significativement plus élevés que celle de CMG. Les caractéristiques morphométriques des IJ de CMW ressemblent à celles de *H. argentinensis* alors que celles des IJ de la population CMG ressemblent aux caractéristiques de *H. zealandica* sauf que cette dernière présente une queue (T) plus courte (Tableau I).

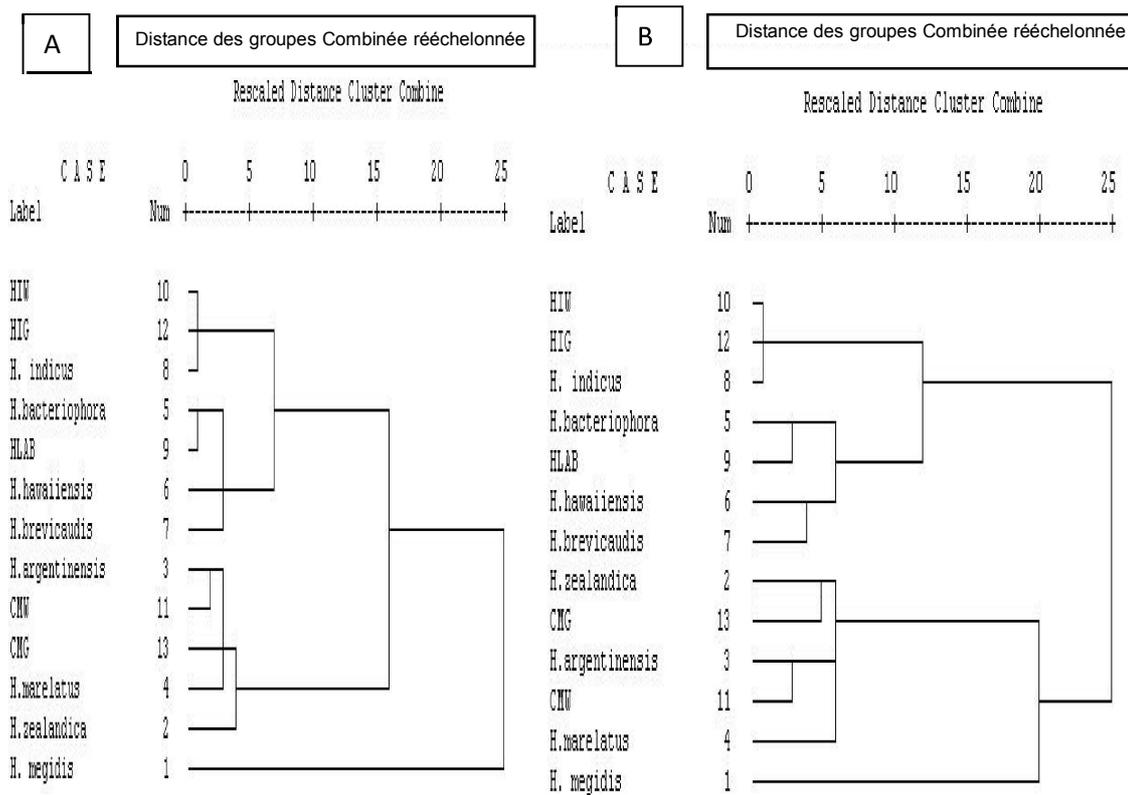


Figure 1 : Dendrogramme des populations et les espèces de *Heterorhabditis* sur la base des caractères validés par la classification hiérarchique ascendante avec deux règles d'agrégations associée à deux mesures des distances. A : Plus proches voisins, le carré de la distance euclidienne, B : entre groupes liés, distance euclidienne. HLAB : population d'*Heterorhabditis* isolée à partir d'œufs prélevés des oothèques de *Schistocerca gregaria*, HIW et CMW : populations d'*Heterorhabditis* sp. isolées de deux sols différents à partir d'œufs prélevés des oothèques de *Locusta migratoria* et HIG et CMG : populations de *Heterorhabditis* sp. isolées de deux sols différents à partir de chenilles de *Galleria mellonella*.

hierarchical Cluster of Heterorhabditis Species based on available characters with two aggregations methods associated with two distance measurements. A : nearest neighbors and square of the Euclidean distance, B : between groups linkage and Euclidean distance. HLAB : Heterorhabditis population isolated from Schistocerca gregaria eggs, HIW and CMW : Heterorhabditis sp. populations isolated from two different soils by Locusta migratoria eggs. HIG and CMG : Heterorhabditis sp. populations isolated from two different soils from Galleria mellonella caterpillars

Tableau I : Critères morphométriques des J de l'espèce *Heterorhabditis* sp
IJ morphometric characteristics of Heterorhabditis sp. *Species.*

SP	L	W	EP	NR	ES	T	a	b	c	D %	E %
<i>H. megidis</i>	768 (736-800)	29 (27-32)	131 (123-142)	109 (104-115)	155 (147-160)	119 (112-128)	26 (23-28)	5 (4,6-5,9)	6,5 (6,1-6,9)	85 (81-91)	110 (103-120)
	685 (570-740)	27 (22-30)	112 (94-123)	100 (90-107)	140 (135-147)	102 (87-119)	25 (24-26)	4,9 (4,2-5)	6,6 (6,2-6,7)	80 (70-84)	108 (103-109)
CMG	685,1c (634-707)	28,5c (25-39)	87a (67-117)	100,7b (82-115)	126a (98-147)	92,35b (72-104)	24,33a (18,1- 28,08)	5,5b (4,53-6,88)	7,51c (6,54- 9,74)	71,16a (50,75- 119,39)	95,95a (65,69- 141,66)
	663,6 c (608-708)	29,25c (22-37)	95,4b (67-121)	97,35b (79-115)	121,05a (97-151)	86,5c (71-103)	23,14a (17,57- 27,7)	5,6b (4,13-7,22)	7,74c (6,09- 9,87)	81,58b (46,85- 123,71)	111,87b (72,28- 169,01)
<i>H. argentinensis</i>	657 (610-710)	31 (24-38)	107 (88-122)	95 (82-116)	132 (101-150)	84 (70-105)	21 (17-24)	5 (4,9)	7,8 (6,1)	81 (77)	127 (96)
	654 (588-700)	28 (24-32)	102 (81-113)	99 (83-113)	133 (121-139)	107 (99-117)	24 (21-29)	4,9 (4,7-5,4)	6,1 (5,5-6,6)	77 (60-86)	96 (89-110)
<i>H. bacteriophora</i>	588 (512-671)	23 (18-31)	103 (87-110)	85 (72-93)	125 (100-139)	98 (83-112)	25 (17-30)	4,5 (4-5,1)	6,2 (5,5-7)	84 (76-92)	112 (103-130)
	572,35b (497-667)	25,3b (16-30)	99,15b (88-108)	83,5a (70-92)	126,3a (97-138)	95,9bc (79-111)	23,2a (19,1- 31,06)	4,5a (4,05-5,12)	5,98b (5,57- 6,32)	78,84b (74,02- 91,92)	103,77ab (96,4- 115,19)
<i>H. hawaiiensis</i>	575 (506-631)	25 (21-28)	114 (95-132)	92 (79-103)	133 (115-181)	90 (82-108)	23 (17-29)	4,3 (4,6-)	6,4 (6,6-8,6)	86 (90)	127 (147)
	572 (528-632)	22 (20-24)	111 (104-116)	101 (96-104)	124 (120-136)	76 (68-80)	26 (25-27)	4,6 (4,3-4,8)	7,6 (4,5-5,6)	90 (79-90)	147 (83-103)
<i>H. brevicaudis</i>	528 (479-573)	20 (19-22)	98 (88-107)	82 (72-85)	117 (109-123)	101 (93-109)	26 (25-27)	4,5 (4,3-4,8)	5,3 (4,5-5,6)	84 (79-90)	94 (96,65ab)
	519,85a (469-572)	21a (15-26)	99,1b (84-109)	80,45a (70-88)	117,05a (103-125)	102,4c (89-111)	25,09a (18,73- 31,27)	4,4a (4,1-4,8)	5,09a (4,6-5,53)	84,5b (78,57-90)	96,65ab (92,52- 101,19)
HIW	516,9a (460-576)	20,65a (17-24)	102,15b (87-112)	79,95a (69-89)	114,2a (99-129)	101,55c (89-111)	25,26a (21,61- 33,23)	4,5a (3,57-5,49)	5,13a (4,26- 6,33)	90,01b (71,9-113,1)	101,22ab (78,38- 124,44)

L = longueur (µm), W = largeur (µm), EP = distance entre la partie antérieure et pore excréteur (µm), NR = distance entre partie antérieure et anneau nerveux (µm), ES = longueur de l'œsophage (µm), T = longueur de la queue(µm), a = l/w, b = L/ES, c = L/T, D % = EP*100/THLAB, E % = EP*100/THLAB : population de *Heterorhabditis* isolée à partir d'œufs prélevés des oothèques de *Schistocerca gregaria*, HIW et CMW : populations de *Heterorhabditis* sp. isolées de deux sols différents à partir d'œufs prélevés des oothèques de *Locusta migratoria* et HIW et CMG : populations de *Heterorhabditis* sp. isolées de deux sols différents à partir de chenilles de *Galleria mellonella*. Les moyennes suivies des mêmes lettres (a, b, c, etc...) ne sont pas significativement différentes selon le test de Student-Newman-Keuls à la p - value = 0,05.

EVALUATION DE L'AGRESSIVITE DES DIFFERENTES SOUCHES D'*HETERORHABDITIS* SUR LES ŒUFS DE CRIQUETS *IN VITRO*

L'éclosion des œufs dans le sable débute après deux semaines du début du traitement (Figure 2). Les traitements par les souches *H. bacteriophora* (HLAB), *H. argentinensis* (CMW) et *H. indicus* (HIW) diminuent les pourcentages d'éclosion des œufs d'insecte par rapport à ceux des témoins non infestés. A la fin du traitement, l'éclosion des œufs témoin dépassent 90 %. *HIG* (*H. indicus*) et *CMG* (*H. zelandica*) montrent des taux d'éclosion moins faibles par rapport aux autres souches (Figure 2).

Parmi les 5 souches de *Heterorhabditis* sp testées, notre étude montre que HLAB, HIW et CMW sont les plus virulentes contre les œufs de *Locusta migratoria* où on a enregistré 100 % de mortalité entre les doses de 5000 IJ et 10000 IJ (Figure 2). L'infestation par *HIG* et *CMG* n'a permis aucune inhibition complète de l'éclosion des œufs de criquet. Seulement l'infestation par 10 000 IJ de HLAB a permis d'obtenir une inhibition complète. L'infestation par 5000IJ a permis d'obtenir 13 % d'éclosion des œufs d'insecte. L'infestation par CMW a permis une inhibition totale des œufs aux doses de 5000 et 10000 IJ. La dose de 1000 IJ de nématode a permis d'obtenir une prés de 25 % d'éclosion. Enfin, l'infestation par HIW a montré une inhibition totale similaire à CMW pour les doses de 5000 et 10000 IJ. Mais pour la dose de 1000 IJ, la population HIW n'a permis l'éclosion que de 11 % des œufs de criquet. La population HIW paraît la plus agressive sur les œufs de l'insecte.

L'agressivité des différentes souches d'*Heterorhabditis* sur les œufs de criquets à des doses différentes sur un milieu Nutrient Agar

montre les mêmes résultats que ceux obtenues dans du sable (Figure 3). L'infection des œufs d'insectes par les nématodes et leurs bactéries mutualistes ne dépasse pas 50 % dans les meilleurs des cas. HIW, CMW et HLAB sont les plus virulentes alors que *HIG* (*H. indicus*) et *CMG* (*H. zelandica*) n'ont pas infecté les œufs. La souche HIW (*H. indicus*) paraît la plus agressive avec le taux d'infection le plus élevé et la dose la plus faible. En effet, seule cette souche a infesté significativement les œufs d'insecte après 4 semaines à faible dose (100 nématodes /1ml).

L'observation de l'aspect des œufs montre que les œufs du criquet inoculés par *Heterorhabditis* présentent un aspect différent par rapport à celui des témoins (Figure 4A). Les œufs de criquet placés avec les IJ des nématodes entomopathogènes montrent tout d'abord une multiplication des bactéries mutualistes autour des téguments de l'œuf. Les larves se déplacent activement autour de l'œuf (Figure 4B) au fur et à mesure que les bactéries se multiplient et forme un nuage autour de l'insecte (Figure 4C). Puis, on peut observer des nématodes à travers les téguments de l'œuf (Figure 4D). Enfin, ces derniers s'éclatent et font apparaître une masse de tissus avec bactéries et nématodes qui se multiplient activement (Figure 4E). Les larves de nématodes finiront par occuper le milieu externe en quête d'autres œufs réceptifs (Figure 4F).

La coque des insectes paraissent formée par des plaques hexagonales de chitine soudées entre-elles par un ciment protéique (Figure 5 A). Les bactéries mutualistes des *Heterorhabditis* sp. se fixent sur la coque protectrice des œufs d'insecte (Figure 5B) mais à des endroits préférentiels localisés au niveau de la soudure entre les plaquettes de chitine (Figure 5C) comparé à une coque témoin (Figure 5D).

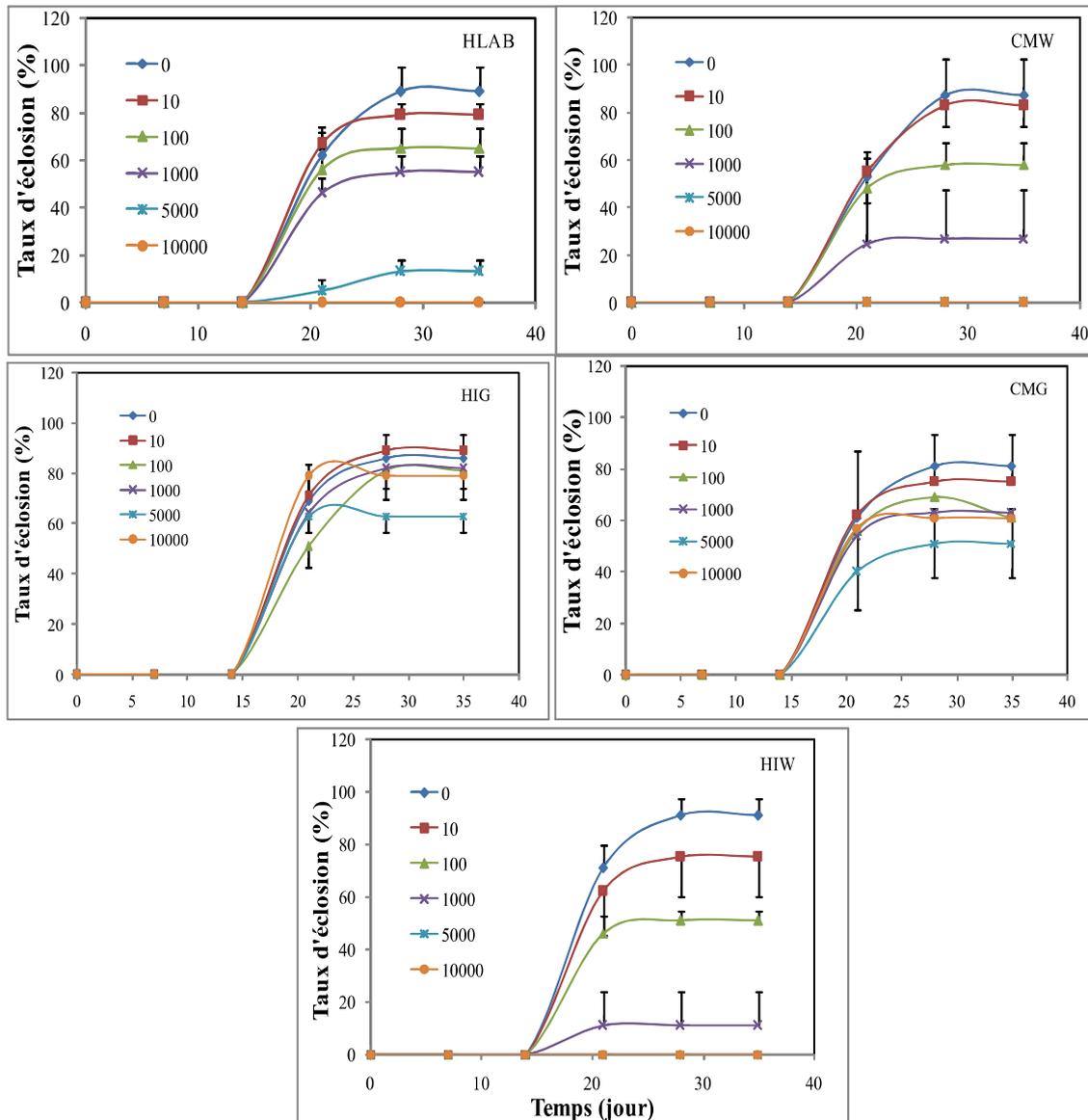


Figure 2 : Effet des différentes souches de *Heterorhabditis* sur l'éclosion des œufs de criquet dans du sable. Les barres correspondent aux moitiés d'intervalles de confiance (p -value = 0,05). HLAB : population d'*Heterorhabditis* isolé à partir d'œufs prélevés des oothèques de *Schistocerca gregaria*, HIW et CMW : populations d'*Heterorhabditis* sp. isolées de deux sols différents à partir d'œufs prélevés des oothèques de *Locusta migratoria* et HIG et CMG : populations de *Heterorhabditis* sp. isolées de deux sols différents à partir de chenilles de *Galleria mellonella*.

Effect of different Heterorhabditis populations on locust eggs hatch in sand. Bars correspond to halves of confidence intervals (p -value = 0.05). HLAB : Heterorhabditis population isolated from Schistocerca gregaria eggs, HIW and CMW : Heterorhabditis sp. populations isolated from two different soils by Locusta migratoria eggs. HIG and CMG : Heterorhabditis sp. populations isolated from two different soils from Galleria mellonella caterpillars.

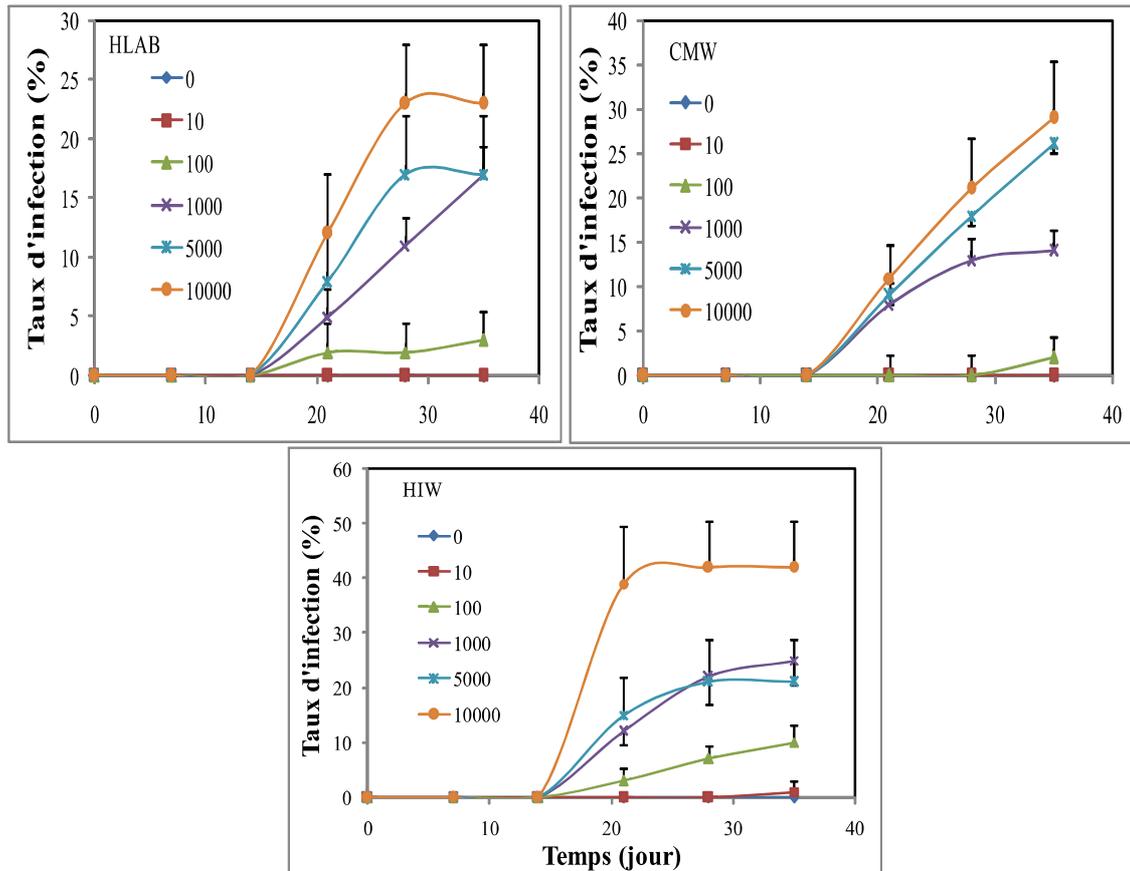


Figure 3 : Agressivité des différentes souches de *Heterorhabditis* sur les œufs de criquet sur le milieu Nutrient Agar. Les barres correspondent aux moitiés d'intervalles de confiance (p -value = 0,05). HLAB : population d'*Heterorhabditis* isolée à partir d'œufs prélevés des oothèques de *Schistocerca gregaria*, HIW et CMW : populations d'*Heterorhabditis* sp. isolées de deux sols différents à partir d'œufs prélevés des oothèques de *Locusta migratoria* et HIG et CMG : populations de *Heterorhabditis* sp. isolées de deux sols différents à partir de chenilles de *Galleria mellonella*.

Aggressiveness of different Heterorhabditis population on migratory locust eggs on Nutrient Agar medium. Bars correspond to halves of confidence intervals (p -value = 0.05). HLAB : Heterorhabditis population isolated from Schistocerca gregaria eggs, HIW and CMW : Heterorhabditis sp. populations isolated from two different soils by Locusta migratoria eggs. HIG and CMG : Heterorhabditis sp. populations isolated from two different soils from Galleria mellonella caterpillars.

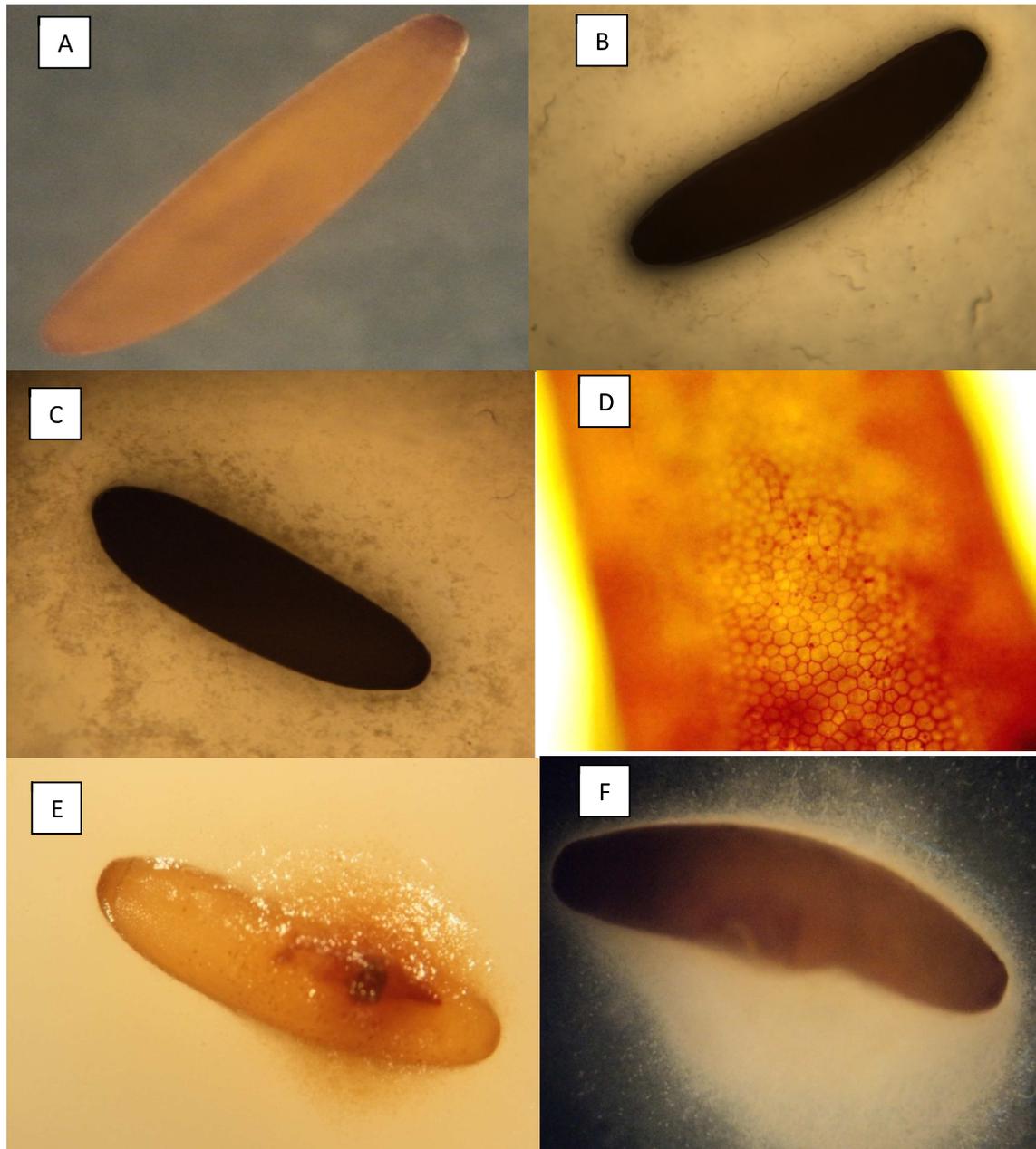


Figure 4 : Œufs de criquet *Locusta migratoria* infestés par *Heterorhabditis* sp A- œuf témoin non infesté ; B- EPN entourant la coque des œufs de l'insecte ; C- présence de l'IJ à l'intérieur de l'œuf infesté (début de l'infestation) ; D- lyse de la coque et éclatement de l'œuf ; E- multiplication des IJ à l'intérieur de l'œuf (fin de l'infestation) ; F- libération des IJ3 et de la bactérie symbiote.

Locusta migratoria eggs infested with *Heterorhabditis* sp. A- uninfected egg control ; B- EPN around insect eggs shell ; C- IJ inside the egg infested (infection beginning) ; D- shell lysis and egg break-up ; E- multiplication IJ inside the egg (end of infestation) ; F- release IJ3 and mutualistic bacteria.

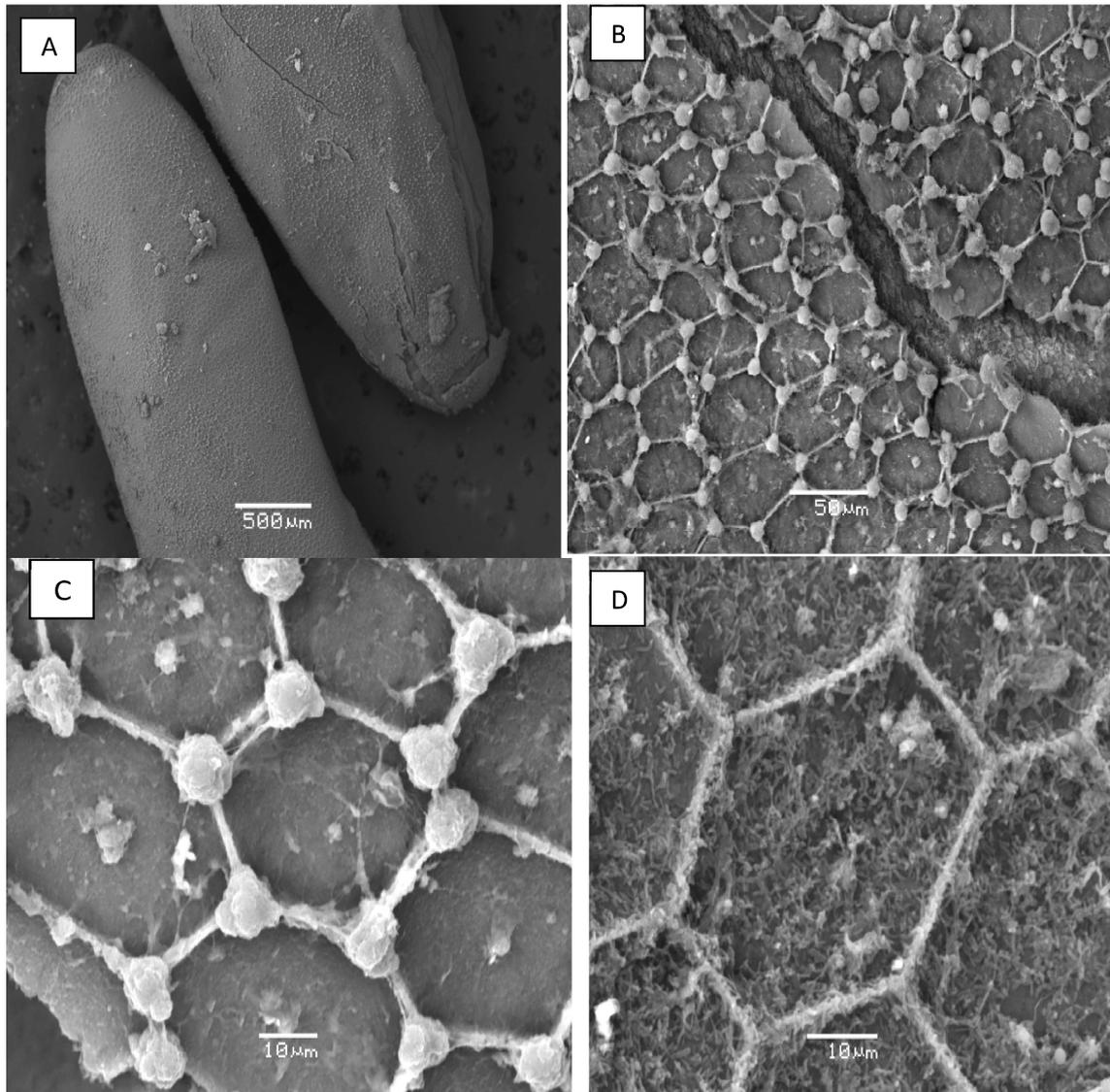


Figure 5 : Œufs de criquet *Locusta migratoria* infestés par *Heterorhabditis* sp. au microscope électronique à balayage. A- œuf de locuste ; B- Aspect de la coque des œufs de l'insecte attaquée par les bactéries ; C- aspect du ciment entre les plaques de chitine de la coque des œufs de l'insecte ; D- Les bactéries s'attaquant au ciment entre les plaques de chitine, lyse de la coque et éclatement de l'œuf.

Locusta migratoria Eggs infested with *Heterorhabditis* sp. on scanning electron microscopy. A- locust egg ; B- Aspect of insect eggs shell attacked by mutualistic bacteria ; C- cement aspect between plates chitin of shell insect eggs ; D- bacteria attacking cement between plates chitin, shell lysis and the egg break-up.

AGRESSIVITE DES DIFFERENTES SOUCHES D'EPN SUR *G. MELLONELLA*

A l'intérieur des chenilles de la fausse teigne, le nombre moyen est de 29 larves IJ de nématode par chenille. La comparaison multiple de moyennes en utilisant le test de Student-Newman et Keuls ne révèle aucune différence significative entre le taux de pénétration des IJ

des différentes souches de nématodes étudiées (Figure 6).

Néanmoins, la figure 7 montre que les populations CMG et HIG isolées sur *G. mellonella* sont plus agressives et induisent une mortalité plus importante sur les chenilles *G. mellonella* que celles isolées au départ sur les œufs de criquet.

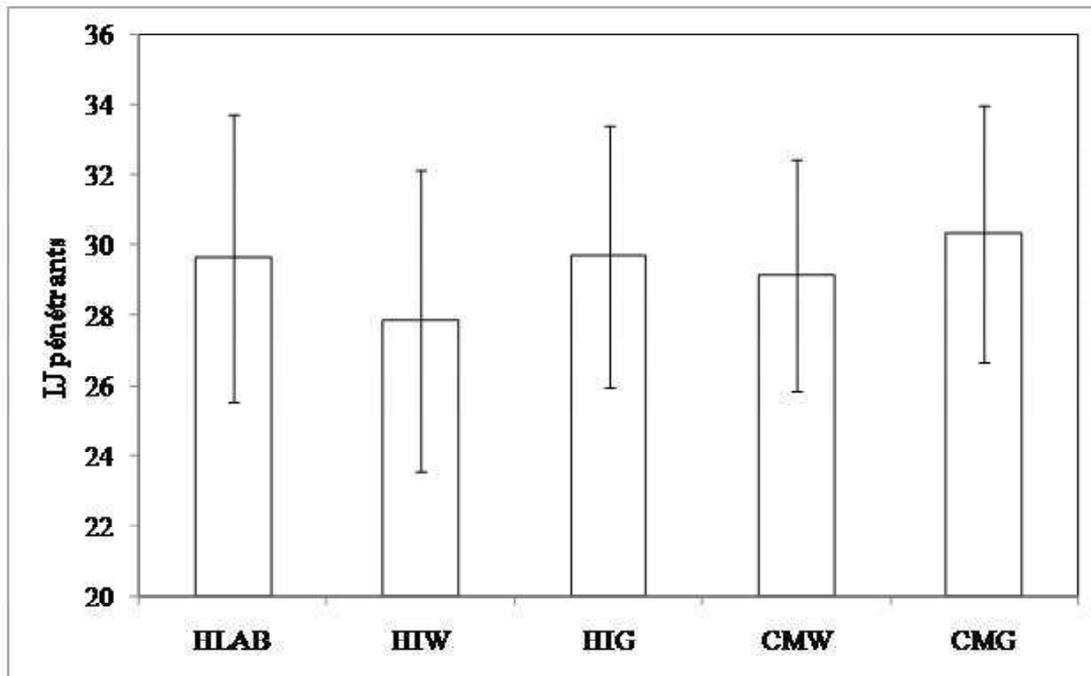


Figure 6 : Infection des larves IJ des différentes souches d'EPN sur *Galleria mellonella*. Les barres correspondent aux intervalles de confiance (p -value =0,05). HLAB : population d'*Heterorhabditis* isolée à partir d'œufs prélevés des oothèques de *Schistocerca gregaria*, HIW et CMW : populations de *Heterorhabditis* sp. isolées de deux sols différents à partir d'œufs prélevés des oothèques de *Locusta migratoria* et HIG et CMG : populations d'*Heterorhabditis* sp. Isolées de deux sols différents à partir de chenilles de *Galleria mellonella*.

IJ infection of different EPN populations on *Galleria mellonella*. The bars correspond to confidence intervals (p -value = 0.05). HLAB : *Heterorhabditis* population isolated from *Schistocerca gregaria* eggs, HIW and CMW : *Heterorhabditis* sp. populations isolated from two different soils by *Locusta migratoria* eggs. HIG and CMG : *Heterorhabditis* sp. populations isolated from two different soils from *Galleria mellonella* caterpillars.

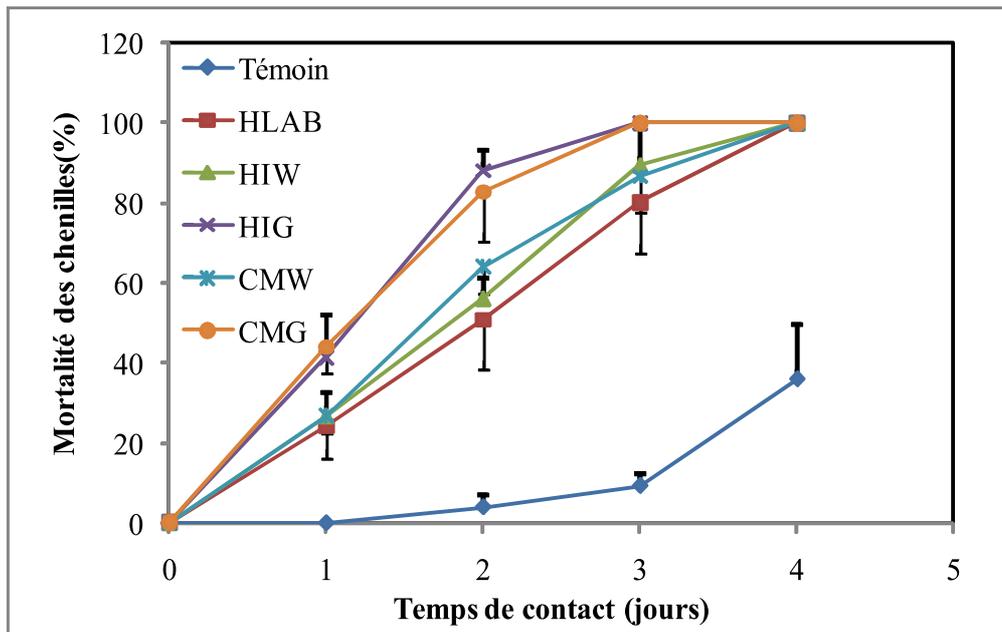


Figure 7 : Agressivité des différentes souches d'EPN sur *Galleria mellonella*. Les barres correspondent aux moitiés d'intervalles de confiance (p -value= 0,05). HLAB : population d'*Heterorhabditis* isolée à partir d'œufs prélevés des oothèques de *Schistocerca gregaria*, HIW et CMW : populations d'*Heterorhabditis* sp. isolées de deux sols différents à partir d'œufs prélevés des oothèques de *Locusta migratoria* et HIG et CMG : populations d'*Heterorhabditis* sp. isolées de deux sols différents à partir de chenilles de *Galleria mellonella*.

Aggressiveness different EPN strains Galleria mellonella. The bars correspond to confidence intervals (p -value = 0.05). HLAB : Heterorhabditis population isolated from Schistocerca gregaria eggs, HIW and CMW : Heterorhabditis sp. populations isolated from two different soils by Locusta migratoria eggs. HIG and CMG : Heterorhabditis sp. populations isolated from two different soils from Galleria mellonella caterpillars.

ACTIVITE ENZYMATIQUE DES HETERO-RHABDITIS ET DE LEURS SYMBIOTES

Après une action de 48 h, la fixation à l'acide trichloracétique révèle à côté du témoin de référence des plages de lyse protéolytique circulaires au niveau des cinq souches de nématodes et trois des bactéries mutualistes. Les diamètres de plages de lyse au niveau des extraits de nématodes HLAB (*H. bacteriophora*) et HIW (*H. indicus*) mesurent 9 mm et sont supérieurs à ceux observés au niveau des extraits des autres nématodes. Le diamètre de l'activité protéolytique de CMW (*H. argentinensis*) est égal à 6 mm. Les extraits des nématodes HIG (*H. indicus*) et CMG (*H. zealandica*) et leurs bactéries associées

ont montrés des plages de 5 mm de diamètre (Figure 8A). Les bactéries associées à HLAB (*H. bacteriophora*), HIW (*H. indicus*) et CMW (*H. argentinensis*) isolés des œufs de criquets sont pourvus de protéases, par contre les bactéries isolées des nématodes entomopathogènes infestant *G. mellonella* en sont dépourvus (Figure 8A). Le diamètre de plage de lyse au niveau des extraits des bactéries HLAB, HIW, CMW non associées aux nématodes est de 5 mm.

L'activité chitinase n'a été observée que sur la plage référence et sur les extraits de HIW et CMW dont les diamètres sont respectivement 6 et 5 mm. Les bactéries mutualistes à ces nématodes n'ont montré aucune plage translucide (Figure 8B).

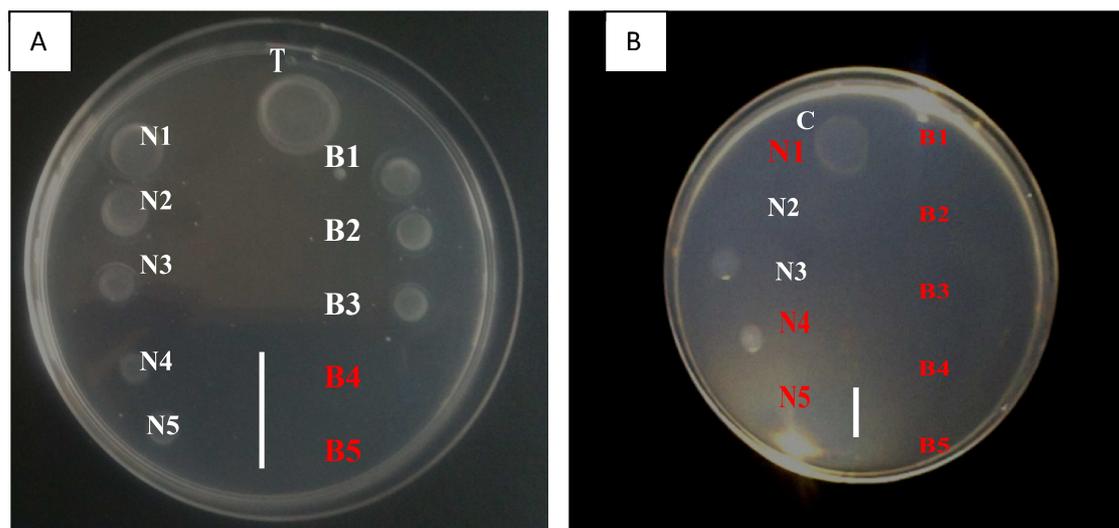


Figure 8 : Activité enzymatiques des Heterorhabditis et leurs bactéries mutualistes sur plaque de caséine (A) montrant des plages de lyse et sur plaque de chitine (B) montrant des plages translucides. T (trypsine), C (chitinase), les nématodes et bactéries mutualistes N1 (HLAB + B1), N2 (HIW + B2), N3 (CMW + B3), N4 (HIG + B4), N5 (CMG + B) et les bactéries mutualistes seules B1, B2, B3, B4, B5. La barre verticale correspond à 1 cm réel.

Enzyme activity of Heterorhabditis and their mutualistic bacteria on casein plate (A) showing lysis area and plaque chitin (B) showing translucent area. T (trypsin), C (chitinase), nematodes and mutualistic bacteria N1 (HLAB + B1), N2 (HIW + B2), N3 (CMW + B3), N4 (HIG + B4), N5 (CMG + B) and the only mutualistic bacteria B1, B2, B3, B4, B5. The vertical bar corresponds to 1 cm real.

DISCUSSION

Heterorhabditis et *Steinernema* et leur bactéries mutualistes sont des pathogènes létaux des insectes (Burnell et Stock, 2000). Toutes les techniques de piégeages, de modélisation du cycle biologique de ces nématodes sont basées sur la pathogénie des larves ou des chenilles d'insectes. L'infestation des œufs d'insecte est étudiée pour la première fois. Les espèces de nématodes entomopathogènes identifiées sont les mêmes que *Heterorhabditis bacteriophora*, *H. indicus* et *H. argentinensis*. *H. bacteriophora* est largement distribuée dans le monde et présente une large gamme d'insecte hôte. *H. indicus* s'attaque aux Lépidoptères, Coléoptères et Thysanoptères (Kaya *et al.*, 2006). *H. argentinensis* parasite les Coléoptères (Kaya *et al.*, 2006). A l'inverse, très peu d'études ont été réalisées sur l'action des nématodes entomopathogènes vis-à-vis des Orthoptères. Seules les actions de *Steinernema scapterisci* (Nematoda : Steinernematidae) sur la Courtillière ou « taupe-grillon » *Scapteriscus* sp. (Nguyen et Smart, 1990) et celle de quelques espèces de *Steinernema* et de *Heterorhabditis* sur les nymphes de *Schistocerca gregaria* (Mahar *et al.*, 2006) et sur le grillon, *Gryllus bimaculatus* (Mahar *et al.*, 2012) ont été étudiées.

La pathogénie des EPN sur les œufs de criquet paraît différente que celle sur les fausses teigne, *Galleria mellonella*. Si le nématode permet d'introduire la bactérie dans la chenille de *G. mellonella*, la bactérie permet de dégrader les téguments de l'œuf pour que le nématode pénètre à l'intérieur et se nourrisse de l'embryon de l'insecte.

Les nématodes entomopathogènes pénètrent de la même manière dans la chenille mais seulement lorsqu'ils sont adaptés à cet insecte et peuvent se multiplier. Les nématodes isolés des œufs ont une agressivité plus faible, ce qui corrobore la thèse de la spécificité de ces nématodes évoquée par plusieurs auteurs (Grewal *et al.*, 1993 ; Burnell et Stock, 2000 ; Mohamed *et al.*, 2004). La pénétration des *Heterorhabditis* est lié au potentiel physique du nématode en utilisant la dent dorsale (Burnell et Stock, 2000) ou des sécrétions protéolytiques (Abu Hatab *et al.*, 1995 ; Dowds et Peters, 2002) et des chitinases (Chen *et al.*, 1996) du nématode et de sa bactérie mutualiste. Les enzymes protéolytiques et chitinolytiques jouent un rôle critique dans la virulence du complexe *Heterorhabditis-Photorhabdus luminescens*. La chitinase permet la dégradation chimique des plaques de chitine

formant les téguments de l'œuf de l'insecte qui pourrait être produite par la bactérie mutualiste ou par le nématode lui-même. Les protéases pourront servir dans la dissolution du ciment entre les plaques de chitines de l'œuf. Dans ce travail, la bactérie mutualiste permettrait, grâce à son potentiel biochimique protéolytique, de solubiliser le ciment entre les plaques de chitine des téguments de l'œuf de l'insecte et permettrait au nématode d'y pénétrer.

La constitution biochimique de l'œuf semble être un milieu propice pour le développement des IJ. 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 phosphoacyl glycérols (Chanussot, 1998). Généralement, cette substance est utilisée comme un émulsifiant nutritif pour l'élevage en masse des Nématodes entomopathogènes (Friedman *et al.*, 1989). De plus, quelques études (Wouts, 1981 ; Pinyon *et al.*, 1996 ; Thaler *et al.*, 1998) 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 le jaune d'œuf (30 % de lécithine). Les lécithinases assurent la sécrétion du phosphate au profit des bactéries, et jouent un rôle important dans le pouvoir pathogène contre les insectes (Thaler *et al.*, 1998 ; Gaugler, 2002). Enfin, 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 (Rai *et al.*, 1997 ; Pener et Yerushalmi, 1998).

CONCLUSION

Les nématodes entomopathogènes du genre *Heterorhabditis* s'attaquent aux œufs de criquet. Les populations des nématodes entomopathogènes isolées à partir des œufs sont plus agressives sur les œufs de criquet que sur les chenilles de *Galleria mellonella*. Par contre les populations isolées à partir de chenille *G. mellonella* ne sont pas pathogènes sur les œufs.

L'insecte modèle, *G. mellonella*, est sensible à toutes les populations isolées. La pénétration des nématodes à l'intérieur de l'œuf de criquet s'effectue grâce à l'activité protéase des bactéries mutualistes.

REFERENCES

- Abu Hatab M., Selvan S., Gaugler R. 1995. Role of proteases in penetration of insect gut the entomopathogenic nematode *Steinernema glaseri* (Nematoda : Steinernematidae). *Journal of invertebrate pathology* 66 (2) : 125 - 130.
- Ammar M. 1983. Action protéolytique de la salive, des extraits des glandes salivaires et du tube digestif de *Rhinocoris* sp. (Heteroptera, Reduviidae). Diplôme d'études approfondies, Biochimie, Faculté des sciences de Tunis, 56p.
- Burnell A. M., Stock S. P. 2000. *Heterorhabditis*, *Steinernema* and their bacterial symbionts -lethal pathogens of insects. *Nematology* 2 : 31 - 42.
- Chanussot F. 1998. Lécithine, métabolisme et nutrition. Lavoisier, France, 169 p.
- Chen G., Zhang Y., Li J., Dunphy G. B., Punja J. M. Webster. 1996. Chitinase activity of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* species, bacterial associates of entomopathogenic nematodes. *Journal of Invertebrate Pathology* 68 (2) : 101 - 108.
- Dowds B. C. A., Peters A. 2002. Virulence mechanisms. In : Gaugler R, editor. *Entomopathogenic nematology*. New York : CABI. 79 - 98.
- Forst S., Neilson K. 1996. Molecular Biology of the Symbiotic-Pathogenic Bacteria *Xenorhabdus* spp. and *Photorhabdus* spp. *Microbiological Reviews* 21 - 43.
- Friedman M. J., Langston S. E., Pollitt S. 1989. Mass production in liquid culture of insect-killing nematodes. International Patent Application, WO 89/ 04602.
- Gaugler R. 2002. *Entomopathogenic nematology*. CAB International, Wallingford, UK, 388 p.
- Grewal P. S., Gaugler R., Lewis E. E. 1993. Host recognition behavior by entomopathogenic nematodes during contact with insect gut contents. *The Journal of parasitology* 79 (4) : 495 - 503.

- Kaya H. K., Aguilera M. M., Alumai A., Choo H. Y., de la Torre M., Fodor A., Ganguly S., Hazâr S., Lás Lakatos T., Pye A., Wilson M., Yamanaka S., Yang H., Ehlers R. U. 2006. Status of entomopathogenic nematodes and their symbiotic bacteria from selected countries or regions of the world. *Biological Control* 38 : 134 - 155.
- Lortkipanidze M., Chkhubianishvili T., Burjanadze M. 2010. Isolation of entomopathogenic nematodes from the soil. *Bulletin of the Georgian National Academy of Sciences* 4 (2) : 137 -1 40.
- Mahar A. N., Jan N. D., Gowen S. R., Hague N. G. M., Al-Siyabi A. A., 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.
- Mahar A. N., Jan N. D., Mahar A. Q., Gowen S. R. 2012. Biocontrol of black cricket, *Gryllus bimaculatus* (Orthoptera : Gryllidae) nymphs with entomopathogenic nematodes. *Pakistan Journal of Nematology* 30 (1) : 27 - 40.
- Miduturi J. S., Matata G. J. M., Waeyenberge I., Moens M. 1996. Naturally occurring entomopathogenic nematodes in the province of east-flanders, belgium. *Nematologia Mediterranea* 24 : 287 - 293.
- Mohamed M. A., El-Sharabasy M. M., El-Khonezy M. I., Ghazy A. M. 2004. The relationship between acidic proteases and pathogenicity of the infective juveniles of *Heterorhabditid* nematodes. *International Journal of Nematology* 14 (2) : 145 -152.
- Nguyen K. B., SmartJR G. C. 1990. *Steinernema scapterisci* n. sp. (Rhabditida : Steinernematidae). *Journal of Nematology* 22 (2) : 187 - 199.
- Nguyen K. B., SmartJR G. C. 1996. Identification of Entomopathogenic Nematodes in the Steinernematidae and Heterorhabditidae (Nematoda : Rhabditida). *Journal of Nematology* 28 (3) : 286 - 300.
- Pener M. P., Yerushalmi Y. 1998. The physiology of locust phase polymorphism : an update. *Journal of Insect Physiology* 44 : 365 - 377.
- Pinyon R. A., Linedale E. C., Webster M. A., Thomas C. J. 1996. Tn5-induced *Xenorhabdus bovienii* lecithinase mutants demonstrate reduced virulence for *Galleria mellonella* larvae. *Journal of Applied Bacteriology* 80 (4) : 411 - 417.
- Rai M. M., Hassanali A., Saini R. K., Odongo H. H. Kahoro. 1997. Identification of components of the oviposition aggregation pheromone of the gregarious desert locust, *Schistocerca gregaria* (Forsk.). *Journal of Insect Physiology* 43 (1) : 83 - 87.
- Roberts W. K., Selitrennikoff C. P. 1988. Plant and bacterial chitinases differ in antifungal activity. *Journal of General Microbiology* 134 : 169 - 176.
- 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.
- Thaler J. O., Duvic B., Givaudan A., N. Boemare. 1998. Isolation and Entomotoxic properties of the *Xenorhabdus nematophilus* F1 Lecithinase. *Applied and Environmental Microbiology* 64 (7) : 2367 - 2373.
- Wouts W. M. 1981. Mass production of the entomogenous nematode *Heterorhabditis heliothidis* (Nematoda : Heterorhabditidae) on artificial media. *Journal of Nematology* 13 : 467 - 469.