

# EFFET DE LA TEMPERATURE ET DE L'HUMIDITE RELATIVE SUR LE DEVELOPPEMENT DE LA MYCOSE A *Entomophaga grylli* BATKO (Zygomycètes, Entomophthorales) CHEZ *Zonocerus Variegatus* L. (Orthoptera, Pyrgomorphidae)

A. J. GNAGO <sup>1</sup>, K. FOUA BI <sup>2</sup> et C. J. LOMER <sup>3</sup>

<sup>1</sup> Institut National Polytechnique Félix Houphouët Boigny (INP-HB) Yamoussoukro, BP 1313, Côte d'Ivoire.

<sup>2</sup> Université de Cocody, UFR Biosciences, 22 BP 582 Abidjan 22 Côte d'Ivoire.

<sup>3</sup> Anciennement à l'Institut International d'Agriculture Tropicale (IITA),

08 BP 0932 Cotonou Bénin.

## RESUME

L'étude a été conduite au laboratoire à l'Institut International d'Agriculture Tropicale (IITA) à Cotonou au Bénin sur la mycose à *Entomophaga grylli*, un champignon entomopathogène, chez *Zonocerus variegatus*. L'influence de la température et de l'humidité relative (HR) sur la sporulation et la germination des conidies a été évaluée. L'infection artificielle des criquets par le champignon a été réalisée au laboratoire et l'effet des facteurs abiotiques précédents étudié. La sporulation intervient entre 6 et 10 h de temps après la mort de l'insecte et continue au-delà de 24 h à 25 °C et à 100 % d'humidité relative. Le maximum de spores est libéré entre 10 et 20 h après incubation des insectes dans les conditions précédentes. La germination des conidies primaires nécessite une humidité relative proche de la saturation. La température optimale de germination s'est située entre 20 et 25 °C. L'infection artificielle par exposition directe des insectes aux conidies fraîchement projetées des cadavres d'insectes a permis d'obtenir 90 % de mortalité en moyenne et plus de 62 % d'infection à 25 °C. La température affecte significativement les taux de mortalité et d'infection de même que la période d'incubation. La température optimale de développement de la maladie est de 25°C avec une durée d'incubation moyenne de 9 jours.

**Mots clés :** Infection artificielle, *Entomophaga grylli*, *Zonocerus variegatus*, conidies, Bénin

## ABSTRACT

EFFECT OF TEMPERATURE AND RELATIVE HUMIDITY ON *Entomophaga grylli* BATKO (zygomycètes, entomophthorales) MYCOSIS DEVELOPMENT IN *ZONOCERUS variegatus* L. (orthoptera, pyrgomorphidae)

The study was conducted in laboratory at the International Institute of Tropical Agriculture (IITA) at Cotonou in Benin, on the mycosis of *Entomophaga grylli*, an entomopathogenic fungus, in *Zonocerus variegatus*. The influence of temperature and relative humidity (RH) on sporulation, conidial germination and the infection steps of the fungus was evaluated. Sporulation of the pathogen, generally, started between 6 and 10 h after death of the host organism and continued beyond 24 hr at 25 °C and 100 % relative humidity. Maximum sporulation occurred between 10 and 20 hr after the death of the host. The optimal temperature for the germination of the primary conidia were between 20 and 25 °C. Conidial germination required a RH near saturation. Artificial infection by exposing grasshoppers to conidial showers from the fungus-killed grasshoppers appeared to be most effective resulting in up to an average of 90 % mortality and more than 62 % infection at 25 °C. Temperature significantly affected mortality and infection rates and so did incubation period. The optimum temperature for the disease development was found to be about 25 °C with a mean incubation period of 9 days.

**Keywords :** Artificial infection, *Entomophaga grylli*, *Zonocerus variegatus*, conidia, Sporulation, Bénin

## INTRODUCTION

Les acridiens tout comme les autres groupes d'insectes sont victimes d'ennemis naturels comprenant, outre les insectes eux-mêmes, des microorganismes tels que les bactéries, les virus, les sporozoaires et les champignons. Il est de plus en plus question de recourir à ces organismes naturels pour le contrôle des ravageurs des cultures dans une optique globale de lutte intégrée. Dans ce contexte, les champignons apparaissent comme les agents les plus potentiellement intéressants dans la lutte contre les criquets et les locustes compte tenu de certaines caractéristiques qui leur sont propres (Prior et Greathead, 1989). Les genres *Beauveria* et *Metarhizium* du groupe des Deutéromycètes sont déjà utilisés à cet égard (Lomer et al., 1997). Ceci n'est pas vrai pour *Entomophaga grylli* qui pose d'énormes difficultés d'utilisation (Macleod et al., 1980).

L'une des caractéristiques du champignon est qu'il ne se développe pas sur les milieux artificiels de culture. Il se comporte en effet comme un parasite obligatoire. En outre, les conditions d'infection artificielle des criquets et la survie des organes infectieux du champignon dans l'environnement sont loin d'être élucidées.

*Zonocerus variegatus* est très abondant en Afrique de l'Ouest et du Centre où il est très étudié (Chiffaud et Mestre, 1990 ; Chapman et al., 1986 ; Le Gall et al., 1998). Il est l'hôte de divers ennemis naturels parmi lesquels le champignon *Entomophaga grylli* lui cause d'importantes épizooties et est considéré comme le principal facteur de régulation naturelle de l'insecte. Cette mycose naturelle, bien que fréquente chez cet insecte, n'est pas bien connue en ce qui concerne sa relation avec *Zonocerus variegatus*. Il est évident qu'une utilisation éventuelle de *Entomophaga grylli* comme agent de lutte biologique passe par une meilleure connaissance de la relation hôte / parasite aussi bien en milieu naturel qu'au laboratoire. Il s'agit de mieux comprendre les facteurs déterminant le développement des épizooties du champignon et les conditions d'infection artificielle des insectes, ainsi que le développement et la survie des spores.

La présente étude s'intéresse à certains aspects du comportement du champignon au laboratoire, en particulier à la sporulation, à la germination des spores du champignon et à l'infection artificielle des criquets.

Les objectifs de cette étude sont, d'abord, de déterminer la durée et l'intensité de la sporulation de *Entomophaga grylli* chez les cadavres d'insectes, et de montrer l'influence combinée de la température, de l'humidité relative et du temps sur la germination des spores du champignon. L'étude réalisée consiste également à maîtriser les conditions d'infection artificielle des criquets et d'étudier l'effet de la température sur le développement et la durée d'incubation de la mycose.

## MATERIEL ET METHODES

### MATERIEL

Les spécimens de *Zonocerus variegatus* utilisés dans les essais biologiques ont été directement échantillonnés dans les champs, lors des prospections hebdomadaires, dans les 4 départements au Sud du Bénin : Atlantique, Ouémé, Zou et Mono. Ils ont été mis en élevage au laboratoire au moins 3 semaines avant les tests d'infection. Les criquets sont capturés à l'aide de filets ou à la main. L'élevage a lieu dans des cages en grillage de dimension 30 x 30 x 38 cm ou dans des bouteilles plastiques d'eau minérale vides de 1,5 litres de capacité, à l'intérieur d'une chambre dont la température moyenne est de 26 °C et l'humidité relative de 60-70 %. Les insectes sont nourris quotidiennement avec des feuilles de manioc.

Le champignon *Entomophaga grylli* a été obtenu à partir de criquets naturellement infectés et échantillonnés dans les zones précédentes, vivants ou fraîchement morts. Certaines «souches» du champignon ont été maintenues *in vivo* à partir des criquets, et ont servi de base pour les essais de laboratoire.

### METHODOLOGIE

#### Infection artificielle

Les insectes à infecter sont introduits dans des boîtes plastiques de sandwich de dimension 14 x 8 x 6 cm. Les couvercles des boîtes sont remplacés par du grillage métallique dont les mailles sont des rectangles de 2 x 1,5 mm. Les cadavres sporulants sont déposés au dessus du grillage (3 à 5 cadavres suivant la capacité de sporulation et la disponibilité des cadavres d'insectes). En moyenne 10 à 20 insectes sont infestés par boîte. Les boîtes sont, ensuite, incubées à 20 °C dans des bassines cylindriques en plastique de 36 cm de diamètre et 19 cm de

haut. Celles-ci contiennent de l'eau de robinet (1/3 du volume) et sont fermées par des plateaux adaptés, afin d'obtenir une humidité relative de saturation.

Après 24 h d'exposition en moyenne, les cadavres sporulants sont retirés, puis les insectes transférés dans les bouteilles plastiques. Ils sont placés dans les conditions de températures souhaitées et nourris chaque jour.

La photopériode est de 12 h par jour et la scotophase de 12 h. Les insectes morts, infectés ou non, sont dénombrés chaque jour depuis le 1<sup>er</sup> jour après l'infestation jusqu'à 16 ou 21 jours après compte tenu de la durée d'incubation de la mycose.

Les quantités de spores libérées sur les insectes infestés ont été estimées en introduisant 4 lamelles au fond de chaque boîte lors de la contamination. Ensuite, on a évalué le nombre de spores par mm<sup>2</sup> ; soit 5 mm<sup>2</sup> par lamelle et 20 mm<sup>2</sup> par boîte.

## Sporulation et germination du champignon

Les insectes fraîchement tués par le champignon sont incubés à 25 °C sur du papier cellulose mouillé, dans une boîte de Pétri fermée. Une lame de microscope est, ensuite, maintenue à 1 ou 2 mm de distance au-dessus du cadavre à l'intérieur de la boîte et remplacée périodiquement par une autre jusqu'à la fin de la sporulation. Une lamelle est ensuite fixée sur chaque lame dans une goutte de lactophénol en tenant compte de la distribution des spores sur la lame.

### *Détermination du début, de la durée et de l'intensité de la sporulation.*

Le début et la fin de la sporulation de chaque cadavre sont vérifiés en observant les lames au microscope, et en notant la présence ou l'absence de spores (Steinkraus et Slaymaker, 1994). La durée de la sporulation est la période comprise entre le début et la fin de celle-ci, et marquée par la présence ou non de spores sur les lames.

L'intensité de la sporulation est déterminée en évaluant par comptage le nombre moyen de spores/mm<sup>2</sup> sur 10 surfaces unitaires de 1 mm<sup>2</sup> choisies, de façon aléatoire, dans la partie de la lame couverte par la lamelle. La photocopie sur

transparent d'un papier millimétré, découpée et positionnée sous le microscope au niveau de la lamelle donne les surfaces en mm<sup>2</sup>, et permet ainsi de compter le nombre de spores/mm<sup>2</sup>.

Le premier essai a été réalisé sur 11 insectes adultes ou larves âgées, infectés au laboratoire, 12 h après leur mort. Les lames ont été renouvelées à des périodes de 8 à 15 h de temps.

Le deuxième test a porté initialement sur 10 insectes adultes infectés au laboratoire. Juste 2 h après leur mort, ceux-ci ont été incubés comme indiqué. Ici, le renouvellement des lames a été effectué en un intervalle de temps constant de 4 h. Par la suite, la détermination de l'intensité de sporulation a porté sur 5 des 10 insectes. Le nombre moyen de spores/mm<sup>2</sup> pour l'ensemble des 5 insectes représentant 50 comptages par période à raison de 10 pour chaque insecte a été ensuite calculé.

### *Influence combinée de la température de l'humidité relative et du temps sur la germination des spores.*

La germination des spores primaires a été testée aux températures suivantes : 20 °C, 25 °C, 30 °C et 35 °C à 100 % d'humidité relative, après 4 h, 8 h, 12 h et 16 h d'incubation des spores. Huit (8) cadavres sont incubés à 25 °C et à 100 % d'humidité relative pour favoriser la sporulation.

Au moment où celle-ci atteint une certaine intensité, une lame est disposée au-dessus de chaque cadavre afin de recueillir les spores. Toutes les 30 mn, les 8 lames sont retirées et incubées à chacune des températures ci-dessus dans des boîtes de Pétri de 120 mm de diamètre à raison de 2 lames par boîte (Oduor *et al.*, 1995). Toutes les spores par lame sont incubées. Avant l'incubation des lames, les boîtes de Pétri contenant les papiers mouillés sont mises en équilibre thermique dans le milieu pendant 2 h.

A chaque période d'observation, 2 lames sont retirées à chacune des températures données. Le taux de germination est déterminé à partir des nombres de spores germées et non germées dans le champ du microscope. Le nombre de champs microscopiques visualisés et de spores observées par lame dépendent de la quantité de spores disponibles sur la lame. Le nombre moyen de spores observés ainsi, par température ou par humidité relative et par période, est de 258. La spore est considérée comme germée, si l'on observe le développement d'un tube germinatif quelle que soit sa taille.

L'effet de l'humidité relative a été étudié suivant le même protocole de récupération des spores sur les lames et leur incubation. Les humidités relatives testées, obtenues à partir de différentes solutions de sels (Solomon, 1951; Winston et Bates, 1960) sont : 45 % (MgCl), 75 % (NaCl) et 93 % (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) et 100 % (saturation) à une température fixe de 30 °C. Les boîtes de Pétri et les lames sont incubées dans des chambres spéciales contenues dans le même incubateur (30 °C). Les différentes humidités et la température à l'intérieur des chambres sont vérifiées à chaque instant par un enregistreur incorporé aux chambres.

### **Effet de la température sur le développement de la mycose.**

Après infestation artificielle des insectes dans les conditions déjà décrites, ceux-ci sont répartis de façon aléatoire par 15 dans les bouteilles plastiques d'élevage avant d'être soumis aux différentes températures à tester, à raison de 4 répétitions par température. Les comparaisons ont porté sur 4 températures constantes, 4 couples de températures alternées. L'exposition a été effectuée pendant 0 h, 2 h, 4 h, 8 h par jour à 35 °C. Pour chaque couple de températures, les insectes sont maintenus pendant 12 h le jour (de 7 h à 19 h) à la température la plus élevée, puis pendant 12 h la nuit (de 19 h à 7 h) à la température la plus basse pendant les 18 jours d'observation. Après 0 h, 2 h, 4 h et 8 h d'exposition respective par jour à 35 °C, les insectes sont conservés à 25 °C le reste de la journée, et ce, pendant les 11 premiers jours. Les insectes sont par la suite maintenus à 25 °C jusqu'au 18<sup>e</sup> jour. Les témoins ne sont pas infectés. L'humidité relative n'a pas été fixée et a varié en fonction de la température considérée.

### **Effet de la température sur la durée d'incubation de la maladie chez *Zonocerus variegatus*.**

La durée d'incubation de la mycose pour chaque insecte a été déterminée, à compter de la date de la contamination jusqu'à la date de la mort de l'insecte. La durée moyenne d'incubation pour un traitement donné est obtenue en additionnant les durées d'incubation de tous les insectes, puis en divisant le total des durées par le nombre total d'insectes utilisés.

### **Traitement et analyse statistique des données.**

Les pourcentages de mortalité et d'infection cumulés sont calculés à partir du premier jour après la contamination artificielle. Les courbes qui en résultent, illustrent l'évolution des ces pourcentages cumulés en fonction du temps. Pour les analyses statistiques, les pourcentages ont été transformés suivant la formule :  $(\arcsin \sqrt{\text{radian}}) \times 57,3$ . Les valeurs correspondantes à 0 % et 100 % ont été corrigées (Gomez et Gomez, 1984).

L'analyse de variance, suivant le programme Statistical Package of Social Sciences (SPSS) a permis de comparer les pourcentages moyens de mortalité et d'infection. Les moyennes ont été séparées suivant le test de Tukey au seuil de 5 %.

## **RESULTATS**

### **INFECTION ARTIFICIELLE**

Les quantités moyennes de spores obtenues au cours de l'infestation varient et avoisinent 100 spores et plus par mm<sup>2</sup> pour 160 comptages. Sur un total de 466 criquets contaminés, la mortalité a atteint 89,44 % dont 62,28 % effectivement infectés et 27,16 % morts de causes diverses (tableau 1).

### **SPORULATION**

#### **Sur insectes morts après 12 h**

Après 8 h d'incubation, presque tous les insectes ont déjà abondamment sporulé. L'intensité de la sporulation a dépassé 100 spores/mm<sup>2</sup>. Au-delà de 22 h après incubation, la plupart des insectes (9/11) continue de sporuler normalement, mais presque plus aucun ne sporule 47 h après incubation (tableau 2).

#### **Sur insectes morts moins de 2 h après.**

Nos données sont regroupées sur la figure 1. Il ressort que 4 h après incubation (environ 5 à 6 h après la mort), aucun des 10 insectes initialement incubés n'a sporulé.

**Tableau 1 :** Taux de mortalité et d'infection de *Zonocerus variegatus* sur plusieurs tests successifs à partir d'un inoculum initial de *Entomophaga grylli*.

*Mortality and infection rates of Zonocerus variegatus for successive tests from an initial inoculum of Entomophaga grylli.*

Série d'essais	Nombre d'insectes	Stade des insectes	Mortalité (%)	Infection (%)
E 1	20	L5 et L6	100	85
E 2	25	„ „	96	68
E 3	25	„ „	92	84
E 4	25	„ „	100	80
E 5	25	„ „	92	72
E 6	15	A	93	93
E 7	15	A	60	53
E 8	25	L5 et L6	80	56
E 9	21	„ „	76	33
E 10	25	„ „	76	48
E 11	25	„ „	100	60
E 12	20	L6 et A	85	65
E 13	25	L6	100	44
E 14	25	L6	92	64
E 15	25	L6	100	56
E 16	25	L6	100	52
E 17	50	L3 et 4	82	50
E 18	50	L4 et 6	86	58
TOTAL	466	Moyenne	89,44	62,28

**Tableau 2 :** Intensité et durée de la sporulation du champignon chez *Zonocerus variegatus* tués par *Entomophaga grylli* et incubés 12 h après leur mort.

*Entomophaga grylli sporulation intensity and duration from Zonocerus variegatus killed by this fungus and incubated 12 h after death.*

	Durée de renouvellement des lames :					
	8 h	14 h	10 h	15 h	10 h	14 h
	Durée cumulée de la Sporulation :					
	8 h	22 h	32 h	47 h	57 h	71 h
Insecte 1 (A)	++	++	-	-	-	-
Insecte 2 (L)	++	++	+	-	-	-
Insecte 3 (L)	++	++	+	-	-	-
Insecte 4 (A)	++	++	+	-	-	-
Insecte 5 (L)	++	++	-	-	-	-
Insecte 6 (L)	++	++	+	-	-	-
Insecte 7 (L)	+	++	++	+	-	-
Insecte 8 (L)	++	++	+	-	-	-
Insecte 9 (A)	++	++	++	-	-	-
Insecte 10 (A)	++	++	+	-	-	-
Insecte 11 (L)	++	++	+	-	-	-

A : Adulte

L : Larve

- : Pas de spores.

+ : < 50 Spores / mm<sup>2</sup> en moyenne.

++ : > 100 Spores / mm<sup>2</sup> en moyenne.

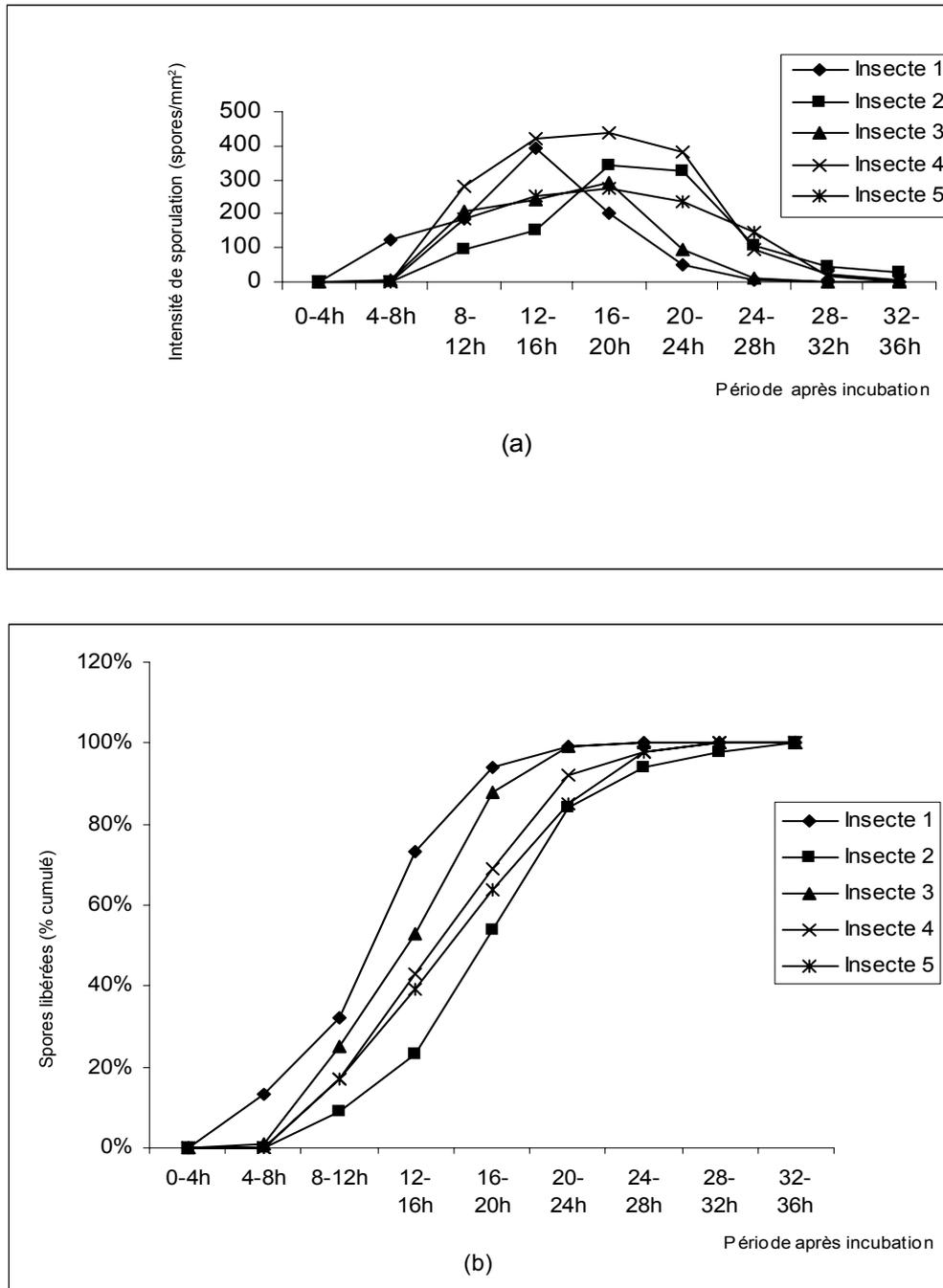
A : Adult

L : Larva

- : No spores

+ : < 50 Spores / mm<sup>2</sup> in mean

++ : > 100 Spores / mm<sup>2</sup> in mean



**Figure 1 :** Sporulation de *Entomophaga grylli* chez *Zonocerus variegatus* adulte peu après la mort

- a) Nombre moyen de spores par insectes par mm<sup>2</sup> sur 10 comptages de 1 mm<sup>2</sup> chacun  
 b) pourcentage cumulé de spores libérées par insecte

*Entomophaga grylli* sporulation from *Zonocerus variegatus* adults few after death

a) sporulation intensity by insect

b) cumulated pourcentage of spores discharged by insect

la sporulation a commencé entre 4 et 8 h après incubation chez tous les insectes soit 6 à 10 h après la mort des insectes. La sporulation est maximale entre 12 et 20 h et le pic est atteint dans l'intervalle 16-20 h (figure 1).

Le nombre moyen de spores / mm<sup>2</sup> obtenu (sur 450 comptages) est de 126. En tenant compte du début effectif de la sporulation, la quantité de spores sur 400 comptages est de 142 spores/mm<sup>2</sup>.

## GERMINATION

La figure 2 illustre l'effet de la température et de l'humidité sur la germination de spores. Il apparaît, que 35 °C est défavorable à la germination des spores de *Entomophaga grylli* puisque le taux maximum de germination observé est de 1 %, et la moyenne globale de 0,12 % sur 1158 spores observées. Par contre, la germination est effective à 20 °C, 25 °C et 30 °C. La gamme de températures favorables à la germination des spores est très large (figure 2). L'influence de l'humidité relative est plus nette. La germination des spores de *Entomophaga grylli* est pratiquement nulle aux faibles humidités relatives avec des proportions moyennes de spores germées respectives de 1,50 % ; 0,80 % ; 2,3 % à 40-50 %, 75 % et 93 % d'humidité relative et de 51 % à saturation (figure 2).

La germination des spores est très rapide puisque, 4 h après l'incubation, elle est déjà effective dans la plupart des cas (figure 2).

## EFFET DE LA TEMPERATURE SUR LA MYCOSE

Les résultats sont illustrés par les figures 3, 4 et 5. A 17 °C, 20 °C et 30 °C, la maladie se développe beaucoup moins rapidement qu'à 25 °C (figure 3).

L'analyse de variance montre une différence hautement significative entre les traitements au 11<sup>e</sup> jour aussi bien pour les taux de mortalité que d'infection. Le test de Tukey au seuil de 5 % indique, que le comportement à 25 °C diffère de celui des autres températures. Les mêmes analyses statistiques montrent, qu'au 21<sup>e</sup> jour seul le témoin diffère significativement des autres traitements qui ne diffèrent plus entre eux quelle que soit la température.

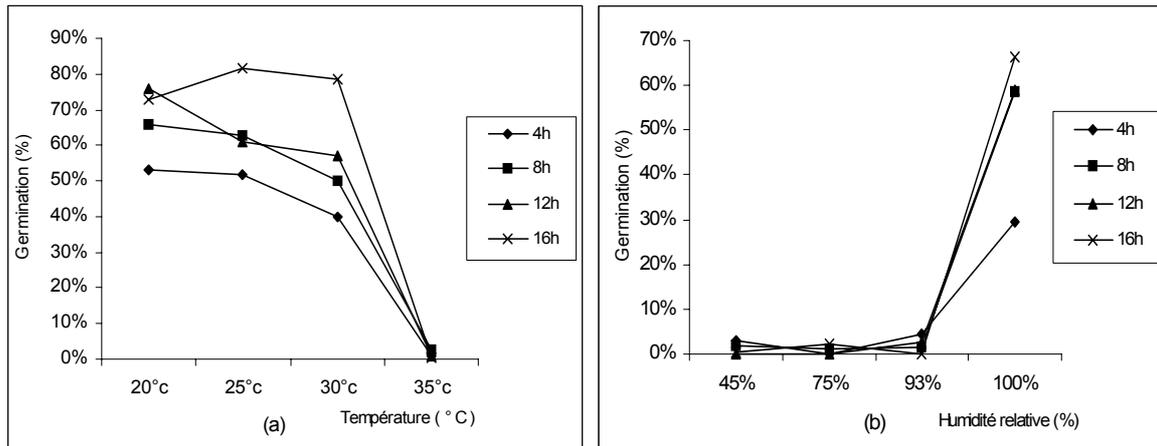
Les taux de mortalité et d'infection chez les insectes conservés à température constante de 25 °C après contamination sont similaires à ceux exposés pendant 12 h à 30 °C le jour et 12 h à 25 °C la nuit. Ceux-ci atteignent 82 % et 83 % de mortalité respectivement et 67 % d'infection (figure 4). Les criquets exposés à 35 °C pendant 12 h puis conservés 12 h à 25 °C ou 20 °C durant la nuit ont subi une mortalité faible au terme de la période d'observation. Aucune infection n'a été mise en évidence ici pendant la durée du test (figure 4).

Statistiquement, les traitements 25 °C et 25-30 °C sont homogènes. Il en est de même pour ceux de 25-35 °C et 20-35 °C. Mais ils diffèrent significativement, au seuil de 5 %, d'un groupe à l'autre au niveau de la mortalité et de l'infection. Signalons, que près de 25 % de mortalité et 17 % d'infection à *Entomophaga grylli*, par rapport au nombre total d'insectes, ont été observés chez les insectes restants mis ensemble en cage au laboratoire, au cours de la semaine ayant suivi la fin de l'expérience.

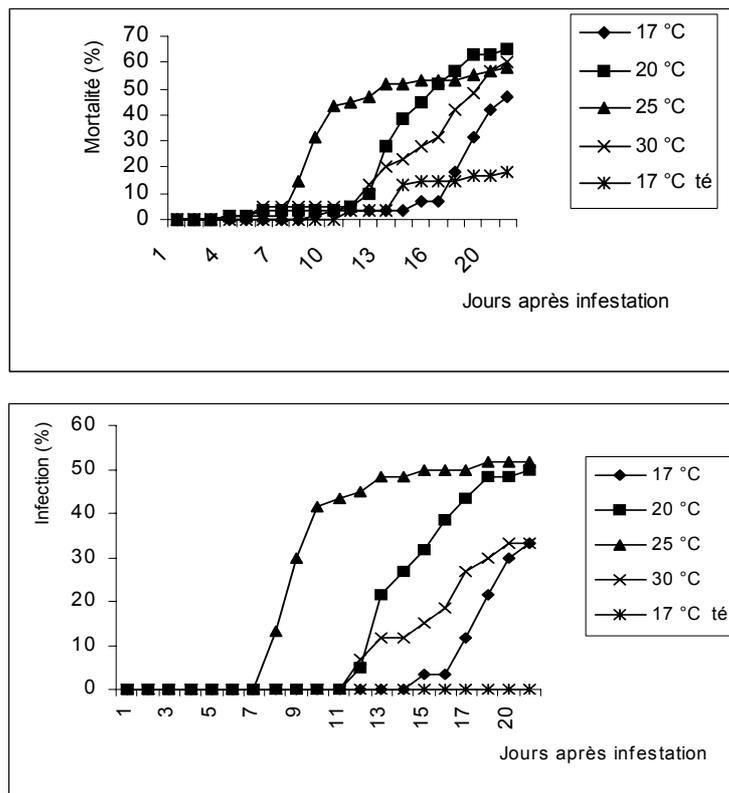
Les résultats de la figure 5 montrent que dix (10) jours après contamination, les insectes exposés pendant 8 h à 35 °C ont un taux de mortalité et d'infection similaire aux témoins non traités et maintenus à 25 °C. Ils sont respectivement de l'ordre de 2 % et 0 %. Les autres insectes maintenus à 25 °C (0 h d'exposition à 35 °C) ou exposés pendant 2 h ou 4 h par jour à 35 °C ont des pourcentages de mortalité de 60 %, 42 % et 35 % et d'infection de 53 %, 40 % et 30 % respectivement (figure 5). L'analyse de variance montre une différence significative et le test de Tukey à 5 % permet de distinguer 3 groupes, à savoir : le témoin et 8 h d'exposition ; 2 h et 4 h d'exposition ; 0 h d'exposition.

Dix huit (18) jours après, les taux de mortalité et d'infection chez les insectes traités, quel que soit le traitement, dépassent 75 % et 68 % respectivement alors qu'ils ne sont que 7 % et 0 % chez le témoin (figure 5).

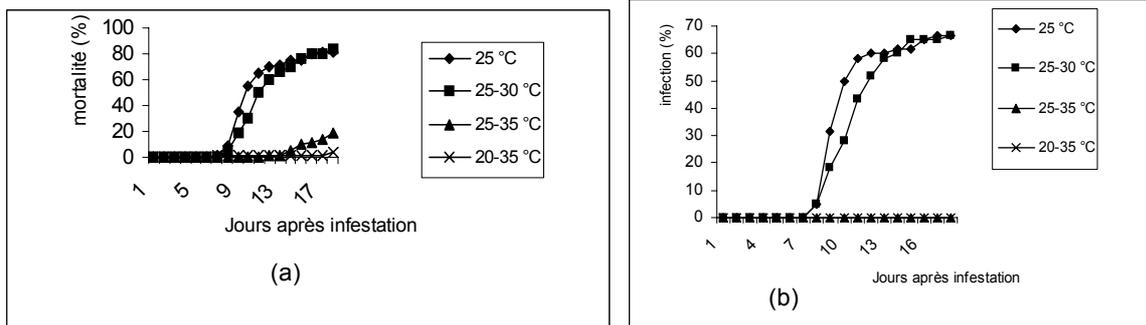
Toutefois, il n'existe pas de différence significative entre les différentes périodes d'exposition. Mais celles-ci diffèrent significativement du témoin.



**Figure 2 :** Germination des conidies de *Entomophaga grylli* en fonction de la température (à saturation) (a) ou de l'humidité relative (à 30 °C) (b).  
*Entomophaga grylli* conidial germination as a function of temperature (at saturation) (a) or of relative humidity (at 30 °C). (b).

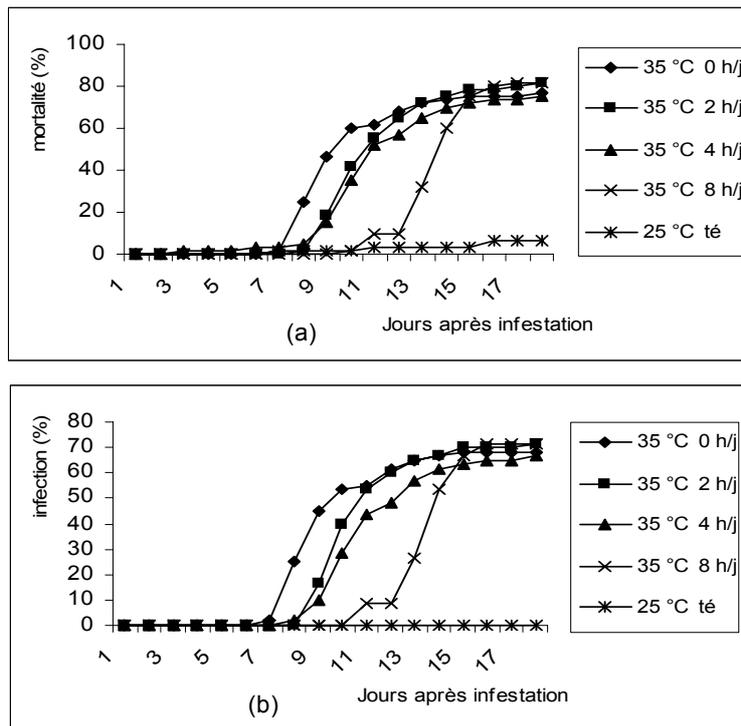


**Figure 3 :** Pourcentages cumulés de mortalité et d'infection de *Zonocerus variegatus* infectés par *Entomophaga grylli* et maintenus à températures constantes.  
*Cumulated percentages of mortality and infection of Zonocerus variegatus infected by Entomophaga grylli and maintained at constant temperatures.*



**Figure 4 :** Effet des températures alternées sur le taux de mortalité (a) et d'infection (b) de *Zonocerus variegatus* par *Entomophaga grylli*.

*Effect of alternated temperatures on mortality (a) and infection (b) rates of Zonocerus variegatus by Entomophaga grylli.*



**Figure 5 :** Effet de l'exposition pendant 0, 2, 4 et 8 h par jour à 35 °C et le reste du temps à 25 °C sur le taux de mortalité (a) et d'infection (b) de *Zonocerus variegatus* par *Entomophaga grylli*.

té : témoin

*Effect of exposition during 0, 2, 4 and 8 h by day at 35 °C and maintained the remain time at 25 °C on the mortality (a) and infection (b) rates of Zonocerus variegatus by Entomophaga grylli.*

té : control

## EFFET DE LA TEMPERATURE SUR LA DUREE DE LA PERIODE D'INCUBATION.

La période d'incubation à 25 °C chez les larves âgées de *Zonocerus variegatus*, estimée sur 113 insectes effectivement morts infectés par

*Entomophaga grylli*, est de  $9,91 \pm 2,16$  jours. Toutefois, elle varie suivant la température (tableau 3).

De même, quand les insectes sont exposés pendant 0, 2, 4 ou 8 h à 35 °C et laissés le reste de la journée à 25 °C, la durée de la période d'incubation croît avec la durée d'exposition à 35 °C (Tableau 4).

**Tableau 3 :** Variation de la durée de la période d'incubation de *Entomophaga grylli* chez *Zonocerus variegatus* à température constante.

*Incubation period variation of Entomophaga grylli in Zonocerus variegatus at constant temperature.*

Températures	Nombre d'insectes observés	Durée moyenne d'incubation (j)
17 °C	20	$18,40 \pm 1,76$
20 °C	30	$14,82 \pm 2,33$
25 °C	31	$9,93 \pm 2,52$
30 °C	20	$15,65 \pm 2,88$

**Tableau 4 :** Variation de la période d'incubation suivant la durée d'exposition à 35 °C.

*Variation of incubation period according to exposition duration at 35 °C.*

Durée de l'exposition à 35°C	Nombre d'insectes	Durée moyenne de l'incubation (j)
0 h	41	$9,53 \pm 1,89$
2 h	43	$10,86 \pm 1,94$
4 h	40	$11,35 \pm 2,11$
8 h	43	$13,72 \pm 1,31$

## DISCUSSION

La contamination par exposition conidienne est en principe une contamination par contact. Les insectes subissent directement un bombardement de spores à partir des cadavres. C'est ce mode de transmission horizontale qui intervient dans la nature au sein des populations acridiennes lors des épizooties dues aux Entomophthorales (Soper et al., 1988 ; Carruthers et Onsager, 1993).

Il est admis que l'infection artificielle des hôtes par les Entomophthorales exige des conditions d'humidité relative de saturation pour, d'une part, permettre la libération des conidies, et d'autre part, assurer l'infection par la germination et la pénétration de l'inoculum. Cela nécessite des dispositifs particuliers (Soper et al., 1988 ; Ramoska et al., 1988 ; Carruthers et al., 1992 ; Steinkraus et Slaymaker, 1994).

Ce mode d'infection présente les avantages suivants. Il favorise et maintient la sporulation chez les cadavres d'insectes ainsi que la germination des spores grâce au dispositif d'incubation. Il assure également un meilleur contact entre les spores et les insectes dans la mesure où les spores projetées atteignent directement les insectes. Par contre, les doses reçues par chaque insecte varient pour un même essai et d'un essai à un autre.

Ceci explique en partie la variation des taux de mortalité et d'infection pour des essais similaires. La longue période d'exposition des insectes aux conidies, en condition saturée (24 h en moyenne) assure la contamination effective des criquets, mais expliquerait en partie les taux élevés de mortalité observée sans infection pour les premiers essais (27,16 %) quand la moyenne de 24 h était souvent dépassée. Cette mortalité est aussi due à des causes naturelles (mues par exemple). Le taux moyen d'infection obtenu (62,28 %) est significatif.

Les infections induites chez les criquets par voie intrahémocoelaire se font par injection du champignon sous forme de protoplastes obtenus à partir des conidies (Macleod *et al.*, 1980). Cette technique d'infection des criquets est largement utilisée depuis longtemps (Ramoska *et al.*, 1988 ; Carruthers *et al.*, 1992). Elle a pour avantage une meilleure maîtrise de la dose contrairement à l'exposition conidienne mais, pour inconvénient, d'éviter au champignon la barrière de l'hôte. Elle induit par conséquent, la maladie à une large gamme d'hôtes que dans le cas des infections par contact.

La méthode d'infection choisie est en définitive fonction de la spécificité du pathogène fongique et de son hôte ainsi que des moyens techniques disponibles.

Les observations en milieu naturel ou au laboratoire sur plusieurs dizaines de *Zonocerus variegatus* tués par le champignon ont montré que la sporulation intervient dans les heures qui suivent la mort des insectes. Elle est, en effet, initiée au cours de la nuit et, de ce fait, perceptible sur la plupart des insectes morts la veille, pour peu que les conditions soient favorables. Les insectes fraîchement tués par le champignon n'exigent pas une humidité relative de saturation avant d'initier leur sporulation, contrairement aux cadavres déjà secs. La taille relativement grande des criquets et leur teneur en eau, juste après la mort, permet l'initiation de la sporulation en conditions d'humidité relative ambiante.

La quantité de spores émises par un individu de *Zonocerus variegatus* reste à estimer. Chez certaines espèces de criquets, elle est évaluée de 1 à plusieurs millions (Carruthers et Onsager, 1993). La rapidité avec laquelle les *Zonocerus variegatus* tués par *Entomophaga grylli* libèrent les conidies est commune chez de nombreux Entomophthorales (Hajek *et al.*, 1990). Il en est de même de l'influence des facteurs abiotiques sur la qualité et la quantité de la sporulation (McDonald et Nolan, 1995).

La germination des conidies primaires est aussi très rapide dans les conditions favorables comme le montre cette étude, puisque le taux de germination est déjà élevé après seulement 4 h d'incubation. C'est aussi le cas des Entomophthorales d'une manière générale (Yendol, 1968 ; Steinkraus et Slaymaker, 1994). La germination des conidies de *Entomophaga*

*grylli* exige des conditions d'humidité relative proches de la saturation. Par contre, elle a lieu à une large gamme de températures. Différents auteurs ont montré, que la germination et la survie des conidies étaient significativement affectées par les conditions environnementales tant sur le plan qualitatif que quantitatif (Yendol, 1968 ; Hajek *et al.*, 1990 ; McDonald et Nolan, 1995). La rapidité de la sporulation et de la germination permet le maintien du champignon en milieu naturel chez les hôtes.

La température (aussi bien les températures constantes que variables), exerce chez *Zonocerus variegatus* un effet important sur l'évolution de la mycose. La température affecte significativement à la fois le taux d'infection et la durée d'incubation de la maladie. Ceci s'explique par le fait, que chaque organisme vivant a une température au delà et en deçà de laquelle son développement est retardé, voire inhibé. La température optimale de développement de *Entomophaga grylli* chez *Zonocerus variegatus* se situe au voisinage de 25 °C. Cette étude montre également, que *Entomophaga grylli* tolère une large gamme de température. Cependant à 35 °C, la germination des spores est presque nulle même à 100 % d'humidité relative, de même que l'infection.

Dans une étude sur l'effet de la température sur le développement de *Entomophaga grylli in vivo* chez l'acridien *Camnula pellucida* et sous forme de protoplaste *in vitro*, Carruthers *et al.*, (1992) ont trouvé une température optimale de développement du champignon à 25 °C et une limite thermique de survie du même champignon autour de 35 °C. Ils ont montré, que la période d'incubation est température dépendante et augmente avec la durée d'exposition aux températures élevées. La présente étude le montre également. Elle montre aussi qu'à partir de la température optimale, la période d'incubation augmente de part et d'autre de celle-ci. Cependant le bon développement observé chez certains champignons à de basses ou à des températures élevées indique une adaptation de ses champignons à leurs conditions climatiques respectives (Butt *et al.*, 1994).

Par ailleurs, il est démontré que certains acridiens comme *Camnula pellucida* utilisent les rayons solaires pour accroître la température de leur corps et la maintenir à 38-40 °C, qui sont les conditions thermiques optimales à leur

propre développement. De telles températures élevées réduisent ou éliminent le champignon à l'intérieur des criquets ainsi que les taux d'infection (Carruthers *et al.*, 1992). L'on peut supposer que ce phénomène se manifeste aussi chez *Zonocerus variegatus*.

## CONCLUSION

Ces résultats ont permis de comprendre un peu plus l'interaction spécifique entre *Entomophaga grylli* et *Zonocerus variegatus*. La possibilité de maîtriser l'infection artificielle des criquets permet de disposer du champignon en dehors des épizooties pour les études. Ces résultats permettent aussi de comprendre un peu plus le

comportement de *Entomophaga grylli* en milieu naturel au sein des populations de *Zonocerus variegatus*. L'introduction d'infestations au sein des populations naturelles dans le cadre d'une lutte biologique peut s'appuyer sur une telle étude.

## REMERCIEMENTS

Nous remercions l'Union Africaine (UA / ex OUA) qui a financé les travaux de cette étude dans le cadre d'une thèse de Doctorat. Nous remercions également l'IITA qui nous a accueilli dans son laboratoire, et qui a donné un complément de moyens logistiques. Toute notre reconnaissance au Professeur BEKON pour la lecture critique du manuscrit.

## REFERENCES

- BUTT (T. M.), HAJEK (A. E.) et (R. A.) HUMBER 1994. The effect of temperature on growth and survival of protoplasts of the gypsy moth pathogen *Entomophaga maimaiga*. J. Invertebr. Pathol., 64 : 74-75.
- CARRUTHERS (R. I.), LARKIN (T. S.) et (H.) FIRSTENCEL 1992. Influence of thermal ecology on the mycosis of a rangeland grasshopper. Ecology, 73 (1) : 190-204.
- CARRUTHERS (R. I.) et (J. A.) ONSAGER 1993. Perspective on the use of exotic natural enemies for biological control of pest grasshoppers (Orthoptera: Acrididae). Environ. Entomol., 22 (5) 885-903.
- CHAPMAN (R. F.), PAGE (W. W.) et (A. R.) McCAFFERY. 1986. Bionomics of the variegated grasshopper (*Zonocerus variegatus*) in West and Central Africa. Ann. Rev. Entomol., 31 : 479-505.
- CHIFFAUD (J.) et MESTRE (J.). 1990. Le criquet puant *Zonocerus variegatus* (Linné, 1758). Essai de synthèse bibliographique. CIRAD-PRIFAS. Département GERDAT, 138 p.
- GOMEZ (K. A.) et GOMES (A. A.). 1984. Statistical procedures in Agricultural Research, 2nd edn. John Wiley et Sons. Inc, New York.
- HAJEK (A. E.), CARRUTHERS (R. I.) et (R. S.) SOPER. 1990. Temperature and moisture relations of sporulation and germination by *Entomophaga maimaiga* (Zygomycetes : Entomophthoraceae), a fungal pathogen of
- Lymantria dispars* (Lepidoptera: Lymantriidae). Environ. Entomol., 19 (1) : 85-90.
- Le GALL (P.), MINGOUOLO (E.) et (G.) BANI. 1998. Diet of *Zonocerus variegatus* (L.) (Orth., Acrididae) in cassava fields in Congo. J. Appl. Entomol., 122 : 9-13.
- LOMER (C. J.), PRIOR (C.) et (C.) KOOYMAN. 1997. Development of *Metarhizium* spp. for the control of grasshoppers and locusts. Memoirs of the Entomol. Soc. of Canada, 171 : 265-286.
- MACLEOD (D. M.), TYRREL (D.) et (M. A.) WELTON. 1980. Isolation and growth of the grasshopper pathogen, *Entomophthora grylli*. J. Invertebr. Pathol., 36 : 85-89.
- McDONALD (D. M.) et NOLAN (R. A.). 1995. Effects of relative humidity and temperature on *Entomophaga aulicae* conidium discharge from infected eastern hemlock looper larvae and subsequent conidium development. J. Invertebr. Pathol., 65 : 83-90.
- ODUOR (G. I.), YANINEK (J. S.), VAN DER GEEST (L. P. S.) et De MORAES (G. J.). 1995. Survival of *Neozygites* cf. *floridana* (Zygomycetes Entomophthorales) in mummified cassava green mites and the viability of its primary conidia. Experimental and Applied Acarology, 19 : 479-488.
- PRIOR (C.) et (D. J.) GREATHEAD. 1989. Biological control of locusts : the potential for the exploitation of pathogens. FAO Plant Prot. Bull. , 37 (1) 37-48.
- RAMOSKA (W. A.), HAJEK (A. E.), RAMOS (M. E.) et (R. S.) SOPER. 1988. Infection of grasshoppers (Orthoptera: Acrididae) by

- members of the *Entomophaga grylli* species complex (Zygomycetes : Entomophthorales). J. Invertebr. Pathol., 52 : 309-313.
- SOLOMON (M. E.). 1951. Control of humidity with potassium hydroxide, sulphuric acid, and other solutions. Bull. Entomol. Res., 42 : 543-553.
- SOPER (R. S.), SHIMAZU (M.), HUMBER (R. A.), RAMOS (M. E.) et (A. E.) HAJEK. 1988. Isolation and characterization of *Entomophaga maimaiga* sp. Nov., a fungal pathogen of gypsy moth, *Lymantria dispar*, from Japan, J. Invertebr. Pathol., 51 : 229-241.
- STEINKRAUS (D.) et SLAYMAKER (P. H.). 1994. Effect of temperature and Humidity on formation, germination, and infectivity of conidia of *Neozygites fresenii* (Zygomycetes : Neozygitaceae) from *Aphis gossypii* (Homoptera : Aphididae). J. Invertebr. Pathol., 64 : 130-137.
- WINSTON (P. W.) et (D. H.) BATES. 1960. Saturated solutions for the control of humidity in biological research. Ecology, 41 (1) : 232-237.
- YENDOL (W. G.). 1968. Factors affecting germination of *Entomophthora* conidia. J. Invertebr. Pathol., 43 : 116-121.