

## PRINCIPALES LÉSIONS HÉMOLYMPHATIQUES OBSERVÉES CHEZ LES LARVES DE *DOCIOTAURUS MAROCCANUS* TRAITÉES SUR TERRAIN PAR LE GREEN MUSCLE®

ARKAM Fatima<sup>1\*</sup>, KARA-TOUMI Fatma Zohra<sup>1</sup>, TAIL-HALIL Ghania<sup>1</sup>, SAIDI Fairouz<sup>1</sup> et AHMED SERIR Billel<sup>2</sup>

1. Université de Blida1, Laboratoire de Biotechnologies, Environnement et Santé, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, BP 270, route de Soumaa, Blida, Algérie.

2. Institut Nationale de Protection des Végétaux, Département de lutte antiacridienne, El-Harrach, Alger-Algérie.

Reçu le 24/08/2017, Révisé le 04/12/2017, Accepté le 31/12/2017

### Résumé

**Description du sujet :** Dans le cadre de la lutte biologique, le Green muscle®, *Metarhizium anisopliae* var. acridum, est testé sur les larves de 3<sup>e</sup> et 4<sup>e</sup> stade de criquet marocain dans un foyer grégaire, la région Marhoum, au Nord-Ouest de l'Algérie.

**Objectifs :** Cette étude vise l'identification d'éventuels lésions hémolymphatiques par les observations microscopiques chez les individus traités au biopesticide.

**Méthodes :** Les traitements sont réalisés en Ultra-Bas-Volume avec trois formulations huileuses dont les concentrations sont  $2,5 \times 10^{12}$ ,  $1,25 \times 10^{12}$ , et  $6,25 \times 10^{11}$  conidies. Des larves de 4<sup>e</sup> stade sont collectées à partir des enclos de terrain témoins et traités le 3<sup>e</sup> et le 5<sup>e</sup> jour après pulvérisation. L'hémolymph est prélevé pour la mise en culture et la réalisation des frottis sanguins.

**Résultats :** Le champignon entomopathogène colonise l'hémolymph de l'hôte dès le 3<sup>e</sup> jour après traitement et exerce un effet cytopathologique sur les hémocytes. Cet effet se traduit par l'apparition des altérations structurales et affecte l'hémogramme par la diminution du nombre moyen total et différentiel des plasmocytes, prohémosocytes et granulocytes.

**Conclusion :** Les altérations observées dépendent des concentrations appliquées et induisent, probablement, des changements dans les défenses antimicrobiennes entraînant la mort des criquets par septicémie.

**Mots clés :** Lutte biologique, *Metarhizium anisopliae*, Criquet marocain, Hémolymph.

## PRINCIPAL HEAMOLYMPH LESIONS OBSERVED IN THE NYMPHS OF *DOCIOTAURUS MAROCCANUS* TRAITED ON GROUND BY THE GREEN MUSCLE®

### Abstract

**Description of the subject:** Within the framework of the biological fight, The Green muscle®, *Metarhizium anisopliae* var. acridum is tested on the nymphs of the Moroccan locust, 3<sup>rd</sup> and 4<sup>th</sup> instar, in a gregarious area, the region Marhoum, North-western of Algeria.

**Objectives:** This study aims at the identification of possible Haemolymph lesions by the microscopic observations at the individuals treated with the biopesticide.

**Methods:** The treatments were carried out in Ultra-Low-Volume with three oily formulations whose concentrations are  $2.5 \times 10^{12}$ ,  $1.25 \times 10^{12}$  and  $6.25 \times 10^{11}$  conidia. The 4<sup>th</sup> instar nymphs are collected from the control and the treated enclosures of ground on the 3<sup>rd</sup> and the 5<sup>th</sup> day after spraying. The haemolymph is taken for the setting in culture and the realization of the blood smears.

**Results:** The entomopathogenic fungus colonizes the haemolymph of the host since the third day after treatments and exerts a cytopathologic effect on the haemocytes. This effect results in the appearance of structural deteriorations and affects the haemocyte's count by the reduction in the total and differential median number of the plasmocytes, prohaemocytes and granulocytes.

**Conclusion:** The deteriorations observed depend on the concentrations applied and, probably, induce changes in antimicrobial defenses resulting in the death of the locusts by septicemia.

**Keywords:** Biological fight, *Metarhizium anisopliae*, Moroccan locust, Heamolymph.

\* Auteur correspondant : ARKAM Fatima, E-mail : [fatima.arkam@yahoo.fr](mailto:fatima.arkam@yahoo.fr)

## INTRODUCTION

Au niveau des haut plateaux Algérien, des pertes importantes de récolte inquiètent tous les acteurs de la filière agricole ; parmi les causes la pression du criquet marocain, *Dociostaurus maroccanus* (Thunberg, 1815) (*Acrididae*, *Gomphocerinae*). C'est un ravageur polyphage, peut s'attaquer aux céréales, aux cultures maraichères et à l'arboriculture fruitière. Les dommages seraient dus surtout aux jeunes stades larvaires [1]. En Algérie, les invasions du criquet marocain se font plus rares ces dernières années. Cette situation résulte largement d'une meilleure connaissance du problème associée à l'apparition de nouveaux moyens de surveillance et de lutte [2]. La pulvérisation en Ultra-Bas-Volume est la technique la plus performante de transférer efficacement un faible volume d'insecticide à sa cible [3]. La lutte chimique a largement contribué à éviter le pire des invasions. Cependant, cette pratique a alourdi le bilan environnemental par l'intoxication de l'homme, du bétail et la destruction de la faune utile et des insectes auxiliaires [4 ; 5]. Les micro-organismes entomopathogènes jouent un rôle important dans la régulation naturelle des populations des insectes [6 ; 7]. *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* (code IMI: 300189) dont le nom commercial est le Green muscle<sup>®</sup>, retrouvé sur *Ornithacris cavroisi* (Finot, 1907) (Orthoptera, Cyrtacanthacridinae) au Niger, s'est avéré le plus virulent [8]. L'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) a identifié le *Metarhizium* comme agent viable de la lutte alternative et l'a placé dans la liste des produits recommandés pour le contrôle des locustes [7]. Ce microchampignon a l'aptitude d'infecter l'hôte par ingestion ou par simple contact rendant tous les stades, œuf, larve et adulte sensibles [9]. La colonisation de l'hôte se fait lorsque le champignon parvient à surmonter les mécanismes immunitaires de défense de l'insecte et envahit l'hémolymphe. Le pathogène se multiplie dans l'insecte, causant des dommages par destruction des tissus, entraînant la mort de l'hôte par septicémie ou par toxémie [10]. L'introduction des particules étrangères peut perturber l'hémogramme des insectes [11]. Cette perturbation peut se traduire soit par l'augmentation du nombre de cellules soit par sa diminution [12].

A ce titre, il est évident que les hémocytes et leurs nombres dans l'hémolymphe jouent un rôle important dans l'indication de l'état physiologique général de l'insecte. Par ailleurs, la plupart des études de terrain sur le Green muscle<sup>®</sup> ont principalement focalisé sur les taux de mortalité et d'efficacité des traitements. Notre étude constitue une première dans la recherche de l'effet de *M. anisopliae* var. *acridum* sur le fonctionnement hématologique des criquets marocains en milieu naturel. C'est dans ce cadre que ce travail s'inscrit. Son objectif principal est de contribuer aux efforts menés par la FAO afin de promouvoir l'utilisation précoce de Green muscle<sup>®</sup> sur les premiers stades larvaires des criquets. Nous avons choisi de mettre en lumière, les altérations provoquées sur l'hémolymphe des larves de *D. maroccanus* traitées dans les conditions naturelles.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 1. Lieu et cible de l'expérimentation

Nous avons conduit les traitements en milieu naturel de la région Marhoum, située au Sud-Est de la Wilaya de Sidi-Bel-Abbes (Nord-Ouest de l'Algérie) (Fig. 1). La station choisie se localise aux points, latitude 34°26'45.61" Nord et longitude 00°11'42.08" Ouest, caractérisée par un climat semi-aride, froid en hiver et frais à chaud en été. La période sèche est généralement supérieure à 7 mois, d'avril à octobre. La station d'étude est une zone jachère caractérisée par un sol sableux limoneux et une végétation peu dense composée essentiellement par des steppes à alfa, *Stemona tenacissima*, des légumineuses et des graminées. Le relief est très aéré, peu élevé et assez uniforme. Cette région est un des foyers grégariques de *D. maroccanus* [13 ; 14], répertoriée par l'Institut Nationale de Protection des Végétaux d'El-Harrach-Alger (INPV). Nous avons effectué les traitements le 30 avril 2016, entre 8h05 et 9h15 sur des populations larvaires de 3<sup>e</sup> et de 4<sup>e</sup> stade (L3 et L4), naturellement présentes dans leur biotope. Nous avons noté les mesures des conditions météorologiques avant et après traitement. La température et l'humidité ont varié entre 15,7°C et 18°C et entre 44,4% et 51,8% respectivement, mesurées à l'aide d'un capteur psychromètre digital de type EP8707. La vitesse du vent est enregistrée par un ventilomètre de type KESTREL 2000, varie entre 5 et 5,3 m/s.

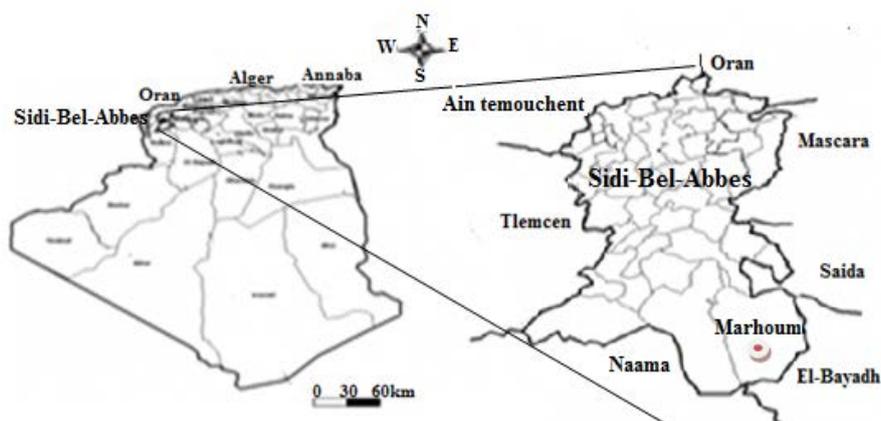


Figure 1. Localisation du site expérimental ● Site d'étude

## 2. Préparation des inoculums du traitement

Un test de germination est effectué au laboratoire pour évaluer la qualité de Green muscle® avant application sur terrain. Le test décrit et utilisé par Atheimine *et al.* [15]. Nous avons trouvé que 78,33% de conidies sont viables. D'après le manuel d'utilisation, si le taux de germination est  $\geq 70\%$ , maintenir la dose recommandée à 50 g/ha contenant environ  $2,5 \times 10^{12}$  conidies. Nous avons choisis cette dernière comme la forte concentration. Nous avons testé également deux doses plus faibles à 25 g/ha ( $1,25 \times 10^{12}$  conidies) et à 12,5 g/ha ( $6,25 \times 10^{11}$  conidies). Le Green muscle présente une formulation «OF», il s'agit d'une suspension concentrée, fluide et miscible à l'huile. Les inoculums sont préparés le jour même du traitement. Pour chaque essai, nous avons mélangé le poids en g de la poudre sèche de spores avec 200 ml d'huile de tournesol. Cette huile végétale est choisie comme un solvant organique pour notre formulation. Après agitation pendant une demi-heure, nous avons complété le volume d'huile jusqu'à 2l dans le réservoir de pulvérisateur.

## 3. Dispositifs expérimentaux et méthode de traitement

Quatre parcelles de 2500 m<sup>2</sup> sont délimitées avec des balises. Dans chacune des parcelles, nous avons installé trois enclos de terrain de 9 m<sup>2</sup> chacun selon la présence des taches larvaires. Nous avons délimité les enclos par un film en plastique transparent,

entouré sur des piquets en fer de 0,5 m de hauteur et bien enfoncés dans le sol pour empêcher la fuite des larves. Nous avons espacé les trois parcelles traitées l'une de l'autre d'au moins 500 m et la parcelle témoin de plus de 800 m.

La méthode d'application de Green muscle® est conforme aux normes décrites par l'Organisation Européenne et méditerranéenne pour la Protection des Plantes (OEPP). La pulvérisation est faite en Ultra-Bas-Volume (UBV) par un Micronaire (AU 8115) monté sur un véhicule léger (Pick-up 4x4). Nous avons pulvérisé 0,5 l de chaque inoculum préparé pour le traitement de parcelle de 2500 m<sup>2</sup>. Le réservoir et les conduits de pulvérisation sont bien rincés entre les trois traitements appliqués. L'appareil est calibré pour un écoulement de produit de 0,7 l/min (le débit). L'espacement entre les passes de pulvérisation (E) choisie à 30 m. Le volume total de l'inoculum dans le pulvérisateur (V.T) est 2 l. La vitesse d'avancement du véhicule (V) est calculée à 7 km/h avec la formule suivante :

$$\text{Débit (l/min)} = \frac{V \text{ (km/h)} \times E \text{ (m)} \times VT \text{ (l)}}{600}$$

Nous avons placé des piquets dans les parcelles traitées, distancés de 5m et disposés perpendiculairement au passage du véhicule de traitement. Sur les piquets, nous avons placé une rangée de papiers oléosensibles à une hauteur de 50 cm du sol. Les papiers sont retirés une heure après traitement. Sous une loupe graduée, la qualité de la pulvérisation est estimée par le dénombrement et la mesure des diamètres des gouttelettes déposées sur les papiers et comparée aux normes [16;17].

#### 4. Collecte des larves et prélèvement de l'hémolymphe

Nous avons capturé des larves de 4<sup>e</sup> stade le 3<sup>e</sup> et le 5<sup>e</sup> jour après traitements à partir des enclos de terrain installés dans les parcelles traitées et témoin. Selon la méthode de Guzo et Stoltz [18] et Mahamat *et al.* [19], nous avons prélevé l'hémolymphe à proximité d'un bec Bunsen pour éviter sa coagulation. L'individu est immobilisé entre le pouce et l'index puis on introduit une micro seringue sous le pronotum entre la patte postérieure et le thorax. L'incision permet de prélever 5 $\mu$ l d'hémolymphe fraîche. Nous avons procédé à l'observation macroscopique des échantillons d'hémolymphe (aspect de la coloration). Nous avonsensemencé de l'hémolymphe frais dans le milieu de culture PDA à fin de vérifier la présence du champignon dans l'hémolymphe et de ré-isoler les spores de *M. anisopliae*. Les cultures sont incubées à 25°C pour la fructification du champignon.

#### 5. Effet de *Metarhizium anisopliae* sur l'hémogramme des larves L4 de *Dociostaurus maroccanus*

L'étude de l'effet du biopesticide sur l'hémogramme des insectes témoins et traités nécessite la réalisation des frottis sanguins et le comptage du nombre total et différentiel des hémocytes. Selon la méthode de Guzo et Stoltz [18] le frottis sanguin se réalise comme suit : nous avons saigné rapidement les 5 $\mu$ l d'hémolymphe fraîche prélevés sur une lame de verre propre. Nous avons étalé en couche mince par tirage à la deuxième diapositive à travers le premier à 45°. Les lames sont séchées à l'air libre, puis colorées au May-Grünwald Giemsa (MGG). Pour la conservation des frottis on réalise un montage entre lame et lamelle on appliquant une fine couche du liquide de Faune. Les observations microscopiques sont réalisées avec un objectif micrométrique et un dispositif de prise de photos au grossissement  $\times 400$  et  $\times 800$ .

L'hémogramme est étudié en fonction des doses appliquées (50 g/ha, 25 g/ha et 12,5 g/ha) et en fonction du temps après pulvérisation (le 3<sup>e</sup> et le 5<sup>e</sup> jour). Le comptage des différents types d'hémocytes est facilité à l'aide des compteurs manuels. Tous les champs de la lame en verre ont été observés et

les hémocytes sont comptées on effectuant des passages de champs successifs. Trois lames sont étudiées pour chaque cas et le comptage est refait trois fois pour chaque lame.

#### 6. Analyse statistique

Nous avons rapporté les résultats sous forme de moyennes  $\pm$  écarts types. Les moyennes sont comparées par le test de l'analyse de la variance (ANOVA) via le logiciel IBM-SPSS-Statistics version 20 (Statistic Package for the Social Science) à un niveau de probabilité de 5%. Suivi par le test de Student Newman et Keuls (SNK) pour déterminer les groupes homogènes à  $\alpha= 0,05$

## RÉSULTAT

#### 1. Aspect macroscopique et cultural de l'hémolymphe des larves de *Dociostaurus maroccanus*

Les hémolymphe prélevés des larves témoins, collectés dans un micro-tube Eppendorf, ont montré une coloration jaune claire. Cependant, un changement de couleur a affecté l'hémolymphe des larves traitées par green muscle. Le changement s'est traduit, 96 heures après traitement à 50 g /ha, par une coloration verte foncée (Fig. 2a).

Chez les témoins, nous avons remarqué l'absence totale de sporulation du champignon sur les cultures de l'hémolymphe. L'hémolymphe prélevée à partir des larves traitées mis en culture révèle, après 5 jours d'incubation, la fructification du champignon. Ainsi, de petites colonies verdâtres entourées d'un feutrage blanc sont bien visibles (Fig. 2b). Après 20 jours d'incubation, le mycélium a proliféré encore et a envahi la totalité du milieu de culture (Fig. 2c). L'identification macroscopique des cultures (le type de fructification et la coloration des colonies) et microscopique par observation sur lame (l'aspect du mycélium, la forme des conidies et des hyphes) nous ont permis d'identifier la souche *Metarhizium anisopliae* var. *acidum*. La culture suggère le passage des spores dans la circulation interne des larves traitées dès le 3<sup>e</sup> jour suivant l'infection pour les tous les échantillons d'hémolymphe prélevés. Le repiquage de l'hémolymphe des larves traitées sur le milieu PDA a permis le ré-isolément des spores du champignon entomopathogène.

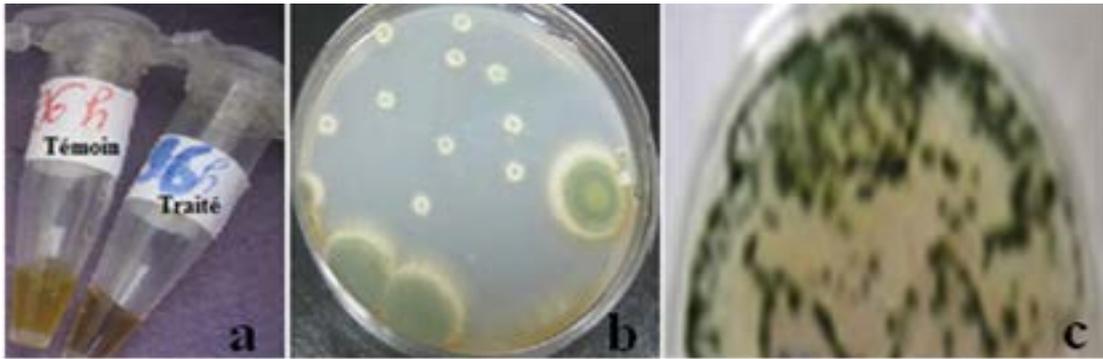


Figure 2: Aspect macroscopique de *M. anisopliae* mise en culture sur l'hémolymphe des larves traitées  
 (a) Coloration de l'hémolymphe des larves témoins et traitées avec le Green muscle à 50 g/ha.  
 (b) et (c) : Fructification de *M. anisopliae* sur le milieu PDA après mise en culture de l'hémolymphe des larves  
 - traitées à 50 g/ha. Culture âgée de 5 jours (b), culture âgée de 20 jours (c).

## 2. Étude microscopique des frottis sanguins

L'examen microscopique des frottis colorés nous a permis d'observer différentes catégories de cellules hémolymphatiques. La variabilité de la taille et de la forme de ces cellules, nous a permis de déterminer uniquement trois d'entre elles, selon la littérature [20 ; 21 et 12], aussi bien chez les larves témoins que chez les traitées.

- **Les plasmocytes (leucocytes)**, cellules hautement polymorphes, arrondies, ovales ou souvent fusiformes, caractérisées par un noyau rond, ovoïde, ou allongée et étirée d'assez grande dimension et située en position médiane. Le cytoplasme n'est relativement abondant que dans les deux zones apicales de la cellule renferment des vacuoles et des globules denses généralement arrondis.

- **Les prohémostocytes**, la forme petite, arrondie ou légèrement ovoïde et la pauvreté en éléments cytoplasmiques mettent en évidence le caractère relativement mal différencié de ces cellules. Les noyaux sont volumineux, arrondies et occupent une position centrale ou excentrique, le cytoplasme est homogène et occupe une zone étroite autour du noyau.

- **Les granulocytes**, cellules relativement volumineuses, rondes ou ovales avec de grands noyaux, occupant généralement une position centrale. Le cytoplasme est caractéristique, dense par sa richesse en organites cellulaires et rempli de nombreuses grandes granules basophiles.

En comparaison avec les images des frottis sanguins observées chez les larves témoins (Fig. 3A, B et C), les photomicrographies observées chez les larves traitées avec le Green muscle révèlent la présence des spores et des hyphes de *M. anisopliae* dans l'hémolymphe des L4 de *D. maroccanus*. Les conidies sont observées à partir du 3<sup>e</sup> jour après traitement à différentes doses et sont soit libres ou en chaînes (Fig. 3E, F, H et I).

Nous avons observé des images de mitose cellulaire (cytokinèse) le 3<sup>e</sup> jour suivant l'infection ce qui suggère une activité hématopoïétique (Fig. 3F). Des hémocytes en mitose sont également observées chez les larves témoins (Fig. 3C).

Les frottis sanguins des larves traitées révèlent d'importantes altérations structurales au niveau des hémocytes totalement absentes chez les individus témoins. Les cellules atteintes présentent un aspect rétracté, dense et diffus et ont tendance à se regrouper pour former des amas (Fig. 3D, E, G et H). Des plasmocytes sont regroupés autour des spores de *M. anisopliae*. Ces cellules peuvent émettre des extensions filamenteuses ou la membrane cytoplasmique émet des invaginations d'endocytose appelées pseudopodes (Fig. 3E, G et I). Nous avons observé la libération des granules de sécrétion par les granulocytes (Fig. 3E et H). Nos résultats reflètent également l'influence de la dose et du temps post-infection sur l'importance des altérations observées.

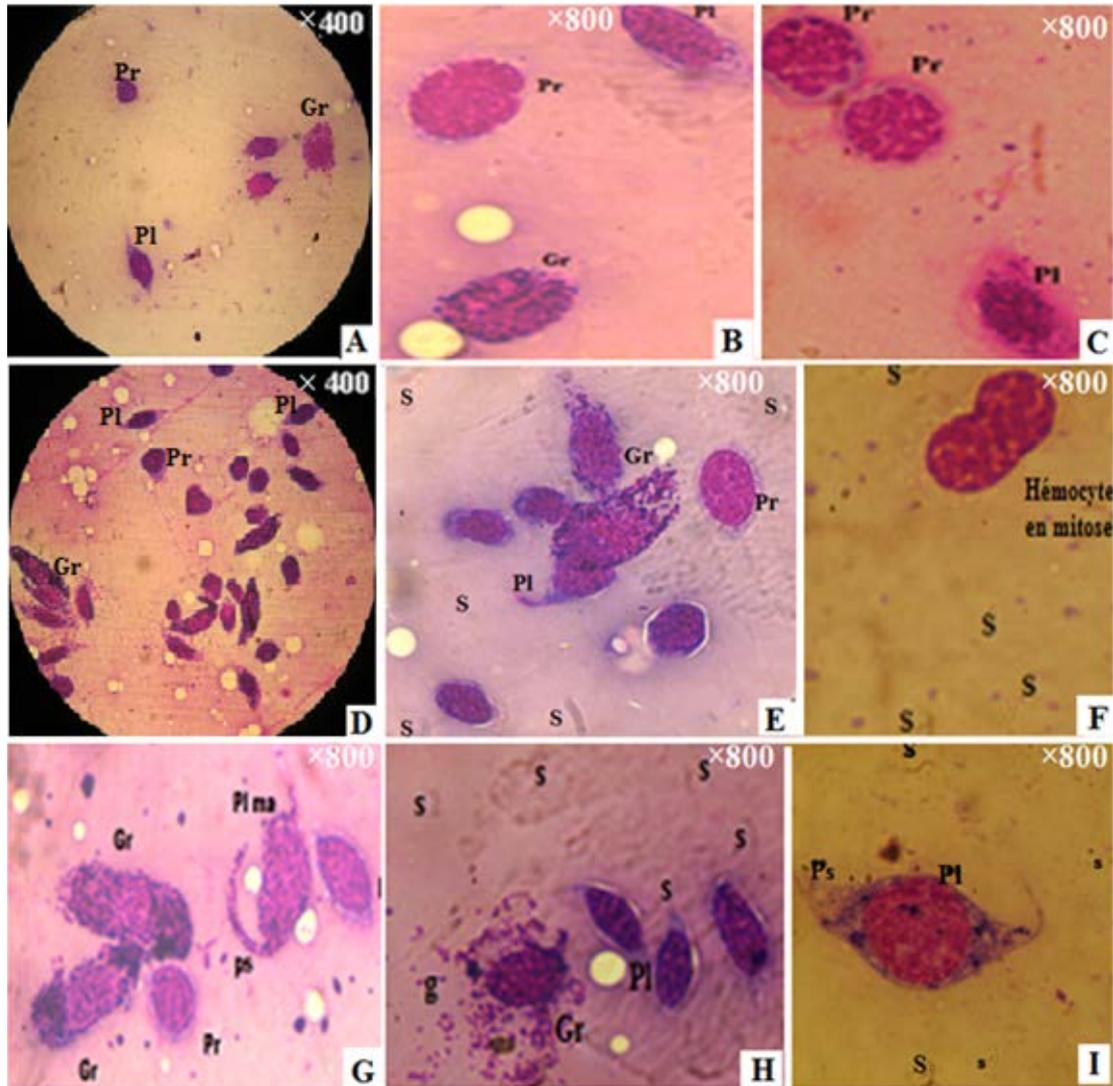


Figure 3: Observations microscopiques des frottais sanguins des L4 de *Doclostaurus maroccanus*

(A, B et C) : chez les larves témoins. (D, E et F) : chez les traitées au *M. anisopliae* à 50 g/ha le 3<sup>e</sup> jour après traitement. (G, H et I) : chez les larves traitées au *M. anisopliae* à 25 g/ha le 5<sup>e</sup> jour après traitement. Coloration MGG. Pl : plasmocyte ; Pr : prohémocyte ; Gr : Granulocyte ; g : granules de sécrétion ; ps : pseudopode ; Pl ma : Plasmocytes macrophage ; S : spores de *M. anisopliae*

### 3. Effet des traitements au *Metarhizium* sur l'hémogramme des larves de *Doclostaurus maroccanus*

Nous avons compté le nombre total des trois types d'hémocytes identifiées ainsi que le nombre et le taux relatif à chaque catégorie de cellule dans les 5µl d'hémolymphe prélevée le 3<sup>e</sup>, et le 5<sup>e</sup> jour après traitements. Les résultats obtenus sont énumérés dans le tableau 1. Les nombres totaux et différentiels des trois catégories d'hémocytes montrent des diminutions par rapport au témoin et en fonction de la dose appliquée. Quant à la différence entre les deux intervalles de temps,

nous avons remarqué que les chutes enregistrés le 5<sup>e</sup> jour sont plus importantes que ceux enregistrés le 3<sup>e</sup> jour. L'analyse de variance à deux critères de classification représentée par les facteurs doses appliquées et temps après infection, nous a révélé qu'il existe un effet hautement significatif des traitements, sur les nombres moyens totaux et différentiels des hémocytes pour les combinaisons par paires entre témoin et traité au 3<sup>e</sup> jour et au 5<sup>e</sup> jour après traitement ( $p < 0,01$ ). Les nombres totaux des hémocytes comptées révèlent, par le test S.N.K, trois sous-ensembles homogènes : (témoin), (50 g/ha, 25g/ha) et (12,5 g/ha) le 3<sup>e</sup> jr suivant l'infection et montrent quatre sous-ensembles (témoin), (50 g/ha), (25g/ha) et (12,5 g/ha) le 5<sup>e</sup> jr après traitement.

Les taux moyens des prohémoctes, des plasmatoctes et des granulocytos pour les trois traitements appliqués montrent des variations non significatives par rapport au témoin ( $p > 0,05$ ) le 3<sup>e</sup> et le 5<sup>e</sup> jour après

traitement. Dans tous les cas étudiés, le taux le plus élevé est celui des plasmatoctes, suivi par celui des prohémoctes et puis le taux des granulocytos.

Tableau 1: Nombres moyens totaux et différentiels des trois catégories d'hémocytes dans 5 ml d'hémolymphe chez les L4 de criquet marocain traités au *M. anisopliae* à différentes doses

		Nombre		Plasmocyte		Prohémoctes		Granulocyte	
		Total	Nombre	Taux (%)	Nombre	Taux	Nombre	Taux(%)	
<b>Témoin</b>		456 ± 5,65 (a) (a')	180,5 ± 6,36 (a) (a')	39,58 ± 0,32	153,5 ± 9,19 (a) (a')	33,66 ± 2,27	122 ± 4,24 (a) (a')	26,75 ± 0,23	
<b>12,5 g/ha</b>	<b>3<sup>e</sup> jr</b>	212,5 ± 20,50 (b)	86 ± 7,07 (b)	40,47 ± 0,58	77 ± 12,72 (b)	36,23 ± 2,50	49,5 ± 0,70 (b)	23,29 ± 1,92	
	<b>5<sup>e</sup> jr</b>	143,5 ± 4,94 (b')	52,5 ± 3,53 (b')	36,58 ± 1,20	50 ± 1,41 (b')	34,84 ± 2,18	41 ± 2,82 (b')	28,57 ± 0,98	
<b>25g/ha</b>	<b>3<sup>e</sup> jr</b>	172,5 ± 3,53 (c)	74,5 ± 4,94 (b) (c)	43,18 ± 1,98	63 ± 4,24 (b)	36,52 ± 1,70	35 ± 5,65 (c)	20,29 ± 3,69	
	<b>5<sup>e</sup> jr</b>	105 ± 1,41 (c')	43 ± 4,24 (b')	40,95 ± 3,48	36 ± 1,41 (c')	34,28 ± 0,88	26 ± 4,24 (c')	24,76 ± 4,37	
<b>50 g/ha</b>	<b>3<sup>e</sup> jr</b>	143 ± 4,24 (c)	60 ± 4,24 (c)	41,95 ± 1,72	51 ± 4,24 (b)	35,66 ± 1,90	32 ± 4,24 (c)	22,37 ± 3,63	
	<b>5<sup>e</sup> jr</b>	51,5 ± 0,70 (d')	23,5 ± 4,94 (c')	45,63 ± 8,98	16,5 ± 2,12 (d')	32,03 ± 4,55	11,5 ± 2,12 (d')	22,33 ± 4,42	

Valeurs en moyennes ± écart type. Le nombre en cellules comptées/ 5µl d'hémolymphe; Les groupes homogènes (a, b, c) et (a', b', c' et d') respectivement pour le 3<sup>e</sup> et le 5<sup>e</sup> jour suivant le traitement avec le Green muscle.

## DISCUSSION

L'infection de l'hémolymphe des larves de *D. maroccanus* traitées en milieu naturel par le Green muscle à différentes concentrations, 12,5 g/ha, 25 g/ha et 50 g/ha, s'est traduite par des perturbations cytologiques de l'hémolymphe que nous avons étudié sur le plan qualitatif et quantitatif. Au 3<sup>e</sup> jour après traitement à 50 g/ha, le changement de couleur de l'hémolymphe des criquets traités par rapport aux individus non traités suggère le passage important des spores de *M. anisopliae* dans la circulation interne. La culture de l'hémolymphe et l'observation microscopique des frottis confirment la présence des hyphes et des amas de spores du champignon dans la circulation interne des larves traitées. De même Bidochka *et al.* [22], ont observé chez des locustes des hémocytes regroupés autour des spores de champignon 24h après traitement. Nous avons détecté également des altérations structurales marquées au niveau des hémocytes. La présence du champignon est apparue pour stimuler l'agrégation des cellules au cours des premiers jours de la mycose.

Plusieurs chercheurs ont noté des observations similaires, on cite les cas de *Locusta migratoria* traités avec deux champignons entomopathogènes, *Beauveria bassiana* et *Metarhizium flavoviride* [23] et [24] et lors des traitements de criquet pèlerin au *M. anisopliae* et au *B. bassiana* [25]. Vey *et al.* [26], signalent que des hémocytes présentent de fortes altérations structurales conséquentes à l'infection des insectes *Lymantria dispar* et *Bombyx mori* par *M. anisopliae*. Latchininsky et Launois-Luong [27] ont montré que des criquets marocains sont morts intoxiqués par des toxines produites par les blastospores de *B. bassiana* qui se sont multipliées dans l'hémocœle.

Concernant l'hémogramme, nous avons noté, pour les trois traitements appliqués, des chutes importantes en nombres moyens totaux des hémocytes. Le dénombrement des hémocytes baisse en fonction des concentrations en spores accumulées dans l'hémolymphe des insectes et en fonction du temps après infection. Nous avons constaté également que les traitements fongiques ont sévèrement diminué les nombres des plasmatoctes, des prohémoctes et des granulocytos. Ces chutes sont plus sévères le 5<sup>e</sup> jour suivant l'infection.

Chez les insectes, le système immunitaire implique à la fois les facteurs cellulaires et humoraux qui forment ensemble une défense efficace contre les organismes envahisseurs [28 ; 29]. Les réactions cellulaires impliquent les hémocytes qui participent à la phagocytose, la nodulation et l'encapsulation [30 ; 29]. Nos résultats concordent avec ceux d'Amouriq [31] et Kooyman [32] qui ont montré que le développement des hyphes de *M. anisopliae* peut être observé dans l'hémolymphe des criquets à partir du 3<sup>e</sup> jour d'inoculation. Ce développement commence à s'intensifier à partir du 4<sup>e</sup> jour accompagné d'une réduction considérable du nombre des hémocytes. Nos résultats vont dans le même sens que ceux de plusieurs auteurs après traitements des criquets avec des micro-organismes entomopathogènes [25 ; 24 ; 33 ; 34 et 35]. La même situation a été signalée par Moussa [36] chez *L. migratoria* traité par l'huile de Neem. La diminution de l'hémogramme est également observée en réponse aux traitements par des entomopathogènes chez d'autres ordres d'insectes. On cite les exemples de *Anacridium aegyptium* traité par *B. bassiana* et par *M. flavoviride* [37] et *Thaumetopea pityocampa* suite au traitement par *Bacillus thuringiensis* [38] et chez *agrotis segetum* traité par *Bacillus melolonthae* [31]. Gillespie *et al.* [39] annonce que *M. anisopliae* colonise l'hémolymphe de *S. gregaria* deux jours après traitement et suggère que l'infection s'est produite en deux étapes : pendant la première phase (les deux premiers jours) il y avait une augmentation du nombre total des hémocytes. Ceci suggère l'activation de l'hématopoïèse. La seconde étape s'est produite quand les spores du champignon sont entrées en masses dans l'hémocœle et ont réplié intensivement (3 à 4 jours après inoculation), cette étape est caractérisée par des baisses en nombres de toutes les catégories des hémocytes. La diminution du nombre des hémocytes peut être expliquée par leur intervention dans le processus de défense immunitaire humorale et cellulaire ainsi qu'à l'épuisement des phagocytes (plasmocytes et granulocytes) suite à la phagocytose contre les spores et les toxines de l'entomopathogène. En effet, le champignon évite les défenses immunitaires de l'hôte en détruisant préférentiellement les pro-hémocyte et les plasmocytes [40]. Les spores adhèrent à la surface des plasmocytes qui émettent des pseudopodes pour phagocyter les particules fongiques.

De telles caractéristiques sont celles des «plasmocytes macrophages» décrits par Brehelin et Zachary [41] chez *L. migratoria* par analogie avec les macrophages des vertébrés. Il est évident que lorsque le système immunitaire est très stimulé par le champignon, l'impact de la défense cellulaire de l'hôte vis-à-vis du *Metarhizium* est minimal puisque les hémocytes demeurent peu attachés aux particules fongiques d'où la réduction de la fonction phagocytaire après le 3<sup>e</sup> jour de l'infection.

## CONCLUSION

A la lumière de ces résultats, il s'avère que l'activité fongique de Green muscle<sup>®</sup> a confirmé ses potentialités acridicides ; *Metarhizium anisopliae* exerce un effet cytopathologique affectant l'hémolymphe des larves de *Dociostaurus maroccanus* traitées en milieu naturel. Cet effet se traduit par l'apparition des altérations cyto-architecturales, la perturbation de l'hémogramme et diminue, probablement, les défenses antimicrobiennes des criquets. La virulence du *M. anisopliae* dépend de la concentration en spores qui envahit l'hémolymphe et s'est montré efficace du moment que ce champignon entomopathogène a échappé à la barrière phagocytaire du système immunitaire des individus traités.

## REMERCIEMENTS

Notre travail de recherche a été fait en collaboration avec l'Institut Nationale de Protection des Végétaux (I.N.P.V.) d'El-Harrach, Algérie. Nos remerciements vont à Monsieur le Docteur LAZAR M. chef de département de la lutte antiacridienne et à toute l'équipe de prospection et de lutte pour leurs disponibilité et pour nous avoir gracieusement fourni le Green muscle et tout le matériel de traitement et de nous avoir aidé à l'installation des dispositifs expérimentaux et au suivi des essais.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1].Chaouch, A. (2009). États phasaire de *Dociostaurus maroccanus* (Thunberg, 1815) (*Acrididae*, *Gomphocerinae*) Effets de deux champignons entomopathogènes, *Beauveria bassiana* (Balsamo) et *Metarhizium anisopliae* var. *acidum* sur quelques

- paramètres biophysiques. Thès. Mag., Ecol. Nat. Sup. Agr, El-Harrach. 107p.
- [2]. **INPV. (2013).** *Bilans des campagnes nationales de lutte contre le criquet marocain.* Institut National de Protection des Végétaux. 25p.
- [3]. **Bateman R.P. (1993).** Simple standardized methods for recording droplet measurements and estimation of deposits from controlled droplet application. *Journal of Crop Protection* 12: 201-206.
- [4]. **Launois-Luong M.H., Launois M. et Rachadi T. (1988).** *La lutte chimique contre les criquets du Sahel.* Éd. Dehan, CIRAD/PRIFAS, Montpellier (3) : 83 p
- [5]. **Bal A. B. et Sidati S. M. (2013).** Réduction des doses efficaces d'insecticides contre les larves de criquet pèlerin (*Schistocerca gregaria* Forskål, 1775 : Orthoptera, Acrididae) par l'utilisation de quantités réduites de phénylacétonitrile. *Journal de Biotechnologie, Agronomie Société et Environnement.* 17(4), 572-579.
- [6]. **Ferron P, Fargues J et Riba G. (1991).** *Les champignons agents de lutte microbiologique contre les ravageurs.* In: Handbook of applied mycology. 2: 237-270.
- [7]. **Kooyman C. (2003).** Report of the Workshop on the use of Green Muscle<sup>®</sup> (*Metarhizium anisopliae* var. *acidum*) and desert locust adult pheromone (Phenylacetoneitrile: PAN) to control desert locust hopper bands, Port Sudan, 10-20 January 2003. Roma: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- [8]. **Zakaria O. et Sagnia S.B. (2003).** *Lutte intégrée contre les sauteriaux et les locustes : importance du biopesticide Green Muscle.* Bulletin trimestriel d'information du Centre Régional AGRHYMET, Niamey, Niger, 5 (3) : 16p.
- [9]. **Toure M. et Ndiaye M. (2010).** Efficacité comparée de *Metarhizium anisopliae* (Hypocreale Clavicipitaceae) sur les différents états biologiques du criquet sénégalais : *Oedaleus senegalensis* (Orthoptères : Acrididea). *Afrique SCIENCE.* 6(3) : 37 - 46
- [10]. **Bissaad F.Z., Youcef M., Bounacerur F. et Doumandji-Mitiche B. (2012).** Activité biologique d'un biopesticide le Green Muscle sur le tégument du criquet pèlerin *Schistocerca gregaria* (Forskål, 1775) (Orthoptera, Acrididae). *Nature & Technologie.* 6 : 51 -58.
- [11]. **Chauvin R. (1956).** *Physiologie de l'insecte. Le comportement. Les grandes fonctions écophysiques.* Éd. Institut national de la recherche agronomique, Paris, 916 p.
- [12]. **Arnold J.W. (1979).** *Controversies about haemocyte types in insects.* In: Insect Haemocytes. [Éd. A.P. Gupta]. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 231-258.
- [13]. **Pasquier R. (1937).** Le criquet marocain en Algérie. Les recherches scientifiques récentes et leur répercussion sur la lutte rationnelle. *Agrid.*, n°53. 1-14.
- [14]. **Doumandi-Mitiche B., Doumandji S. et Benfkih L. (1992).** Données préliminaires sur la bioécologie de la sauterelle Marocaine *Dociostaurus maroccanus* (Thunberg, 1815) à Ain Boucif (Médéa – Algérie). Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent., 57/3a, pp 659-665.
- [15]. **Atheimine M., Ely S., Mohamed S., Barry A. et Mounsif B. (2014).** Simulation de traitement en barrière avec *Metarhizium anisopliae* var. *acidum* (Green muscle<sup>®</sup>) contre des larves grégaires du criquet pèlerin, *Schistocerca gregaria* afpp – Dixième conférence internationale sur les ravageurs en agriculture. Montpellier. 22 et 23 Octobre 2014.
- [16]. **FAO. (2004).** Workshop on spray equipment used in desert locust control. FAO Commission for controlling the desert locust in the Near East 21-23 August 1994. Cairo, Egypt.
- [17]. **Bateman R.P. (1993).** Simple standardized methods for recording droplet measurements and estimation of deposits from controlled droplet application. *Crop Prot.*12: 201-206.
- [18]. **Guzo, D. and Stolz, D.B. (1987).** Observations on cellular immunity and parasitism in the tissok moth. *Journal of Insect Physiology.* 33: 19-31.
- [19]. **Mahamat H., Hassanali A et Munyinyi D. (1997).** Hemolymph pigment composition as chemometric indicator of phase in desert locust, *Schistocerca gregaria* . *Journal of Insect Science and its Application,* 17 (2): 199-204.
- [20]. **Gupta, A.P. (1979).** Haemocyte Types: Their Structure, Synonymies, Interrelation ships and Taxonomic Significance. In: Insect

- Haemocytes. [Éd. A.P. Gupta]. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 85-127.
- [21]. **Gupta, A.P. (1985)**. Cellular elements in the haemolymph. In: *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. [Eds. G.A. Kerkut and L.I. Gilbert]. Pergamon Press, Oxford, New York, Toronto, Sydney, Paris, Frankfurt 3: 401-451.
- [22]. **Bidoshka M.J., Leger R. J. et Roberts D.W. (1997)**. Mechanisms of Deuteromycete fungal infections in grasshoppers and locust: an overview. *Memoirs of the Entomological Society of Canada*. 171: 213 - 224.
- [23]. **Bouhacein M. (1999)**. Effet de deux entomopathogène (Hyphomycètes, Deuteromycotina), *Beauveria bassiana* (Balasmo) Veuillemin et *Metarhizium flavoviride* Gams et Rozyspal sur les métabolites hémolympatiques, l'hémogramme et les protéines circulaires chez *Locusta migratoria* (Linné, 1758). *Mém. Ing. Agro., Ecol. Nati. Sup. Agro., El-Harrach*, 121 p.
- [24]. **Halouane F. Benzara A. Doumadji-Mitiche B. Bouhacein M. (2001)**. Effet de deux entomopathogènes *Beauveria bassiana* et *Metarhizium flavoviride* (Hyphomycètes, Deuteromycotina) sur l'hémogramme des larves de 5e stade et des adultes de *Locusta migratoria migratorioides* (Orthoptera : Acrididae). *Journal of Orthopedic Research*. 10 : 331-334.
- [25]. **Kaidi N., (2007)**. Bioécologie de *Schistocerca gregaria* Forskål, 1775 (Orthoptera, Cyrtacanthacridinae) dans la région de l'Ahaggar. Essais de lutte biologique au moyen de champignons entomopathogènes : *Beauveria bassiana* et *Metarhizium anisopliae* var. *acidum*. *Mém. Magi.. École. Nati. Sup. Agro. El-Harrach*, 109 p.
- [26]. **Vey A., Quiot J. M. et Pais M. (1986)**. Toxémie d'origine fongique chez les invertébrés et ses conséquences cytotoxiques : étude sur l'infection à *Metarhizium anisopliae* (Hyphomycètes, Moniliales) chez les Lépidoptères et les Coléoptères. *Journal de la Société de Biologie*. 180 : 105 – 112.
- [27]. **Latchininsky A.V. et Launois-Luong M.H. (1992)**. Le criquet Marocain, *Doclostaurus maroccanus* (Thunberg, 1815) dans la partie orientale de son aire de distribution. Étude monographique relative à l'ex-URSS et aux pays proches.- CIRAD-GERDAT-PRIFAS : Montpellier /VIZR : Saint-Pétersbourg, 270p.
- [28]. **Gillespie, JP, Kanost, MR et Trenczek, T. (1997)**. Biological mediators of insect immunity. *Annual Review Entomology* 42: 611-642.
- [29]. **Lavine, M.D. and Strand, M.R. (2002)**. Insect haemocytes and their role in immunity. *Insect Biochem. mol. Biol.*, 32, 1295-1309.
- [30]. **Schmidt, O., Theopold, U. et Strand, M. (2001)**. L'immunité innée et son évation et suppression par endoparasitoïdes hyménoptères *Bio-assays*, 23: 344-51
- [31]. **Amouriq L. (1973)**. *Rapport entomologico-cryptogamiques : Éléments sur la relation entre les insectes et les champignons*. Éd. Herman, Paris, 135p.
- [32]. **Kooyman, C. (2007)**. *Metarhizium anisopliae* var. *acidum*, la matière active du Green muscle®, pp : 11-13 cité par WADE V. : Atelier international sur l'avenir des biopesticides dans l'avenir contre le criquet pèlerin (Sénégal, 12-15 février 2007) Éd. The orthopterist's society, 32 p.
- [33]. **Xia P., Dean P., Judge A.J., Gillespie J.P., Clarkson J.M., and Charnley A.K. (2000)**. Acidphosphatases in the haemolymph of the desert locust, *Schistocerca gregaria*, infected with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Insect Physiology*. 46: 1249-1257.
- [34]. **Milat-Bissaad F.Z., Bounaceur F., Halouane F., Behidj N., Chebouti N., and Doumandji- Mitiche B. (2011)**. Effect of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* var. *acidum* on the haemolymph of the desert locust *Schistocerca gregaria*. *Tunisian Journal of Plant Protection* 6: 127-132.
- [35]. **Bissaad F.Z., Bounaceur F., Behidj N., Chebouti N., Halouane F. et Doumandji-Mitiche B. (2014)**. Effect of two entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* var. *acidum* on the haemolymph of the desert locust *Schistocerca gregaria*. *International journal of biological, biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering*. 8 (11): 1298-1301

- [36]. **Moussa A. (2003)**. Effet de l'huile de Neem (*Azadirachta indica*) sur quelques paramètres biologiques et physiologiques de *Locusta migratoria migratorioides* (R & F, 1850) (Orthoptera : Acrididae). Thèse Magister Sci. Agro., Ecol. Nat. Sup. Agr., El-Harrach, 123p.
- [37]. **Coulybaly Adama A., (2002)**. Effet de *Beauveria bassiana* (B) et *Metarhizium flavoviride* (G et R) sur l'hémogramme et les protéines de l'hémolymphe d'*Anacridium aegyptium* (L, 1764) (Orthoptera, Acrididae). Mém. Ing., Ecol.Nat. Sup. Agr., El-Harrach. 99p.
- [38]. **Habbes D. (1989)**. Effet de *Bacillus thurigiensis* sur l'intestin, les hématocytes et sur le métabolisme général de *Thaumetopea pityocampa* Schiff (Mepidoptera, Notodontidae). Thèse Magister, Sci. Agr. Univ. Annaba. 83p
- [39]. **Gillespie J.P., Burnett C., and Charnley A.K.(2000)**. The immune response of the desert locust *Schistocerca gregaria* during mycosis of the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. *Journal of Insect Physiology*. 46: 429-437
- [40]. **Avulova S. and Rosengaus R.B. (2011)**. Losing the battle against fungal infection: suppression of termite immune defenses during mycosis. *Journal of Insect Physiology*. 57: 966-971.
- [41]. **Brehelin M. et Zachary D. (1983)**. About insect plasmatocytes and granular cells. *Journal of Developmental and Comparative Immunology*. 7: 683-686.