







## 2.4. Echantillonnage des larves et étude histologique

A différents temps (3<sup>ème</sup>, 5<sup>ème</sup> et 7<sup>ème</sup> jour), et après traitement, nous avons collecté des larves (L4) à partir des enclos de terrain témoins et traités à différentes doses du bio-pesticide (50 g/ha, 25 g/ha et 12,5 g/ha). Après sacrifice des individus par décapitation de la tête et dissection par ouverture de l'abdomen, les tubes digestifs sont prélevés, plongés et fixés dans le formol à 10% pour réaliser des coupes histologiques. Les prélèvements passent par plusieurs étapes décrites par Martoja et Martoja-Pierson, (1967). Les coupes obtenues sont colorées par Trichrome de Masson. Les observations au microscope optique sont réalisées avec un dispositif de prise de photos aux grossissements ( $\times 100$ ) et ( $\times 400$ ).

## 3. Résultats et Discussions

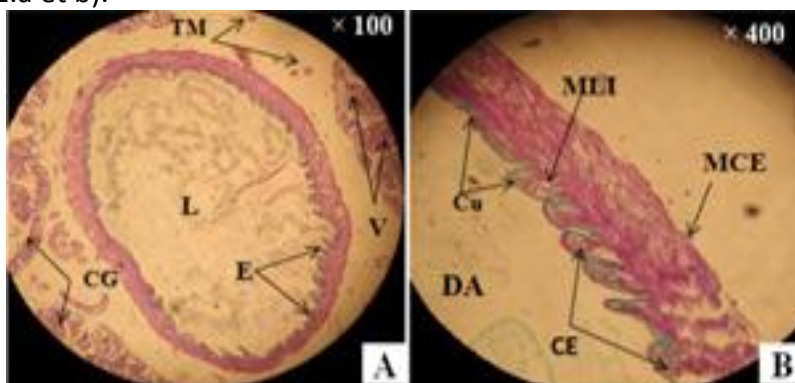
### Abréviations :

**CG.** cæca gastriques, **CR.** cryptes de régénération, **d.** destruction. **Cu.** Cuticule intima, **a.** altération, **CEV.** Cellules épithéliales vacuolisées, **BB.** Bordure en brosse, **E.** épines, **MC.** Muscle circulatoire, **MCE.** Muscle circulatoire externe, **MCI.** Muscle circulatoire interne, **MCE.** Muscle circulatoire externe, **MLE.** Muscle longitudinal externe, **MLI.** Muscle longitudinal interne, **V.** villosité, **RE.** Replis épithéliaux, **MP.** Membrane péritrophique, **AE.** Assise épithéliale. **TM.** Tube de Malpighie, **U.** ulcération, **L.** lumière intestinale, **N.** nécrose. **CBR.** Cellules basales de régénération, **Np.** noyaux pycnotiques.

Les observations de terrain ont permis de constater que les larves traitées par le Green muscle sont devenues moins actives et moins voraces ce qui a favorisé la prédation. L'observation macroscopique des tubes digestifs provenant des larves infectées par *M. anisopliae* var. *acidum* ne montre pas de lésions morphologiques.

Chez les larves témoins :

- le stomodeum ou intestin antérieur est constitué d'un jabot formé d'un épithélium simple cubique et tapissé par une couche de cuticule intima. Nous observons de nombreuses petites villosités, sur lesquelles se dressent les épines. La musculature est constituée d'une couche de muscle circulaire externe qui entoure l'organe et de plusieurs couches de muscles longitudinaux internes bien développés (Fig.2.a et b).



**Fig.2.** Coupes transversales au niveau du stomodeum (Jabot) chez *D. maroccanus*. a et b : larves témoins

- Le gésier, fait partie du stomodeum, est tapissé d'une intima cuticulaire et présente de nombreuses petites villosités uniformes formés d'un épithélium unistratifié cubique. La musculature du gésier est constituée de muscles longitudinaux internes et de nombreuses couches de muscles circulaires externes mal délimitées (Fig.3. a et b).
- Le mésentéron ou intestin moyen présente un épithélium pseudo-stratifié palissadique à bordure en brosse et à cellules basales de régénération. La cuticule est absente à ce niveau. Les muscles sont très réduits et forment une fine couche circulaire interne et des fibres longitudinales externes. Une membrane péritrophique, sous la forme d'une mince couche, enveloppe le bol alimentaire (Fig.4.a et b).

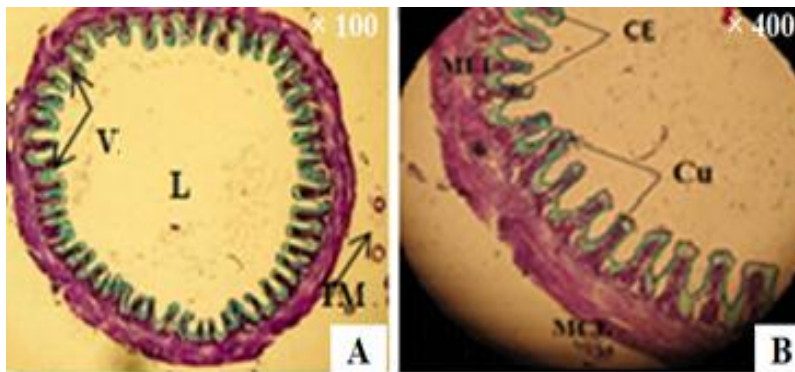


Fig.3. Coupes transversales au niveau du stomodeum (Gésier) chez *D. maroccanus*. a et b : larves témoins.

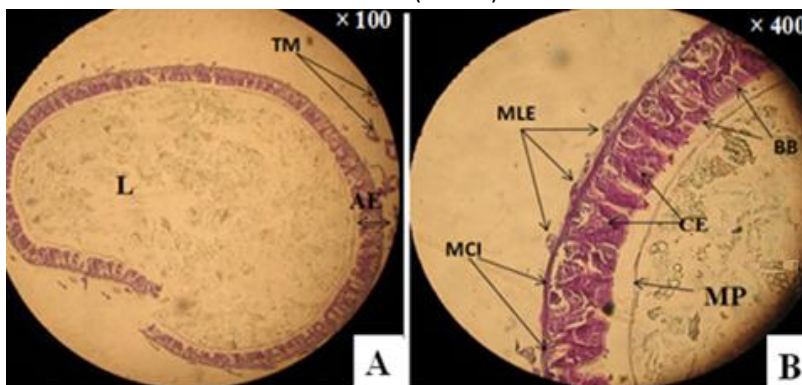


Fig.4. Coupes transversales au niveau du mésentéron chez *D. maroccanus*. a et b : larves témoins.

- La région du mésentéron est pourvue de six cæca gastriques disposés radialement autour de la lumière centrale du tube digestif. Le cæcum gastrique présente des villosités qui s'alternent avec les autres plus petites représentant les cryptes de régénération. Les villosités présentent un épithélium simple prismatique à noyaux rond et avec des bordures en brosse. La musculature est très réduite et composée d'une seule couche de muscles circulaires très fine (Fig.5.a et b).

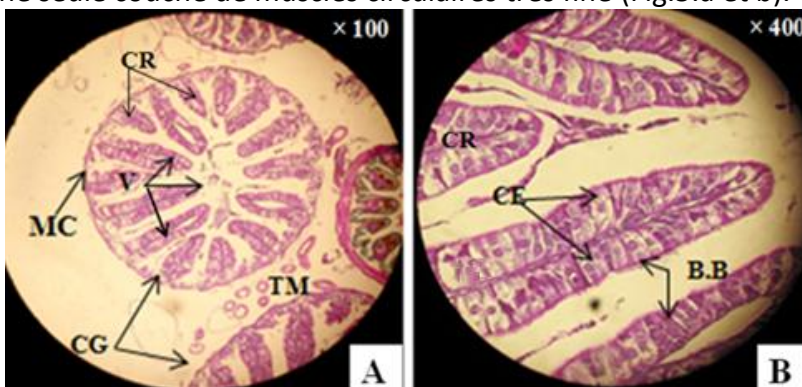
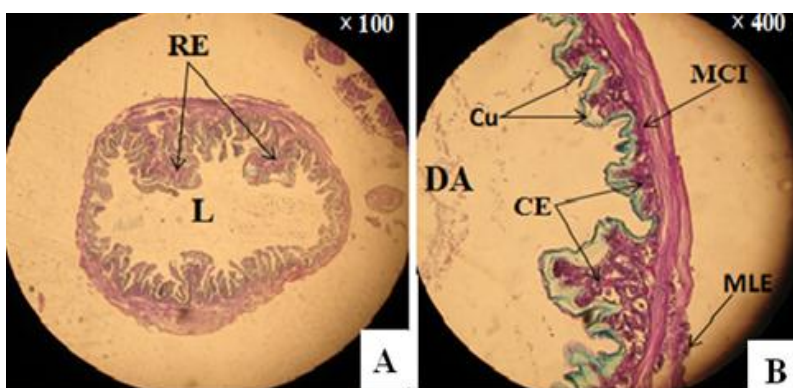


Fig.5. Coupes transversales au niveau des cæca gastriques chez *D. maroccanus*. a et b : larves témoins.

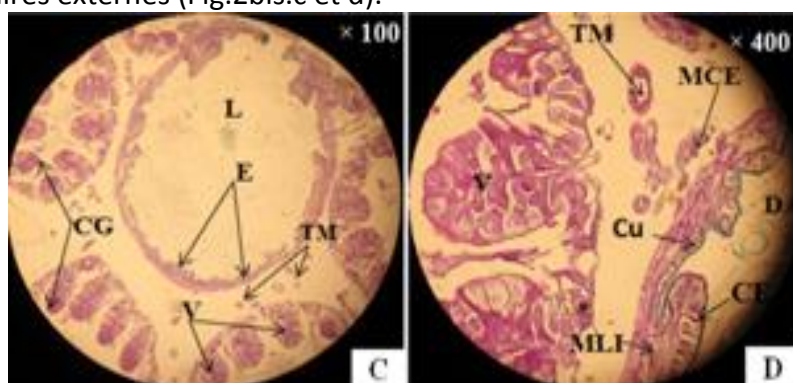
- Entre le mésentéron et le proctodeum débouchent les tubes de malpighin qui forme l'organe excréteurs. Le proctodeum présente des replis épithéliaux développés et fructueux. Le revêtement chitineux est moins épais dans l'intestin antérieur. La musculature est représentée par des couches longitudinales et circulaires (Fig.6.a et b).



**Fig.6.** Coupes transversales au niveau du proctodeum (colon) chez *D. maroccanus*. a et b : larves témoins.

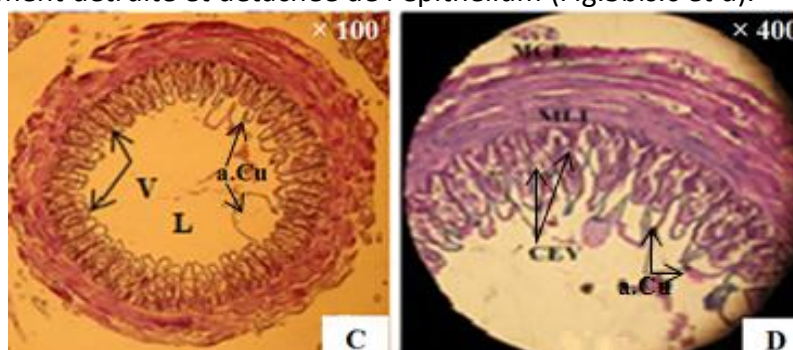
Chez les larves traitées avec *M. anisopliae*, des lésions intestinales sont observées dès le 3<sup>ème</sup> jour après traitement à raison de 50 g/ha de Green muscle. Quelques dommages apparaissent au 5<sup>ème</sup> jour par la séparation de l'épithélium intestinal des couches musculaires. Après le 7<sup>ème</sup> jour, la dégénérescence des tissus épithéliaux est évidente, notamment au niveau du mésentéron et des cæca gastriques, où la cohésion entre les cellules épithéliales et les fibres musculaires n'est plus observée. Pour les traitements à faibles doses avec le Green muscle (25 g/ha et 12,5g/ha), les altérations tissulaires sont plus au moins comparables mais apparaissent plus tardivement. Nous avons choisis de démontrer les principales lésions observées chez les larves traitées à 50g/ha le 5<sup>ème</sup> jour après traitement comme suit :

- Au niveau du jabot, nous remarquons une légère destruction de la cuticule intima des épines. L'épaisseur des couches musculaires est réduite sensiblement par le détachement et la lyse des couches musculaires externes (Fig.2bis.c et d).



**Fig.2bis.** Coupes transversales au niveau du stomodeum (Jabot) chez *D. maroccanus*. c et d : larves traitées avec le Green muscle à 50 g/ha.

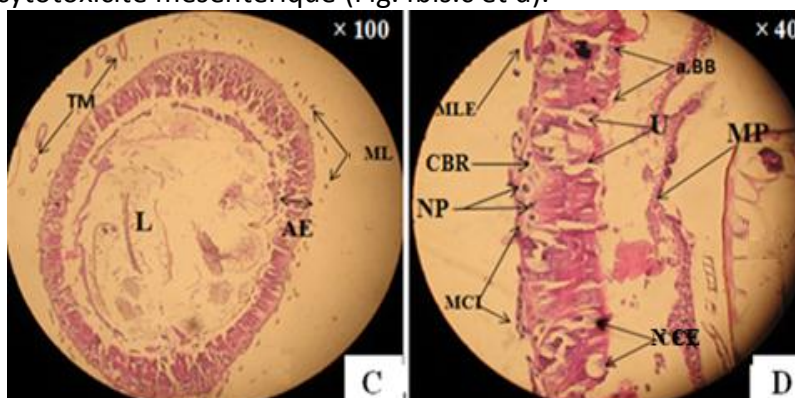
- Le gésier a subi le relâchement des assises musculaires et le détachement de quelques fibres. Nous observons la désorganisation des cellules épithéliales formant les petites villosités. La cuticule intima est totalement détruite et détachée de l'épithélium (Fig.3bis.c et d).



**Fig.3bis.** Coupes transversales au niveau du stomodeum (Gésier) chez *D. maroccanus*. c et d : larves traitées avec le Green muscle à 50 g/ha.

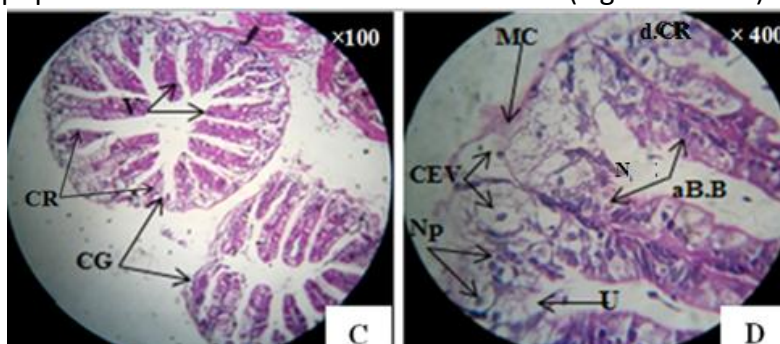


- Au niveau du mésentéron, nous observons le détachement de l'épithélium intestinal des couches musculaires externes. L'assise épithéliale n'est pas en ligne et présente un diamètre supérieur à celui des témoins résultant, probablement, d'une réduction de la lumière intestinale. Nous avons noté l'absence totale des bordures en brosse par endroits. Les cellules épithéliales sont désagrégées, vacuolisées et parfois nécrosées libérant leurs noyaux. Les cellules basales présentent des noyaux évidents à chromatine condensée. La membrane périthrophique est altérée et discontinue. Ces lésions cyto-architecturales sont en faveur de dégénérescence tissulaire témoignant une cytotoxicité mésentérique (Fig.4bis.c et d).



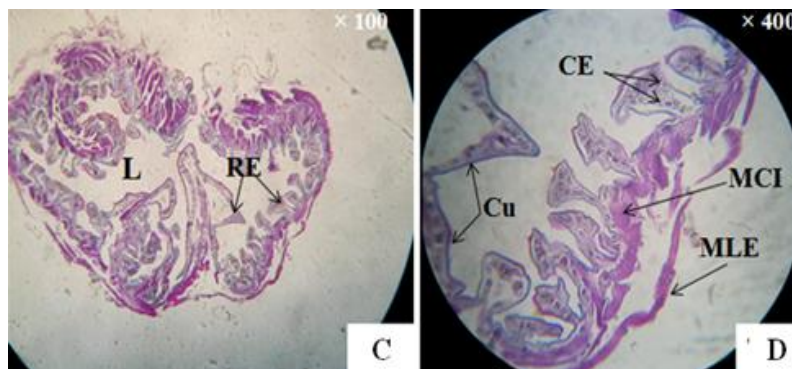
**Fig.4bis.** Coupes transversales au niveau du mésentéron chez *D. maroccanus*. c et d : larves traitées avec le Green muscle à 50 g/ha.

- Au niveau des cæca gastriques, l'hypertrophie des villosités est bien observée, les cryptes régénératrices étaient évidentes mais semblaient être en cours de désintégration. L'épithélium montre un aspect hypertrophié et désorganisé. Les bordures en brosse sont moins abondantes et irrégulières due probablement à la vacuolisation des cellules épithéliales. Les noyaux deviennent volumineux à chromatine condensée en granules évidentes dans le nucléoplasme. Ces dommages sont des signes typiques d'ulcération et de nécrose cellulaire (Fig.5bis.c et d).



**Fig.5.** Coupes transversales au niveau des cæca gastriques chez *D. maroccanus*. c et d : larves traitées avec le Green muscle à 50 g/ha.

- Au niveau du proctodeum, ou intestin postérieur, les altérations sur cette partie terminale n'ont pas été très remarquables pour toutes les coupes histologiques étudiées. Les cellules épithéliales sont parfois désorganisées et vacuolisées. L'assise musculaire circulaire montre une atrophie et une distension de celle-ci. La cuticule est restée intacte comparativement aux individus témoins (Fig.6bis.c et d).



**Fig.6bis.** Coupes transversales au niveau du proctodeum (colon) chez *D. maroccanus*. c et d : traitées avec le Green muscle à 50 g/ha.

#### 4. Discussion

Les résultats de l'examen microscopique chez les criquets témoins concordent avec ceux reportés par la littérature (Grassé, 1976; Raccaud-Schoeller, 1980; Mohand kaci et al., 2008; Oulebsir-Mohand kaci et Doumandji-Mitiche, 2011). Chez les larves traitées sur terrain avec Green muscle, l'histologie des différentes parties du tube digestif a montré quelques altérations tissulaires dose et temps dépendantes. Les deux voies de pénétration des conidies de *Metarhizium anisopliae* var. *acidum*, par contact ou par ingestion, peuvent être à l'origine des dommages observés chez les larves infectées par le champignon. Selon Kooyman, (2007), les spores de *Metarhizium* tombées sur la cuticule de l'insecte ou ramassées de la végétation germent pendant 24 à 48 h. Les hyphes sortants pénètrent dans la cuticule à l'aide des enzymes et se désintègrent ensuite en corpuscules hyphales qui se répliquent à travers le corps de l'insecte, du mycélium pousse ensuite dans les tissus. Nos résultats sont assez comparables avec ceux de plusieurs études réalisées sur l'histologie du tube digestif chez des espèces acridiennes après différents traitements biologiques. Des modifications importantes sont révélées au niveau des trois parties intestinales chez les individus de criquet pèlerin traités par des bactéries entomopathogènes, *Bacillus thuringiensis*, *Cytisus triflorus* et *Pseudomonas fluorescens* (Mohand kaci et al., 2008; Oulebsir-Mohand kaci et Doumandji-Mitiche, 2011). Des effets comparables sont induits par l'ingestion de l'extrait brut saponique de *Cestrum parqui* sur le système digestif de *Schistocerca gregaria* (Chaieb et al., 2007) et par l'ingestion orale de l'acide gibbérélique (GA3), un régulateur de croissance de plantes, chez des larves de *Locusta migratoria* (Abdellaoui, 2009). Ces derniers auteurs ont noté une dilatation des cæca gastriques montrant une lumière tout à fait visible accompagnée d'une chute de la taille des plis épithéliaux. Ammar et N'cir (2008) ont également observé une modification au niveau de la cuticule intima intestinale des larves de *S. gregaria* alimentés avec des feuilles de *Cestrum parquii* (Solanaceae). Etant donné que le stomodeum et le proctodeum sont d'origine ectodermique, il pourrait supposer que les particules fongiques colonisant les cavités du corps peuvent pénétrer et envahir les tissus.

Le *Metarhizium* affecte surtout l'intestin moyen. Cette partie présente une sensibilité élevée aux microorganismes entomopathogènes administrés par ingestion par rapport aux deux autres parties de l'intestin (Oulebsir-Mohand kaci et Doumandji-Mitiche, 2011). Les activités de l'épithélium du mésentéron répondent aux fonctions digestives suivantes: la sécrétion, l'absorption et l'excrétion (Grassé, 1976; Beaumont, 1983; Oulebsir-Mohand kaci et Doumandji-Mitiche, 2011). D'après nos résultats, l'absence de l'assimilation et de l'absorption intestinale sont presque certaines avec un épithélium mésentérique dégénéré et nécrosé par endroit. Quesada-Moraga et Santiago-Alvarez (2001) ont trouvé des altérations semblables au niveau du mésentéron de l'acrididae *D. maroccanus* traité avec une bactérie entomopathogène, *Bacillus thuringiensis*.



De même, les effets toxiques de *Peganum harmala* (Zygophyllaceae) engendrent des signes d'ulcération et de nécrose cellulaire au niveau de l'intestin moyen du criquet pèlerin (Idrissi Hassani et Hermas, 2008; Abbassi et al., 2003). Ces derniers auteurs ont observé également l'atrophie de la muqueuse intestinale présentant un épithélium strié réduit avec un aspect granuleux et absence de plissements caractéristiques. Messgo-Moumene et al. (2015) ont étudié l'effet biocide des extraits aqueux et éthanoliques des plantes des zones arides du Sahara Algérien *Calotropis procera*, *Schouwia purpurea* sur les larves L5 de *S. gregaria*. Des changements morphologiques et une inhibition de la mue ont été décelés suite à ces traitements en plus des modifications structurales du mésentéron, les cellules épithéliales ont semblé être désagrégées, leurs inclusions étaient dispersées dans la matrice intercellulaire. L'épithélium des individus traités a montré une épaisseur plus réduite que celui des témoins. Les travaux d'Oulebsir-Mohandkaci et Doumandji-Mitiche (2011) sur l'histologie du mésentéron des larves de *L. migratoria* traitées avec la bactérie entomopathogène, *Pseudomonas fluorescens*, révèlent en plus de l'altération de la membrane péritrophique et de l'épithélium mésentérique, un élargissement de la lumière intestinale. Des observations ultrastructurales ont révélé que l'intestin moyen des adultes de *L. migratoria* traités par *B. thuringiensis* était hypertrophié et ont montré une désorganisation considérable en comparaison à l'intestin moyen des individus non traités (Quesada-Moraga, 2001). Nasiruddin et Mordue (1993) ont remarqué les mêmes effets après ingestion des extraits de *Melia azadirachtina* par le criquet pèlerin et le criquet migrateur. Plusieurs auteurs suggèrent que les ulcérations observés chez les individus traités, consistant en une rupture de l'épithélium, sont dues à des nécroses causées par la substance de traitement sur les cellules épithéliales ou à l'effet des micro-organismes bactériens. Les grégaires dont le nombre est fortement réduit chez les insectes traités (Idrissi Hassani et Hermas, 2008; Ouali-N'goran et al., 2013).

Dans nos conditions des traitements de terrain avec le bio-pesticide Green muscle, les effets entomopathogène se sont manifestés par une cytotoxicité intestinale progressive. Cette cytotoxicité dépend de la concentration en spores de *M. anisopliae* var. *acridum* accumulées dans l'hôte. Cela peut expliquer le déclin dans l'ingestion de la nourriture enregistrée chez les criquets traités comparées aux témoins d'où carence protéique et lipidique. Ce manque en apports nutritifs provoque probablement une réduction de la locomotion et des difficultés de mue larvaires et par conséquent la mort des larves traitées avec le *Metarhizium anisopliae* par toxémie.

## Conclusion

A la lumière de ces résultats, il s'avère que l'activité biologique de Green muscle a confirmé ses potentialités entomopathogène sur l'histologie intestinale des larves traitées en milieu naturel. *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* attaque les muqueuses intestinales qui ne peuvent plus remplir leurs fonctions en termes d'efficacité digestive. Le mésentéron et les cæca gastriques sont les plus endommagés par l'altération de l'architecture épithéliale et la présence des signes typiques de nécrose et d'ulcération. Notre souche fongique est à la fois un agent très prometteur de la lutte biologique contre les insectes ravageurs agricoles et un modèle important pour l'étude des interactions hôte-pathogène.

## Remerciements

Cette étude a été faite en collaboration de l'Institut Nationale de Protection des Végétaux (INPV) d'El-Harrach-Algérie. Nos remerciements vont à Monsieur Lazar M. le chef de département de lutte antiacridienne et à toute l'équipe de prospection et de lutte pour leurs orientations et leur disponibilité sur le terrain.

## Références

- Abbassi K, Mergaoui L, Atay-Kadiri Z, Stambouli A, Ghaout S** (2003). Effet des extraits de *peganum harmala* L. (Zygophyllaceae) sur le criquet pèlerin *Schistocerca gregaria* (Forskål, 1775). *Zool. Baetica*, vol 13 (14) pp 203-217.
- Abdellaoui K, Ben Halima-Kamer M, Ben Hamouda M H** (2009). Insecticidal activity of gibberellic Acid against *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera, Noctuidae) and *Locusta migratoria* (Orthoptera, Acrididae). *Pest technol*, vol 3(1) pp 28-33.
- Arkam F, kara-toumi F Z, Tail-Halil G, Saidi F** (2017a). Effets des traitements avec le Green muscle® en milieu naturel (Nord-Ouest de l'Algérie) sur les larves de *Doclostaurus maroccanus* (Thunberg, 1815) et sur l'histologie du tegument. *Algerian J. Nat. Product*, vol 5(3) pp 530-540
- Arkam F, kara-toumi F Z, Tail-Halil G, Saidi F, Ahmed Serir B** (2017b). Principales lésions hémolymphatiques observées chez les larves de *Doclostaurus maroccanus* traitées sur terrain par le Green muscle®, *Agrobiologia*, vol 7(2) pp 401-411.
- Ammar M, N'cir S** (2008). Incorporation of *Cestrum parquii* (Solanaceae) leaves in an artificial diet affected larval longevity and gut structure of the desert locust *Schistocerca gregaria*. *Tunis J Plant Prot*, vol 3 pp 27-34
- Atheimine M, Ely S, Mohamed S, Barry A, Mounsif B** (2014). Simulation de traitement en barrière avec *Metarhizium acridum* (green muscle®) contre des larves grégaires du criquet pèlerin, *Schistocerca gregaria*. Afpp – Dixième conférence internationale sur les ravageurs en agriculture. Montpellier – 22 et 23 Octobre 2014, 10 p.
- Bal A B, Sidati S M** (2013). Réduction des doses efficaces d'insecticides contre les larves de criquet pèlerin (*Schistocerca gregaria* Forskål, 1775 : Orthoptera, Acrididae) par utilisation de quantités réduites de phénylacétonitrile. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ*, vol 17 (4) pp 572-579.
- Beaumont A et Cassier P** (1983). Biologie Animale: des Protozoaires aux Métazoaires Epithélioneuriens, éd Dunod 2, pp 632-833.
- Bissaad F Z, Youcef M, Bounacerur F, Doumandji-Mitiche B** (2012). Activité biologique d'un biopesticide le Green Muscle sur le tegument du criquet pèlerin *Schistocerca gregaria* (Forskål, 1775) (Orthoptera, Acrididae). *Nature & Technologie*, vol 6 pp 51-58.
- Chaieb I, Ben Halima-Kamel M, Ben Hamouda M** (2007). Toxicity experiments of the saponic extract of *Cestrum parquii* (Solanaceae) on some insect species. *J Entomol*, vol 4 pp 113-120.
- Chaouch A** (2015). Bioécologie du criquet marocain *Doclostaurus maroccanus*, Thunberg, 1815 (Acrididae, Gomphocerinae) dans la phase grégaire en Algérie et perspective de lutte biologique. Thèse Doctorat. Ecol. Nat. Sup. Agro. El-Harrach-Alger, 174 p.
- Chauvin R** (1938). Anatomie et histologie du tube digestif de *Schistocerca gregaria*. Bulletin de la Société d'Histoire Naturelle de l'Afrique du Nord 18, pp. 488 – 499.
- Doumandi-Mitiche B, Doumandji S, Benfkih L (1992)**. Données préliminaires sur la bioécologie de la sauterelle marocaine *Doclostaurus maroccanus* (Thunberg, 1815) à Ain Boucif (Médéa – Algérie). Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent., 57/3a pp 659-665.
- Douro Kpindou OK, Gbongboui C, Badou R, Paa-Kwessi E, Ackonor J B, Langewald J** (2005). Optimisation de l'application du *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* sur le criquet puant, *Zonocerus variegates* (Orthoptera: Pyrgomorphidae) *Int J Trop Insect Sci*, vol 25, (4) pp 251–258.
- Ferron P, Fargues J, Riba G** (1991). Les champignons agents de lutte microbologique contre les ravageurs. In: *Handbook of applied mycology*, vol 2 pp 237-270.
- Grassé PP** (1976). Traité de Zoologie. Tome VIII. Masson. Paris, pp 226-259.
- Idrissi Hassani L M, Hermas J** (2008). Effets de l'alimentation en *Peganum harmala* L. (Zygophyllaceae) sur le tube digestif du criquet pèlerin *Schistocerca gregaria* (Forskål, 1775). (Orthoptera, Acrididae). *Zool Baetica*, vol 19 pp 71-84.
- Kooyman C** (2003). Report of the Workshop on the use of Green Muscle® (*Metarhizium anisopliae* var. *acridum*) and desert locust adult pheromone (Phenylacetoneitrile: PAN) to control desert locust hopper bands, Port Sudan, 10-20 January 2003, Roma, FAO, 28p.
- Kooyman C** (2007). *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*, 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. ed. The orthopterist's society, 32p.
- Kooyman C, Ammati M, Moumene K, Chaouch A, Ahmed Zaid A** (2005). Essai de Green Muscle® sur les larves du criquet pèlerin dans la wilaya d'El-Oued, Nord-Est Algérie. *Raport FAO- TAC 715*, 23p.
- Martoja R, Martoja-Pierson M** (1967). Initiation aux techniques de l'histologie animale. VIème ed. Masson et Cie, Paris, 345p.
- Messgo-Moumene S, Merzouk D.E, Houmani Z, Moumene K** (2015). Valorization of three plant species of arid areas in biological control of the desert locust *Schistocerca gregaria*. *Tunis J Plant Prot*, Vol 10 pp 117-130.

- Mohandkaci H, Ait Kaci K, Doumandji- Mitiche B, Fazouane F** (2008). Study of the insecticidal activity of alkaloids of the hairybroom *Cytisus triflorus* and of the bacterium *Bacillus thuringiensis* against the desert locust *Schistocerca gregaria*. The XX International Congress of Zoology, 26-29 August 2008, Paris.
- Nasiruddin M, Mordue A J** (1993). The effect of Azdirachtine on the midgut histology of the locusts, *Schistocerca gregaria* and *Locusta migratoria*. *Tissues and Cell*, vol 25(6) pp 875-884.
- Ouali-N'goran S W M, Koua K H, Tano Y, Glitho A I** (2013). Effects of sub-lethal doses of fenitrothion on the microscopic structure of the midgut of the desert locust, *Schistocerca gregaria* (Forsk., 1775; Orthoptera, Acrididae). *J Biol Food Sci Res*, vol 2 (7) pp 79-84.
- Oulebsir-Mohandkaci H, Doumandji-Mitiche B** (2017). Etude de l'impact biologique de *Pseudomonas spp.* Fluorescents sur les métabolites hémolyphatiques et l'histologie du tube digestif des larves L5 du criquet migrateur *locusta migratoria* (linné, 1758). *Lebanese Science Journal*, vol 13 (2) pp 99-115.
- Pasquier R** (1937). Le criquet marocain en Algérie. Les recherches scientifiques récentes et leur répercussion sur la lutte rationnelle. *Agrid*. n°53, pp 1-14.
- Quesada-Moraga E** (2001). Histopathological effects of *Bacillus thuringiensis* on the midgut of the Mediterranean locust *Dociostaurus maroccanus*. *J Inverteb Pathol*, vol 78 pp 183-186
- Quesada-Moraga E, Santiago-Alvarez C** (2001). Histopathological effects of *Bacillus thuringiensis* on the midgut of the Mediterranean locust *Dociostaurus maroccanus*. *J. of invertebr. Pathol*, vol 78 pp 183-186.
- Raccaud-Schoeller J** (1980). Insect's physiology, development. ed Masson, Paris, pp296.
- Zakaria O, Sagnia S B** (2003). Lutte intégrée contre les sautériaux et les locustes : importance du biopesticide Green Muscle. *Bulletin trimestriel d'information du Centre Régional AGRHYMET Niamey, Niger*, vol 5 (3) pp 1-16.