



UNIVERSITE DE CORSE
Faculté des Sciences et Techniques



MASTER 2 Ingénierie écologique

Optimisation d'une formulation biocide dans le cadre du développement d'une stratégie de biocontrôle de type « attract-and-kill » contre des insectes ravageurs

Mémoire présenté par :

Brice CHECCONI

Gembloux Agro-Bio Tech - TERRA (ULiège)
Avenue de la faculté d'Agronomie 2B
5030 Gembloux (Belgique)

Juin 2023

Remerciements

Tout d'abord, je remercie l'ensemble des membres de mon jury de mémoire pour avoir pris de leur temps pour lire et évaluer mon travail à l'écrit, comme à l'oral. Je remercie en particulier ma responsable de master Dr. Emilie GAREL pour avoir répondu à mes diverses questions au sujet du mémoire et de la présentation orale.

Je souhaite remercier chaleureusement Mme Andrea CHACON et Dr. Fanny RUHLAND, mes deux co-tutrices qui m'ont conjointement encadré tout au long de mon stage, durant la rédaction de ce mémoire et pour la préparation de la présentation orale. Je les remercie pour tout le temps passé à m'expliquer, à me former et à m'enseigner sur divers procédés et expérimentations, utiles pour mes expériences ou pour m'inculquer de nouvelles compétences. Je les remercie d'autant plus pour tout le temps passé à m'aider sur la mise en place et la réalisation de mes nombreuses expérimentations, malgré leur travail respectif sur leurs expériences, la rédaction d'articles, etc. sans qui je n'aurais pu faire autant. Je remercie également l'ensemble du personnel du laboratoire TERRA de l'université Agro-Bio Tech pour leur accueil, leur amabilité et leur professionnalisme au quotidien, en particulier M. Sébastien STEELS de l'équipe MIPI, qui m'a grandement aidé et conseillé sur la partie biologie moléculaire et la chimie en général, qui était la partie dont j'avais le plus de lacunes.

Un grand merci aux membres de mon département « Ecologie chimique et comportementale », dont son directeur Pr. François VERHEGGEN, qui m'ont très bien accueilli et intégré au quotidien du laboratoire, par de simples discussions au bureau, dans les labos ou durant la pause de midi, qui m'ont permis d'échanger sur le travail que je réalisais et sur les améliorations que je devrais faire, grâce à leur expérience. Ces personnes, qui sont Mme Julie BROOS (qui est partie peu de temps après mon arrivée), Mme Chloé GALLAND et Dr. Clément MARTIN, m'ont présenté et expliqué leurs différents travaux, me permettant d'acquérir de nombreuses connaissances et procédés qui m'ont été utiles durant la réflexion de mon travail et notamment Dr. Solène TRAVAILLARD pour m'avoir non seulement présenté son travail, mais aussi nous avoir aidé moi et mes tutrices sur la réalisation de diverses expériences. Je remercie également M. Rémy PARENT, M. Giancarlo BATTAGLIA et Mme Salimata DRABO, d'autres stagiaires de l'équipe, avec qui j'ai travaillé au quotidien, me permettant de discuter avec eux de nos travaux respectifs et qui m'ont aidé sur la réalisation de certaines expériences.

Pour finir, je souhaiterais adresser un très grand merci à ma famille et à mes amis pour m'avoir soutenu et aidé durant toute la période de stage et de rédaction de ce mémoire.

Contexte de travail

Mon principal lieu de travail a été le centre d'enseignement et de recherche TERRA, appartenant à l'ensemble de la faculté Gembloux Agro-Bio Tech qui est un des trois campus de l'université de Liège (ULiège), se situant dans la ville de Gembloux.

Au sein de ce centre de recherche, je faisais partie du département « Ecologie chimique et comportementale », dont son directeur est le professeur François VERHEGGEN.

Mon stage a été encadré par la doctorante et la post-doctorante Mme Andrea CHACON et Dr Fanny RUHLAND, qui travaillaient conjointement sur la thématique ravageurs telluriques.

J'ai également réalisé des sorties terrains sur différents sites de Belgique (cultures et prairies) durant le mois d'avril et de mai, afin de récolter différents organismes utiles pour les expériences réalisés durant ce stage.

Mon stage a pu être réalisé grâce à l'aide de la bourse de mobilité et à la bourse Erasmus + fournies par l'Union Européenne (UE).

Sommaire

1. Introduction.....	5
2. Matériels et méthodes	9
2.1. Matériel biologique.....	9
2.1.1. Larves de taupins.....	9
2.1.2. Nématodes entomopathogènes	9
2.2. Identification et virulence des NEPs	11
2.2.1. Identification moléculaire de différentes espèces de nématodes entomopathogènes locales	11
2.2.2. Evaluation de la virulence de différentes souches de nématodes entomopathogènes envers les larves de taupins.....	11
2.3. Evaluation de l'efficacité de la formulation biocide	13
2.3.1. Evaluation du taux de survie et de la virulence des nématodes entomopathogènes	13
2.3.2. Test d'orientation des larves de taupins envers la co-encapsulation attractant, phagostimulant et nématodes entomopathogènes	14
2.3.3. Test d'efficacité de la co-encapsulation attractant, phagostimulant et NEPs sur les larves de taupins.....	15
2.4. Analyses statistiques.....	16
3. Résultats	17
3.1. Identification moléculaire de différentes espèces de nématodes entomopathogènes locales.....	17
3.2. Evaluation de la virulence de différentes souches de nématodes entomopathogènes envers les larves de taupins	20
3.3. Evaluation du taux de survie et de la virulence des nématodes entomopathogènes..	21
3.4. Test d'orientation des larves de taupins envers la co-encapsulation attractant, phagostimulant et nématodes entomopathogènes	22
3.5. Test d'efficacité de la co-encapsulation attractant, phagostimulant et NEPs sur les larves de taupins.....	23
4. Discussion	23
5. Conclusion	29
Bibliographie.....	30
Annexe	42
Résumé.....	46

1. Introduction

Depuis la fin des années 1940, une intensification agricole s'est installée, apportant avec elle l'utilisation de pesticides par les agriculteurs (produits phytopharmaceutiques), pour protéger leurs cultures. Deux millions de tonnes de pesticides sont utilisés chaque année dans le monde [1], dont 27 % en 2010, étaient des insecticides néonicotinoïdes, qui sont des neurotoxiques affectant le système nerveux central des insectes, dans le but de provoquer une paralysie mortelle [2]. Depuis leur introduction, ceux-ci sont rapidement devenus les plus utilisés dans le monde, afin de faire face à de nombreux bioagresseurs [3], [4]. Cependant, il a été démontré que les néonicotinoïdes détruisent la biodiversité et menacent la survie de nombreux organismes non-ciblés, aquatiques comme terrestres [5], [6]. En effet, ces pesticides ont par exemple, d'importants effets perturbateurs sur le système nerveux central des abeilles domestiques [7], [8]. De plus, de par une importante accumulation dans le sol, ils impactent négativement les espèces vivants dans le sol, comme les vers de terre entre autres [9]. C'est pour cette raison qu'en 2012, l'Union Européenne (UE) a promulgué une loi visant à réglementer la mise sur le marché et l'utilisation de produits biocides [10]. On peut noter, entre autres l'interdiction depuis 2018 de l'usage en plein champ pour toutes les cultures, de trois néonicotinoïdes (clothianidine, thiaméthoxame et imidaclopride) avec cependant, des dérogations possibles par demande d'un gouvernement auprès de la Commission européenne [11]. Depuis 2020, onze états membres de l'UE, dont la France et la Belgique, utilisaient ces dérogations en adoptant des « autorisations d'urgences » pour les cultivateurs de betteraves sucrières, qui ont par la suite été mises à l'arrêt depuis le 19 janvier 2023, par la Cour de Justice de l'Union Européenne [12]. Aujourd'hui, il devient donc nécessaire de développer des alternatives à l'utilisation de pesticides pour les agriculteurs et plus particulièrement, ceux de betteraves sucrières, qui n'ont plus de solutions efficaces contre les ravageurs de leurs cultures. A l'heure actuelle, un certain nombre de méthodes sont utilisées pour contrôler les insectes nuisibles, comme la rotation des cultures [13], [14], le labourage des champs [15] et la gestion de l'eau, en asséchant ou en inondant les champs [16], [17]. Elles sont cependant peu nombreuses et ont un champ d'action limité. Le biocontrôle est un ensemble de méthodes utilisant des mécanismes naturels, afin de prévenir ou de réduire les dommages causés par des organismes nuisibles, regroupés en 4 catégories : les macro-organismes, les micro-organismes, les médiateurs chimiques et les substances naturelles [18]–[21]. Ce type de contrôle est souvent considéré comme étant un élément fondamental pour suppléer les pesticides et qui est à la base

de certaines des applications pratiques les plus innovantes [22]. Parmi les micro-organismes, on y trouve les nématodes entomopathogènes.

Les nématodes entomopathogènes (NEPs) sont des parasites obligatoires d'insectes qui tuent leur hôte en 48 h / 72 h par toxémie. Les juvéniles sont le stade infectieux, qui entrent dans l'insecte par des orifices naturels. Ils relâchent dans l'hémolymphe de l'insecte une bactérie symbiotique pathogène transportée dans leur tube digestif. Ces bactéries tuent l'insecte et simultanément, produisent des antibiotiques afin de conserver le cadavre, permettant aux nématodes de se nourrir et de se reproduire à l'intérieur de l'insecte. Les nouveaux juvéniles formés ingurgitent la bactérie entomopathogène, avant d'émerger à la recherche d'un nouvel hôte [23] (**Figure 1**). Les NEPs sont actuellement reconnus comme des agents de biocontrôle prometteurs et sont utilisés dans la lutte de nombreux insectes ravageurs, notamment souterrains [24]–[27]. Les plus connus sont les espèces des genres *Steinernema* (Travassos, 1927) et *Heterorhabditis* (Poinar, 1976) [28]–[30]. L'utilisation de souches non-indigènes doit tout de même être soumise à la vigilance, car elles peuvent avoir des effets néfastes sur des organismes non-ciblés ou remplacer partiellement ou complètement des NEPs locaux [31]. En effet, cela a mené de nombreux pays à la mise en place de réglementations restreignant l'utilisation de produits à base de NEPs non-indigènes [32]. Toutefois, l'utilisation de NEPs comme biocide comporte des limites. De par leur mode d'application au sol par inondation, les NEPs sont directement exposés aux conditions environnementales, ce qui rend leur survie difficile hors et dans le sol lorsque les conditions ne sont pas favorables (sécheresse) [33], [34]. Dans le but d'augmenter leur efficacité sur un insecte ravageur, il est nécessaire d'identifier la souche de NEPs étant la plus virulente face à l'espèce cible, ici la larve de taupin [35]–[38].

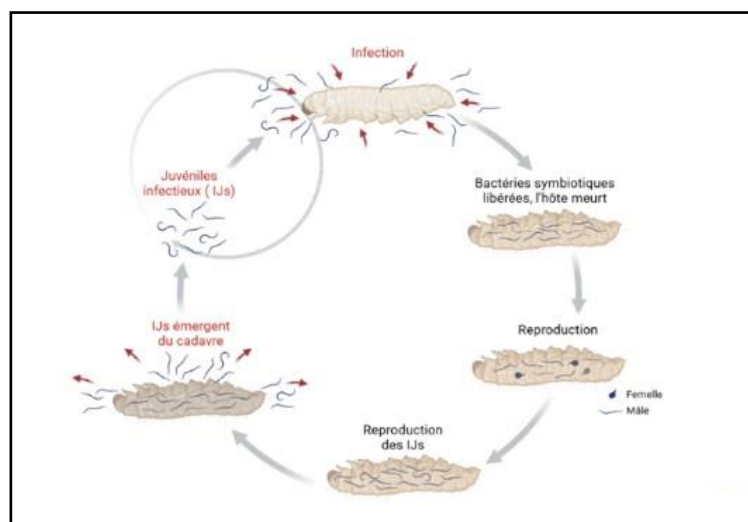


Figure 1 Cycle de vie des nématodes entomopathogènes dans une larve de *Galleria mellonella* (NEPs), modifié sur BioRender.com à partir de Dillman *et al.* [23]

La larve de taupin (Coleoptera : Elateridae), communément appelé « vers fil-de-fer », est un ravageur polyphage vivant dans le sol. Elle se nourrit principalement de graines, de racines et de tubercules de diverses plantes, comme le maïs, la canne à sucre et les pommes de terre [39]. Parmi les nombreuses espèces que l'on retrouve en Europe, seulement quelques-unes sont classées comme des ravageurs. Les plus importantes font partie du genre *Agriotes* (Eschscholtz, 1829) et sont au nombre de trois, *Agriotes lineatus* (Linnaeus, 1767), *Agriotes obscurus* (Linnaeus, 1758) et *Agriotes sputator* (Linnaeus, 1758) [40]. Contrairement aux adultes qui font peu de dégâts, les larves de taupins sont considérées parmi les insectes ravageurs du sol les plus néfastes sur de nombreuses cultures [41], [42]. Les larves de taupins possèdent une cuticule très résistante, créant une importante barrière physique contre les infections et un système immunitaire efficace [43]. Celles-ci ont un long cycle de développement, qui peut aller de deux à cinq ans en fonction des espèces et des conditions environnementales, période durant laquelle les dommages sont occasionnés [42], [44] (**Figure 2**). Le réchauffement climatique pourrait accentuer les pertes agricoles causées par ces ravageurs, impactant ainsi la production agricole, mais aussi la sécurité alimentaire [45]. Ainsi, les pertes pourraient augmenter de 10 à 25 % par degré Celsius, pour 3 cultures céréalières : le blé, le riz et le maïs [46].

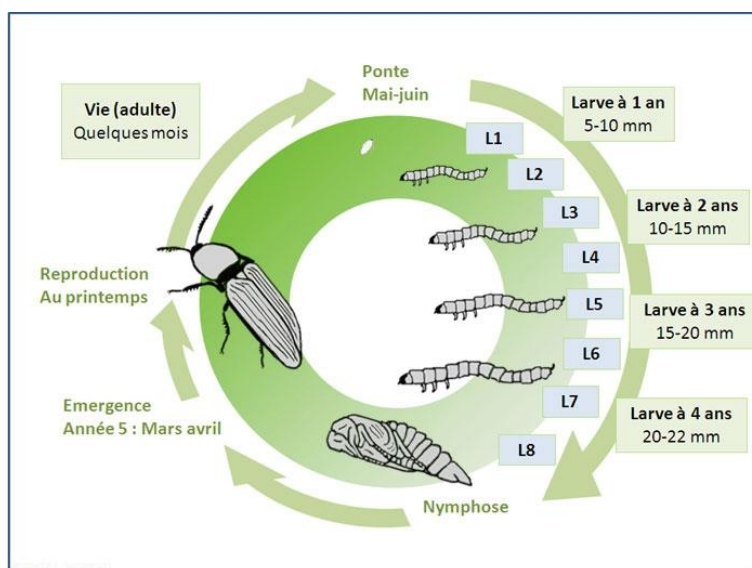


Figure 2 Cycle de vie du taupin [54]

Les organismes herbivores mangeurs de racines, comme les larves de taupins, utilisent certains composés émis par les plantes comme signal, pour repérer leur source d'alimentation [47], [48]. Cette localisation et identification se déroulent en trois étapes distinctes. En premier lieu, le dioxyde de carbone (CO₂) joue un rôle important dans ces interactions plante-insecte, car il est le premier signal qu'ils perçoivent sur de longues distances, leur permettant d'identifier la présence de matériel vivant [47], [49]–[51]. Ensuite, les insectes utilisent des composés

organiques volatils (COVs) produits par les racines et les graines en germination dans la rhizosphère, afin de localiser et d'identifier une plante hôte à courte distance [52]. Enfin, la dernière étape du comportement de recherche alimentaire des larves de taupins (orientation et morsure) est induite par la présence de macro-éléments. Ils ont été identifiés pour trois espèces (*Agriotes lineatus*, *A. obscurus* et *A. sputator*) comme étant un ensemble de glucides, lipides et protéines [53], [54]. L'encapsulation des NEPs dans des billes d'alginate, avec un attractant et un phagostimulant, pourrait augmenter la probabilité de rencontre entre les larves de taupins et les NEPs [55]–[59]. Celle-ci pourrait permettre de protéger les NEPs des facteurs environnementaux, sans que cela n'affecte leur infectiosité [60], [61].

Ce travail s'inscrit dans le cadre du développement d'une nouvelle méthode de lutte de type « attract-and-kill » contre les larves de taupins. Le premier objectif a été d'identifier les espèces des NEPs isolées en région wallonne et de tester leur potentiel biocide envers des larves de taupins (*Agriotes sp.*), en les comparant à des souches commerciales et venant d'autres laboratoires. Le deuxième objectif a été d'optimiser une formulation d'encapsulation en gel d'alginate des NEPs, en y intégrant un attractant et un phagostimulant pour les larves de taupins. Enfin, l'efficacité de la formulation développée a été testée sur le comportement et la survie des larves de taupins.

2. Matériels et méthodes

2.1. Matériel biologique

2.1.1. Larves de taupins

Les larves de taupins utilisées dans cette étude (*Agriotes lineatus* et *A. obscurus*) ont été récoltées en 2022 et en 2023 sur différents sites (**Tableau I**). Les larves ont été maintenues en élevage dans des microcosmes (barquettes en plastique) remplis de 400 ml de substrat humide, composé de terreau (La plaine Chassart, Belgique) tamisé à 5 mm et de vermiculite (Hermie, Pays-Bas) (proportion 1:1, v:v). Comme source d'alimentation, il a été semé 1.7 g d'un mélange de graines de froment biologique, devenu des plantules après une semaine. Les microcosmes étaient stockés dans une chambre climatisée à 22 °C.

2.1.2. Nématodes entomopathogènes

Au cours du printemps et de l'automne 2022, différentes souches de nématodes entomopathogènes ont été isolées sur différents sites (prairies et zones de cultures) de la région wallonne en Belgique (**Tableau I**), selon le protocole de Blanco *et al.* [62]. Pour cela, des insectes sentinelles *Galleria mellonella* (Linnaeus, 1758), issues d'un élevage permanent dans le laboratoire, ont été utilisés. Dans un récipient de 200 ml, 200 g de sol collecté du site d'intérêt et 5 larves de *G. mellonella* ont été placés et ensuite stockés à l'obscurité dans une chambre climatisée à 22 °C. Après 4 jours d'exposition, les larves ont été récupérées, rincées à l'eau du robinet et placées individuellement en pièges White [63]. Ce type de piège consistait à mettre une larve morte sur un papier filtre humidifié, qui était placé dans un couvercle de boîte de pétri (Ø 55 mm). Si des juvéniles infectieux (IJs) émergeaient du cadavre, alors un postulat de Koch devait être réalisé pour confirmer le statut de nématode entomopathogène. L'activité entomopathogène a été vérifiée en inoculant 5 larves de *G. mellonella* avec 250 ± 50 IJs. Si le postulat de Koch s'avérait positif, les larves infectées étaient placées en étoile sur du papier filtre humidifié dans un couvercle de boîte de pétri (Ø 55 mm). Ensuite, l'ensemble a été mis à flotter sur 5 ml d'eau, dans une boîte de pétri (Ø 90 mm). Cela permettait la migration des IJs vers l'eau lors de leur émergence, qui a été contrôlée tous les 2-3 jours à la loupe binoculaire jusqu'à un mois. Les IJs qui émergeaient des cadavres étaient récoltés, puis stockés dans des flacons de culture cellulaire à col incliné (Thermo Scientific™ EasYFlasks™) à 14 °C.

Tableau I Zones de récoltes des NEPs et des larves de taupins (le symbole ¹ indique les sites de collectes des larves de taupins et le symbole ² indique l'origine des souches utilisées lors du test de virulence)

Lieu de récolte	Localisation	Usage du sol	Nomenclature
Gembloux	50°33'48.5"N 4°41'58.4"E	Terrain d'essai sous culture biologique	Gbx w ^{1 2}
Gembloux	50°33'48.5"N 4°41'58.4"E	Prairie	Gbx p ¹
Ardennes	49°56'15.8"N 4°56'31.4"E	Zone sous culture biologique	Arc ¹
Ardennes	49°56'19.1"N 4°56'23.7"E	Prairie	Arp
Gesves	50°25'21.2"N 5°04'46.6"E	Zone de culture de pomme de terre et de maïs sous traitements	Gev ¹
Ormeignies	50°35'25.5"N 3°44'15.9"E	Ancienne prairie transformée en horticulture	OHM ^{1 2}
Sirault	50°30'46.6"N 3°47'16.3"E	Zone de culture de maïs et de blé biologique	Sir ¹
Jemeppe-sur-Sambre	50°28'15.2"N 4°39'21.0"E	Parcelle de maïs non-traitée	Jem ¹
Ernage	50°34'57.8"N 4°40'35.8"E	Zone de culture de betterave traitée aux pesticides	BetEr ²
Ernage	50°35'13.2"N 4°40'19.5"E	Zone de culture de maïs traitée aux pesticides	MaEr
Ernage	50°34'49.1"N 4°40'43.2"E	Zone de culture de pomme de terre traitée aux pesticides	PdEr

2.2. Identification et virulence des NEPs

2.2.1. Identification moléculaire de différentes espèces de nématodes entomopathogènes locales

L'identification a été réalisée selon un protocole adapté de Campos-Herrera *et al.* [64]. Un millilitre de solution de NEPs provenant des flacons de stockage a été prélevé, afin d'en extraire l'ADN en suivant le protocole du mini kit commercial « NucleoSpin Tissue » (Macherey Nagel™). L'ADN extrait a ensuite été amplifié utilisant la réaction en chaîne par polymérase (PCR) [65], utilisant comme amorces d'amplification : forward 18S et reverse 26S pour l'analyse de la région ITS, puis forward D2F et reverse 536 pour l'analyse de la région D2D3 permettant de confirmer l'espèce, associés à la Taq polymérase Q5®. La PCR a été effectuée avec un thermocycleur FastGene® à gradient. Les conditions de la PCR pour la région ITS étaient : 1 min à 98 °C, puis 15 secondes à 98 °C, 30 secondes à 58 °C, 1 minute à 72 °C et 2 minutes à 72 °C. Les conditions de la PCR pour la région D2D3 étaient : 30 secondes à 98 °C, 10 secondes à 98 °C, 30 secondes à 57 °C, 1 minute à 72 °C et 2 min à 72 °C. Ces conditions ont été réalisées sur un total de 30 cycles. Après les étapes d'extraction et d'amplification, la concentration d'ADN de chaque échantillon a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre Nanodrop™ 2000/2000c. Puis, l'échantillon a été purifié selon le protocole du mini kit commercial « Gel and PCR Clean up » (Macherey Nagel™). Les fragments amplifiés ont été envoyés en séquençage au laboratoire indépendant « Eurofins Genomics ». L'espèce de chaque échantillon a ensuite été identifiée par alignement des séquences avec l'outil BLAST sur le site National Library of Medicine [66].

2.2.2. Evaluation de la virulence de différentes souches de nématodes entomopathogènes envers les larves de taupins

Le test de virulence a été réalisé selon un protocole adapté de Campos-Herrera et Gutiérrez [36]. Pour cette expérience, trois espèces à travers onze souches de NEPs ont été testées, dont trois étaient d'origine commerciale, trois provenaient d'autres laboratoires et cinq provenaient des isolations réalisées (**Tableau II**). Les souches locales testées ont été choisies en fonction de l'espèce, de l'usage du sol (prairie ou culture) et des conditions de culture (avec ou sans utilisation de pesticides). Des pots en plastique ($V = 6.6 \text{ cm}^3$) ont été remplis de 10 grammes de sable (Cobo garden, Belgique) autoclavé et séché à 49 °C durant 48 h. Le sable a ensuite été humidifié à 90 % de sa capacité en rétention d'eau (CRE), avec une solution de NEPs permettant

d'atteindre une concentration de 250 IJs/cm³. Cette concentration a été déterminée par comparaison avec d'autres tests de virulence effectués sur différents insectes et les quantités préconisées dans le commerce [35], [36], [38], [67], [68].

Une larve de taupin (stade larvaire L5-L6) était ensuite placée dans chaque pot (n = 15 par souche). Un contrôle positif a été réalisé en remplaçant la larve de taupin par une larve de *G. mellonella* (n = 5 par souche). Deux contrôles négatifs ont été réalisés, en mettant des larves de taupins (n = 10) et des larves de *G. mellonella* (n = 5), dans des pots de sable avec seulement de l'eau sans NEPs. Les pots ont ensuite été fermés avec un couvercle percé et stockés à l'obscurité dans une chambre climatisée à 22 °C. Deux répliques techniques, séparés d'une semaine, ont été réalisés pour cette expérience. La mortalité des larves (taupins et *G. mellonella*) a été vérifiée 24 h, 48 h et 72 h après l'infection. Puis, un suivi hebdomadaire de la mortalité a été réalisé jusqu'à 4 semaines. Chaque semaine, les pots ont été pesés et la CRE a été ajustée à 90 %. Afin de vérifier que la mortalité observée était due aux NEPs, chaque larve morte a été rincée à l'eau, puis placée individuellement dans des pièges White et suivi jusqu'à l'émergence des nouveaux juvéniles infectieux (IJs) à l'obscurité dans une chambre climatisée à 22 °C [63].

Tableau II Souches de NEPs utilisées lors du test de virulence

Espèce	Origine	Nomenclature
<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	Commerciale	Hb enema
<i>Steinernema carpocapsae</i>	Commerciale	Sc enema
<i>Steinernema feltiae</i>	Commerciale	Sf insectosphere
<i>Steinernema carpocapsae</i>	Laboratoire	Sc lab1
<i>Steinernema feltiae</i>	Laboratoire	Sf lab2
<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	Laboratoire	Hb lab3
<i>Steinernema carpocapsae</i>	Locale	Sc Bett Ernage
<i>Steinernema carpocapsae</i>	Locale	Sc Gbx1
<i>Steinernema feltiae</i>	Locale	Sf OHM2
<i>Steinernema affine</i>	Locale	Sa OHM9
<i>Steinernema affine</i>	Locale	Sa Jem19

2.3. Evaluation de l'efficacité de la formulation biocide

2.3.1. Evaluation du taux de survie et de la virulence des nématodes entomopathogènes

Avant la réalisation de cette expérience, plusieurs pré-tests ont été effectués, permettant de sélectionner différents paramètres pour l'encapsulation : la taille de l'aiguille (Gauge 18G) (Annexe a) et la température de stockage des billes (4 °C) (Annexe b). Les concentrations de glycérol ont été ajustées en fonction de la littérature et des expériences préliminaires menées au sein du laboratoire. L'attractant utilisé dans ce mémoire (extrait de jus de pomme de terre) a été préalablement sélectionné grâce à diverses expérimentations réalisées au sein de mon laboratoire d'accueil. L'extrait de pomme de terre frais utilisé pour chaque formulation a été extrait à froid (EASEHOLD Centrifugeuse Fruits et Légumes 600 W), à partir de tubercules des variétés « Monalisa » et « Spunta » de l'espèce *Solanum tuberosum* (L., 1753) label Demeter [69]. Des billes d'alginate de sodium ont été fabriquées selon un protocole adapté de Kim *et al.* [55], [61], [70]. Une solution d'alginate de sodium (2 %, w/v) (Sigma-Aldrich, Royaume-Uni), d'extrait de pomme de terre (50 %, v/v), d' α -tocophérol (0.7 %, w/v), de glycérol (18 %, v/v) et de NEPs a été préparée et homogénéisée à l'aide de plaques agitatrices et d'agitateurs magnétique adaptés. Les NEPs incorporés étaient des nématodes de l'espèce *Heterorhabditis bacteriophora* (Poinar, 1976) et commercialisés par l'entreprise e-nema[®]. Cette souche de NEPs avait été désignée comme la plus virulente envers les larves de taupins, lors d'un précédent test de virulence réalisé au sein de ce centre de recherche [71]. La solution a été extrudée à travers une aiguille de seringue de 1.2 mm x 38 mm Gauge 18G (Romed HOLLAND) en utilisant une pompe péristaltique (6 rpm, Shenchen LabS3) pour être versée goutte à goutte dans une solution de chlorure de calcium (0.1 M) sous agitation magnétique (150 rpm). Les billes ont été polymérisées 30 minutes dans la solution, puis rincées à l'eau distillée et séchées pendant 20 minutes sous hotte chimique. Elles ont été stockées dans un flacon Schott (100 ml) à 4 °C durant 24 h avant d'être utilisées. Afin d'évaluer l'effet de l'encapsulation sur la virulence des NEPs, différentes concentrations ont été testées : 300 NEPs, 1 000 NEPs et un témoin (ne contenant pas de NEPs).

La survie des NEPs dans la bille a été évaluée après 24 h, 1 semaine et 4 semaines de stockage. Pour cela, chaque bille a été individuellement placée dans une boîte de pétri (Ø 55 mm) contenant 7 ml d'eau (bille immergée), puis ouverte en deux à l'aide d'un scalpel (n = 45 par concentration de NEPs). Après une incubation d'une heure dans une chambre climatisée à 22 °C, le nombre de nématodes émergés de chaque bille a été dénombré. Pour cela, les boîtes de

pétri ont été placées et observées sous une loupe binoculaire. Après avoir homogénéisé la solution avec une pince, les nématodes se trouvant dans un quart de la boîte de pétri (équivalent à 1.75 ml) ont été comptabilisés, puis une estimation de leur nombre pour le volume total (7 ml) a été réalisée. En parallèle, la virulence des NEPs encapsulés a également été évaluée. Pour ce faire, des billes ont été individuellement placées dans une boîte de pétri (Ø 55 mm) sur un papier filtre humidifié avec 250 µl d'eau (n = 30 par modalité). Chaque bille a été mise en présence d'une larve de *G. mellonella*. Chaque système a été placé à l'obscurité dans une chambre climatisée à 22 °C. Un suivi journalier de la mortalité des larves de *G. mellonella* a été réalisé durant 5 jours.

2.3.2. Test d'orientation des larves de taupins envers la co-encapsulation attractant, phagostimulant et nématodes entomopathogènes

Des tests d'orientation ont été réalisés, afin d'évaluer si l'ajout des NEPs avait un effet sur l'attractivité des billes. Des billes d'alginate contenant des NEPs, l'extrait de pomme de terre (attractant) et un phagostimulant ont été fabriquées : alginate de sodium (2 %, w/v), extrait de pomme de terre (50 %, v/v), α -tocophérol (0.7 %, w/v), NEPs (300 par bille), glycérol (9 %, v/v) et sucrose (1 %, w/v). Un pré-test a été réalisé afin de déterminer le phagostimulant le plus efficace pour les larves de taupins parmi différents sucres simples, en s'appuyant sur les résultats obtenus par Crombie et Darrah [54]. Les résultats ont permis de sélectionner le sucrose à 1 %, utilisé lors du test d'orientation et de morsure (Annexe c). Des billes d'alginate sans NEPs (contrôle) ont également été fabriquées. Les billes ont ensuite été stockées dans un flacon Schott (100 ml) à 4 °C pendant 24 h avant d'être utilisées.

Un olfactomètre en verre (20 cm) à deux voies a été utilisé, comportant une zone centrale (neutre ou non-choix) de 6 cm et 2 zones de choix latérales de 7 cm ouvertes à leur extrémité. L'olfactomètre a été rempli avec de la vermiculite humidifiée à 50 % (w/v). Un gramme de billes (avec ou sans NEPs) a été placé dans un flacon Schott (100 ml) rempli de vermiculite humidifiée à 50 % et fermé avec un bouchon (GL45) en polypropylène avec ouverture et une moustiquaire. La moustiquaire avait pour but d'empêcher l'accès à l'insecte aux billes contenues dans le flacon Schott. Les deux flacons contenant les billes ont par la suite été connectés à chaque extrémité de l'olfactomètre (**Figure 3**). Le système est resté clos pendant 15 minutes, afin de permettre la diffusion des odeurs dans l'ensemble de l'olfactomètre. Puis, une larve de taupin (stade larvaire L5-L6) a été ajoutée, la tête vers le bas, par l'entrée centrale

(GL14). L'entrée centrale a été fermée (non hermétiquement), puis l'olfactomètre a été mis à l'obscurité dans une chambre climatisée à 22 °C et laissé 1 heure, le temps que la larve de taupin fasse un choix. Une fois l'heure écoulée, l'olfactomètre a été vidé progressivement et la position de la larve a été relevée (n = 59).



Figure 3 Dispositif olfactométrique utilisé dans le cadre de test d'orientation

2.3.3. Test d'efficacité de la co-encapsulation attractant, phagostimulant et NEPs sur les larves de taupins

Afin d'évaluer l'efficacité de notre formulation, des billes d'alginate de sodium contenant des NEPs, un attractant (extrait de pomme de terre) et un phagostimulant (sucrose) ont été fabriquées : alginate de sodium (2 %, w/v), extrait de pomme de terre (50 %, v/v), α -tocophérol (0.7 %, w/v), glycérol (18 %, v/v), NEPs (300 par bille) et sucrose (1 %, w/v). Des billes sans NEPs ont également été fabriquées afin de vérifier que la formulation « attractant + phagostimulant » n'induisait pas de mortalité non désirée. Les billes ont été stockées dans un flacon Schott (100 ml) à 4 °C pendant 24 h avant d'être utilisées.

Pour chaque modalité, 5 billes ont été placées avec une larve de taupin (stade larvaire L5-L6) dans des pots rectangulaires (5,5 cm x 4 cm x 5 cm) contenant 12 g de vermiculite humidifiée à 50 % (v/v) (billes avec NEPs : n = 42 ; billes sans NEPs : n = 15). La validité du système a été évaluée en remplaçant la larve de taupin par une larve de *G. mellonella* (billes avec NEPs : n = 10). Les pots ont été stockés à l'obscurité dans une chambre climatisée à 22 °C. Au bout de 48 heures, un suivi de l'appétence des billes a été réalisé en notifiant le nombre de billes avec

ou sans morsure à la loupe binoculaire. Un suivi de la mortalité des larves a été réalisé à 48 h, 4 jours, 8 jours, 11 jours et 15 jours. Pour chaque suivi, les anciennes billes ont été remplacées par des nouvelles et la vermiculite était renouvelée.

2.4. Analyses statistiques

Toutes les données présentées dans ce manuscrit ont été analysées avec le langage de programmation R[®] (4.2.2) et l'environnement de travail RStudio (4.2.2). Concernant les tests de virulence, un test du Chi-deux χ^2 a été réalisé afin de comparer la similitude entre les deux tests (packages « lme4 », « emmeans » et « multcomp »). Puis une analyse de la mortalité a été réalisée grâce à un test Log-Rank de Mantel-Cox et des courbes de survie de Kaplan-Meier, avec comme souche de référence « Contrôle négatif » (packages « survival », « ggplot2 » et « survminer »). Pour les résultats du test d'évaluation du taux de survie et du test d'efficacité de la co-encapsulation, la normalité des résidus et l'homoscédasticité ont été vérifiées en utilisant respectivement un test de Shapiro-Wilk et un test de Bartlett. La différence significative des moyennes a été testée en utilisant une ANOVA à un facteur, suivi d'un test post-hoc de Tukey lorsque les conditions de normalité et d'homoscédasticité étaient avérées. Lorsqu'elles ne l'étaient pas, la différence significative des moyennes a été testée en utilisant un test de Kruskal-Wallis, suivi d'un test post-hoc de Dunn (package « dunn.test »). Les résultats d'orientation en olfactomètre ont été analysés grâce à un test du Chi-deux χ^2 (packages « lme4 », « emmeans » et « multcomp »).

3. Résultats

3.1. Identification moléculaire de différentes espèces de nématodes entomopathogènes locales

Les espèces de NEPs récoltées sur les différents sites de Belgique ont été identifiées (**Tableau III**). La présence des NEPs a été enregistrée pour 7 des 11 sites de récolte : Potager Gembloux (Gbx w), Prairie Gembloux (Gbx p), Culture Ardennes (Arc), Prairie Ardennes (Arp), Ormeignies (OHM), Jemeppe-sur-Sambre (Jem) et Betterave Ernage sous pesticide (BetEr).

Parmi tous les nématodes entomopathogènes récoltés, 3 espèces différentes ont été identifiées appartenant tous au genre *Steinernema* : *Steinernema carpocapsae* (Weiser, 1955), *Steinernema affine* (Bovien, 1937) et *Steinernema feltiae* (Filipjev, 1934). La proportion de chaque espèce sur l'ensemble des sites était équivalente, avec 29.3 ± 8.6 % (n = 58) pour *S. carpocapsae*, 34.5 ± 7.0 % (n = 58) pour *S. affine* et 36.2 ± 5.9 % (n = 58) pour *S. feltiae* (**Figure 4**). Quatre de ces sites ne comportaient qu'une seule espèce : *S. carpocapsae* sur 3 sites (Gbx w, Gbx p et BetEr) et *S. feltiae* sur un site (Arp). Alors que sur les 3 autres sites (Arc, OHM et Jem), au moins 2 espèces différentes ont été identifiées, dont l'une était présente majoritairement (> 75 %) par rapport aux autres (77.7 ± 1.1 %, n = 35) : *S. affine* sur 2 sites (Arc et Jem) et *S. feltiae* sur un site (OHM). A noter que *S. carpocapsae* a été identifiée sur 6 des 7 sites, alors que *S. affine* et *S. feltiae* n'ont été identifiées que sur 3 des 7 sites (**Figure 5**).

Tableau III Identification et répartition des espèces de nématodes entomopathogènes récoltées en Belgique (le symbole * représente la proportion de larves de *G. mellonella* infectées dans les récipients contenant le sol du site par des NEPs)

Codification	Espèce	Proportion sur site*
Gbx w	<i>S. carpocapsae</i>	100 %
Gbx p	<i>S. carpocapsae</i>	100 %
Arc	<i>S. carpocapsae</i>	18 %
	<i>S. affine</i>	82 %
Arp	<i>S. feltiae</i>	100 %
Gev	-	-
OHM	<i>S. feltiae</i>	80 %
	<i>S. carpocapsae</i>	10 %
	<i>S. affine</i>	10 %
Sir	-	-
Jem	<i>S. feltiae</i>	7 %
	<i>S. carpocapsae</i>	22 %
	<i>S. affine</i>	71 %
BetEr	<i>S. carpocapsae</i>	100 %
MaEr	-	-
PdEr	-	-

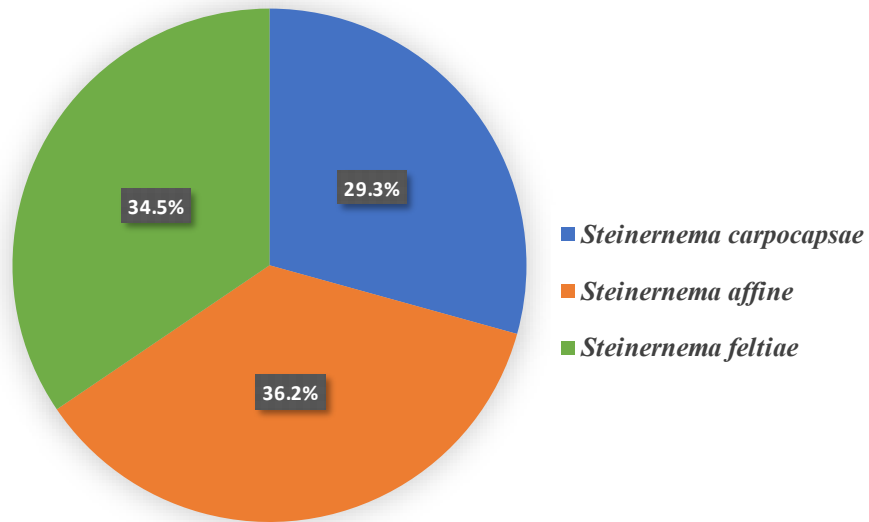


Figure 4 Proportion des espèces récoltées sur l'ensemble des sites

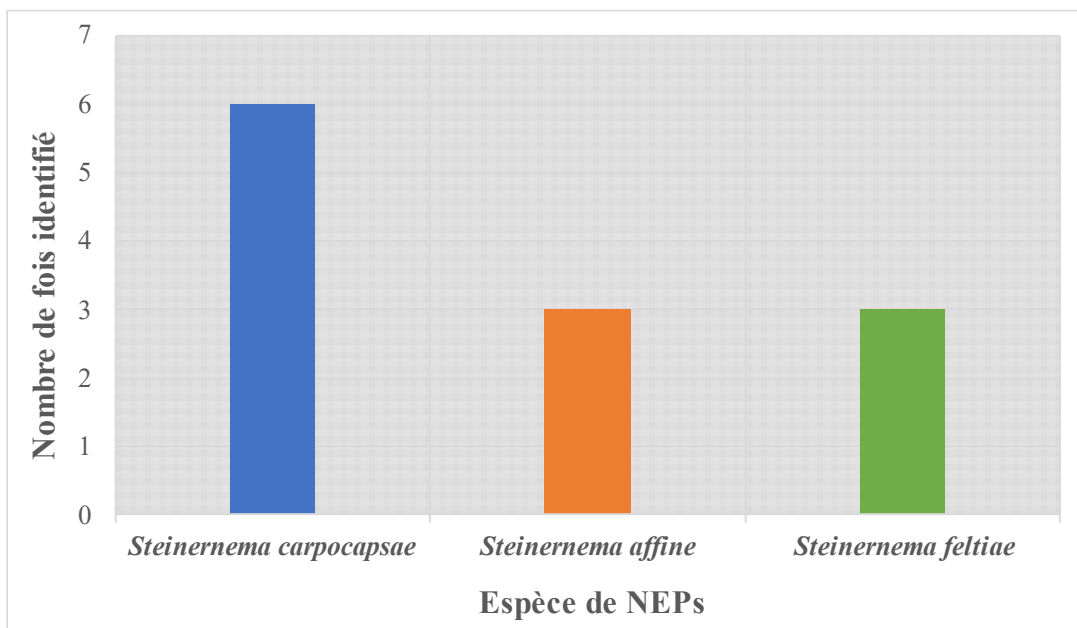


Figure 5 Nombre de sites où l'espèce de NEPs a été détectée sur l'ensemble des 7 sites

3.2. Evaluation de la virulence de différentes souches de nématodes entomopathogènes envers les larves de taupins

La virulence des onze souches de NEPs envers les larves de taupins, a été évaluée jusqu'à 4 semaines d'exposition (28 jours) (**Figure 6**). Les résultats des deux réplicas techniques n'étant pas significativement différents (test du Khi-deux : $\chi^2 = 0.074$, $p = 0.79$, $df = 1$), ils ont été combinés. La virulence des souches envers les larves de taupins était significativement différente (test Log-Rank de Mantel-Cox : $\chi^2 = 38.65$, $p < 0.001$, $df = 11$). Sur l'ensemble des souches testées, la probabilité de survie des larves de taupin est restée supérieure à 0.65. Les souches Sc lab1, Sc enema et Sf insectosphere ont été celles qui se sont montrées les plus virulentes envers les larves de taupins, avec respectivement 33 %, 30 % et 33 % d'efficacité. *A contrario*, 5 souches n'ont pas atteint plus de 10 % d'efficacité : Hb lab3, Sf OHM2, Sa OHM9, Sa Jem19 et Sc Gbx 1. Concernant le contrôle, aucun mort n'a été enregistré (**Figure 6**).

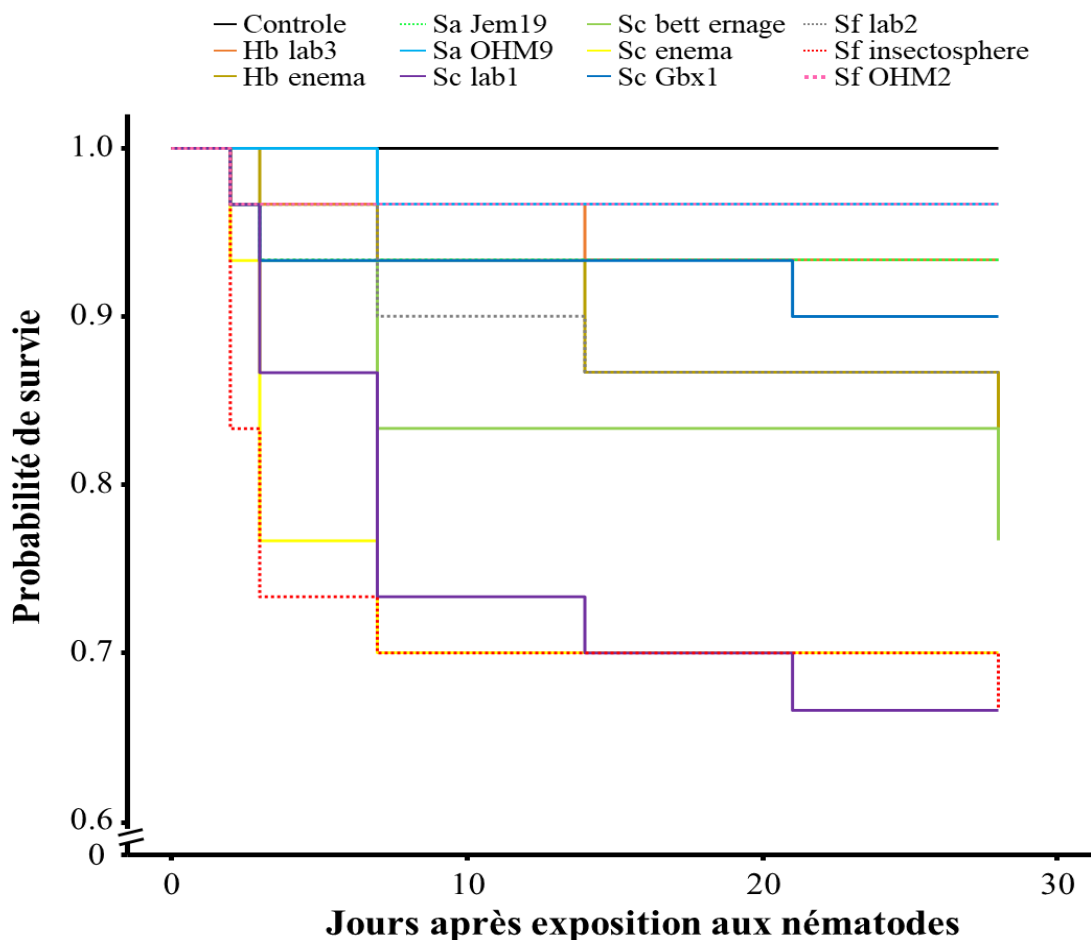


Figure 6 Courbes de suivi de la mortalité de larves de taupins en fonction du temps d'exposition aux différentes souches de NEPs (test Log-Rank de Mantel-Cox)

3.3. Evaluation du taux de survie et de la virulence des nématodes entomopathogènes

Le taux de NEPs émergés des billes a été évalué pour la totalité du volume d'eau dans la boîte de pétri (7 ml) (**Tableau IV**). Pour les billes contenant 300 NEPs, le taux d'émergence des NEPs était significativement différent selon la durée de stockage (test de Kruskal–Wallis : $\chi^2 = 51.818$, $p < 0.001$, $df = 2$). Le taux d'émergence était de 52 % après 72 h de stockage, puis est resté constant après 1 semaine de stockage (42 %), mais a diminué significativement après 4 semaines (13 %) (test post hoc de Dunn : $\chi^2 = 51.8183$, $p < 0.001$, $df = 2$). Le taux de mortalité de *G. mellonella* était significativement différent en fonction de la durée de stockage des billes (test de Kruskal–Wallis : $\chi^2 = 55.049$, $p < 0.001$, $df = 2$). Celui-ci a significativement diminué après 4 semaines de stockage avec 20 % de larves mortes, contre 100 % après 72 h et 1 semaine de stockage (test post hoc de Dunn : $\chi^2 = 55.0494$, $p < 0.001$, $df = 2$). De plus, la durée de stockage des billes influençait significativement le délai infection/mort (test de Kruskal–Wallis : $\chi^2 = 19.173$, $p < 0.001$, $df = 2$). Celui-ci a significativement augmenté après 4 semaines de stockage (3.8 ± 0.3 jours), comparé à 72 h (2.8 ± 0.1 jours) et 1 semaine de stockage (2.6 ± 0.1 jours) (test post hoc de Dunn : $\chi^2 = 19.1734$, $p < 0.001$, $df = 2$).

En ce qui concerne les billes formulées avec 1 000 NEPs, le taux moyen de NEPs sortis des billes n'était pas significativement différent à celui des billes contenant 300 NEPs (test de Kruskal–Wallis : $\chi^2 = 0.771$, $p = 0.380$, $df = 1$). Néanmoins, le taux de NEPs émergés était significativement différent en fonction des durées de stockage (test de Kruskal–Wallis : $\chi^2 = 14.587$, $p < 0.001$, $df = 2$). Après 1 semaine de stockage, le taux de survie des NEPs était significativement inférieur (20 %) comparé au taux de survie des NEPs après 72 h (29 %) et 4 semaines de stockage (26 %) (test post hoc de Dunn : $\chi^2 = 14.5871$, $p < 0.01$, $df = 2$). Le taux de mortalité de *G. mellonella* exposées aux billes contenant 1 000 NEPs est resté constant (100 %) pour chaque condition. Cependant, le délai infection/mort était significativement différent en fonction des durées de stockage (test de Kruskal–Wallis : $\chi^2 = 55.049$, $p < 0.001$, $df = 2$). Après 4 semaines de stockage, celui-ci a augmenté (3.2 ± 0.1 jours), comparé à ceux après 72 h (2.2 ± 0.1) et 1 semaine de stockage (2.2 ± 0.1) (test post hoc de Dunn : $\chi^2 = 55.0494$, $p < 0.001$, $df = 2$). A noter, qu'aucune larve de *G. mellonella* contrôle n'a été retrouvée morte.

Tableau IV Nombre de NEPs émergés des billes d'alginate et leur virulence sur *G. mellonella*

Durée de stockage	Nombre de NEPs par bille		Virulence sur <i>G. mellonella</i>	
	Incorporés	Emergés (% ± IC)	Taux de mortalité (% ± IC)	Délai infection - mort (Moy jour ± ES)
72 h	0	-	0	-
	300	52 ± 8.5	100	2.8 ± 0.1
	1000	29 ± 3.2	100	2.2 ± 0.1
1 semaine	0	-	0	-
	300	42 ± 5.2	100	2.6 ± 0.1
	1000	20 ± 1.4	100	2.2 ± 0.1
4 semaines	0	-	0	-
	300	13 ± 1.4	20	3.8 ± 0.3
	1000	26 ± 2.0	100	3.2 ± 0.1

3.4. Test d'orientation des larves de taupins envers la co-encapsulation attractant, phagostimulant et nématodes entomopathogènes

Après 1 heure de test, 53 % des larves de taupins ont fait un choix (**Figure 7**). Parmi les larves ayant réalisé un choix, il n'y a pas eu de différence significative entre les billes avec NEPs et les billes sans NEPs (test du Khi-deux : $\chi^2 = 0.290$, $p = 0.59$, $df = 1$) (**Figure 7**).

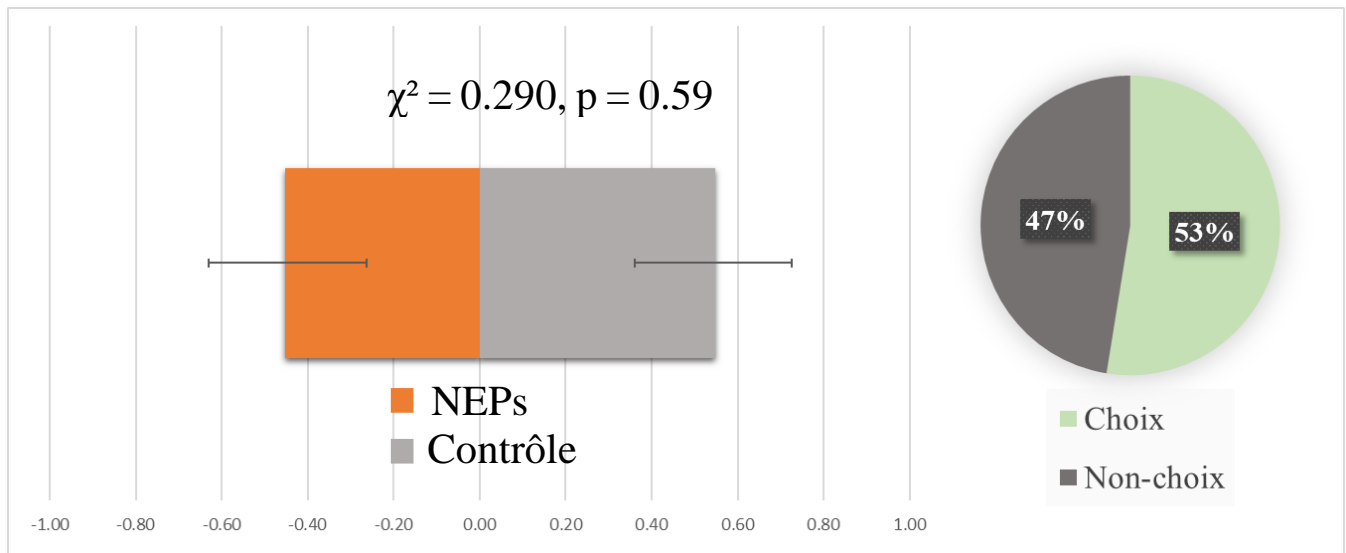


Figure 7 Proportion de larves (± IC) ayant réalisé un choix (test du Khi-deux)

3.5. Test d'efficacité de la co-encapsulation attractant, phagostimulant et NEPs sur les larves de taupins

Le nombre de billes mordues par les larves de taupins n'était pas significativement différent entre les formulations : NSJ18 (billes avec NEPs, sucrose, extrait de pomme de terre et glycérol) et SJ18 (billes avec sucrose, extrait de pomme de terre et glycérol) (test de Kruskal–Wallis : $\chi^2 = 0.851$, $p = 0.0837$, $df = 3$) (**Figure 8**).

La virulence des billes envers les larves de taupins et les larves de *G. mellonella* n'était pas significativement différente selon la formulation. En effet, pour les modalités contenant des NEPs, il n'y a pas eu de larves de taupins mortes durant toute la période de suivi. En revanche, 100 % des larves de *G. mellonella* utilisées comme contrôle positif ont été tuées par les NEPs. Les contrôles négatifs n'ont pas montré de mortalité.

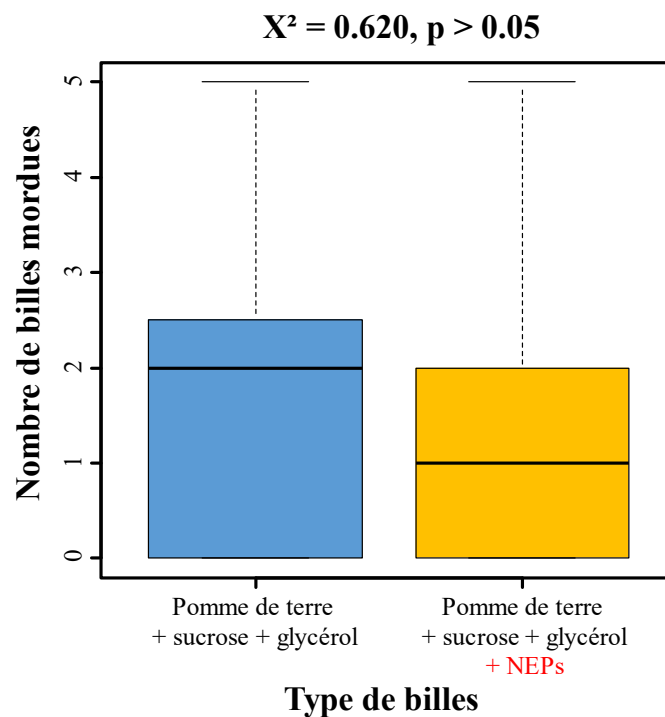


Figure 8 Nombre de billes mordues par modalité par larve de taupin (test de Kruskal–Wallis)

4. Discussion

L'objectif principal de ce travail était de participer au développement d'une nouvelle méthode de biocontrôle de type « attract-and-kill » contre la larve de taupin, en utilisant des NEPs, un attractant et un phagostimulant. Pour cela, des souches locales de NEPs ont été identifiées et leur efficacité évaluée. Puis, une formulation en gel d'alginate encapsulant des

NEPs, de l'extrait de jus de pomme de terre et du sucrose a été optimisée, puis son efficacité a été testée sur des larves de taupins.

L'utilisation de souches non-indigènes de NEPs peut induire des effets néfastes sur des organismes non-ciblés ou remplacer des NEPs locaux [31]. Ainsi, dans le cadre de ce travail, différents sites de la région wallonne ont été prospectés afin de récolter des souches locales de NEPs. Sur les 4 sites dont la présence de NEPs n'a pas été détectée, 3 d'entre eux ont été traités aux pesticides. Les pesticides utilisés ont probablement dû impacter la reproduction et la survie des NEPs présents sur les sites, ce qui peut expliquer leur absence dans nos échantillons [72]–[75]. Le site « Betterave Ernage sous pesticide » a été une exception, bien qu'il ait été traité aux pesticides, des NEPs ont été identifiés, avec cependant un faible nombre d'échantillons. En ce qui concerne les sites dont la présence de NEPs a été confirmée, les 3 espèces différentes de NEPs identifiées sont des espèces communes se retrouvant dans différents pays européens [64], [76]–[78]. Néanmoins, nos résultats n'ont pas été similaires à ceux d'autres études, qui ont généralement retrouvé au moins 2 genres : *Steinernema* et *Heterorhabditis*, sur différents sites de forêts, de prairies et d'agricultures, avec notamment l'espèce *Heterorhabditis bacteriophora* [62], [64], [76], [77], [79]. Dans cette étude, il n'a été retrouvé qu'un seul genre : *Steinernema*. Ceci pourrait s'expliquer par un plus faible nombre de sites échantillonnés (11 contre 40 [76] et 50 [64]) et une plus faible variété de sites (2 contre 4 [64], [76]), comparés aux autres études. L'espèce *H. bacteriophora* est une espèce généralement commune des sols côtiers sablonneux [80]–[83], un type de site que nous n'avons pas échantillonné, car ne se trouve pas en région wallonne. Ceci pourrait expliquer leur absence parmi les sites. Chaque espèce était présente en proportion équivalente sur chaque site où elles étaient présentes. Il y avait cependant une répartition plus abondante de *S. carpocapsae* comparée à *S. affine* et *S. feltiae*, alors qu'en général l'espèce *S. feltiae* est identifiée sur un plus grand nombre de sites et est la plus commune [62], [64], [76], [77], [79]. En effet, l'espèce *S. feltiae* peut se retrouver sur une grande variété de sites (altitude, température, pH, etc.) avec comme préférence les prairies [80], [84]–[86]. Au contraire, *S. carpocapsae* préfère les sols lourds dans des habitats secs et tempérés [84], ce qui est le cas de la Belgique [87]. La moitié des sites où des NEPs ont été détectés ne comportaient qu'une seule espèce, l'autre moitié comportant 2 ou 3 espèces, avec toujours la dominance d'une espèce sur les autres. Cela peut s'expliquer par le fait que les espèces de *Steinernema* prédominent sur les autres lorsqu'elles co-infectent un hôte, dû aux différences de spécificité et de capacité de croissance de leurs bactéries symbiotiques [88]–[90]. Sur nos différents sites, 3 espèces appartenant au même genre ont été retrouvées. Il serait alors intéressant de réaliser de

nouveaux prélèvements sur de nouveaux sites en Belgique (forêt, prairie, etc.). Ceci afin de confirmer la répartition des espèces présentes et d'en trouver de nouvelles, comme les côtes sablonneuses en Flandre, afin de récolter des souches locales d'*H. bacteriophora*, qui se révèle parmi les espèces les plus virulentes [38], [67].

Dans cette étude, un test de virulence a été réalisé afin de sélectionner la meilleure souche de NEPs pour avoir le biocide le plus efficace envers les larves de taupins. Les résultats provenant d'autres études sont différents et hétérogènes, en fonction des espèces ciblées, des souches de NEPs utilisées, des quantités d'IJs inoculés et de la durée d'exposition, rendant difficile une comparaison avec nos résultats [35], [36], [38], [67]. Néanmoins, un des tests de virulence semble avoir été réalisé dans des conditions similaires aux nôtres. En effet, ce test ciblait une même espèce (*A. obscurus*) en utilisant des souches commerciales et locales de NEPs de mêmes genres (*Steinernema* et *Heterorhabditis*), sur une durée similaire (4 semaines), avec cependant une quantité différente d'IJs inoculés par larve de taupin (1 000 et 2 000 contre 1 650 dans notre étude) [91]. Les résultats de cette étude ont montré que les larves de taupins inoculées avec 2 000 IJs avaient un taux de mortalité allant de 15 % à 35 %. Ces résultats sont sensiblement similaires aux nôtres, à la différence que nous avons obtenue jusqu'à 35 % de mortalité avec 1 650 IJs inoculés par larve de taupin, montrant ainsi que certaines de nos souches testées ont été plus efficaces. Dans notre étude, ce sont les souches Sc lab1 (laboratoire), Sc enema et Sf insectosphere (commerciales) qui ont été les plus virulentes, des souches qui ont déjà été utilisées en test et/ou dans le commerce [68], [92], [93]. A l'inverse, 4 des 5 souches locales testées (Sf OHM2, Sa OHM9, Sa Jem19 et Sc Gbx 1), ont été parmi les moins efficaces. Cela peut être expliqué par le principe de co-évolution entre un prédateur et une proie, les larves de taupins se seraient adaptées aux NEPs locaux et sauraient donc mieux se défendre contre eux, [94], [95]. Contrairement aux résultats d'un précédent test de virulence réalisé au sein de notre centre de recherche, Hb enema n'a pas été la souche la plus virulente [71]. Cela peut provenir du fait que les souches de laboratoires et commerciales ont peut-être subi des processus de sélection répétés les rendant de plus en plus virulentes envers cet organisme cible. Cela peut aussi être dû à la différence d'IJs inoculés par larve de taupin qui était significativement plus élevé (6 000 IJs) lors du test précédent contre 1 650 IJs dans le nôtre. Nous avons choisi cette quantité afin de mieux correspondre aux quantités utilisées dans d'autres tests de même type et aux préconisations dans le commerce [35], [36], [38], [67], [68]. Avec nos conditions, les souches Sc lab1, Sc enema et Sf insectosphere déterminées comme les plus virulentes, peuvent être sélectionnées pour de futures encapsulations.

L'utilisation actuelle de NEPs comme biocide comporte des limites [33], [34]. Dans l'objectif de palier à celles-ci, les NEPs ont été encapsulés dans des billes d'alginate [55]–[59]. La formulation a par la suite été améliorée en ajoutant du glycérol, afin d'induire la dormance des NEPs, augmentant ainsi leur durée de stockage [56], [61]. Néanmoins, au cours de nos tests nous avons constaté que les NEPs encapsulés avec du glycérol émergeaient lentement des billes après qu'elles aient été placées dans l'eau. De fait, pour faciliter la sortie des NEPs, une coupure de la bille en deux a été réalisée au scalpel. L'étude de Kim *et al.* [61] a montré qu'il était possible d'incorporer différentes quantités de NEPs dans des billes d'alginate (de 100 à 4 000 par bille), sans que cela n'affecte la forme des billes. Nous avons ainsi encapsulé 2 quantités de NEPs différentes (300 IJs et 1 000 IJs) afin de vérifier leur taux d'émergence et leur virulence à température ambiante. A la différence de ce qui a été observé par Kim *et al.* [61], le taux d'émergence pour les 2 modalités n'a pas dépassé les 55 %, mais est cohérent avec les résultats de Hiltbold *et al.* [57], qui ont observé jusqu'à 40 % de NEPs émergés à température ambiante. Concernant les billes contenant 300 NEPs, le taux d'émergence des billes diminuait après un stockage à long terme (4 semaines). Cette observation est corrélée avec le fait que la température est un paramètre important de la survie des IJs [96]–[98]. En effet, il a été montré qu'un stockage à basse température donnait un faible taux d'émergence sur le long terme [57], [96], [99]. En revanche, pour les billes contenant 1 000 NEPs, nous avons observé une diminution significative du taux d'émergence après 1 semaine de stockage, mais pas après 4 semaines de stockage. Le nombre de NEPs encapsulés dans les billes aurait donc une influence sur leur taux d'émergence à travers le temps. Il est possible que la cause soit le glycérol. Nous pouvons émettre l'hypothèse qu'au plus la densité de NEPs dans une bille est élevée, au moins chaque individu a la possibilité d'être entourée de glycérol et donc d'avoir une dormance efficace, causant ainsi un épuisement plus rapide des NEPs. Ici, la concentration a donc pu être trop faible par rapport à la quantité de NEPs, induisant une qualité de dormance insuffisante. Concernant la virulence sur des *G. mellonella*, le taux de mortalité a été maximal sur la quasi-totalité des modalités, confirmant que les NEPs sortant des billes d'alginate étaient toujours virulents [57], [96]. Cependant, le taux de mortalité des larves en présence de billes contenant 300 NEPs a chuté à 20 % après 4 semaines de stockage. Cette diminution de virulence n'est pas en accord avec les observations de Chen et Glazer [56] montrant que la virulence des NEPs restait à 100 % dans des capsules d'alginates de sodium (2 %), même après 6 mois de stockage dans des conditions différentes. Etant donné qu'un long stockage à basse température impacte la survie des NEPs dans les billes, nous pouvons émettre l'hypothèse que la quantité de NEPs capables d'infecter les larves de *G. mellonella* ait diminué [96]–[99]. Nos résultats montrent

que la quantité de NEPs incorporée avait une influence sur la rapidité des NEPs à tuer. Les billes contenant 1 000 NEPs ont été plus rapides à tuer (2 jours) que celles avec 300 NEPs (3 jours) après un stockage de 72 h et d'une semaine. Après un stockage à long terme (4 semaines), les NEPs émergents des billes ont mis une journée de plus à tuer, comparé aux stockages à court (72 h) et moyen terme (1 semaine), alors que les NEPs tuent leur hôte en 48 h / 72 h [23], [24]. Ces résultats ont ainsi montré une diminution de la virulence des NEPs lorsqu'ils sont stockés à long terme dans des billes d'alginate, quelle que soit leur quantité. Dans l'objectif de conserver le plus longtemps possible un taux élevé d'émergence et une importante efficacité biocide des billes, il faudrait potentiellement modifier la formulation avec 18 % de glycérol et une encapsulation d'au minimum 1 000 NEPs par bille, afin de déterminer l'influence de la quantité de NEPs sur la formulation.

Il a été démontré que des billes d'alginate composé de jus de pomme de terre étaient attractives pour les larves de taupins [100], [101]. La présence d'un attractant au sein des billes d'alginate permettrait donc d'augmenter la probabilité de rencontre entre les larves de taupins et les NEPs. Cette nouvelle formule combinant attractant, phagostimulant et NEPs a été testée dans l'objectif de déterminer si le potentiel attractif des billes était toujours actif ou si une répulsivité était détectée. Dans ce test, la moitié des larves de taupins ne semblent pas avoir réalisé de choix. Cette observation peut s'expliquer par le fait que la larve de taupin avait la possibilité de se mouvoir dans l'olfactomètre durant toute l'heure de test. En effet, il n'y avait pas de choix définitif, la larve avait la possibilité de choisir un côté, puis de se rediriger vers l'autre côté [102], [103]. De plus, étant donné que l'extrait de pomme de terre se situait parmi les deux choix, son odeur attractante s'est diffusée dans l'ensemble de l'olfactomètre [104]. La forte proportion de non-choix nous a ainsi montrés que l'ajout de NEPs n'a pas eu d'influence sur le comportement des larves. Concernant l'autre moitié des larves de taupins, elles s'orientaient de façon similaire du côté des billes avec et sans NEPs. Or, la défense la plus efficace des insectes est le comportement d'évitement des différents pathogènes [105]. Les larves de taupins n'ont donc pas détecté les NEPs encapsulés. La dureté des billes d'alginate est dépendante de la concentration de calcium (Ca^{2+}) mise dans la formulation [106]. Une dureté trop importante des billes a donc pu bloquer la détection des NEPs. Cela peut aussi être expliqué par l'odeur fortement attractive de l'extrait de pomme de terre contenu dans les billes [100], [101]. Celle-ci aurait pu « camoufler » les odeurs émises par les NEPs encapsulés. Ces résultats nous permettent donc de supposer qu'il est possible d'encapsuler différents pathogènes (champignons entomopathogènes, bactéries entomopathogènes, nématodes entomopathogènes,

etc.) dans des billes d'alginate avec un attractant et un phagostimulant, sans que l'insecte n'arrive à les détecter. Une étude des odeurs émises par les NEPs pourrait être réalisée afin d'en comprendre les mécanismes.

Une des principales limites d'utilisation de NEPs comme biocide contre les larves de taupins est que les larves de taupins possèdent des mécanismes de défense performant contre eux, dont notamment une cuticule très résistante et un système immunitaire efficace [43]. Afin d'y faire face, un phagostimulant a été choisi parmi différents composés afin d'induire une morsure des billes, pour que les NEPs soient ingérés et puissent infecter les larves de taupins. Du sucrose à 1 % a donc été ajouté dans la formulation des billes d'alginate [54]. Nos résultats ont montré que l'ajout de NEPs dans les billes n'a pas eu d'impacts significatifs sur le nombre de billes mordues. Cela confirme ainsi nos résultats obtenus précédemment, qui ont montré que les NEPs n'avaient pas été détectés dans les billes par les larves de taupins, ne modifiant pas leur orientation. Le sucrose ajouté dans la formulation n'a pas induit de mortalité non désirée. Les larves de *G. mellonella* (contrôle) ont été tuées par les NEPs, signifiant que les NEPs dans les billes étaient vivants et virulents et que le système est efficace. En revanche, aucune larve de taupin n'est morte après avoir mordu des billes contenant des NEPs. Ces résultats peuvent s'expliquer par le fait qu'il n'y ait pas eu d'observation de billes entièrement mangées, seulement des morsures. Ces morsures ont été réalisées aux bordures de la bille, là où la concentration de NEPs est la plus faible. En effet, Kim *et al.* [61] avait montré que pour nos concentrations d'alginate et de chlorure de calcium, les NEPs se concentraient au centre de la bille. La quantité de NEPs ingérés a donc été sensiblement inférieure à la quantité totale encapsulée (300 NEPs). De plus, nos résultats du test de virulence ont montré que la souche Hb enema était peu virulente après 2 semaines en exposition directe. La faible quantité de NEPs ingérés a probablement réussi à pénétrer dans la larve de taupin, mais ont sans doute été tués par le système immunitaire de la larve de taupin, qui est élaboré et capable de répondre de manière adaptée à de nombreux agents infectieux [107]. Le système d'encapsulation d'un attractant, d'un phagostimulant et de NEPs dans des billes d'alginate, a possiblement permis de contourner la cuticule résistante des larves de taupins en introduisant directement les NEPs dans l'organisme. Cependant, cela ne leur a pas permis d'arriver dans l'hémolymphe (zone où la bactérie est relâchée) [23], mais dans le système digestif, les exposant aux nombreuses défenses immunitaires de l'insecte [107]–[109]. Il serait intéressant d'augmenter la quantité de NEPs à encapsuler et d'utiliser une souche plus virulente afin d'augmenter significativement la probabilité d'infection de la larve de taupin.

5. Conclusion

La lutte biologique contre les ravageurs de cultures est un point essentiel de l'avenir de l'agriculture. Des systèmes alternatifs aux pesticides sont nécessaires et doivent être développés. Notre étude a permis de participer au développement d'un système de bio-contrôle de type « attract-and-kill », envers les larves de taupins (*Agriotes lineatus* et *A. obscurus*), en utilisant des NEPs encapsulés dans des billes d'alginate. Cette technique a pu être améliorée en ajoutant un attractant (extrait de pomme de terre) et un phagostimulant (sucrose) induisant la morsure, afin d'augmenter la probabilité de leur rencontre et l'infectiosité. Pour cela, des souches locales de NEPs ont été récoltées et identifiées sur différents sites de Wallonie en Belgique (*Steinernema carpocapsae*, *Steinernema affine* et *Steinernema feltiae*). Un test de virulence sur des souches de laboratoire, commerciales et locales nous a permis d'identifier 3 souches virulentes (*Sc lab1*, *Sc enema* et *Sf insectosphere*) envers les larves de taupins après 4 semaines d'exposition. Il serait ainsi intéressant d'échantillonner de nouveaux sites en Belgique, pour essayer d'avoir des *Heterorhabditis bacteriophora*. La virulence de ces nouvelles souches serait comparée à celles des 3. Nous avons pu mettre au point une formulation (attractant, phagostimulant et biocide). Des objectifs ont été atteints, les larves de taupins sont attirées par les billes et les mangent. Mais certains paramètres restent à être ajustés (souche utilisée, quantité à incorporer). La réalisation d'une étude sur les odeurs émises par les NEPs serait pertinente pour comprendre le comportement des larves de taupins vis-à-vis des NEPs. Enfin, il pourrait être intéressant d'isoler et d'étudier les bactéries entomopathogènes symbiotique avec les NEPs. Nous pourrions alors envisager d'encapsuler les bactéries les plus virulentes dans les billes sans le vecteur nématode. La viabilité et la virulence de ce nouveau type de bille seraient ainsi évaluées et comparées à celles des NEPs.

Bibliographie

- [1] SHARMA A., KUMAR V., SHAHZAD B., TANVEER M., SIDHU G. P. S., HANDA N., KOHLI S. K., YADAV P., BALI A. S., PARIHAR R. D., DAR O. I., SINGH K., JASROTIA S., BAKSHI P., RAMAKRISHNAN M., KUMAR S., BHARDWAJ R., et THUKRAL A. K., « Worldwide pesticide usage and its impacts on ecosystem », *SN Appl. Sci.*, vol. 1, n° 11, p. 1446, oct. 2019, doi: 10.1007/s42452-019-1485-1.
- [2] FUTURA J. C., « Définition | Néonicotinoïdes | Futura Planète », *Futura*. <https://www.futura-sciences.com/planete/definitions/developpement-durable-neonicotinoides-14365/> (consulté le 5 juin 2023).
- [3] JESCHKE P., NAUEN R., SCHINDLER M., et ELBERT A., « Overview of the Status and Global Strategy for Neonicotinoids », *J. Agric. Food Chem.*, vol. 59, n° 7, p. 2897-2908, avr. 2011, doi: 10.1021/jf101303g.
- [4] CASIDA J. E. et DURKIN K. A., « Neuroactive Insecticides: Targets, Selectivity, Resistance, and Secondary Effects », *Annu. Rev. Entomol.*, vol. 58, n° 1, p. 99-117, janv. 2013, doi: 10.1146/annurev-ento-120811-153645.
- [5] SHARMA D. R., THAPA R. B., MANANDHAR H. K., SHRESTHA S. M., et PRADHAN S. B., « Use Of Pesticides In Nepal And Impacts On Human Health And Environment », *Journal of Agriculture and Environment*, vol. 13, p. 67-74, 2012, doi: 10.3126/aej.v13i0.7590.
- [6] MAHMOOD I., IMADI S. R., SHAZADI K., GUL A., et HAKEEM K. R., « Effects of Pesticides on Environment », in *Plant, Soil and Microbes: Volume 1: Implications in Crop Science*, K. R. Hakeem, M. S. Akhtar, et S. N. A. Abdullah, Éd. Cham: Springer International Publishing, 2016, p. 253-269. doi: 10.1007/978-3-319-27455-3_13.
- [7] DECOURTYE A., LACASSIE E., et PHAM-DELÈGUE M.-H., « Learning performances of honeybees (*Apis mellifera* L) are differentially affected by imidacloprid according to the season », *Pest Management Science*, vol. 59, n° 3, p. 269-278, 2003, doi: 10.1002/ps.631.
- [8] YANG E. C., CHUANG Y. C., CHEN Y. L., et CHANG L. H., « Abnormal Foraging Behavior Induced by Sublethal Dosage of Imidacloprid in the Honey Bee (Hymenoptera: Apidae) », *Journal of Economic Entomology*, vol. 101, n° 6, p. 1743-1748, déc. 2008, doi: 10.1603/0022-0493-101.6.1743.
- [9] GOULSON D., « REVIEW: An overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides », *Journal of Applied Ecology*, vol. 50, n° 4, p. 977-987, 2013, doi: 10.1111/1365-2664.12111.

- [10] *Regulation (EU) No 528/2012 of the European Parliament and of the Council of 22 May 2012 concerning the making available on the market and use of biocidal products Text with EEA relevance*, vol. 167. 2012. Consulté le: 20 janvier 2023. [En ligne]. Disponible sur: <http://data.europa.eu/eli/reg/2012/528/oj/eng>
- [11] « Article L253-8 - Code rural et de la pêche maritime - Légifrance », 16 décembre 2020. https://www.legifrance.gouv.fr/codes/article_lc/LEGIARTI000042669494 (consulté le 20 janvier 2023).
- [12] LESUR A., « Néonicotinoïdes : la justice européenne réaffirme l'interdiction des dérogations à certains pesticides », *Touteleurope.eu*, 19 janvier 2023. <https://www.touteleurope.eu/agriculture-et-peche/neonicotinoides-la-justice-europeenne-reaffirme-l-interdiction-des-derogations-a-certains-pesticides/> (consulté le 5 juin 2023).
- [13] BRUST G. E. et KING L. R., « Effects of crop rotation and reduced chemical inputs on pests and predators in maize agroecosystems », *Agriculture, Ecosystems & Environment*, vol. 48, n° 1, p. 77-89, févr. 1994, doi: 10.1016/0167-8809(94)90077-9.
- [14] ZOHRY A. et OUDA S., « Crop Rotation Defeats Pests and Weeds », in *Crop Rotation: An Approach to Secure Future Food*, S. Ouda, A. E.-H. Zohry, et T. Noreldin, Éd. Cham: Springer International Publishing, 2018, p. 77-88. doi: 10.1007/978-3-030-05351-2_5.
- [15] SEAL D. R., CHALFANT R. B., et HALL M. R., « Effects of Cultural Practices and Rotational Crops on Abundance of Wireworms (Coleoptera: Elateridae) Affecting Sweetpotato in Georgia », *Environmental Entomology*, vol. 21, n° 5, p. 969-974, oct. 1992, doi: 10.1093/ee/21.5.969.
- [16] LANDIS B. J. et ONSAGER J. A., *Wireworms on Irrigated Lands in the West: How to Control Them*. Department of Agriculture, Agricultural Research Service, 1977.
- [17] HALL D. G. et CHERRY R. H., « Effect of Temperature in Flooding to Control the Wireworm *Melanotus communis* (Coleoptera: Elateridae) », *The Florida Entomologist*, vol. 76, n° 1, p. 155-160, 1993, doi: 10.2307/3496022.
- [18] FLINT M. L., *IPM in Practice, 2nd Edition: Principles and Methods of Integrated Pest Management*. University of California Agriculture and Natural Resources, 2012.
- [19] BUSSON M., CHETTY J., ROBIN M.-H., et AUBERTOT J.-N., « Biocontrôle : Définition », 2016, doi: 10.17180/Z4QT-5R85.
- [20] LA FORGIA D. et VERHEGGEN F., « Biological alternatives to pesticides to control wireworms (Coleoptera: Elateridae) », *Agri Gene*, vol. 11, p. 100080, mars 2019, doi: 10.1016/j.aggene.2018.100080.

- [21] NIKOUKAR A. et RASHED A., « Integrated Pest Management of Wireworms (Coleoptera: Elateridae) and the Rhizosphere in Agroecosystems », *Insects*, vol. 13, n° 9, Art. n° 9, sept. 2022, doi: 10.3390/insects13090769.
- [22] STENBERG J. A., « A Conceptual Framework for Integrated Pest Management », *Trends in Plant Science*, vol. 22, n° 9, p. 759-769, sept. 2017, doi: 10.1016/j.tplants.2017.06.010.
- [23] DILLMAN A. R., CHASTON J. M., ADAMS B. J., CICHE T. A., GOODRICH-BLAIR H., STOCK S. P., et STERNBERG P. W., « An Entomopathogenic Nematode by Any Other Name », *PLOS Pathogens*, vol. 8, n° 3, mars 2012, doi: 10.1371/journal.ppat.1002527.
- [24] KAYA H. K. et GAUGLER R., « Entomopathogenic Nematodes », *Annu. Rev. Entomol.*, vol. 38, p. 181-206, 1993.
- [25] GREWAL P. et GEORGIS R., « Entomopathogenic Nematodes », in *Biopesticides: Use and Delivery*, F. R. Hall et J. J. Menn, Éd. Totowa, NJ: Humana Press, 1999, p. 271-299. doi: 10.1385/0-89603-515-8:271.
- [26] SHAPIRO-ILAN D. I., GOUGE D. H., et KOPPENHÖFER A. M., « Factors affecting commercial success: case studies in cotton, turf and citrus. », *Entomopathogenic nematology*, p. 333-355, janv. 2002, doi: 10.1079/9780851995670.0333.
- [27] GREWAL P. S., EHLERS R.-U., et SHAPIRO-ILAN D. I., *Nematodes as Biocontrol Agents*. CABI, 2005.
- [28] GEORGIS R., « Commercialization of steinernematid and heterorhabditid entomopathogenic nematodes. », *Brighton Crop Protection Conference, Pests and Diseases*, vol. 1, p. 275-280, 1990.
- [29] EHLERS R.-U., « Mass production of entomopathogenic nematodes for plant protection », *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 56, n° 5, p. 623-633, sept. 2001, doi: 10.1007/s002530100711.
- [30] DIVYA K. et SANKAR M., « Entomopathogenic nematodes in pest management », *Indian Journal of Science and Technology*, vol. 2, n° 7, p. 53-60, juill. 2009.
- [31] MILLAR L. C. et BARBERCHECK M. E., « Interaction between Endemic and Introduced Entomopathogenic Nematodes in Conventional-Till and No-Till Corn », *Biological Control*, vol. 22, n° 3, p. 235-245, nov. 2001, doi: 10.1006/bcon.2001.0978.
- [32] AKHURST R. et SMITH K., « Regulation and safety. », *Entomopathogenic nematology*, p. 311-332, janv. 2002, doi: 10.1079/9780851995670.0311.
- [33] GEORGIS R., KOPPENHÖFER A. M., LACEY L. A., BÉLAIR G., DUNCAN L. W., GREWAL P. S., SAMISH M., TAN L., TORR P., et VAN TOL R. W. H. M., « Successes and failures in the

- use of parasitic nematodes for pest control », *Biological Control*, vol. 38, n° 1, p. 103-123, juill. 2006, doi: 10.1016/j.biocontrol.2005.11.005.
- [34] PLATT T., STOKWE N. F., et MALAN A. P., « A Review of the Potential Use of Entomopathogenic Nematodes to Control Above-Ground Insect Pests in South Africa », *South African Journal of Enology and Viticulture*, vol. 41, n° 1, p. 1-16, 2020, doi: 10.21548/41-1-2424.
- [35] LEITE L. G., MACHADO L. A., GOULART R. M., TAVARES F. M., et BATISTA FILHO A., « Screening of entomopathogenic nematodes (Nemata: Rhabditida) and the efficiency of *Heterorhabditis* sp. against the sugarcane root spittlebug *Mahanarva fimbriolata* (Fabr.) (Hemiptera: Cercopidae) », *Neotrop. entomol.*, vol. 34, p. 785-790, oct. 2005, doi: 10.1590/S1519-566X2005000500010.
- [36] CAMPOS-HERRERA R. et GUTIÉRREZ C., « Screening Spanish isolates of steinernematid nematodes for use as biological control agents through laboratory and greenhouse microcosm studies », *Journal of Invertebrate Pathology*, vol. 100, n° 2, p. 100-105, févr. 2009, doi: 10.1016/j.jip.2008.11.009.
- [37] SHAIRRA S. A., HASSAN H. A., et IBRAHIM S. S., « Efficiency of entomopathogenic nematodes as biocontrol agents for *Agrotis ipsilon* larvae. », *Bull. Ent. Soc. Egypt.*, n° 42, p. 1-12, 2016.
- [38] YAĞCI M., ÖZDEM A., ERDOĞUŞ F. D., et AYAN E., « Efficiency of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Heterorhabditidae and Steinernematidae) on the codling moth (*Cydia pomonella* L.) (Lepidoptera: Tortricidae) under controlled conditions », *Egypt J Biol Pest Control*, vol. 31, n° 1, p. 75, mai 2021, doi: 10.1186/s41938-021-00399-1.
- [39] REDDY G. V. P., TANGTRAKULWANICH K., WU S., MILLER J. H., OPHUS V. L., PREWETT J., et JARONSKI S. T., « Evaluation of the effectiveness of entomopathogens for the management of wireworms (Coleoptera: Elateridae) on spring wheat », *Journal of Invertebrate Pathology*, vol. 120, p. 43-49, juill. 2014, doi: 10.1016/j.jip.2014.05.005.
- [40] PARKER W. E. et HOWARD J. J., « The biology and management of wireworms (*Agriotes* spp.) on potato with particular reference to the U.K. », *Agricultural and Forest Entomology*, vol. 3, n° 2, p. 85-98, 2001, doi: 10.1046/j.1461-9563.2001.00094.x.
- [41] CHALFANT R. B., JANSSON R. K., SEAL D. R., et SCHALK J. M., « Ecology and Management of Sweet Potato Insects », *Annual Review of Entomology*, vol. 35, p. 157-180, janv. 1990.

- [42] ANDREWS N., AMBROSINO M., FISHER G., et RONDON S., « Wireworm biology and nonchemical management in potatoes in the Pacific Northwest », déc. 2008.
- [43] EIDT D. C. et THURSTON G. S., « Physical deterrents to infection by entomopathogenic nematodes in wireworms (Coleoptera: Elateridae) and other soil insects », *The Canadian Entomologist*, vol. 127, n° 3, p. 423-429, juin 1995, doi: 10.4039/Ent127423-3.
- [44] MILES H. W., « Wireworms and Agriculture, with Special Reference to *Agriotes Obscurus* L. », *Annals of Applied Biology*, vol. 29, n° 2, p. 176-180, 1942, doi: 10.1111/j.1744-7348.1942.tb07585.x.
- [45] SHARMA H. C., « Global Warming and Climate Change: Impact on Arthropod Biodiversity, Pest Management, and Food Security », présenté à National Symposium on Perspectives and Challenges of Integrated Pest Management for Sustainable Agriculture, Solan, 2010, p. 1-11. Consulté le: 27 mai 2023. [En ligne]. Disponible sur: <http://oar.icrisat.org/2030/>
- [46] DEUTSCH C. A., TEWKSBURY J. J., TIGCHELAAR M., BATTISTI D. S., MERRILL S. C., HUEY R. B., et NAYLOR R. L., « Increase in crop losses to insect pests in a warming climate », *Science*, vol. 361, n° 6405, p. 916-919, août 2018, doi: 10.1126/science.aat3466.
- [47] JOHNSON S. N. et GREGORY P. J., « Chemically-mediated host-plant location and selection by root-feeding insects », *Physiological Entomology*, vol. 31, n° 1, p. 1-13, 2006, doi: 10.1111/j.1365-3032.2005.00487.x.
- [48] CURTIS R. H. C., ROBINSON A. F., et PERRY R. N., « Hatch and host location. », *Root-knot nematodes*, p. 139-162, janv. 2009, doi: 10.1079/9781845934927.0139.
- [49] NICOLAS G. et SILLANS D., « Immediate and Latent Effects of Carbon Dioxide on Insects », *Ann. Rev. Entomol.*, vol. 34, p. 97-116, 1989.
- [50] HEUSKIN S., LORGE S., GODIN B., LEROY P., FRÈRE I., VERHEGGEN F. J., HAUBRUGE E., WATHELET J.-P., MESTDAGH M., HANCE T., et LOGNAY G., « Optimisation of a semiochemical slow-release alginate formulation attractive towards *Aphidius ervi* Haliday parasitoids », *Pest. Manag. Sci.*, vol. 68, n° 1, p. 127-136, janv. 2012, doi: 10.1002/ps.2234.
- [51] BARSICS F., DELORY B. M., DELAPLACE P., FRANCIS F., FAUCONNIER M.-L., HAUBRUGE É., et VERHEGGEN F. J., « Foraging wireworms are attracted to root-produced volatile aldehydes », *J Pest Sci*, vol. 90, n° 1, p. 69-76, févr. 2017, doi: 10.1007/s10340-016-0734-y.

- [52] VAN DAM N. M. et BOUWMEESTER H. J., « Metabolomics in the Rhizosphere: Tapping into Belowground Chemical Communication », *Trends in Plant Science*, vol. 21, n° 3, p. 256-265, mars 2016, doi: 10.1016/j.tplants.2016.01.008.
- [53] THORPE W. H., CROMBIE A. C., HILL R., et DARRAH J. H., « The Behaviour of Wireworms in Response to Chemical Stimulation », *Journal of Experimental Biology*, vol. 23, n° 3-4, p. 234-266, avr. 1947, doi: 10.1242/jeb.23.3-4.234.
- [54] CROMBIE A. C. et DARRAH J. H., « The Chemoreceptors of the Wireworm (*Agriotes* Spp.) and the Relation of Activity to Chemical Constitution », *Journal of Experimental Biology*, vol. 24, n° 1-2, p. 95-109, sept. 1947, doi: 10.1242/jeb.24.1-2.95.
- [55] KAYA H. K. et NELSEN C. E., « Encapsulation of Steinernematid and Heterorhabditid Nematodes with Calcium Alginate: A New Approach for Insect Control and Other Applications », *Environmental Entomology*, vol. 14, n° 5, p. 572-574, oct. 1985, doi: 10.1093/ee/14.5.572.
- [56] CHEN S. et GLAZER I., « A novel method for long-term storage of the entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae* at room temperature », *Biological Control*, vol. 32, n° 1, p. 104-110, janv. 2005, doi: 10.1016/j.biocontrol.2004.08.006.
- [57] HILTPOLD I., HIBBARD B. E., FRENCH B. W., et TURLINGS T. C. J., « Capsules containing entomopathogenic nematodes as a Trojan horse approach to control the western corn rootworm », *Plant Soil*, vol. 358, n° 1, p. 11-25, sept. 2012, doi: 10.1007/s11104-012-1253-0.
- [58] KARY N. E., CHAHARDOLI S., MOHAMMADI D., et DILLON A. B., « Effect of temperature, time and glycerol concentration on the dehydration and rehydration process of *Steinernema carpocapsae* and *S. feltiae* in alginate granule formulation », *Nematology*, vol. 19, n° 2, p. 225-235, janv. 2017, doi: 10.1163/15685411-00003042.
- [59] KARY N. E., CHAHARDOLI S., MOHAMMADI D., et DILLON A. B., « Effects of abiotic factors on the osmotic response of alginate-formulated entomopathogenic nematode, *Heterorhabditis bacteriophora* (Nematoda: Rhabditida) », *Biocontrol Science and Technology*, vol. 28, n° 7, p. 688-701, juill. 2018, doi: 10.1080/09583157.2018.1479731.
- [60] GREWAL P. S., « Enhanced ambient storage stability of an entomopathogenic nematode through anhydrobiosis », *Pest Management Science*, vol. 56, n° 5, p. 401-406, 2000, doi: 10.1002/(SICI)1526-4998(200005)56:5<401::AID-PS137>3.0.CO;2-4.
- [61] KIM J., HILTPOLD I., JAFFUEL G., SBAITI I., HIBBARD B. E., et TURLINGS T. C. J., « Calcium-alginate beads as a formulation for the application of entomopathogenic

- nematodes to control rootworms », *J Pest Sci*, vol. 94, n° 4, p. 1197-1208, sept. 2021, doi: 10.1007/s10340-021-01349-4.
- [62] BLANCO-PÉREZ R., SÁENZ-ROMO M. G., VICENTE-DÍEZ I., IBÁÑEZ-PASCUAL S., MARTÍNEZ-VILLAR E., MARCO-MANCEBÓN V. S., PÉREZ-MORENO I., et CAMPOS-HERRERA R., « Impact of vineyard ground cover management on the occurrence and activity of entomopathogenic nematodes and associated soil organisms », *Agriculture, Ecosystems & Environment*, vol. 301, p. 107028, oct. 2020, doi: 10.1016/j.agee.2020.107028.
- [63] WHITE G. F., « A Method for Obtaining Infective Nematode Larvae from Cultures », *Science*, vol. 66, n° 1709, p. 302-303, sept. 1927, doi: 10.1126/science.66.1709.302.b.
- [64] CAMPOS-HERRERA R., BLANCO-PÉREZ R., BUENO-PALLERO F. Á., DUARTE A., NOLASCO G., SOMMER R. J., et RODRÍGUEZ MARTÍN J. A., « Vegetation drives assemblages of entomopathogenic nematodes and other soil organisms: Evidence from the Algarve, Portugal », *Soil Biology and Biochemistry*, vol. 128, p. 150-163, janv. 2019, doi: 10.1016/j.soilbio.2018.10.019.
- [65] DELUZARCHE C., « Définition | PCR - Amplification par PCR - Polymerase Chain Reaction | Futura Santé », *Futura*. <https://www.futura-sciences.com/sante/definitions/genetique-pcr-91/> (consulté le 2 mars 2023).
- [66] « BLAST: Basic Local Alignment Search Tool ». <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (consulté le 2 mars 2023).
- [67] TOEPFER S., GUELLENZOPH C., EHLERS R.-U., et KUHLMANN U., « Screening of entomopathogenic nematodes for virulence against the invasive western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera* (Coleoptera: Chrysomelidae) in Europe », *Bull. Entomol. Res.*, vol. 95, n° 5, p. 473-482, oct. 2005, doi: 10.1079/BER2005379.
- [68] « Nématodes sf anti taupins », *Insectosphere*. <https://www.insectosphere.fr/nematodes-sf-anti-taupins> (consulté le 11 juin 2023).
- [69] « Demeter ». <https://www.labelinfo.be/fr/label/demeter> (consulté le 22 juin 2023).
- [70] VEMMER M. et PATEL A. V., « Review of encapsulation methods suitable for microbial biological control agents », *Biological Control*, vol. 67, n° 3, p. 380-389, déc. 2013, doi: 10.1016/j.biocontrol.2013.09.003.
- [71] SMEETS T. et TECH U. de L. > G. A.-B., « Développement d’une méthode de type “attract-and-kill” dans le cadre d’une stratégie de lutte biologique contre les taupins du genre *Agriotes* spp », août 2022, Consulté le: 13 juin 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://matheo.uliege.be/handle/2268.2/16119>

- [72] ROVESTI L. et DESEÖ K. V., « Compatibility of Chemical Pesticides With the Entomopathogenic Nematodes, *Steinernema Carpocapsae* Weiser and *S. Feltiae* Filipjev (Nematoda: Steinernematidae) », *Nematologica*, vol. 36, n° 1-4, p. 237-245, janv. 1990, doi: 10.1163/002925990X00202.
- [73] ROVESTI L. et DESEÖ K. V., « Compatibility of pesticides with the entomopathogenic nematode, *Heterorhabditis heliothidis* », *Nematologica*, vol. 37, n° 1-4, p. 113-116, janv. 1991, doi: 10.1163/187529291X00114.
- [74] LAZNIK Ž. et TRDAN S., « The influence of insecticides on the viability of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae) under laboratory conditions », *Pest Management Science*, vol. 70, n° 5, p. 784-789, 2014, doi: 10.1002/ps.3614.
- [75] ÖZDEMİR E., İNAK E., EVLICE E., et LAZNIK Z., « Compatibility of entomopathogenic nematodes with pesticides registered in vegetable crops under laboratory conditions », *J Plant Dis Prot*, vol. 127, n° 4, p. 529-535, août 2020, doi: 10.1007/s41348-020-00337-7.
- [76] JAFFUEL G., BLANCO-PÉREZ R., HUG A.-S., CHIRIBOGA X., MEULI R. G., MASCHER F., TURLINGS T. C. J., et CAMPOS-HERRERA R., « The evaluation of entomopathogenic nematode soil food web assemblages across Switzerland reveals major differences among agricultural, grassland and forest ecosystems », *Agriculture, Ecosystems & Environment*, vol. 262, p. 48-57, juill. 2018, doi: 10.1016/j.agee.2018.04.008.
- [77] BLANCO-PÉREZ R., VICENTE-DÍEZ I., POU A., PÉREZ-MORENO I., MARCO-MANCEBÓN V. S., et CAMPOS-HERRERA R., « Organic mulching modulated native populations of entomopathogenic nematode in vineyard soils differently depending on its potential to control outgrowth of their natural enemies », *Journal of Invertebrate Pathology*, vol. 192, p. 107781, juill. 2022, doi: 10.1016/j.jip.2022.107781.
- [78] EMELIANOFF V., LE BRUN N., PAGÈS S., STOCK S. P., TAILLIEZ P., MOULIA C., et SICARD M., « Isolation and identification of entomopathogenic nematodes and their symbiotic bacteria from Hérault and Gard (Southern France) », *Journal of Invertebrate Pathology*, vol. 98, n° 2, p. 211-217, juin 2008, doi: 10.1016/j.jip.2008.01.006.
- [79] JAFFUEL G., MÄDER P., BLANCO-PÉREZ R., CHIRIBOGA X., FLIESSBACH A., TURLINGS T. C. J., et CAMPOS-HERRERA R., « Prevalence and activity of entomopathogenic nematodes and their antagonists in soils that are subject to different agricultural practices », *Agriculture, Ecosystems & Environment*, vol. 230, p. 329-340, août 2016, doi: 10.1016/j.agee.2016.06.009.

- [80] STOCK S. P., PRYOR B. M., et KAYA H. K., « Distribution of entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) in natural habitats in California, USA », *Biodiversity and Conservation*, vol. 8, n° 4, p. 535-549, avr. 1999, doi: 10.1023/A:1008827422372.
- [81] GRIFFIN C. T., MOORE J. F., et DOWNES M. J., « Occurrence of Insect-Parasitic Nematodes (Steinernematidae, Heterorhabditidae) in the Republic of Ireland », *Nematologica*, vol. 37, n° 1-4, p. 92-100, janv. 1991, doi: 10.1163/187529291X00097.
- [82] HARA A. H., GAUGLER R., KAYA H. K., et LEBECK L. M., « Natural Populations of Entomopathogenic Nematodes (Rhabditida: Heterorhabditidae, Steinernematidae) from the Hawaiian Islands », *Environmental Entomology*, vol. 20, n° 1, p. 211-216, févr. 1991, doi: 10.1093/ee/20.1.211.
- [83] LIU J. et BERRY R. E., « Natural Distribution of Entomopathogenic Nematodes (Rhabditida: Heterorhabditidae and Steinernematidae) in Oregon Soils », *Environmental Entomology*, vol. 24, n° 1, p. 159-163, févr. 1995, doi: 10.1093/ee/24.1.159.
- [84] CAMPOS-HERRERA R., ESCUER M., LABRADOR S., ROBERTSON L., BARRIOS L., et GUTIÉRREZ C., « Distribution of the entomopathogenic nematodes from La Rioja (Northern Spain) », *Journal of Invertebrate Pathology*, vol. 95, n° 2, p. 125-139, juin 2007, doi: 10.1016/j.jip.2007.02.003.
- [85] BOAG B., NEILSON R., et GORDON S. C., « Distribution and prevalence of the entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae* in Scotland », *Annals of Applied Biology*, vol. 121, n° 2, p. 355-360, 1992, doi: 10.1111/j.1744-7348.1992.tb03448.x.
- [86] HOMINICK W. M., REID A. P., et BRISCOE B. R., « Prevalence and habitat specificity of steinernematid and heterorhabditid nematodes isolated during soil surveys of the UK and the Netherlands », *Journal of Helminthology*, vol. 69, n° 1, p. 27-32, mars 1995, doi: 10.1017/S0022149X00013791.
- [87] MOELLER K., « Une abondance de biomes », 31 mai 2017. <https://askabiologist.asu.edu/les-biomes> (consulté le 13 juin 2023).
- [88] KOPPENHÖFER A. M., KAYA H. K., SHANMUGAM S., et WOOD G. L., « Interspecific Competition between Steinernematid Nematodes within an Insect Host », *Journal of Invertebrate Pathology*, vol. 66, n° 2, p. 99-103, sept. 1995, doi: 10.1006/jipa.1995.1070.
- [89] PŮŽA V. et MRÁČEK Z., « Mixed infection of *Galleria mellonella* with two entomopathogenic nematode (Nematoda: Rhabditida) species: *Steinernema affine* benefits

- from the presence of *Steinernema kraussei* », *Journal of Invertebrate Pathology*, vol. 102, n° 1, p. 40-43, sept. 2009, doi: 10.1016/j.jip.2009.06.005.
- [90] BASHEY F., HAWLENA H., et LIVELY C. M., « ALTERNATIVE PATHS TO SUCCESS IN A PARASITE COMMUNITY: WITHIN-HOST COMPETITION CAN FAVOR HIGHER VIRULENCE OR DIRECT INTERFERENCE », *Evolution*, vol. 67, n° 3, p. 900-907, mars 2013, doi: 10.1111/j.1558-5646.2012.01825.x.
- [91] MORTON A. et GARCIA-DEL-PINO F., « Laboratory and field evaluation of entomopathogenic nematodes for control of *Agriotes obscurus* (L.) (Coleoptera: Elateridae) », *Journal of Applied Entomology*, vol. 141, n° 4, p. 241-246, 2017, doi: 10.1111/jen.12343.
- [92] TÜRKÖZ S. et KAŞKAVALCI G., « Determination of the efficacy of some entomopathogenic nematodes against *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) under laboratory conditions », *Turkish Journal of Entomology*, vol. 40, n° 2, juin 2016, doi: 10.16970/ted.92606.
- [93] TUMIALIS D., MAZURKIEWICZ A., FLORCZAK L., et SKRZECZ I., « The potential of entomopathogenic nematodes of the genera *Steinernema* and *Heterorhabditis* for biological control of the pine lappet moth *Dendrolimus pini* L. (Lepidoptera: Lasiocampidae) in Scots pine stands », *Forestry: An International Journal of Forest Research*, p. cpad008, févr. 2023, doi: 10.1093/forestry/cpad008.
- [94] VERMEIJ G. J., « The evolutionary interaction among species: Selection, Escalation, and Coevolution », *Annual Review of Ecology and Systematics*, vol. 25, n° 1, p. 219-236, 1994, doi: 10.1146/annurev.es.25.110194.001251.
- [95] ABRAMS P. A., « The Evolution of Predator-Prey Interactions: Theory and Evidence », *Annual Review of Ecology and Systematics*, vol. 31, n° 1, p. 79-105, 2000, doi: 10.1146/annurev.ecolsys.31.1.79.
- [96] KAGIMU N. et MALAN A. P., « Formulation of South African entomopathogenic nematodes using alginate beads and diatomaceous earth », *BioControl*, vol. 64, n° 4, p. 413-422, août 2019, doi: 10.1007/s10526-019-09945-1.
- [97] STUART R. J., BARBERCHECK M. E., et GREWAL P. S., « Entomopathogenic Nematodes in the Soil Environment: Distributions, Interactions and the Influence of Biotic and Abiotic Factors », in *Nematode Pathogenesis of Insects and Other Pests: Ecology and Applied Technologies for Sustainable Plant and Crop Protection*, R. Campos-Herrera, Éd. Cham: Springer International Publishing, 2015, p. 97-137. doi: 10.1007/978-3-319-18266-7_4.

- [98] KAGIMU N., FERREIRA T., et MALAN A. P., « The attributes of survival in the formulation of entomopathogenic nematodes utilised as insect biocontrol agents », *African Entomology*, vol. 25, n° 2, p. 275-291, sept. 2017, doi: 10.4001/003.025.0275.
- [99] ADDIS T., MIJUŠKOVIĆ N., STRAUCH O., et EHLERS R.-U., « Life history traits, liquid culture production and storage temperatures of *Steinernema yirgalemense* », *Nematology*, vol. 18, n° 3, p. 367-376, janv. 2016, doi: 10.1163/15685411-00002966.
- [100] FORGIA D., JAFFUEL G., CAMPOS-HERRERA R., VERHEGGEN F., et TURLINGS T. C. J., « Efficiency of an attract-and-kill system with entomopathogenic nematodes against wireworms (Coleoptera: Elateridae) », *Microbial and Nematode Control of Invertebrate Pests*, vol. 150, p. 91-95, 2020, doi: 10.13039/501100002661.
- [101] LA FORGIA D., BRUNO P., CAMPOS-HERRERA R., TURLINGS T., et VERHEGGEN F., « The lure of hidden death: development of an attract-and-kill strategy against *Agriotes obscurus* (Coleoptera: Elateridae) combining semiochemicals and entomopathogenic nematodes », *Turk J Zool*, vol. 45, n° SI-1, p. 347-355, août 2021, doi: 10.3906/zoo-2106-38.
- [102] VET L. E. M., LENTEREN J. C. V., HEYMANS M., et MEELIS E., « An airflow olfactometer for measuring olfactory responses of hymenopterous parasitoids and other small insects », *Physiological Entomology*, vol. 8, n° 1, p. 97-106, 1983, doi: 10.1111/j.1365-3032.1983.tb00338.x.
- [103] LASKA M., GALIZIA C. G., GIURFA M., et MENZEL R., « Olfactory Discrimination Ability and Odor Structure–Activity Relationships in Honeybees », *Chemical Senses*, vol. 24, n° 4, p. 429-438, août 1999, doi: 10.1093/chemse/24.4.429.
- [104] MATESON J. F., « Olfactometry: Its Techniques and Apparatus », *Journal of the Air Pollution Control Association*, vol. 5, n° 3, p. 167-170, nov. 1955, doi: 10.1080/00966665.1955.10467702.
- [105] DE ROODE J. C. et LEFÈVRE T., « Behavioral Immunity in Insects », *Insects*, vol. 3, n° 3, Art. n° 3, sept. 2012, doi: 10.3390/insects3030789.
- [106] KIM J., JAFFUEL G., et TURLINGS T. C. J., « Enhanced alginate capsule properties as a formulation of entomopathogenic nematodes », *BioControl*, vol. 60, n° 4, p. 527-535, août 2015, doi: 10.1007/s10526-014-9638-z.
- [107] HUOT L., « Analyse moléculaire de la réponse immunitaire du lépidoptère *Spodoptera frugiperda* au complexe nématobactérien entomopathogène *Steinernema carpocapsae*-*Xenorhabdus nematophila* », phdthesis, Université Montpellier, 2019. Consulté le: 30 mai 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://theses.hal.science/tel-02861890>

- [108] LEMAITRE B. et HOFFMANN J., « The Host Defense of *Drosophila melanogaster* », *Annual Review of Immunology*, vol. 25, n° 1, p. 697-743, 2007, doi: 10.1146/annurev.immunol.25.022106.141615.
- [109] LU H.-L. et ST. LEGER R. J., « Chapter Seven - Insect Immunity to Entomopathogenic Fungi », in *Advances in Genetics*, vol. 94, B. Lovett et R. J. St. Leger, Éd. Academic Press, 2016, p. 251-285. doi: 10.1016/bs.adgen.2015.11.002.

Annexe

a. Comparaison de différents diamètres d'aiguilles de seringues

L'extrait de pomme de terre frais utilisé pour chaque formulation a été extrait à froid (EASEHOLD Centrifugeuse Fruits et Légumes 600 W) à partir de tubercules des variétés « Monalisa » et « Spunta » de l'espèce *Solanum tuberosum*, label Demeter [69]. Des billes d'alginate de sodium ont été fabriquées selon un protocole adapté de Kim *et al.* [55], [61], [70]. Une solution d'alginate de sodium (2 %, w/v) (Sigma-Aldrich, Royaume-Uni), d'extrait de pomme de terre (50 %, v/v) et d' α -tocophérol (0.7 %, w/v) a été préparée et homogénéisée à l'aide de plaques agitatrices et d'agitateurs magnétique adaptés. Des aiguilles de seringues de quatre diamètres différents ont été testées : 1.2 mm x 38 mm (Gauge 18G), 0.82 mm x 38 mm (Gauge 21G), 0.63 mm x 38 mm (Gauge 23G) et 0.51 x 38 mm (Gauge 25G).

De chaque condition, des billes ont été récupérées et ont été disposées sur du papier millimétré, puis prises en photo (n = 100 par gauge d'aiguille). La taille des billes (diamètre) a été analysée sur le logiciel GIMP. L'objectif était de tester s'il était possible de diminuer le diamètre des billes jusqu'à 1 mm, sans que cela ne complexifie ou modifie leur fabrication, ce qui n'a pas été le cas. Les résultats ont donc permis de sélectionner l'utilisation de l'aiguille de seringue Gauge 18G pour les expériences (**Figure 9**).

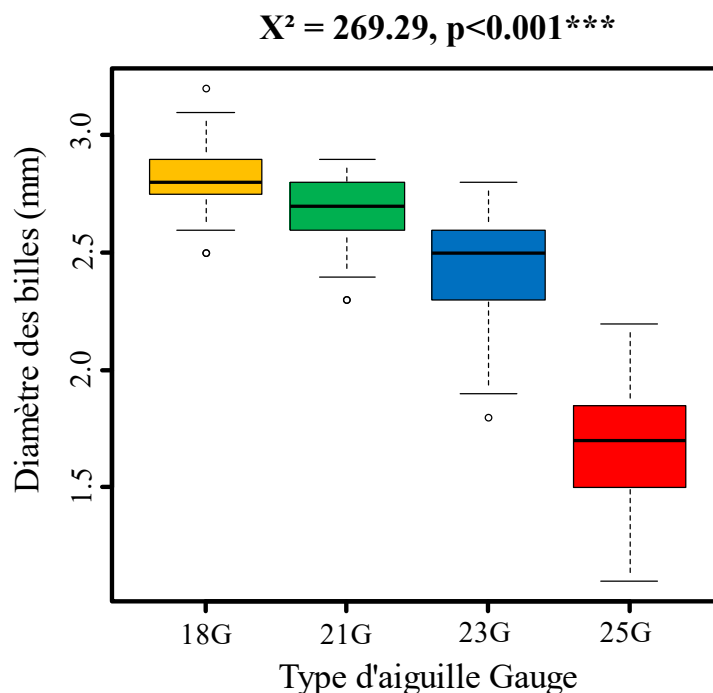


Figure 9 Diamètre moyen des billes en fonction du type d'aiguille

b. Détermination de la température optimal de stockage des billes d'alginate

Des billes d'alginate de sodium ont été fabriquées selon un protocole décrits dans la partie Annexe a, avec l'ajout de juvéniles infectieux (IJs) (60 par bille) issues de l'espèce *Heterorhabditis bacteriophora* et commercialisés par l'entreprise e-nema®. Une fois les billes rincées et séchées, elles ont été mises dans un flacon Schott (100 ml) et ont ensuite été stockées à deux températures différentes : 4 °C et 14 °C.

Après un stockage de 24 h, puis de 72 h, 48 différentes billes de chaque condition ont été récupérées. Chaque bille a été placée individuellement dans une boîte de pétri (Ø 55 mm) remplie de 7 ml d'eau (bille immergée), puis a été ouverte en deux à l'aide d'un scalpel. Les boîtes ont été stockées pendant 24 h à l'obscurité dans une chambre climatisée à 22 °C. A la suite des 24 h, puis des 72 h, les nématodes encore vivants (mobiles) dans chaque boîte de pétri ont été comptabilisés à l'aide d'une loupe binoculaire. Les résultats ont permis de sélectionner 4 °C comme température de stockage des billes pour les expériences (**Figure 10**).

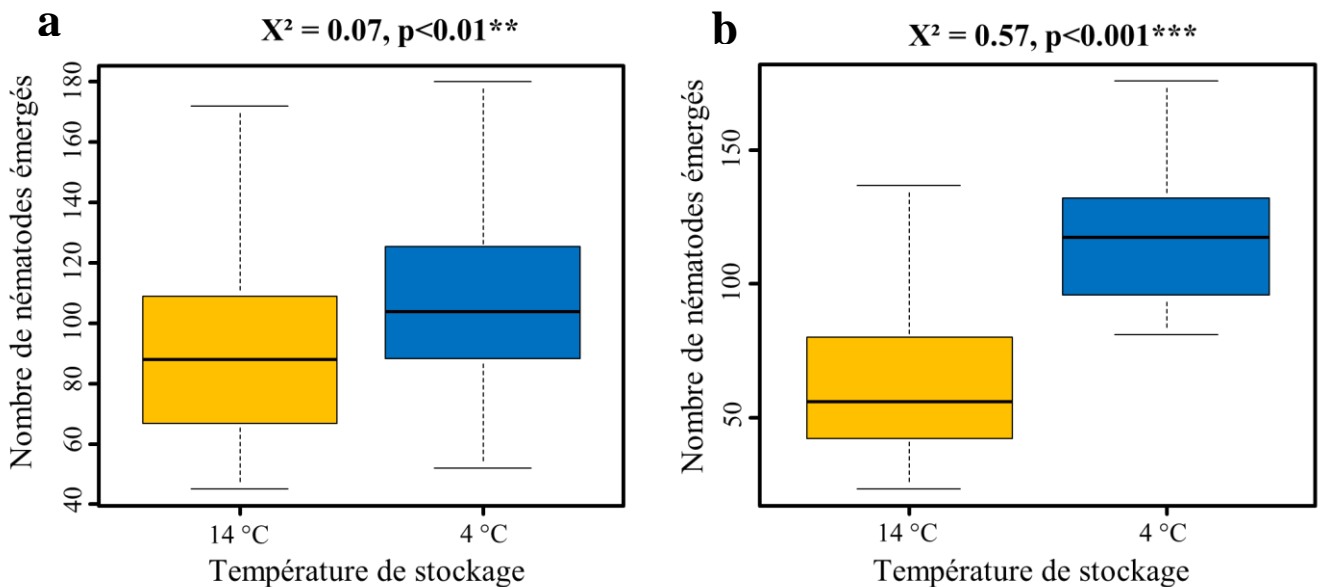


Figure 10 Nombre de NEPs émergés des billes après un stockage de 24 h (a) et de 72 h (b) à différentes températures

c. Détermination du phagostimulant induisant la morsure

Des billes d'alginate de sodium ont été fabriquées selon un protocole décrits dans la partie Annexe a, avec l'ajout de différents composés induisant la morsure des larves de taupins. Parmi ces composés, différents sucres simples ont été testés : le glucose à 1.26 %, le sucrose à 1 % et la peptone à 1.5 %. Les composés et leur concentration ont été choisis en utilisant les résultats obtenus par Crombie et Darrah [44]. Dix billes de chaque modalité ont été mises dans des pots rectangulaires (5,5 cm x 4 cm x 5 cm) contenant 12 g de vermiculite humidifiée à 50 % (v/v) et une larve de taupin de stade larvaire L5/L6. Les résultats ont permis de sélectionner le sucrose à 1 % pour les expériences (**Figure 11 - Figure 12**).

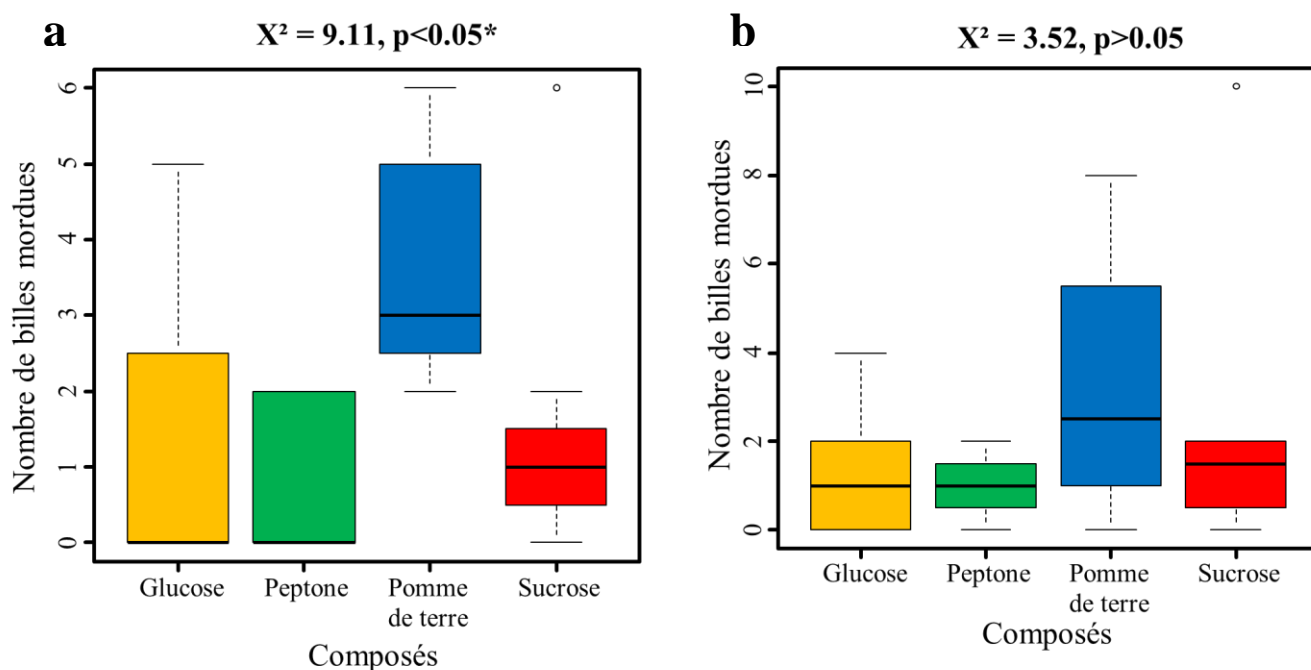


Figure 11 Nombre moyen de billes mordues sur un total de 10 après 24 h (a) et 48 h (b) en fonction du composé ajouté

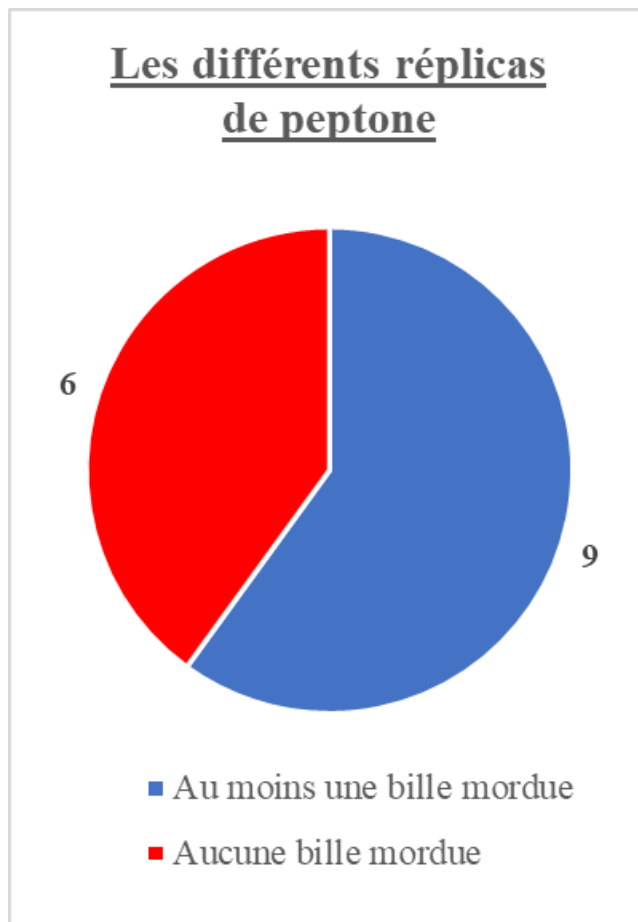
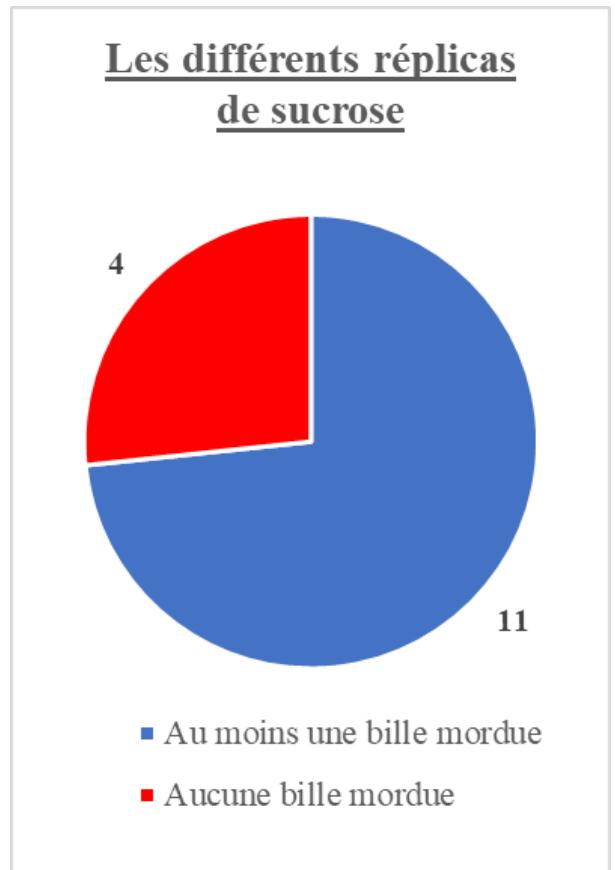
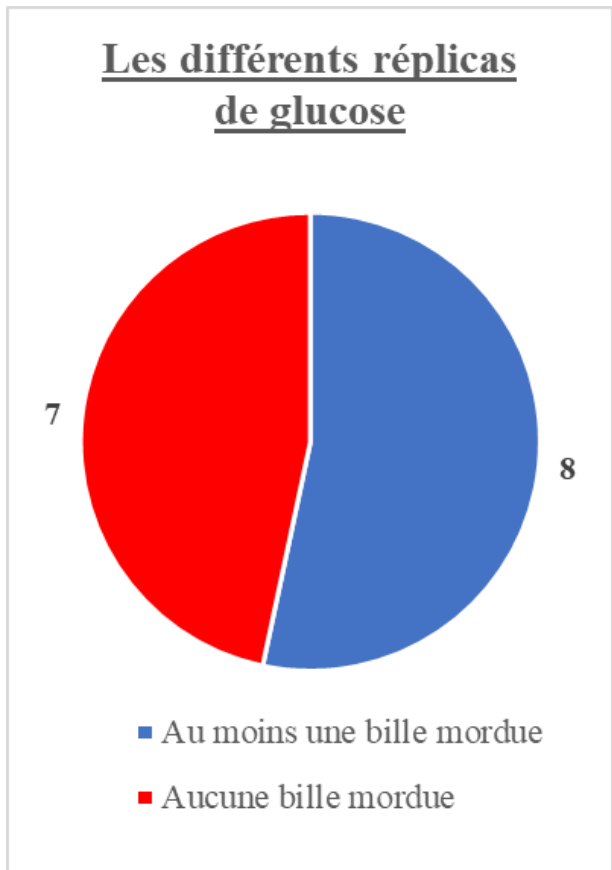


Figure 12 Nombre de réplicas total (15) à 24 h et 48 h ayant ou non une morsure pour chaque composé

Résumé

La larve de taupin est un ravageur polyphage de nombreuses cultures, pour laquelle peu de méthodes de lutte efficace existent, à l'exception des pesticides. Les nématodes entomopathogènes (NEPs) présents naturellement dans le sol, pourraient être des agents biocides prometteurs. Cependant, leur utilisation actuelle possède de nombreuses limites. Leur encapsulation conjointe avec un attractant et un phagostimulant, dans des billes d'alginate de sodium, permettrait de palier aux limites d'utilisation. Dans cette étude 3 espèces de NEPs ont été identifiées en région wallonne : *Steinernema carpocapsae*, *S. affine* et *S. feltiae*. Leur virulence envers des larves de taupins (*Agriotes lineatus* et *A. obscurus*) a été comparé avec des souches commerciales et de laboratoire, révélant les souches Sc lab1, Sc enema et Sf insectosphere comme les plus virulentes. Une formulation a été mise au point (attractant, phagostimulant et biocide), permettant d'atteindre les objectifs d'attraction et d'appétence des billes. Mais certains paramètres restent à être ajustés (souche utilisée, quantité à incorporer).

Wireworm is a polyphagous pest of many crops, for which few effective control methods exist, except for pesticides. Entomopathogenic nematodes (EPNs) found naturally in soil may be promising biocidal agents. However, their current use has many limitations. Their joint encapsulation with an attractant and a phagostimulant, in sodium alginate balls, would help to overcome the limits of use. In this study three species of EPNs were identified in the Walloon region: *Steinernema carpocapsae*, *S. affine* and *S. feltiae*. Their virulence towards wireworm larvae (*Agriotes lineatus* and *A. obscurus*) was compared with commercial and laboratory strains, revealing the Sc lab1, Sc enema and Sf insectosphere strains as the most virulent. A formulation has been developed (attractant, phagostimulant and biocide), to achieve the objectives of attraction and appetite of the balls. But some parameters have yet to be adjusted (strain used, quantity to be incorporated).

Mots-Clés : *Elateridae* – Agent infectieux – Lutte biologique – Ecologie chimique