



**HAL**  
open science

# Facteurs d'opérationnalité des nématodes entomopathogènes pour le biocontrôle d'insectes ravageurs de culture

Elisabeth Depuydt

► **To cite this version:**

Elisabeth Depuydt. Facteurs d'opérationnalité des nématodes entomopathogènes pour le biocontrôle d'insectes ravageurs de culture. Parasitologie. Université de Montpellier, 2024. Français. NNT : 2024UMONG026 . tel-04934822

**HAL Id: tel-04934822**

**<https://theses.hal.science/tel-04934822v1>**

Submitted on 7 Feb 2025

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Biologie des Interactions- Mécanismes des Interactions parasites pathogènes et symbiotiques

École doctorale GAIA

Unité de recherche Diversité, Génomes et Interactions Microorganismes-Insectes (UMR 1333-DGIMI)

## Facteurs d'opérationnalité des nématodes entomopathogènes pour le biocontrôle d'insectes ravageurs de culture

Présentée par Elisabeth Depuydt

Le 18 octobre 2024

Sous la direction de Sophie Gaudriault  
Encadrement Jean-Claude Ogier, Eric Nguema-Ona

Devant le jury composé de

Lise Dupont, PR, Université Paris Est Créteil (UPEC), Paris, France

Matthieu Chauvat, PR, Université de Rouen Normandie, Rouen, France

Myriam Siegwart, IE, INRAE, Avignon, France

Mathieu Sicard, PR, Université de Montpellier, Montpellier, France

Jean Trap, CR, IRD, Montpellier, France

Sophie Gaudriault, DR, INRAE, Montpellier, France

Jean-Claude Ogier, IR, INRAE, Montpellier, France

Eric Nguema-Ona, CR, CMI, Saint Malo, France

Rapporteure

Rapporteur

Examinatrice

Président

Examineur

Directrice de thèse

Co-encadrant, invité

Co-encadrant, invité



UNIVERSITÉ DE  
MONTPELLIER



Il existe deux types de personne à la fin des trois ans de thèse :  
le titulaire d'un doctorat ou le docteur.

Eric Nguema-Ona, 2020

## Remerciements

---

Je tiens à remercier tout d'abord les deux rapporteurs de ma thèse, Lise Dupont et Matthieu Chauvat, ainsi que les trois examinateurs, Jean Trap, Myriam Siegart et Mathieu Sicard, pour avoir accepté d'évaluer mon travail en espérant qu'il sera à la hauteur de vos attentes.

Je remercie aussi les membres de mon comité de thèse Bernard Duvic, Mickael Hedde, Cécile Villenave et Raquel Campos-Herrera pour leurs précieux conseils et leur écoute.

Il n'existe pas de thèse sans encadrants, et je suis heureuse d'avoir eu la chance d'être encadrée par Sophie Gaudriault, Jean-Claude Ogier et Eric Nguema-Ona. C'est tout naturellement que je les remercie pour leur encadrement, leur patience et leurs conseils. Je remercie particulièrement Sophie pour sa volonté à me former en tant que chercheur, ses conseils, sa patience. Mais je la remercie surtout pour cette volonté qu'elle a eu tout le long de la thèse à faire attention à mon bien être. Je me souviendrais de ce moment où attaqué par un fauve roux, tu m'as gentiment amener au médecin. Je remercie Jean Claude qui malgré une file d'attente pour aller à son bureau digne des services administratifs français, a toujours mis un point d'honneur à se montrer disponible pour discuter, aider et m'expliquer les points sur lesquels je bloquais. Je me souviendrais de ces moments où nous avons dû creuser des trous dans des sols durs comme de la pierre sous le soleil pour que cette thèse ait lieu. Evidement je remercie Eric pour ces discussions sur la recherche en générale et en particulier la R&D. Je te remercie pour m'avoir introduit dans ce milieu particulier qu'est l'entreprise et m'avoir expliqué les subtilités liées à ce milieu. Je me souviendrais de toutes ces anecdotes sur ton expérience en tant que docteur et post doc racontées pour souvent me rassurer sur mes différentes appréhensions.

Je remercie Anne-Nathalie Volkoff pour m'avoir accueilli dans le laboratoire DGIMI. Je remercie l'ensemble du personnel du laboratoire en particulier l'ex équipe BIBINE pour leur accueil chaleureux. Je retiendrais particulièrement la volonté de l'ensemble des membres du laboratoire non seulement de s'assurer du bien-être et de la formation des doctorants, mais aussi de les impliquer dans les démarches et les réflexions autour de la vie du laboratoire. Je remercie en particulier Sylvie Pages pour son aide sur les expérimentations, ces moments partagés d'incompréhension autour des maintiens en collection des NEPs, et sa gentillesse. Je remercie Anne pour ces conseils et son soutien, Alain pour les nombreuses discussions partagées autour d'un café ou une pause viennoiserie, Sarah pour tes partages d'expériences, tes conseils et ces parties de jdr.

Je remercie l'ensemble des doctorantes et doctorant du laboratoire Laëticia, Noémie, Victoria, Lan, Hyerin, Linda, Shannon et Floris pour ces moments de rire partagés ensemble. Le premier jour où

je suis arrivée, tu m'as gentiment invité à manger le midi et une amitié est née. Je te remercie infiniment Linda pour ces trois ans passés en ta compagnie, pour ta gentillesse, ta présence et ta compréhension. Les trois années de thèse n'auraient pas été un aussi bon moment sans ta compagnie. Je remercie Victoria pour avoir sacrifié ses moments de télétravail afin de ne pas me laisser seule au bureau. Je te remercie aussi pour ton écoute, ton soutien et tous ces moments drôles partagés ensemble. Je remercie aussi Shannon rencontrée malheureusement sur la fin de ma thèse mais qui m'a marquée de manière importante. L'ermite que je suis a appréciée toutes ces sorties que nous avons partagées, ces instants drôles au cheval où je me blessais dans les moments les plus improbables, et juste ces discussions que nous avons eu. Je te remercie aussi Floris pour ta gentillesse et tes memes très drôles et personnalisés. Je me souviendrais toujours de toi te baladant avec ton papier d'aluminium du 4<sup>e</sup> étage car tu refusais d'utiliser celui du 3<sup>e</sup>.

Je remercie Brendan que j'ai encadré pendant son stage de M1. J'ai beaucoup appris sur l'encadrement grâce à toi et tu as fait un travail exceptionnel qui m'a beaucoup aidé. Je remercie aussi Marie pour son humour et sa gentillesse. Je me souviendrais que nous avons survécu ensemble à la formation « Massol ». Je remercie évidemment tous les autres stagiaires Célia, Ninon, Sylvia, Chloé, Nell, Maël qui ont appris souvent à leur dépend qu'il ne faut jamais dire à une doctorante la phrase « Je n'ai rien à faire, je m'ennuie ». Je fais un remerciement particulier à Célia avec qui j'ai eu des grands moments de rigolade qui ont ponctué mes années de thèse.

Il est nécessaire que je remercie le Centre Mondial de l'Environnement (CMI), deuxième laboratoire auquel j'appartenais. Je remercie Thomas Georgelin, directeur du CMI, pour m'avoir accueilli pendant six mois au cours de ma thèse. Je remercie Sylvain Pluchon directeur de l'équipe Nutrition Végétale à laquelle j'appartiens. Je remercie l'ensemble de l'équipe Nutrition Végétale et des membres du CMI pour leur accueil. Je remercie tout d'abord l'une des premières personnes que j'ai croisé à mon arrivé à Saint Malo, Elise. L'adage dit que la première impression est souvent la meilleure et pour toi c'était amplement véridique. Tu as été d'une gentillesse et d'une capacité à l'écoute merveilleuse, je te remercie amplement pour cela. Je remercie Aurélien, Anne, Noémie pour leur accueil dans le bureau, les moments partagés au repas le midi et ces moments conviviaux en dehors du laboratoire. Vous m'avez aidé à me sentir à l'aise au CMI et apporté de nombreux conseils autant pour le doctorat que pour la suite. Je remercie aussi Nusrat et Sandrine pour leur aide et leur soutien face à mes problèmes techniques en biologie moléculaire. Je tiens à te remercier Bastien pour m'avoir accueilli dans ton bureau.

Je vous remercie Lisa et Geoffrey avec qui j'ai le plus travaillé. Lisa je te remercie car j'ai appris énormément à ton contact, tu as partagé tes expériences en tant que doctorante mais sur la suite de la thèse et tu m'as aidé à me former. Je retiendrais de toi ton courage, ta détermination mais surtout ta grande gentillesse. Je me souviendrais que tu n'as pas hésité à me « babysitter » pour le congrès IOBC. Je te remercie aussi Geoffrey ça été un véritable plaisir de travailler avec toi. Ta douceur et ta gentillesse au quotidien étaient un bonheur. Je remercie évidemment Manon et Mélody pour les sorties à Saint Malo. Nos amis à quatre pattes ont certainement contribué à ce que nous nous rencontrions.

Je remercie évidemment tous les gens qui ont travaillé avec moi et qui ont contribué à l'aboutissement de ce travail de thèse. Il est possible que j'en ai oublié ou que je ne vous ai pas cité, ne le prenez pas mal il y a tant de gens à remercier qu'il me faudrait encore un mois de plus pour tous les énumérer. Mais soyez sûr que je ne vous oublie pas et je vous remercie.

Je finis cette partie en remerciant trois personnes importantes qui n'étaient pas présentes physiquement pendant la thèse, mais dont l'influence reste importante. Je remercie Didier Bouchon et Marius Bredon mes deux encadrants préférés de mon stage de M2 à Poitiers. Vous m'avez préparé à la recherche et à la thèse, vous m'avez transmis cette passion de la recherche, et vous m'avez soutenu dans ce projet de continuer en thèse. Sans vous je ne suis pas sûre que je serais là aujourd'hui à écrire ce texte alors je vous remercie sincèrement. Je remercie aussi Coralie Garon que j'ai rencontré au cours de ce fameux stage M2. Dans ce lointain pays qu'est les USA, tu m'as soutenue, fait énormément rire et conseillée pour tout cela je te dis un grand merci.

J'avais l'intention de finir mes remerciements ici, mais pour ceux qui me connaissent et surtout qui m'ont supportée pendant trois ans, je rajoute ces dernières phrases. Je remercie Nala pour sa présence pendant ces trois ans de thèse et pour son soutien (oui, j'ose l'affirmer). Et, je remercie Julien Courbet et son équipe pour tous leurs conseils sur la vie quotidienne pendant leur émission sur RTL dont j'ai fait profiter l'ensemble du laboratoire.

## Sommaire

---

<b>Sommaire .....</b>	<b>6</b>
<b>Liste des figures .....</b>	<b>10</b>
<b>Liste des tableaux .....</b>	<b>14</b>
<b>Résumé.....</b>	<b>16</b>
<b>Synthèse bibliographique.....</b>	<b>18</b>
<b>Partie I : Compréhension des enjeux de la lutte biologique et connaissance sur les organismes vivants du sol pour une protection agro-écologique des cultures.....</b>	<b>19</b>
<b>I. Le défi de la protection des cultures .....</b>	<b>19</b>
1. Quelles sont les pertes dans les cultures chaque année ? .....	20
a. La place des facteurs abiotiques dans les pertes des cultures .....	20
b. La place des facteurs biotiques dans les pertes des cultures .....	21
2. Qu'est-ce qu'un bioagresseur en agriculture ? .....	21
a. Définition d'un bioagresseur .....	22
b. Quelle est l'importance de chaque bioagresseur ? .....	23
3. Quelles solutions pour lutter contre les bioagresseurs aujourd'hui ? .....	24
a. Les produits phytosanitaires .....	24
b. L'utilisation de plantes génétiquement modifiées .....	25
c. L'agroécologie .....	25
<b>II. La lutte biologique, une solution durable pour lutter contre les bioagresseurs ?.....</b>	<b>27</b>
1. Qu'est-ce qu'une espèce autochtone ou exotique ?.....	27
2. Les définitions de biocontrôle et lutte biologique .....	28
a. Le flou autour des notions de biocontrôle et lutte biologique en France .....	28
b. Les définitions de biological control à l'international.....	30
3. L'importance de la lutte biologique dans l'agriculture.....	31
a. La part mondiale du marché des produits de lutte biologique .....	31
b. Des exemples de lutte biologique en France.....	31
4. Les limites et futurs défis de la lutte biologique .....	32
a. Quelle est l'efficacité ?.....	32
b. Les effets non intentionnels .....	33
c. La lutte biologique par conservation, le futur pour l'agriculture ? .....	34
<b>III. Les sols, des écosystèmes vivants et complexes .....</b>	<b>36</b>
1. Les changements de vision au sujet des sols depuis le 19 <sup>ème</sup> siècle .....	36



2.	Quels sont les organismes des sols ? .....	38
a.	Description du biote des sols .....	38
b.	Quels sont les facteurs qui influencent la composition du biote des sols ? .....	39
a.	Le phylum Nematoda .....	41
b.	Quels sont les nématodes qui font partie de la « nématofaune des sols » ? .....	41
c.	Les facteurs qui influencent la composition de la nématofaune des sols .....	42
4.	La nématofaune, un indicateur de la qualité biologique des sols.....	44
a.	De l'évaluation de la qualité physico-chimique des sols à l'évaluation de leur qualité biologique .	44
b.	Le principe de la nématofaune comme outil d'évaluation de la qualité biologique des sols .....	45
c.	Les indices calculés pour rendre compte de la qualité des sols .....	46
5.	Les outils pour détecter les nématodes dans les sols.....	47
a.	Les techniques pour extraire les nématodes des sols .....	48
b.	L'apport de l'imagerie pour identifier les nématodes sur critères morphologiques .....	48
c.	Le piégeage, un outil pour la détection des nématodes parasites .....	49
d.	L'apport des outils moléculaires pour améliorer la sensibilité de détection des nématodes du sols ?	

49

**Partie II : Les NEPs, des macroorganismes du sol, utilisés en lutte biologique pour une protection agro-écologique des cultures..... 54**

<b>I.</b>	<b>Le cycle de vie des NEPs.....</b>	<b>54</b>
1.	Le cycle de vie de <i>Steinernema</i> sp. et <i>Heterorhabditis</i> sp. ....	54
2.	Les caractéristiques d'un nématode entomopathogène .....	55
<b>II.</b>	<b>Les bactéries qui sont associées aux nématodes entomopathogènes .....</b>	<b>57</b>
1.	Les symbiotes entomopathogènes .....	57
2.	Le FAM (Frequently Associated Microbiota).....	58
<b>III.</b>	<b>La pathogénicité des nématodes entomopathogènes contre les insectes.....</b>	<b>59</b>
1.	Comment les NEPs tuent les insectes ? .....	59
2.	Un spectre d'hôte large et spécialisé selon les espèces .....	60
3.	Les facteurs qui influencent la pathogénicité des NEPs.....	60
<b>IV.</b>	<b>Les nématodes entomopathogènes en lutte biologique .....</b>	<b>62</b>
1.	Comment sont-ils utilisés en lutte biologique ?.....	62
2.	Des exemples d'utilisation en lutte biologique .....	63
3.	Limites de l'utilisation des NEPs en lutte biologique par augmentation.....	63
<b>V.</b>	<b>La distribution des nématodes entomopathogènes autochtones dans les sols.....</b>	<b>65</b>
1.	Dans quels continents sont retrouvés les NEPs ? .....	65
2.	Dans quels écosystèmes sont décrits les NEPs ? .....	66

<b>VI. Les facteurs qui influencent la distribution des nématodes entomopathogènes dans les sols</b>	<b>67</b>
1. Les facteurs abiotiques .....	67
a. Les conditions climatiques .....	67
b. La topologie .....	68
c. Les propriétés physico-chimiques des sols.....	68
2. Les facteurs biotiques .....	68
a. L'abondance et la présence d'insectes .....	68
b. La présence d'organismes antagonistes aux NEPs.....	68
3. Les pratiques agricoles.....	69
<b>Contexte et objectifs de la thèse.....</b>	<b>71</b>
<b>Chapitre 1 : Une nouvelle approche méthodologique de détection des nématodes entomopathogènes pour étudier leur distribution dans les cultures de maïs dans le sud-ouest de la France.....</b>	<b>73</b>
<b>Résultats supplémentaires .....</b>	<b>75</b>
I. Détection moléculaire par ddPCR au niveau du genre avec les amorces spécifiques du genre <i>Heterorhabditis</i> .....	75
II. Détection moléculaire des NEPs au niveau de l'espèce .....	77
1. Caractéristique et contrôle qualité des amorces espèces spécifiques .....	77
2. Détection moléculaire au niveau de l'espèce avec trois couples d'amorces publiés en PCRq .....	79
3. Détection moléculaire au niveau de l'espèce <i>H. bacteriophora</i> avec un couple d'amorce dessiné au laboratoire en ddPCR .....	79
III. Usage de plusieurs couples d'amorces, espèce et genre spécifique pour augmenter la capacité de détection moléculaire des NEPs .....	80
1. Comparaison de la détection espèce spécifique et genre spécifique pour <i>Steinernema</i> sp. ....	80
2. Comparaison de la détection espèce spécifique et genre spécifique chez <i>Heterorhabditis</i> sp.....	81
<b>IV. Conclusion.....</b>	<b>81</b>
<b>Chapitre 2 : Facteurs qui influencent la présence des NEPs dans les sols agricoles .....</b>	<b>83</b>
<b>Introduction .....</b>	<b>83</b>
<b>Materials and methods.....</b>	<b>88</b>
<b>Results/Discussion.....</b>	<b>92</b>
<b>Conclusion.....</b>	<b>98</b>

**Chapitre 3 : Influence du microbiote et de la phylogénie des nématodes entomopathogènes sur leur cycle parasitaire selon l'insecte hôte utilisé .....100**

<b>Introduction .....</b>	<b>100</b>
<b>Matériels et méthodes.....</b>	<b>102</b>
I.    Bio-essais sur <i>Spodoptera littoralis</i> .....	102
1.    Elevage des larves de <i>Spodoptera littoralis</i> .....	102
2.    Description des isolats de NEPs.....	102
3.    Essais des performances du cycle parasitaire des NEPs sur <i>Spodoptera littoralis</i> .....	103
II.   Bio-essais sur <i>Diabrotica virgifera virgifera</i> .....	103
1.    Maintien au laboratoire des larves jusqu'au stade L3 .....	103
2.    Description des isolats de NEPs.....	104
3.    Essais des performances du cycle parasitaire des NEPs sur Dvv .....	104
III.  Description du microbiote bactérien des IJs .....	105
IV.  Analyses statistiques .....	106
1.    Performances parasitaires des NEPs sur <i>S. littoralis</i> ou Dvv.....	106
2.    Recherche d'une corrélation entre les profils de microbiote et la phylogénie des NEPs .....	106
3.    Analyse du lien entre les performances du cycle parasitaire des NEPs sur <i>S. littoralis</i> et la diversité du microbiote.....	107
<b>Résultats .....</b>	<b>107</b>
I.    Evaluation des performances du cycle parasitaire des NEPs sur deux ravageurs de culture de maïs	107
1.    Evaluation de la pathogénicité et de la réussite du cycle parasitaire des NEPs sur <i>Spodoptera littoralis</i> .....	107
2.    Evaluation de la pathogénicité et de la réussite du cycle parasitaire des NEPs sur <i>Diabrotica virgifera virgifera</i> .....	109
II.   Profil de microbiote et phylogénie des NEPs.....	110
1.    Comparaison des microbiotes entre les genres <i>Heterorhabditis</i> et <i>Steinernema</i> .....	110
2.    Comparaison des microbiotes entre espèces au sein du genre <i>Steinernema</i> .....	111
III.  Existe-t-il un lien entre le cycle parasitaire des NEPs et la diversité de leur microbiote ? .....	111
<b>Discussion .....</b>	<b>113</b>
<b>Conclusion.....</b>	<b>115</b>
<b>Discussion Générale.....</b>	<b>116</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>125</b>

### Synthèse bibliographique

Figure 1 : Les facteurs biotiques et abiotiques responsables des pertes dans les cultures.

Figure 2 : Proposition des équivalences entre les traductions anglaises et françaises des termes pouvant être définis comme bioagresseur.

Figure 3 : Niveau de préoccupation selon l'estimation des dommages provoqués sur les cultures de chaque classe de bioagresseurs.

Figure 4 : Schéma des différences entre les définitions entre une espèce autochtone, allochtone et naturalisée.

Figure 5 : Définition de biocontrôle en France.

Figure 6 : L'évolution de la vision des sols en tant qu'écosystème vivant ou support inerte depuis le 19<sup>ème</sup> siècle.

Figure 7 : Les différents facteurs qui influencent les interactions dans un sol suppressif.

Figure 8 : Représentation de la classification du biote des sols basée sur la taille de leur corps.

Figure 9 : Les interactions qui ont lieu entre les différentes classes qui composent le biote du sol ainsi que leurs interactions avec différents facteurs abiotiques.

Figure 10 : Définition de la texture et la structure des sols.

Figure 11 : Ecologie trophique de 53 taxa de nématodes.

Figure 12 : Les groupes trophiques considérés dans la nématofaune des sols et les nématodes non considérés dans ce groupe.

Figure 13 : Les interactions entre les indicateurs physiques, chimiques et biologiques de la santé des sols.

Figure 14 : L'utilisation de la nématofaune pour évaluer la qualité biologique des sols (réalisé à partir de Coll et al., 2013).

Figure 15 : Les avantages et les limites des trois principales méthodes d'extraction des nématodes des sols.

Figure 16 : Principe de la *digital droplet* PCR (ddPCR).

Figure 17 : Cycle de vie des nématodes entomopathogènes (NEPs).

Figure 18 : Principaux facteurs qui influencent la présence des NEPs dans les sols.

## Chapitre 1

### Article

Figure 1: Distribution of the sampled plots planted with maize in the Pyrénées-Atlantiques area of South-West France.

Figure 2: Baiting of entomopathogenic nematodes (EPNs) in maize plots.

Figure 3: Pathogenicity to *Galleria mellonella* of the 78 EPN isolates.

Figure 4: Determination of the copy number of the *Steinernema* ITS in samples from the 43 maize plots by qPCR and ddPCR.

Figure 5: Comparison EPN detection rates with the four methods.

### Chapitre

Figure 19 : Détermination du nombre de copies ITS des nématodes *Heterorhabditis* sp. dans les 43 parcelles cultivées en maïs par ddPCR.

Figure 20 : Schéma des régions ITS où les différents couples d'amorces s'hybrident.

Figure 21 : Spécificité des couples d'amorces DGIMI testés sur des ADNs de nématodes entomopathogènes (NEPs) et nématodes libres des sols (FLNs).

Figure 22 : Détermination du nombre de copies ITS des nématodes *Steinernema feltiae*, *Heterorhabditis bacteriophora* et *Steinernema carpocapsae* dans les 43 parcelles cultivées en maïs par PCRq.

Figure 23 : Détermination du nombre de copies ITS des nématodes *Heterorhabditis bacteriophora* dans les 43 parcelles cultivées en maïs par ddPCR.

Figure 24 : Synthèse des détections genre spécifique et espèce spécifique.

## Chapitre 2

Figure 25: Schematic representation of the methodology leading to the predictive modelling used in the study.

Figure 26: Repartition of positive (green) and negative (red) plots for the *Steinernema* detection in the soils cultivated in maize according five agricultural practices and to the detection method.

Figure 27: Correlation analysis between explanatory variables

## Chapitre 3

Figure 28 : Cycle de vie de *Spodoptera littoralis*.

Figure 29 : Photographie des différents stades de développement de *Diabrotica virgifera virgifera* fournie par Mr Stephan Toepfer.

Figure 30 : Schéma de la méthode pour obtenir les boîtes d'élevage de *Diabrotica virgifera virgifera*.

Figure 31 : Schéma des essais pour évaluer la pathogénicité contre *Diabrotica virgifera virgifera*.

Figure 32 : Succès reproducteur des isolats de NEPs en fonction de leur espèce.

Figure 33 : Survie des larves de *Diabrotica virgifera virgifera* infestées avec les NEPs.

Figure 34 : Succès reproducteur des NEPs infestés sur les larves de *Diabrotica virgifera virgifera*.

Figure 35 : Proportion normalisée des espèces de bactéries composant le microbiote des isolats de NEPs testés.

Figure 36 : L' $\alpha$ -diversité du microbiote des IJs de *Steinernema* en fonction de leur espèce.

Figure 37 :  $\beta$ -diversité du microbiote des NEPs en fonction de leur espèce.

Figure 38 : Corrélation entre le temps de mortalité des NEPs et l' $\alpha$ -diversité du microbiote des NEPs.

Figure 39 : Corrélation entre le temps d'émergence des NEPs et l' $\alpha$ -diversité du microbiote des NEPs.

### **Discussion générale**

Figure 40 : Schéma de la méthodologie et des résultats de la détection des NEPs dans les sols cultivés en maïs.

Figure 41 : Schéma résumé des facteurs qui influencent la présence de *Steinernema* sp. dans les sols cultivés en maïs.

Figure 42 : Pathogénicité, succès parasitaire et succès reproducteur des NEPs infestant deux insectes ravageurs du maïs *Spodoptera littoralis* et *Diabrotica virgifera virgifera*.

## Synthèse bibliographique

Tableau 1 : Correspondance entre les définitions françaises de lutte biologique et celles anglaises de *biological control*.

Tableau 2 : Les types d'écosystèmes où différentes espèces de *Steinernema* sp. ont été découvertes dans différentes parties du monde.

Tableau 3 : Les types d'écosystèmes où différentes espèces de *Heterorhabditis* sp. ont été découvertes dans différentes parties du monde.

Tableau 4 : Contrôle qualité de l'hybridation in silico entre les couples d'amorces et des séquences d'ADN des régions ITS de différents nématodes.

Tableau 5 : Synthèse des résultats obtenus avec les six couples d'amorces espèces spécifiques testés.

## Chapitre 2

Table 6: Agricultural practices in the 41 plots cultivated in maize.

Table 7: Physico-chemical parameters of soils correlated with *Steinernema* sp. presence.

Table 8: Nematode trophic groups, nematode ecological index correlated with *Steinernema* sp. presence.

Table 9: Probabilities, confidence intervals and p. value of each parameter of the quantitative and qualitative variables after modelling the detection of *Steinernema* sp. with a Generalized Linear Model (GLM), based on the binomial law and logit link.

Table 10: Probabilities and confidence intervals of the cumulated effect of the two qualitative variables.

## Chapitre 3

Tableau 11 : Cinétique de mortalité des larves de *Spodoptera littoralis* selon l'isolat de NEP.

Tableau 12 : Cinétique d'émergence des IJs infestant les larves de *Spodoptera littoralis*.



Tableau 13 : Succès parasitaire après 3 jours post infestation des NEPs infestés sur *Diabrotica virgifera virgifera*.

Tableau 14 : Lien entre l' $\alpha$ -diversité du microbiote des NEPs (Richesse taxonomique, Chao1, Shannon et inverse de Simpson) et la réussite de leur cycle parasitaire (mortalité des larves de *Spodoptera littoralis* infestées avec les isolats de NEPs, le succès parasitaire des isolats, le succès reproducteur des isolats après 30 jours post infestation).



## Résumé

---

La découverte des effets néfastes des produits phytosanitaires chimiques utilisés en agriculture sur la santé humaine, animale et environnementale a conduit à la réduction de leur utilisation et au développement de nouvelles stratégies pour lutter contre les bioagresseurs. Une de ces stratégies est la lutte biologique c'est-à-dire l'usage d'agents vivants pour contrôler des bioagresseurs. Les nématodes entomopathogènes (NEPs) sont capables de tuer un grand nombre d'espèces d'insectes en moins de 120h. Ils sont utilisés en lutte biologique par augmentation et/ou acclimatation (introduction d'un ennemi naturel dans l'environnement) sur des cultures à hautes valeurs ajoutées (ornementales, maraîchage, verger). Le coût important de leur utilisation ainsi que la variabilité de leur efficacité réduisent leur utilisation dans des grandes cultures comme le maïs ou le blé. De plus, de nombreux facteurs sont connus (la texture des sols, le pH, les champignons nématophages, les nématodes bactériovores compétiteurs, ect...) pour influencer leur présence et leur diversité dans les sols. Etonnement peu d'études ont été menées pour décrire les effets des pratiques agricoles sur la présence, la diversité et la persistance des NEPs dans les sols agricoles.

L'enjeu aujourd'hui est d'utiliser les NEPs en lutte biologique par conservation (utilisation de différentes pratiques agricoles pour favoriser la présence des ennemis naturels des bioagresseurs). La thèse menée s'inscrit dans cet enjeu et a ainsi trois objectifs clés :

- 1/ Proposer une nouvelle méthodologie pour améliorer la détection des NEPs en vue de décrire leur présence dans les sols agricoles
- 2/ Déterminer les facteurs qui influencent la présence des NEPs
- 3/ Déterminer les facteurs, phylogénie et/ou microbiote, qui influencent la réussite du cycle parasitaire des NEPs

## Thesis summary

---

The discovery of the harmful effects of chemical plant protection products used in agriculture on human, animal and environmental health has led to a reduction in their use and the development of new strategies to combat bio-aggressors. One such strategy is biological control, *i.e.* the use of living organisms to control pests. Entomopathogenic nematodes (EPNs) are capable of killing a large number of insect species in less than 120 hours. They are used in biological control by augmentation and/or acclimatization (introduction of a natural enemy into the environment) on high-value crops (ornamentals, vegetables, orchards). The high cost of their use, as well as the variability of their efficacy, reduces their use in field crops such as corn and wheat. What's more, many factors (soil texture, pH, nematophagous fungi, competitive bacterivorous nematodes, etc.) are known to influence their presence and diversity in soils. Surprisingly few studies have been carried out to describe the effects of agricultural practices on the presence, diversity and persistence of EPNs in agricultural soils.

The challenge today is to use EPNs in conservation biological control (using different agricultural practices to encourage the presence of pests' natural enemies). The thesis we are working on has three key objectives:

- 1/ Propose a new methodology to improve the detection of EPNs with a view to describing their presence in agricultural soils.
- 2/ Determine the factors influencing the presence of EPNs
- 3/ Determine the factors, phylogeny and microbiota, that influence the success of parasite cycle of EPNs



# **Synthèse bibliographique**



## Partie I : Compréhension des enjeux de la lutte biologique et connaissance sur les organismes vivants du sol pour une protection agro-écologique des cultures

---

### I. Le défi de la protection des cultures

Le dernier bulletin publié par les Nations Unies sur les perspectives de l'évolution de la population mondiale prévoit une augmentation de la population à 8,5 milliards d'individus en 2030 et jusqu'à 9,7 milliards en 2050 (United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division (2022)). Les besoins alimentaires augmenteraient ainsi de 54%-70% en 2050 rendant nécessaire le développement de stratégies pour améliorer les rendements des cultures (Dijk et al., 2021; Fao.org : <https://www.fao.org/wsfs/forum2050/wsfs-forum/en/>). Un levier pour augmenter la production alimentaire est de diminuer les pertes en protégeant les cultures des bioagresseurs. Aujourd'hui cela est réalisé par l'ajout de produits chimiques de synthèses qui ont des effets néfastes pour la santé humaine, animale et environnementale. Le deuxième objectif du plan de développement durable (ODD2) dans lequel la France s'est engagée est de répondre à ces enjeux : éliminer la faim, assurer la sécurité alimentaire, améliorer la nutrition et promouvoir une agriculture durable. Pour cela plusieurs objectifs ont été mis en avant : doublement de la productivité agricole tout en mettant en œuvre des pratiques agricoles résilientes, contribution à la préservation des écosystèmes pour renforcer les capacités d'adaptation aux changements climatiques et améliorer progressivement la qualité des terres et des sols. L'ODD2 prévoit la résolution de ces objectifs d'ici 2030. Cette date limite extrêmement ambitieuse permet d'instaurer un cadre d'urgence mobilisant les différents acteurs (politiques, professionnels agricoles, chercheurs...) et financements autour de ces problématiques. La date limite fixée est inatteignable, mais elle rappelle aux acteurs la nécessité pour le futur d'agir rapidement.

*L'ambition de cet ODD2 est liée à un certain nombre d'enjeux qu'il est nécessaire de comprendre et d'identifier. Pour se faire je ferai un état des lieux des causes des pertes des cultures, et la place importante des bioagresseurs dans ces pertes. Puis je vous présenterai les moyens de lutte mis en place et les solutions émergentes respectueuses de l'environnement. Pour ces dernières je développerai leurs avantages mais aussi leurs limites. J'en profiterai pour souligner l'importance d'unifier les définitions au sein de la communauté scientifique.*



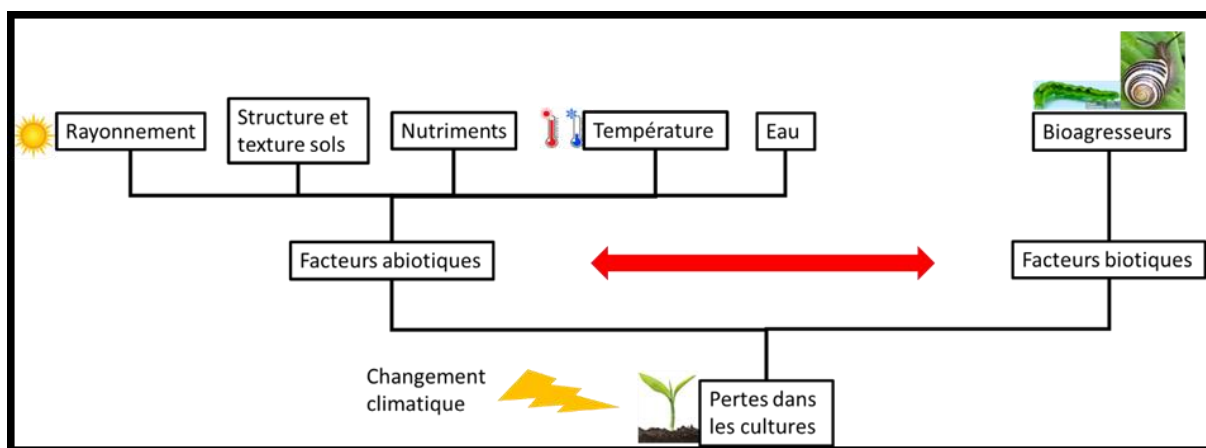


Figure 1 : Les facteurs biotiques et abiotiques responsables des pertes dans les cultures.

## **1. Quelles sont les pertes dans les cultures chaque année ?**

Les cultures subissent de nombreux stress abiotiques et biotiques qui peuvent conduire à des pertes importantes dans les cultures (Figure 1) (Oerke, 2006). Les pertes de culture peuvent être de nature qualitative (réduction de la qualité nutritive et esthétique, contamination des récoltes avec des produits toxiques) et quantitative (diminution de la productivité) (Oerke, 2006). La mesure la plus couramment utilisée en agriculture pour décrire la production agricole est le rendement. Un rendement en agriculture est défini de la manière suivante : le poids de la production végétale à un taux d'humidité standard du sol par unité de surface récoltée (Fischer, 2015; Karthikeyan et al., 2020).

### ***a. La place des facteurs abiotiques dans les pertes des cultures***

Les facteurs abiotiques, qui influencent le rendement des cultures, intègrent les propriétés physico-chimiques des sols et les conditions climatiques. Les paramètres des sols limitants les plus décrits pour le développement des plantes sont la texture et la structure des sols, la composition en macronutriments (N, P, K, Ca, S, Mg, C, O, H) et micronutriments (Fe, B, Cl, Mn, Zn, Cu, Mo, Ni), le pH, et la disponibilité en eau (Figure 1) (Slingo et al., 2005; Oerke, 2006; Tandzi Ngoune and Mutengwa, 2020). Quant aux conditions climatiques, le volume et les fréquences des précipitations, la température sont les plus impactant pour le rendement des cultures (Karthikeyan et al., 2020; Tandzi Ngoune and Mutengwa, 2020). Les événements climatiques extrêmes comme les sécheresses (quantité d'eau disponible non suffisante pour contrebalancer l'évapotranspiration des cultures) ou les chocs thermiques sont des sources de stress pour les cultures contribuant à des diminutions des rendements (Raza et al., 2019).

Difficile de parler de l'influence des conditions climatiques sans évoquer l'effet du changement climatique sur les rendements des cultures (Figure 1). Un effet positif sur les rendements a été principalement décrit, l'élévation du taux de CO<sub>2</sub> atmosphérique. Il s'agit de la source de carbone des végétaux ce qui permettrait d'augmenter les rendements des cultures. Néanmoins d'autres facteurs limitant pour la croissance de la plante pourraient annuler cet effet bénéfique (Grace et al., 2019). Les différents scénarios projetés prévoient aux Etats-Unis une diminution des rendements de maïs entre 20 et 50% d'ici 2050 (Wang et al., 2018). Les changements de température, du niveau et de la fréquence des précipitations, induits par le changement climatique sont suspectés de réduire les rendements. Les événements extrêmes tels que la sécheresse et les chocs thermiques, favorisés par le changement climatique, sont de véritables sources de stress pour les cultures contribuant aux baisses de rendements (Grace et al., 2019; Raza et al., 2019). Les effets du changement climatique sur les cultures seraient très hétérogènes géographiquement d'après les projections. Par exemple, les scénarios prévoient des augmentations de rendements des cultures dans le Nord-Ouest de l'Europe tandis qu'ils



diminueraient dans la zone méditerranéenne (Grace et al., 2019; Raza et al., 2019). Le changement climatique aurait aussi des effets indirects en agissant sur les bioagresseurs des plantes. Il pourrait ainsi favoriser la multiplication ou la dispersion des bioagresseurs, augmenter la fréquence des maladies de certains parasites. De plus, les changements climatiques pourraient altérer l'efficacité des produits phytosanitaires utilisés en protection des cultures. Par exemple l'augmentation de la durée, de la fréquence et de l'intensité des pluies réduit l'efficacité des fongicides en champ (Grace et al., 2019; Tandzi Ngoune and Mutengwa, 2020).

### ***b. La place des facteurs biotiques dans les pertes des cultures***

Le rendement des cultures est aussi influencé par les facteurs biotiques (Figure 1). Ceux-ci peuvent être favorables ou défavorables selon l'organisme étudié. Les organismes favorables retrouvés dans les cultures appartiennent aux pollinisateurs, aux décomposeurs de la litière végétale et aux ennemis naturels des ravageurs de cultures aussi appelés auxiliaires des cultures (Oerke, 2006). Parmi les facteurs biotiques des organismes et virus peuvent être défavorables aux cultures (Tandzi Ngoune and Mutengwa, 2020). Les dégâts qu'ils provoquent peuvent être classés en quatre catégories différentes (Karthikeyan et al., 2020) :

- réduction de la biomasse végétale
- développement de lésions dues à des infections
- destruction des pigments des feuilles
- flétrissement des plantes

Les dommages causés par des macro-organismes et micro-organismes ont provoqué 23% des pertes des cultures de blé, de maïs, de pomme de terre et de soja, et jusqu'à 30% de pertes pour les cultures de riz en 2017 (Savary et al., 2019).

Les facteurs biotiques qui diminuent les rendements sont appelés bioagresseurs des cultures. Derrière ce terme générique de bioagresseur se cachent différentes catégories de macro-organismes et micro-organismes : adventices, ravageurs et agents phytopathogènes.

## **2. Qu'est-ce qu'un bioagresseur en agriculture ?**

Comme souligné dans le paragraphe précédent les bioagresseurs jouent un rôle important dans les pertes de rendement des cultures. Il est ainsi nécessaire de définir ce que sont les bioagresseurs, d'évaluer leurs effets sur les rendements et d'évoquer les solutions existantes pour les contrôler.

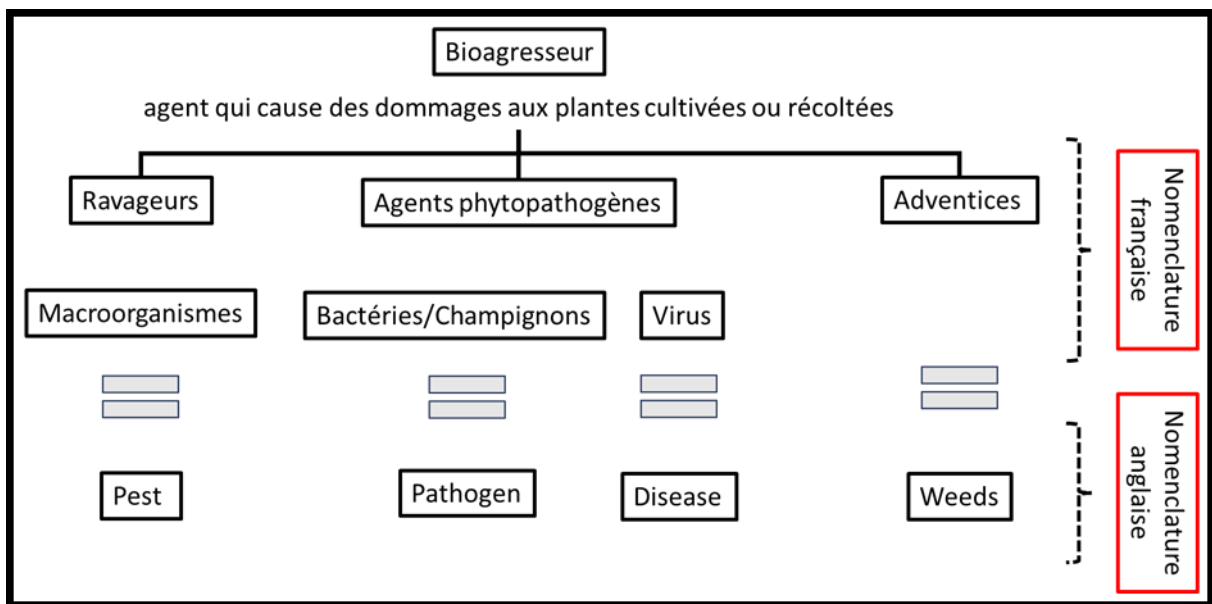


Figure 2 : Proposition des équivalences entre les traductions anglaises et françaises des termes pouvant être définis comme bioagresseur.

### **a. Définition d'un bioagresseur**

En France le terme bioagresseur est défini dans le journal officiel français de 2018 (<https://www.education.gouv.fr/bo/18/Hebdo36/CTNR1823406K.htm>). C'est « un organisme vivant qui cause des dommages aux plantes cultivées ou récoltées ». A noter que l'utilisation du terme « organisme vivant » dans cette définition peut soulever des questionnements sur l'intégration des virus dans les bioagresseurs. Les catégories de bioagresseurs concernés par cette définition sont les ravageurs de culture, les agents phytopathogènes et les adventices. Les ravageurs de cultures sont définis par l'Académie Française comme « des organismes qui causent des ravages, de graves dommages ». Les agents phytopathogènes regroupent les agents qui provoquent des maladies aux végétaux. Les adventices couramment appelées mauvaises herbes sont les espèces végétales qui poussent spontanément dans une culture et dont la présence freine le développement de la plante cultivée (Larousse).

Les équivalents anglais de ces mots français, utilisés par la communauté scientifique, sont *pest*, *disease*, *pathogen* et *weeds*. Le dictionnaire de Cambridge définit le terme « pest » comme « un insecte ou un petit animal qui blesse ou endommage les cultures » souvent traduit en français par ravageur. A souligner que le bulletin officiel propose de traduire le terme *pest* par bioagresseur le rapprochant de sa définition donnée par la FAO (Food and Agriculture Organization) dans son code de 2014 intitulé « International Code of Conduct on Pesticide Management » : « n'importe quelles espèces, souches ou biotypes de plantes, animales ou agents pathogènes qui blessent les plantes et les produits des plantes, les matériaux ou l'environnement ce qui incluent les vecteurs de parasites ou pathogènes de maladies humaines ou animales et les animaux causant des nuisances de santé publique ». Les mots *disease* et *pathogen* sont utilisés pour décrire des micro-organismes provoquant des dommages ou des perturbations de l'activité vitale des végétaux similaires à des maladies (Bos and Parlevliet, 1995). Ils peuvent être traduit en français par agent phytopatogène. Le mot *weeds* signifie littéralement adventices.

Au vu de ces définitions le terme de bioagresseur peut être utilisé pour parler des agents causant des dommages aux cultures de manière générale. Les termes de ravageurs ou *pest* en anglais peuvent être réservés aux macroorganismes. Pour être plus proche de la littérature scientifique anglaise la catégorie du bulletin officiel « agents phytopathogènes » peut être séparée en deux classes : les virus ou *disease* et les bactéries/champignons ou *pathogen* (Figure 2).

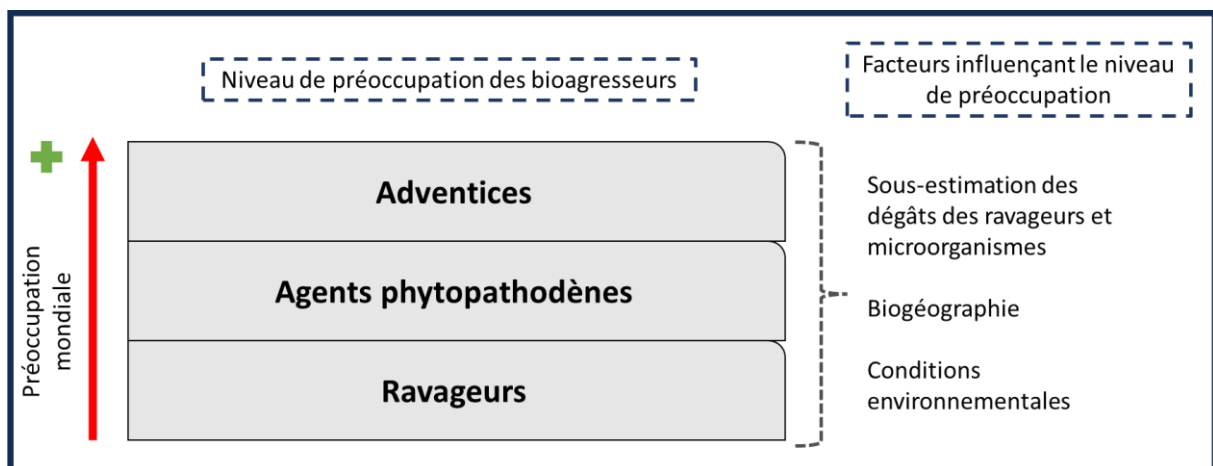


Figure 3 : Niveau de préoccupation selon l'estimation des dommages provoqués sur les cultures de chaque classe de bioagresseurs.

### ***b. Quelle est l'importance de chaque bioagresseur ?***

Les bioagresseurs les plus préoccupants en agriculture sont les adventices qui représentent des pertes de rendement de 34% à 100% quand ils ne sont pas contrôlés (Figure 3) (Chauhan, 2020). Les agents phytopathogènes sont aussi responsables d'une perte de rendement des cultures entre 10% et 16% de la production mondiale de nourriture (Oerke, 2006; Grace et al., 2019), voir 22% dans les cultures de maïs de l'Ohio en 2016 (Mueller et al., 2020). Pour certains agents phytopathogènes les pertes sont supérieures à 30%. La nécrose létale du maïs est une maladie provoquée par l'interaction de deux virus différents, Sargaçane Mosaic Virus et Maize Chlorotic Mottle Virus. Cette maladie provoque des pertes de rendement de 30% et jusqu'à 100% des rendements de culture de maïs de l'Est et du Centre de l'Afrique (Tandzi Ngoune and Mutengwa, 2020).

Il est surprenant de constater qu'à l'échelle mondiale les ravageurs sont considérés comme moins préoccupants. A l'échelle mondiale le niveau de dégâts sur les rendements sont moins importants (Chauhan, 2020) (Figure 3). Pour autant certains ravageurs de culture sont connus pour être responsables d'énormes pertes de culture dans certaines aires géographiques. Le puceron Russe du blé, *Diuraphis noxia*, est une espèce invasive provoquant des pertes de rendement de 80 à 100% en Afrique, Asie, Europe, Amérique du Nord et du Sud, et en Australie (Tandzi Ngoune and Mutengwa, 2020). De même les cultures de maïs en Amérique et dans l'Est de l'Asie perdent 16% des rendements à cause des ravageurs, contre 9% et 3% de pertes causées par les pathogènes et les virus respectivement (Oerke, 2006). En Chine les rendements des cultures de blé ont diminué de 9.9% à cause des ravageurs depuis ces 19 dernières années (Zhang et al., 2022). Ces exemples montrent que les ravageurs des cultures peuvent affecter les rendements de manière significative selon le type de culture et surtout la localisation géographique. Il est aussi à noter que les pertes de rendement causées par les ravageurs de culture peuvent être sous-estimées par la méconnaissance de leur symptomatologie, ce qui conduirait à attribuer leurs dégâts aux effets des conditions environnementales ou à des déficits nutritionnels (Mueller et al., 2020) (Figure 3). Toutes ces études se focalisent sur l'effet d'un bioagresseur en particulier mais prennent peu en compte l'effet d'un complexe de ravageurs de culture. L'effet des multi-stress est pourtant connu et étudié, en effet la plante peut être rendue vulnérable par un ravageur face à d'autres stress abiotiques mais aussi biotiques (Hill, 1997).

***Les effets négatifs de ces bioagresseurs sur les cultures et en particulier sur leurs rendements sont significatifs et peuvent être désastreux quel que soit la catégorie de bioagresseur***



*considérée. L'enjeu est de contrôler les bioagresseurs de manière efficace et durable pour maintenir les rendements au-dessus d'un certain seuil en particulier économique.*

### **3. Quelles solutions pour lutter contre les bioagresseurs aujourd'hui ?**

Des solutions ont été développées pour lutter contre les bioagresseurs de manière efficace notamment en faisant appel à des produits chimiques. Aujourd'hui les enjeux de la lutte contre les bioagresseurs se tournent vers des solutions efficaces, durables et respectueuses de l'environnement.

#### ***a. Les produits phytosanitaires***

Les produits phytosanitaires ou *pesticides* en anglais regroupent toutes les substances actives ou sous une forme formulée permettant de lutter contre les bioagresseurs (Hassaan and El Nemr, 2020). Deux millions de tonnes de pesticides sont utilisés et répartis de la manière suivante : 47.5% d'herbicides, 29.5% d'insecticides, 17.5% de fongicides et 5.5% d'autres produits phytosanitaires (Hassaan and El Nemr, 2020). Les produits phytosanitaires chimiques peuvent être classés en plusieurs catégories : les carbamates, les organophosphates, les organochlorines, et les pyrethroides (Hassaan and El Nemr, 2020). Il existe une autre classe de produits phytosanitaires, les biopesticides qui sont des composés naturels ou dérivés de produits naturels. Parmi les biopesticides différents groupes sont distinguables : les biopesticides biochimiques, les biopesticides microbiens, et les plantes modifiées génétiquement pour produire des insecticides (Hassaan and El Nemr, 2020).

Le cas des insecticides chimiques permet d'illustrer les problématiques liées à l'utilisation des produits phytosanitaires chimiques. Le premier avertissement sur les effets néfastes de l'utilisation des insecticides chimiques est un article, intitulé « Silent Springs », publié dans The New Yorker en 1962 par Rachel Carson (Davis, 2019). Elle y fait l'état des lieux des effets négatifs des hydrocarbures chlorés notamment le dichlorodiphényltrichloroethane (DDT) très utilisé à cette époque. Le principal effet pointé du doigt pour le DDT et les autres composés appartenant aux hydrocarbures chlorés est leur capacité à s'accumuler dans les sols, sur la nourriture, à se bioaccumuler (le produit se transmet et se concentre à chaque passage d'un niveau trophique inférieur à supérieur) et se transmettre de la mère à l'enfant via le placenta maternel (Davis, 2019). D'autres classes d'insecticides ont été utilisées comme alternatives aux hydrocarbures chlorés mais des effets négatifs sur la santé humaine et environnementale ont aussi été montrés (Alavanja et al., 2003; Date et al., 2004; Robin and Marchand, 2018; Davis, 2019).

Malgré nos connaissances sur leurs effets néfastes il est parfois compliqué de remplacer l'utilisation des produits phytosanitaires, y compris certains insecticides chimiques considérés comme les plus

dangereux. Par exemple, le DDT est toujours utilisé en Afrique pour lutter contre le paludisme faute de trouver d'autres solutions efficaces (WHO position statement, 2011; Davis, 2019). La nécessité d'utiliser ce produit pour lutter contre une maladie problématique ou le besoin de tout stopper pour éviter les risques pour la santé humaine reste sujet à débat aujourd'hui (Bouwman, 2011).

Les produits phytosanitaires se sont montrés assez efficaces pour lutter contre différents bioagresseurs mais aussi dangereux d'un point de vue humain et environnemental. D'autres solutions ont été recherchées pour les remplacer comme l'utilisation d'organismes génétiquement modifiés (OGMs) pour les plantes.

### ***b. L'utilisation de plantes génétiquement modifiées***

Les OGMs sont des organismes qui ont subi des changements génétiques de leur ADN génomique. Pour les plantes cultivées, ces changements ont pour but d'améliorer certains traits de l'organisme comme la qualité nutritionnelle d'un légume ou fruit ou encore la résistance contre des stress abiotiques et biotiques (Ghosal et al., 2023). Dès 1980 la première variété de tomate OGM, Flavr Savr, a été commercialisée pour l'utilisation dans des cultures à large échelle. Les débats et les controverses naissent quelques années plus tard car des acteurs de la société civile se sont inquiétés du manque de données sur les dangers potentiels des OGMs sur l'environnement et/ou la santé. Les premières lois sur leur utilisation apparaissent au 20<sup>e</sup> siècle (Ghosal et al., 2023). Le protocole de Cartagena, signé par 166 pays en 2003, encadre le transport transfrontalier des OGMs (Secretariat of the Convention on Biological Diversity, 2000; Ghosal et al., 2023; Hartung and Schiemann, 2013). Dans l'Union Européenne la production et la propagation des OGMs sont régulées par la Directive 2001/18/CE. L'utilisation des OGMs en Europe est très faible avec seulement 129 000 hectares en 2012 (Hartung and Schiemann, 2014). Le coût, 7-15 millions d'euros, ou le temps, 4-6 ans, des procédures européennes pour approuver la culture des OGMs peuvent être un frein important à leur utilisation dans cette partie du Monde (Hartung and Schiemann, 2014). En Europe l'utilisation des OGMs pour remplacer les produits chimiques n'est pour l'instant pas une solution envisageable au moins à court et moyen terme.

### ***c. L'agroécologie***

Dès 1928 le terme agroécologie fut introduit pour désigner les sciences de base de la conservation des sols (Rivera-Ferre, 2018; Wezel et al., 2018). Ce terme désigne ainsi un ensemble de pratiques et de techniques agricoles basées sur des processus écologiques pour développer une agriculture durable et respectueuse de l'environnement (Rivera-Ferre, 2018). La définition s'est ensuite complexifiée avec le temps en introduisant d'autres aspects : la nécessité d'assurer une souveraineté alimentaire, la justice sociale et la préservation des connaissances indigènes (Dumont et al., 2021). L'association de l'agroécologie d'Europe ([www.agroecology-europe.org](http://www.agroecology-europe.org)) définit le terme agroécologie comme (i) une science qui donne la priorité à la recherche-action, en utilisant par exemple la science participative, et



la transdisciplinarité, (ii) une pratique qui repose sur l'utilisation des ressources renouvelables locales, les connaissances et les priorités des agriculteurs locaux, l'utilisation judicieuse de la biodiversité pour fournir des services écosystémiques et de la résilience et des solutions qui offrent des avantages multiples au niveau local et mondial, (iii) un mouvement social qui défend les petits exploitants et l'agriculture familiale, les agriculteurs et les communautés rurales, la souveraineté alimentaire, les chaînes d'approvisionnement alimentaire locales et courtes, la diversité des semences et des races indigènes, ainsi qu'une alimentation saine et de qualité. La notion de l'agroécologie est complexe et surtout interdisciplinaire. Mais les études scientifiques se focalisent souvent sur une discipline particulière, par exemple en mettant l'accent sur l'aspect agronomique mais en négligeant la discipline sociale (Dumont et al., 2021). En Allemagne le concept d'agroécologie est uniquement lié à la science tandis qu'en Italie le concept d'agroécologie ressemble plus à une philosophie agricole (Wezel et al., 2018). En France le terme « agroécologie » est introduit dans l'article L1 du code rural et de la pêche maritime et définit l'agroécologie comme un système de production agricole. Le Ministère de l'Agriculture a enregistré 14,3% des exploitations agricoles françaises qui étaient engagées dans une démarche agroécologique en 2016.

Les dimensions socio-économiques qui existent dans le domaine de l'agroécologie sont rarement pris en compte dans les différentes études menées. Ce manque d'homogénéité entre les pays et les études, amène des manques de connaissances sur l'analyse de l'agroécologie au niveau systémique (Dumont, 2021). Il est pourtant très important de pouvoir réaliser des études à grandes échelles qui dépassent la frontière d'un unique pays, au vu des influences existantes des conditions abiotiques et biotiques pour enregistrer tous les cas de figures. Cela requiert l'homogénéité des définitions et des données collectées.

*Le champ de l'agroécologie est vaste et compte de nombreuses pratiques ou systèmes agricoles différents. L'un de ces systèmes, cité dans l'article français L1 du code rural et de la pêche maritime, est l'agriculture biologique. L'agriculture biologique est caractérisé par le bannissement des produits phytosanitaires chimiques, une fertilisation organique et un labour intense (Chassain, 2023). L'interdiction d'utiliser des produits phytosanitaires chimiques dans ce système agricole oblige les agriculteurs à se tourner vers d'autres solutions pour protéger les cultures des bioagresseurs, appelées biocontrôle ou lutte biologique.*

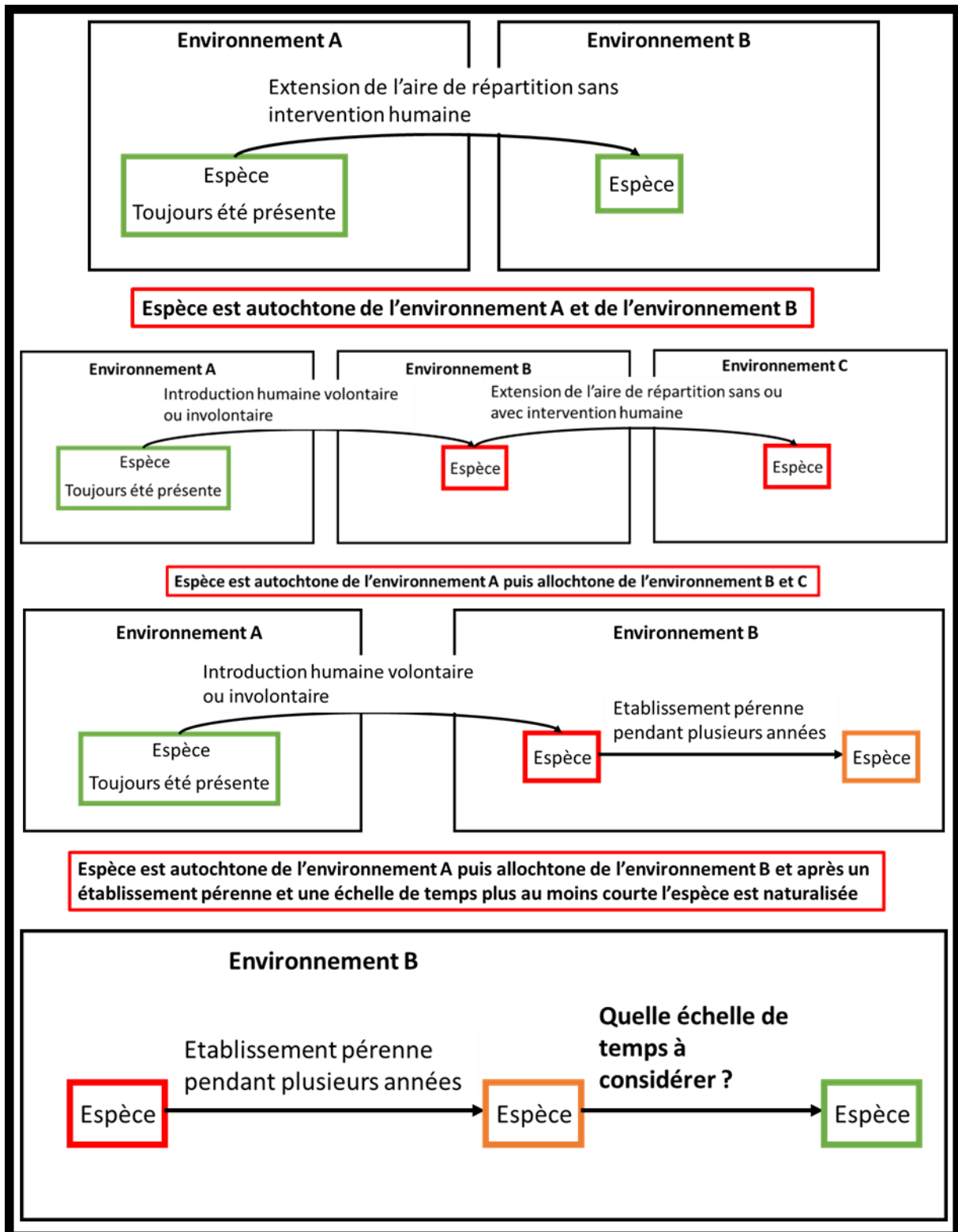


Figure 4 : Schéma des différences entre les définitions entre une espèce autochtone (vert), allochtone (rouge) et naturalisée (orange).

## II. La lutte biologique, une solution durable pour lutter contre les bioagresseurs ?

Dans la lutte contre les bioagresseurs de manière durable, le biocontrôle ou la lutte biologique sont souvent évoqués. Le biocontrôle est de plus en plus connu et cité par différents acteurs (médias, professionnels agricoles ...) et il est utilisé depuis plus de 100 ans (Hajek et al., 2016). A l'international le terme de *biological control* est traduit par biocontrôle en français. Si ces notions sont utilisées et connues depuis longtemps encore une fois leurs définitions ne sont pas claires.

### 1. Qu'est-ce qu'une espèce autochtone ou exotique ?

La compréhension des définitions de biocontrôle, de lutte biologique ou encore de leur pendant anglais *biological control* impose de bien connaître les différences entre ce qui est considéré comme une espèce autochtone ou indigène (*native* en anglais) et une espèce exotique ou allochtone. L'union internationale pour la conservation de la nature et la convention sur la diversité biologique définit une espèce autochtone comme une espèce qui est observée dans son territoire naturel (Figure 4). Certains auteurs précisent cette définition en indiquant que l'espèce est autochtone d'une aire géographique pour une période donnée (Thévenot, 2013). Cette précision est importante pour différencier une espèce naturalisée d'une espèce autochtone. Une espèce naturalisée est une espèce non autochtone qui s'établit de manière pérenne et stable dans son nouvel environnement (Figure 4). Le questionnement soulevé par certains auteurs est à partir de quelle échelle de temps l'espèce naturalisée peut être considérée comme autochtone (Pyšek et al., 2009; Crees and Turvey, 2015). Les espèces allochtones (*non native* en anglais) n'appartiennent pas à l'aire géographique à un temps donné, l'ont colonisée par la suite, et y ont constitué des populations pérennes (Thévenot, 2013) (Figure 4).

Une espèce peut aussi être considérée comme autochtone d'un nouvel environnement si elle y est arrivée en étendant son aire de répartition naturelle d'un environnement où elle était autochtone sans aucune d'intervention humaine volontaire ou involontaire (Figure 4). Au contraire si l'espèce était allochtone dans l'environnement d'où elle a colonisé son nouvel environnement, cette espèce est considérée comme allochtone même s'il n'y a eu aucune intervention humaine pour cette nouvelle expansion (Pyšek et al., 2009; Thévenot, 2013) (Figure 4).

***La connaissance de ces définitions est importante pour saisir les subtilités des définitions autour du biocontrôle et de la lutte biologique mais pas seulement. En effet ces définitions mettent en lumière une réalité actuelle sur la difficulté de faire l'inventaire des espèces***

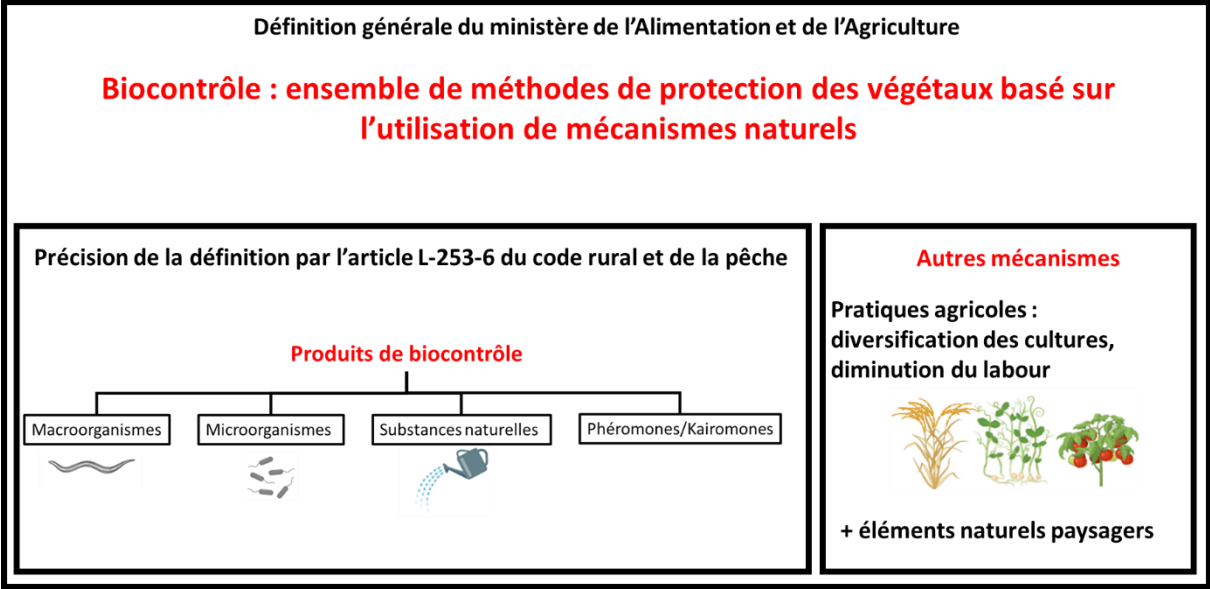


Figure 5 : Définition de biocontrôle en France.

*considérées comme autochtone, allochtone ou exotique. Aujourd'hui le changement climatique change les aires de répartition naturelles potentielles des différentes espèces autour du monde. A partir de quelle échelle de temps doit on arrêter de considérer une espèce comme exotique ?*

## **2. Les définitions de biocontrôle et lutte biologique**

En France deux termes sont utilisés pour définir la lutte contre les bioagresseurs par des méthodes biologiques : biocontrôle et lutte biologique. En 2023, Thibault Malausa, chercheur à l'INRAE, fait le constat que les définitions de ces mots sont floues et très diverses en fonction du message que les acteurs veulent faire passer.

### ***a. Le flou autour des notions de biocontrôle et lutte biologique en France***

Le mot biocontrôle est une contraction dérivée du mot anglais *biological control*. Le Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation définit le biocontrôle comme un ensemble de méthodes de protection des végétaux basé sur l'utilisation de mécanismes naturels tels que la prédation des ravageurs par leurs ennemis naturels. Au niveau législatif, l'article L-253-6 du code rural et de la pêche précise la définition de ce qui est appelé produits de biocontrôle. Un produit de biocontrôle est un agent ou un produit qui utilise des mécanismes naturels pour contrôler de manière intégrée les bioagresseurs des cultures. Il les catégorise en quatre classes : 1/ les micro-organismes (virus, bactéries, champignons), 2/ les macro-organismes (insectes, nématodes), 3/ les médiateurs chimiques (phéromones, kairomones), 4/ les substances naturelles (extraits de plantes, algues, minéraux) (Figure 5). Bien que l'article de loi précise uniquement une définition des produits de biocontrôle, il est souvent cité et repris par certains acteurs comme étant la définition de biocontrôle en France occultant ainsi les autres voies possibles du biocontrôle (Deguine and Ledouble, 2022). Une certaine ambiguïté autour du mot biocontrôle peut subsister en fonction des personnes auxquelles on s'adresse et de leurs intérêts.

Le mot biocontrôle est aussi associé ou utilisé en synonyme avec le mot lutte biologique. La lutte biologique est l'usage des êtres vivants ou de substances produites par des organismes vivant pour contrôler des bioagresseurs. Différentes catégories de lutte biologique peuvent être distinguées (communiqué INRAE : A, B, C, D... SPE- L comme lutte biologique, par Thibault Malausa, 2023) :

- La lutte biologique par acclimatation : ajout d'un ennemi naturel exotique dans l'environnement pour son établissement et le contrôle d'un bioagresseur exotique sur le long terme.





- La lutte biologique par augmentation : introduction d'un ennemi naturel natif dans l'environnement pour augmenter leur densité de population. Deux types de lutte par augmentation peuvent être distingués : l'inondation où l'ennemi naturel est introduit massivement dans l'environnement pour un contrôle sur le court terme sans établissement de sa population, et l'inoculation où l'ennemi naturel est introduit en petit nombre pour un contrôle à moyen et long terme avec un établissement de sa population.

- La lutte biologique par conservation : utilisation de différentes pratiques agricoles pour apporter les ressources nécessaires aux ennemis naturels autochtones des bioagresseurs et favoriser leur présence.

*La définition de la lutte biologique est équivalente à celle de biocontrôle pour autant l'utilisation des deux mots en synonymes est gênante. La première raison, et sûrement la moins importante, est que le mot biocontrôle est un anglicisme dont les définitions ont parfois divergé au cours du temps. La deuxième raison, le cœur du problème selon moi, est l'ambiguïté autour de la notion de biocontrôle en France. En effet les différents acteurs de ce domaine utilisent autant le mot biocontrôle dans son sens large, c'est-à-dire un ensemble de méthodes de protection des végétaux basées sur l'utilisation de mécanismes naturels (définition du Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation), que dans son sens restreint, c'est-à-dire la définition des produits de biocontrôle sans plus de précision. Cela amène de la confusion et de l'incompréhension dans les études ou les discussions dans ce domaine. La troisième raison, et sûrement plus personnelle, est qu'actuellement la notion de biocontrôle est intimement liée à la notion de produits (communiqué INRAE : A, B, C, D... SPE- L comme lutte biologique, par Thibault Malausa, 2023 ; IBMA, France) occultant ainsi les autres aspects du biocontrôle où l'usage de produits de lutte biologique n'est pas nécessaire (diversification végétale dans les cultures, réduction du labour, etc).*

*Il est évident que derrière cela se cachent des enjeux politiques et surtout économiques. Or, il est déroutant de limiter le biocontrôle aux seuls produits commercialisables. Le terme lutte biologique semble ainsi préférable pour ces trois raisons. La précision des mots utilisés dans ce domaine est d'autant plus importante qu'il y a des acteurs très différents (chercheurs, politiciens, entreprise privée, agriculteurs...), donnant lieux à des débats importants et surtout est au cœur de l'actualité et des priorités avec l'ODD2.*

**Tableau 1 : Correspondance entre les définitions françaises de lutte biologique et celles anglaises de *biological control*.** Les mots en vert montrent la concordance entre les deux définitions et en rouge la discordance.

Définition française	Définition anglaise
<b>Lutte biologique</b> : usage des êtres vivants ou de substances produites par des organismes vivants pour contrôler des bioagresseurs	<b>Biological control</b> : agent (organisme ou virus) qui agit directement ou indirectement en ciblant le ravageur ou pathogène
<b>Lutte biologique par acclimatation</b> : ajout d'un ennemi naturel exotique dans l'environnement pour un établissement et un contrôle d'un bioagresseur exotique sur le long terme	<b>Classical biological control</b> : ajout d'un nouvel agent de biocontrôle pour qu'il prolifère et s'établisse de manière permanente
<b>Lutte biologique par augmentation</b> : introduction d'un ennemi naturel natif dans l'environnement pour augmenter leur densité de population	<b>Augmentative biological control</b> : ajout humaine d'un agent de biocontrôle pour augmenter temporairement la population de l'agent de biocontrôle présent
<b>Lutte biologique par inondation</b> : introduction massive dans l'environnement de l'agent	
<b>Lutte biologique par inoculation</b> : l'ennemi naturel est introduit en petit nombre	
<b>Lutte biologique par conservation</b> : favoriser la présence des ennemis naturels des bioagresseurs	<b>Conservation biological control</b> : stimulation humaine d'un agent de biocontrôle natif
	<b>Natural biological control</b> : aucune intervention humaine délibérée

### ***b. Les définitions de biological control à l'international***

Souvent les mots français et leurs traductions anglophones ne sont pas toujours strictement identiques. L'équivalent anglais utilisé dans les études concernant la lutte biologique est *biological control*. Les premières définitions ont été introduites en 1964 par Debach et en 1967 par Beiner qui le définit simplement comme le contrôle d'un bioagresseur par l'action de parasites, prédateurs ou pathogènes. Au cours du temps le concept de *biological control* s'est complexifié en ajoutant des catégories : *natural biological control*, *conservation biological control*, *augmentative biological control*, *classical biological control*. Le terme *augmentative biological control* en particulier ne fait pas référence aux mêmes définitions selon les articles. Certaines études utilisent ce terme dans sa définition la plus large : ajout d'un agent de contrôle dans l'environnement pour lutter contre un bioagresseur (Hajek et al., 2016) tandis que d'autre vont se limiter à sa définition plus restrictive : ajout d'un agent natif de la région pour lutter contre le bioagresseur (Stenberg et al., 2021).

En 2021 Stenberg *et al.* unifient les définitions de *biological control* et surtout en fixent les catégories, et énoncent trois principes qui caractérisent le *biological control* :

- Il y a un agent vivant (organisme ou virus) qui agit directement ou indirectement en ciblant le ravageur ou le pathogène.
- Les dommages du bioagresseur doivent être réduits par son contrôle.
- Les méthodes de biocontrôle peuvent être classées en 4 catégories : 1/ *natural biological control* aucune intervention humaine délibérée, 2/ *conservation biological control* stimulation humaine d'un agent de biocontrôle autochtone, 3/ *augmentative biological control* ajout humain d'un agent de biocontrôle autochtone pour augmenter temporairement sa population, 4/ *classical biological control* ajout d'un nouvel agent de biocontrôle autochtone pour qu'il prolifère et s'établisse de manière permanente.

Cette définition restreint l'utilisation du mot *biological control* aux organismes vivants ou virus, et exclut les substances développées à partir de produits naturels. Le mot *bioprotection* a été proposé pour regrouper les solutions *biological control* et les substances issues de produits naturels (Stenberg et al., 2023).

Au final, la lutte biologique dans son sens large (l'usage des êtres vivants ou de substances produites) doit être traduite par *bioprotection* en anglais, et par *biological control* dans son sens restreint (l'usage des êtres vivants). Les catégories définies au sein de *biological control* correspondent à celles de la lutte biologique (Tableau 1).

### **3. L'importance de la lutte biologique dans l'agriculture**

En France une enquête a été menée pour connaître la part d'utilisation des produits microbiens commerciaux de lutte biologique : 73% des agriculteurs contactés ont déclaré utiliser des produits microbiens de lutte biologique (Pressecq et al., 2024). Les plus jeunes agriculteurs semblent être ceux les plus attirés par la lutte biologique. Différentes raisons orientent ce choix : 1/ éviter les résidus de produits phytosanitaires sur les légumes pour les consommateurs, 2/ les restrictions sur l'utilisation des produits phytosanitaires, 3/ la préservation de l'environnement, et 4/ préserver leur santé et celle de leurs ouvriers (Pressecq et al., 2024).

#### **a. La part mondiale du marché des produits de lutte biologique**

En 2015 le marché mondial des produits de lutte biologique pesait 1,7\$ milliard soit 2% du marché des produits phytosanitaires hors herbicides (Lenteren et al., 2018). Ce chiffre est en constante augmentation, il est estimé que la part du marché atteindra 30% en 2030 (Baratange et al., 2023). A l'échelle mondiale il existe un grand nombre d'entreprises qui commercialisent des produits de lutte biologique souvent à petite-moyenne échelle, et spécialisé dans un ou deux organismes, et méthodes de production (Lenteren et al., 2018). Les macro organismes (prédateurs et parasitoïdes) sont les plus utilisés en lutte biologique suivis par les micro-organismes (Lenteren et al., 2018). En France une hausse moyenne de 8,5% par an depuis 2019 des ventes des produits de la lutte biologique est observée par l'IBMA (International biocontrol manufacturers association), et la part de marché de la lutte biologique est estimée à 278 millions d'euros en 2023 (IBMA France, 2023).

#### **b. Des exemples de lutte biologique en France**

Il existe de nombreux produits commercialisés en lutte biologique listés dans les annexes des articles L.253-5 et L.253-7 du code rural et de la pêche maritime, et l'arrêté du 26 février 2015 (version du 22 février 2023). Il existe de nombreuses formulations autorisées pour être commercialisées : environ 547 substances naturelles, 453 macro-organismes, 96 microorganismes, et 75 phéromones et kairomones. Paradoxalement la quantité de produits enregistrés paraît énorme, mais le nombre d'espèces ou des modes d'action différents est moitié moins important. Par exemple les 84 produits de phéromones sont des chaînes lipidiques ciblant les Lépidoptères.

Les produits les plus utilisés contiennent des préparations à partir de souches de *Bacillus*, *Clonostachys*, *Coniothyrium*, *Saccharomyces*, et *Trichoderma* (Pressecq et al., 2024). Des microorganismes ont aussi été développés pour leur utilisation en lutte biologique. Par exemple la bactérie *Bacillus thuringiensis* et le champignon entomopathogène *Beauveria bassiana* sont connus et utilisés en lutte biologique en France (Regnault-Roger, 2012). L'exemple historique de lutte biologique par augmentation est l'utilisation du *Trichogramme brassicae* et *Trichogramme evenescens* contre la pyrale du maïs, *Ostrinia*

*nubilalis* (Razinger et al., 2015; Ivezić et al., 2022). La protection des cultures de maïs avec les *Trichogrammes* sp. a fortement augmenté en 25 ans passant de 10 120 hectares de cultures maïs protégées en 1993 (Hassan, 1993) à 120 000 hectares en 2018 (Robin and Marchand, 2018).

#### **4. Les limites et futurs défis de la lutte biologique**

La hausse du marché de la lutte biologique ne signifie pas qu'il n'existe pas de limites qui freinent son adoption. La lenteur et le coût des procédures d'homologation et d'enregistrement ainsi que le coût des produits finalement commercialisés sont des freins non négligeables pour le développement de nouveaux produits et leur adoption par les agriculteurs (Lamichhane et al., 2016; Pressecq et al., 2024). Le facteur le plus important qui limite l'utilisation de la lutte biologique est la variabilité de l'efficacité voir une absence totale d'efficacité des produits de lutte biologique commercialisés (Pressecq et al., 2024).

##### ***a. Quelle est l'efficacité ?***

La variabilité de l'efficacité des produits commercialisés en lutte biologique est connue au sein de la communauté scientifique et des professionnels de l'agriculture (Stewart, 2001; Collier and Steenwyk, 2004; Lamichhane et al., 2016). De nombreux facteurs expliquent cette variabilité et le manque d'efficacité : un environnement défavorable pour l'agent, une dispersion naturelle de l'agent, la prédation naturelle de l'agent par d'autres organismes, présence de refuge pour le bioagresseur, une trop forte densité de l'agent, la compensation de la mortalité causée par le bioagresseur, la qualité de l'agent, l'agent n'est pas compatible avec le bioagresseur, l'immigration du bioagresseur, un problème dans la période d'ajout de l'agent (Collier and Steenwyk, 2004).

Il existe des stratégies pour passer outre ces problèmes : 1/ la combinaison avec d'autres méthodes telles que des pratiques agricoles particulières, des mesures prophylactiques, ou l'utilisation de produits chimiques (Lamichhane et al., 2016; Pressecq et al., 2024), 2/ l'utilisation d'adjuvants pour améliorer la dispersion et la persistance des produits dans l'environnement (Pressecq et al., 2024), 3/ la prise en compte des conditions environnementales avant l'application du produit (Pressecq, 2024). Malgré l'existence de ces stratégies cette variabilité freine les entreprises à s'engager sur le marché de la lutte biologique qui se doivent de proposer des produits performants (Stewart, 2001).

De plus, cette connaissance de la variabilité des produits en lutte biologique pousse les agriculteurs à s'interroger sur la réelle efficacité des produits vendus en lutte biologique. Quand aucun dommage n'a été observé sur la parcelle, ils se demandent si cela est dû à l'action du produit ou est-ce parce que le bioagresseur visé n'était tout simplement pas ou peu présent ? De manière générale les agriculteurs

souhaitent plus de transparence sur la réelle efficacité des produits de lutte biologique en mettant aussi bien en avant les retours d'utilisations positifs que négatifs (Pressecq, 2024).

### ***b. Les effets non intentionnels***

Depuis 1980 les effets négatifs sur des espèces non cibles de la lutte biologique par acclimatation ou par augmentation sont connus (Hajek et al., 2016). Le cas emblématique sur les risques liés aux effets non intentionnels de l'utilisation des produits en lutte biologique est l'introduction de la coccinelle asiatique *Harmonia axyridis* qui aujourd'hui est devenue une espèce exotique envahissante (espèce introduite par l'Homme qui prolifère et cause des nuisances pour la santé humaine ou environnementale, l'économie (Thévenot, 2013)) (Evans et al., 2011; Robin and Marchand, 2020). Cette espèce a été introduite volontairement dans de nouvelles régions géographiques, dont l'Europe et Amérique du Nord, pour contrôler les pucerons à partir de la fin du 19e siècle (Evans et al., 2011; Leppanen et al., 2018). De même l'espèce *Coccinella septempunctata* a été introduite en Amérique du Nord comme agent de lutte biologique (Evans et al., 2011). Ces espèces de coccinelles introduites intentionnellement par l'Homme se sont révélées plus compétitives que les espèces autochtones entraînant leur dominance (Evans et al., 2011). Ces retours d'expériences négatives ont conduit les pays, en particulier européens, à freiner l'utilisation d'espèces allochtones et à demander des évaluations de risques sur les espèces non cibles. Depuis les années 2000, plus de 75% des nouvelles espèces utilisées sont des espèces autochtones (Hajek et al., 2016).

Aujourd'hui encore il existe peu d'études qui s'intéressent à l'évaluation des effets des produits utilisés en lutte biologique sur les organismes non-cibles. Un groupe de travail INRAE, piloté par Simon Fellous et Louise Vandenhove, nommé ENI-BC+ (Effets Non-Intentionnels des BioContrôles), a été formé entre autres pour examiner l'ensemble des effets des méthodes de protection des cultures (<https://eni-bc.hub.inrae.fr/>). Cette initiative est nécessaire pour avoir toutes les informations sur l'agent, sa capacité de dispersion, et ses interactions avec un panel d'espèces cibles et non cibles. Les conclusions sur l'absence d'effets sur des organismes non-cibles des agents en lutte biologique sont souvent tirées sans de solides études. En effet, bien souvent l'absence d'études est utilisée pour constituer des « preuves » qu'il n'y a aucun effet non cible (Leppanen et al., 2018).

***Notre expérience sur l'introduction d'agents allochtones pour la lutte biologique nous a appris à être prudent vis-à-vis des introductions d'espèces exotiques. Il est surprenant qu'il y ait encore si peu d'études qui aient évalué les effets négatifs des agents utilisés en lutte biologique. A la lumière des objectifs de l'ODD2, éviter de mettre en place des solutions qui***

*peuvent perturber la stabilité de l'environnement semble être un prérequis. Le développement de la lutte biologique par augmentation ou par acclimatation présente des risques pour l'environnement mais une alternative subsiste pour réduire les effets non intentionnels en développant la lutte biologique par conservation.*

### **c. La lutte biologique par conservation, le futur pour l'agriculture ?**

La lutte biologique par conservation est l'utilisation de différentes pratiques agricoles pour apporter les ressources nécessaires pour favoriser la présence des ennemis naturels des bioagresseurs. Parmi les pratiques les plus étudiées, on trouve la diversification végétale dans les cultures, l'utilisation d'un couvert végétal entre les saisons, l'amélioration de la complexité du paysage (= mélange d'habitats semi naturels et de portion agricole), et la réduction du labour (Bianchi et al., 2006; Veres et al., 2013; Begg et al., 2017; Isbell et al., 2017; Snyder, 2019). L'adoption de ces pratiques a parfois montré une diminution de l'abondance des bioagresseurs dans les cultures (Letourneau et al., 2011), mais les dommages sur les cultures ne sont pas toujours diminués (Bianchi et al., 2006; Letourneau et al., 2011; Veres et al., 2013; Begg et al., 2017).

La lutte biologique par conservation peut être réalisée à l'échelle de la parcelle et ses abords ou à l'échelle du paysage (Begg et al., 2017; Shields et al., 2019). L'augmentation des surfaces de forêts et d'espaces semi-naturels corrèle avec la diminution de l'abondance de pucerons ou de l'herbivorie de *Meligethes aeneus* (Veres et al., 2013). Une modélisation de l'effet de la complexité du paysage sur la densité des ravageurs de culture et de leurs prédateurs a mis en évidence que 41% de la densité des prédateurs naturels des ravageurs dans les cultures était expliquée par la présence de haies (Zamberletti et al., 2021). De même cette étude a mis en évidence une augmentation de la densité des populations de ravageurs par un fort pourcentage de culture et d'agrégation des haies (Zamberletti et al., 2021).

Il faut reconnaître que la lutte biologique par conservation a fait l'objet de peu d'études (Naranjo et al., 2015; Begg et al., 2017), et encore moins en expérimentation contrôlée (Shields et al., 2019). A ma connaissance les seules études portant sur la lutte biologique par conservation ne s'intéressent pas strictement à l'effet de la lutte biologique par conservation. En effet il y a souvent l'effet d'une pratique sur l'abondance des bioagresseurs en prenant en compte parfois l'impact sur les rendements, mais surtout il arrive souvent que les autres pratiques agricoles menées dans les parcelles étudiées impliquent aussi l'usage des insecticides. Il n'existe donc pas de réelle étude sur l'efficacité de la lutte biologique par conservation sur les bioagresseurs.





La lutte biologique par conservation bien que prometteuse pour l'agriculture montre d'importantes limites dues à son efficacité non évaluée, l'intensité du travail à fournir par les agriculteurs, et à la difficulté d'application à des échelles régionales à cause de la multiplication des propriétaires terriens (Shields et al., 2019). Le manque d'études et d'exemples documentés est un sérieux problème pour le développement de cette solution potentielle. Certaines études suggèrent que l'utilisation de la lutte biologique par conservation à l'échelle de la parcelle pourrait être améliorée en intégrant des stratégies à l'échelle du paysage telles que l'intégration de corridors pour faciliter le mouvement des ennemis naturels (Veres et al., 2013; Begg et al., 2017; Zamberletti et al., 2021). Cela impliquerait une application et une gestion de la lutte biologique par conservation à l'échelle régionale. Mais pour cela il faut une coopération et une coordination au niveau régional entre les agriculteurs mais aussi avec les autres propriétaires terriens privés. Cela amène aussi la question de la place des entreprises privées. Cette stratégie peut être bénéfique sur le long terme, mais oblige certainement à repenser notre manière de concevoir l'agriculture, sa protection, et son mode économique. Pour cela il est vraiment nécessaire d'augmenter nos connaissances sur cette stratégie, mais aussi sur les interactions entre tous les organismes impliqués.

*Cette première partie a permis de montrer l'importance de la lutte biologique pour protéger les cultures, ainsi que les études scientifiques qui restent à faire pour réduire le nombre de limites qui freinent l'adoption de la lutte biologique par conservation. Il s'agit de la première thématique qui est au cœur de mon sujet de thèse dont il fallait apporter un éclairage pour comprendre les enjeux de ma thèse.*

*La deuxième thématique est le sol et en particulier les organismes des sols. J'ai décidé de focaliser cette troisième partie sur les organismes des sols, leurs interactions et les facteurs qui les influencent. De plus, le sol est un compartiment qui peut être autant une source potentielle de bioagresseurs que de leurs ennemis naturels.*

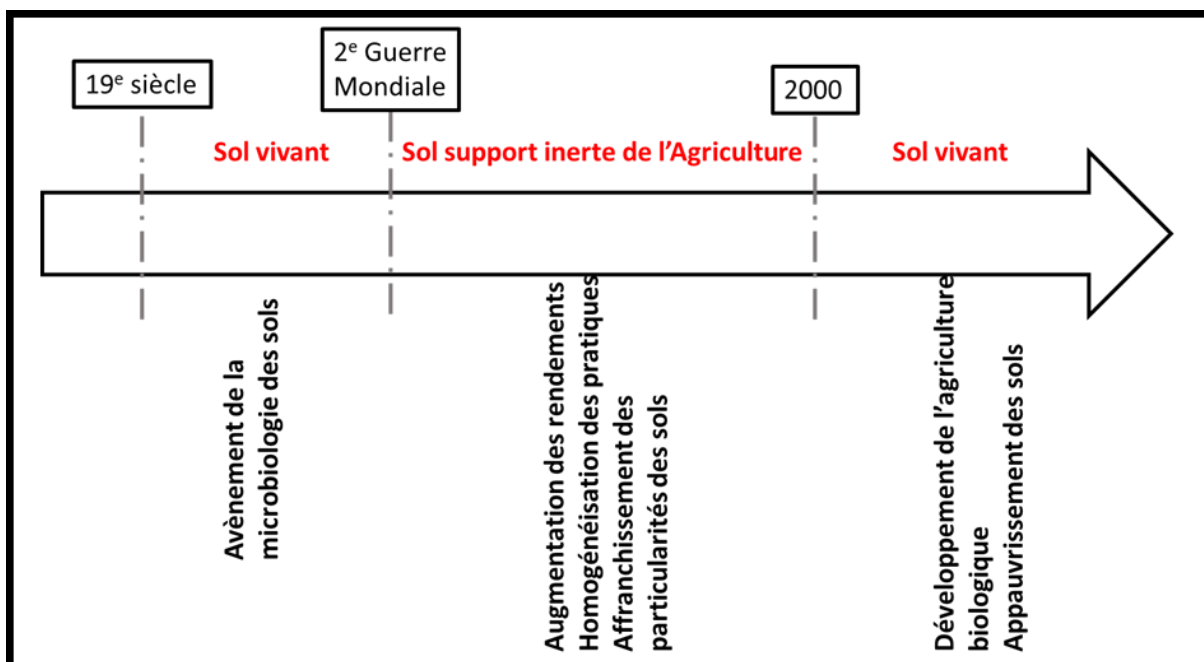


Figure 6 : L'évolution de la vision des sols en tant qu'écosystème vivant ou support inerte depuis le 19<sup>ème</sup> siècle.

### III. Les sols, des écosystèmes vivants et complexes

Le sol peut être défini comme un écosystème complexe dont les propriétés chimiques et physiques proviennent de différents processus causés par des interactions entre différents organismes vivants et les matières minérales constituant les sols (Calo et al., 2022). Ces organismes vivants du sol, le biote du sol, font partie de différents phylum : les Archées, les Eubactéries, et les Eucaryotes (Parker, 2010). La première partie a montré l'importance de la lutte biologique pour l'application de l'ODD2. Dans ce cadre il est important de comprendre le fonctionnement biologique du sol. En effet le biote du sol a un rôle pour réduire ou augmenter les dommages sur les cultures. La connaissance des organismes qui composent les sols et de leurs interactions peut fournir des pistes pour la lutte biologique en particulier en conservation. En outre, la qualité des sols, autant physico-chimique et biologique, est corrélée avec des meilleurs rendements des cultures.

#### 1. Les changements de vision au sujet des sols depuis le 19<sup>ème</sup> siècle

Aujourd'hui le monde agricole s'intéresse de plus en plus aux organismes vivants qui peuplent les sols et les interactions qu'ils nouent ensemble. Si l'abandon de la vision d'un sol inerte support des cultures pour celle d'un sol vivant est récente, pour autant les connaissances sur la vie des sols remontent à la fin du 19<sup>e</sup> siècle (Pessis, 2020). L'essor de la microbiologie au 19<sup>ème</sup> siècle a mis en lumière les micro-organismes des sols. Le sol devient un écosystème vivant qui évolue selon des facteurs biologiques (végétation, macro et micro-faune des sols). Après la Seconde Guerre Mondiale les connaissances sur la vie des sols sont mises de côté, et la vision d'un sol devenant un support inerte est soutenue notamment par les instituts de recherche comme l'INRA. L'étude de la fertilisation minérale, pour s'affranchir des particularités locales et de la diversité des sols, est alors mise en avant. L'avènement de l'agriculture biologique et les alertes sur l'appauvrissement des sols contribuant à la baisse des rendements remettent en avant la notion du sol comme organisme vivant et les études sur les organismes des sols (Figure 6) (Pessis, 2020). Un exemple qui illustre les effets de la fertilisation minérale sur le biote des sols sont les champignons mycorhiziens arbusculaires (=champignons appartenant aux *Glomeromycota* qui forment des associations avec les racines de la plupart des espèces végétales terrestres) (Cavagnaro et al., 2015). La majorité des plantes terrestres sont capables de s'associer avec des champignons mycorhiziens arbusculaires permettant d'améliorer l'assimilation de l'azote par les plantes, et par conséquent de réduire les pertes d'azote dans les cultures (Johansen, 1999; Cavagnaro et al., 2015). La formation d'hyphes et la sporulation de ces champignons sont liées à la fertilisation des sols. Une fertilisation organique favorise la sporulation des champignons tandis qu'une fertilisation minérale, et surtout azotée, diminue la production d'hyphes (Antunes et al., 2011).

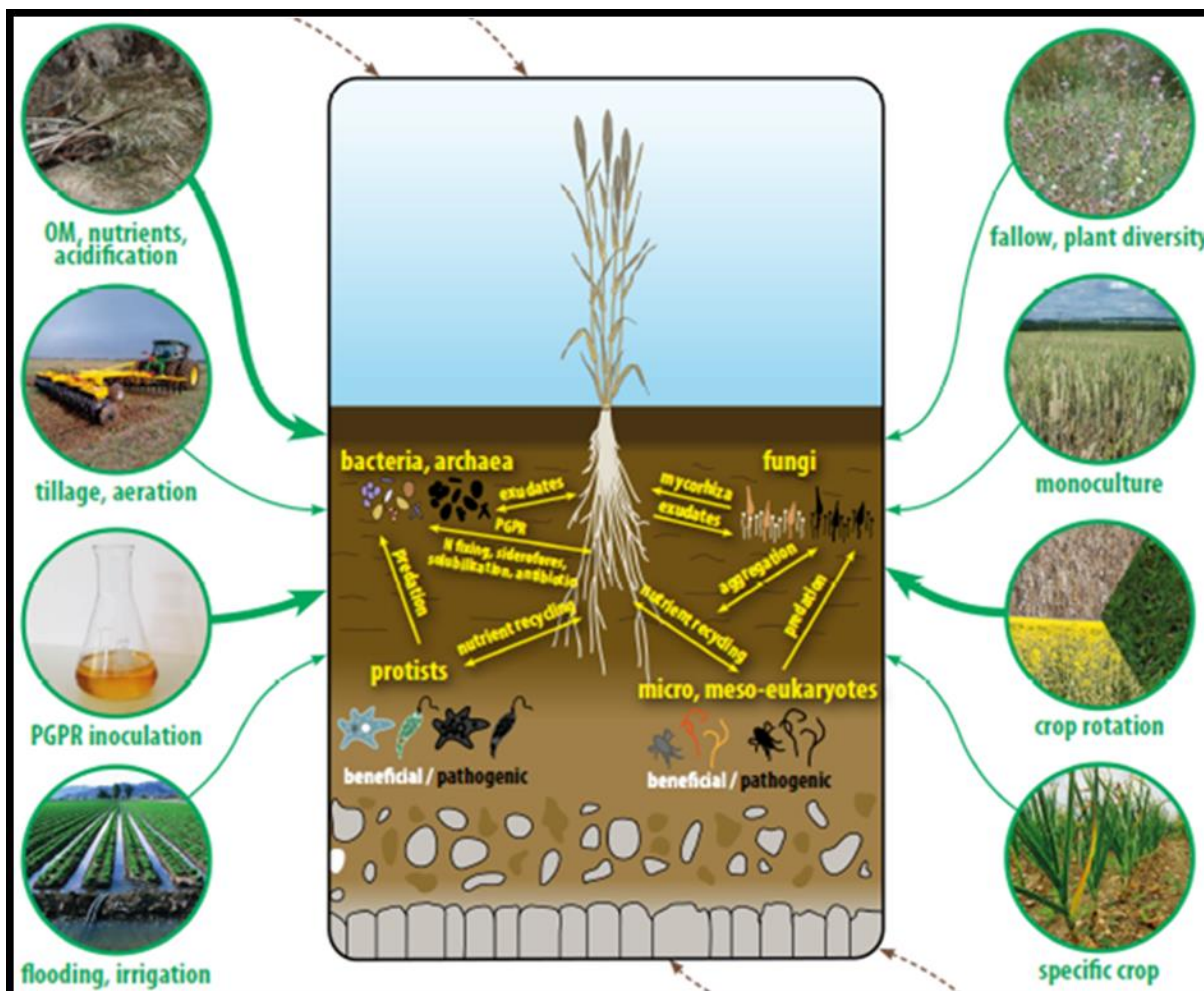


Figure 7 : Les différents facteurs qui influencent les interactions dans un sol suppressif. Figure issue de Sagova-Mareckova et al., 2022.

La remise en avant du biote des sols, et de son importance dans l'agriculture, a conduit les scientifiques à s'intéresser aux organismes des sols. Ils se sont notamment intéressés au biote des sols où les agents phytopathogènes causaient peu de dommages dans les cultures. Les sols des cultures caractérisés par une diminution des dommages causés par les agents phytopathogènes sont caractérisés par des communautés fongiques et bactériennes différentes des sols sur lesquelles les cultures subissaient de nombreux dommages (Weller et al., 2002; Schlatter et al., 2017; Siegel-Hertz et al., 2018; Ding et al., 2021). En 1974 Baker et Cook définissent ces sols comme suppressifs, c'est-à-dire « des sols dans lesquels l'agent phytopathogène ne peut pas s'établir ou persister, s'établir avec peu ou pas de dommages ou s'établir en créant des maladies dont l'effet est moins important » (Sagova-Mareckova et al., 2022). Le glossaire des termes de la pathologie des plantes restreint cette définition originale en considérant un sol suppressif uniquement si certaines maladies sont supprimées par l'action de micro-organismes antagonistes (Shurtleff and Averre, 1997). Certaines études élargissent la notion de sol suppressif en introduisant les macro-organismes en tant que bioagresseurs mais aussi en tant qu'auxiliaires (Creamer et al., 2022; Sagova-Mareckova et al., 2022). Par exemple, des auteurs ont décrit des sols suppressifs des maladies causées par les nématodes phytoparasites (Westphal, 2005; Janvier et al., 2007). La définition élargie d'un sol suppressif est la capacité d'un sol à prévenir l'établissement et le développement des pathogènes des sols et des ravageurs malgré leur présence, la disponibilité d'un hôte et des conditions environnementales favorables (Creamer et al., 2022).

Le rôle des microorganismes dans le caractère suppressif des sols a été largement étudié. Ils ont un rôle prédominant pour la suppression des agents phytopathogènes (Creamer et al., 2022). Des effets biostimulants ou antagonistes de la communauté bactérienne sont à l'origine du caractère suppressif des sols *via* le relargage dans les sols de molécules antimicrobiennes, toxines et VOC, ou de phénomènes de compétition pour les ressources (Sagova-Mareckova et al., 2022; Corato, 2023). Au contraire, le contrôle des ravageurs serait plus lié à de la prédation ou du parasitisme de macroorganismes des sols (Creamer et al., 2022).

Plusieurs facteurs abiotiques sont aussi connus pour affecter le caractère suppressif des sols : la température, la texture des sols, la capacité d'échange cationique (CEC), les nutriments des sols, le pH (Jayaraman et al., 2021; Sagova-Mareckova et al., 2022; Wang et al., 2022). Différentes pratiques agricoles ont été reportées pour favoriser le microbiote des sols : fertilisation organique, l'ajout d'agent de lutte biologique (notamment microbien) et diminution du travail des sols, amélioration du choix du moment pour l'ensemencement des cultures et récoltes (Wang et al., 2022; Corato, 2023) (Figure 7).

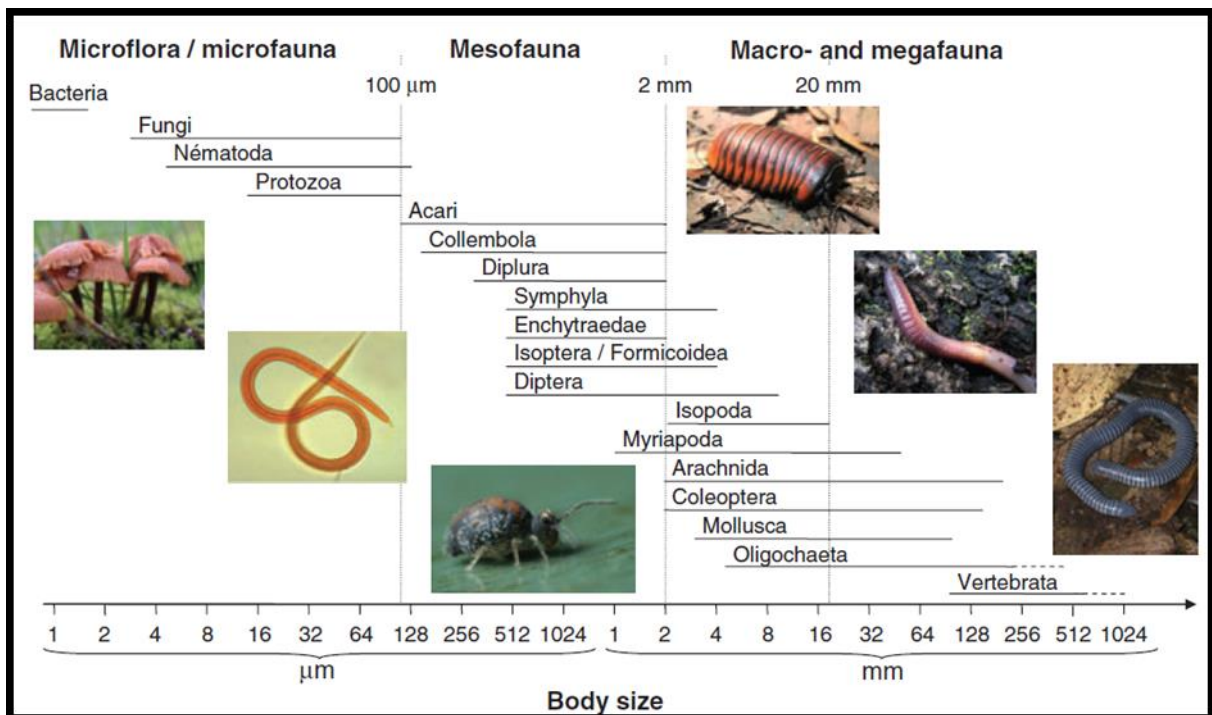


Figure 8 : Représentation de la classification du biote des sols basée sur la taille de leur corps. Figure issue de Decaëns, 2010.

Ce paragraphe montre le rôle majeur des organismes des sols dans la lutte contre les bioagresseurs des cultures. La connaissance sur le biote des sols et de leurs interactions sont indispensables pour identifier les taxa bénéfiques aux cultures, mais aussi ceux causant des pertes de rendement.

## **2. Quels sont les organismes des sols ?**

Les sols contiennent une grande diversité d'organismes avec 25% des espèces décrites dans le monde (Decaëns, 2010). Si la définition de ce qu'est un organisme des sols peut paraître évidente de prime abord, des questions peuvent se poser quant à l'inclusion ou non d'espèces qui participent à la genèse des sols ou à certaines fonctions des sols, mais n'y passent qu'une partie de leur vie (Parker, 2010).

Dans le but de mieux comprendre le biote du sol les scientifiques ont tenté de les catégoriser pour comprendre leurs interactions et fonctionnement. Cela permet aussi de simplifier les études en choisissant un représentant de chaque catégorie. Cependant ces classifications utilisées pour simplifier les réseaux trophiques des sols sont un défi même au jour d'aujourd'hui et reste un sujet de débat dans la communauté scientifique (Hedde et al., 2022).

### ***a. Description du biote des sols***

Les organismes des sols sont classés selon différentes caractéristiques : la taxonomie, la taille du corps, le groupe trophique, ou le rôle fonctionnel (Hedde et al., 2022). La classification basée sur la taille des corps des organismes, très utilisée pour évoquer les organismes des sols, classe la faune du sol en trois groupes : la macrofaune du sol dont la taille est supérieure à 20 mm, la mésofaune du sol dont la taille est entre 2 mm-20 mm, la mésofaune du sol dont la taille est entre 100 µm-2 mm, et la microfaune/microflore dont la taille est inférieure à 100 µm (Figure 8) (Decaëns, 2010). Il est à noter que ces tailles limites peuvent être différentes selon les auteurs, et que l'intégration de critères taxonomiques pourrait inciter à adapter les critères de tailles de chaque classe pour regrouper certains groupes d'organismes proches taxonomiquement. Ces trois classes contribuent à l'enrichissement des sols à travers entre autre la décomposition de la litière des sols (Chamorro-Martínez et al., 2022; Creamer et al., 2022).

La macrofaune inclut les vers de terre, les fourmis, les termites, les centipèdes, les mille-pattes, les escargots et les limaces (Izadi et al., 2017). Les vers de terre sont beaucoup étudiés, et sont considérés comme des ingénieurs des sols du fait de leur capacité à modifier et créer des habitats favorables pour d'autres organismes des sols en créant des terriers, en augmentant l'espace des pores entre les particules des sols, en ingérant des particules des sols et de la matière organique et les redistribuant dans les sols, en transformant la matière organique pour sa dégradation par les microorganismes, en



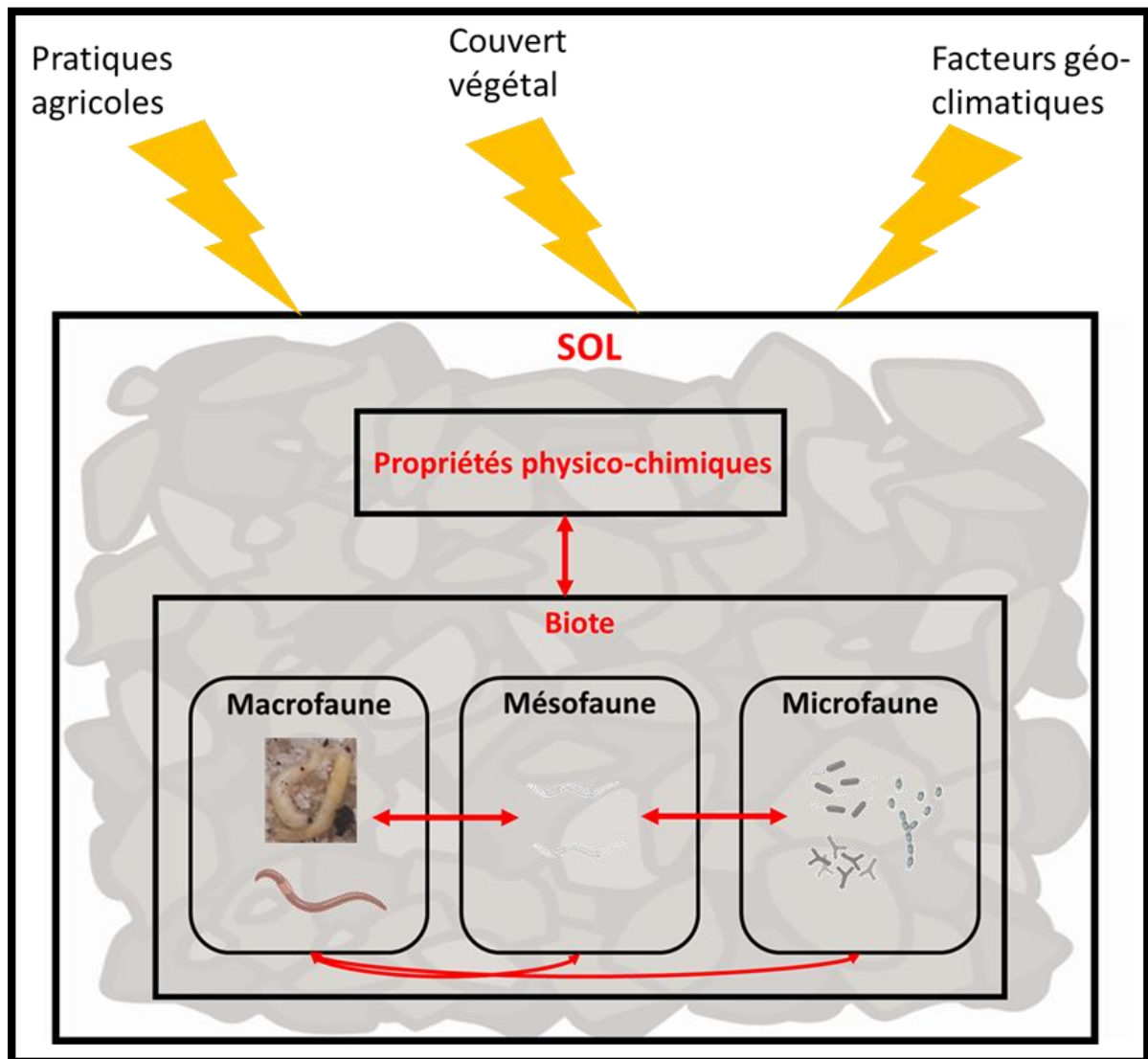


Figure 9 : Les interactions qui ont lieu entre les différentes classes qui composent le biote du sol ainsi que leurs interactions avec différents facteurs abiotiques.

fournissant les nutriments aux plantes, et en relocalisant les graines (Römbke et al., 2005; Asshoff et al., 2010; Liu et al., 2023). Toutes ces activités améliorent la structure des sols et favorisent les rendements des cultures (Römbke et al., 2005; Lemtiri et al., 2014; Creamer et al., 2022). Un autre clade qui a fait l'objet de beaucoup d'études sont les nématodes des sols qui sont classés dans la mésofaune ou la microfaune selon les auteurs (Decaëns, 2010; Riutta et al., 2012). Les raisons de cet intérêt sont leurs rôles dans différents processus des sols, leur utilisation comme bioindicateur biologique (Lu et al., 2020) (voir paragraphe suivant).

Malgré le développement de l'intérêt sur le biote des sols, il reste des lacunes dans nos connaissances sur ce sujet. Les études scientifiques se sont focalisées sur certaines familles d'organismes (les vers de terre, les collemboles) au détriment d'autres organismes (diptères, enchytraeidae) (Gongalsky, 2021). De même, une hétérogénéité sur l'effort d'études des organismes des sols est présente à travers le monde avec plus d'études en Europe comparé au reste du monde (Hedde et al., 2022).

*Un effort reste à faire pour développer nos connaissances sur l'ensemble du biote qui constitue les sols en particulier pour les espèces qui ont peu retenu l'intention ou les stades de développement moins connus. De plus, la composition des communautés des organismes des sols est influencée par différents facteurs abiotiques et biotiques. La compréhension de l'influence de ces paramètres est d'autant plus importante que la composition de ces communautés a un rôle dans l'acquisition du caractère suppressif des sols.*

#### ***b. Quels sont les facteurs qui influencent la composition du biote des sols ?***

Plusieurs facteurs abiotiques sont connus pour influencer les organismes des sols (Figure 9). Des effets de la localisation géographique contribuent à des changements dans la biodiversité des organismes des sols (Hillebrand, 2004; Decaëns, 2010; Parker, 2010). Par exemple, la richesse spécifique des termites et des fourmis est plus élevée dans les sols situés dans les régions au niveau de l'équateur que les régions tempérées au nord ou au sud (Decaëns, 2010). L'altitude diminue le nombre de familles des isoptères, coléoptères et diptères, entre 10 et 3 familles à 300m d'altitude à 4-0 familles à 2500 m d'altitude. Il en est de même pour la richesse spécifique des fourmis et des vers de terre qui diminuent entre 300m et 2500 m d'altitude (Decaëns, 2010). Cet effet serait lié aux conditions abiotiques sévères (températures, quantité d'oxygène...), et à la faible taille des habitats disponibles (Decaëns, 2010). Les conditions climatiques exercent aussi une influence sur la composition des organismes des sols. Par exemple, les précipitations favorisent la fréquence dans la litière en décomposition des collemboles et



des acariens de 30% et 8% pendant les saisons sèches, et de 70% et 14% pendant les saisons des pluies, respectivement (Calo et al., 2022).

D'autres paramètres incontournables sont les propriétés physico-chimiques, la structure (assemblage spatial des agrégats des sols, c'est-à-dire des macromolécules organiques liées chimiquement à des particules minérales), et la texture (proportion entre les petites particules l'argile, les particules de taille moyenne le limon et les grandes particules le sable) d'un sol (Figure 10) (Lissy, 2019). La mésofaune des sols est positivement corrélée avec la quantité de matière organique et le phosphore dans les sols, tandis que la microfaune des sols est influencée par le pH des sols (Ayuke et al., 2009; Chamorro-Martínez et al., 2022). La macrofaune de tel endroit, en particulier les communautés des microarthropodes, a une composition différente dans les sols acides et non acides (Ruf et al., 2003).

La qualité de l'humus, en particulier la complexité des horizons de l'humus, influence la diversité de la macrofaune. La diversité de 13 ordres de macrofaune (Diplopode, Isopode, Hyménoptères, Diptère, Arachnides, Chilopode, Coléoptère, Haplotuxide, Opilionide, Hemiptère, Amphipode, Lépidoptères et Stylommatophore) est plus grande dans l'humus sans l'horizon d'humification (transformation de la matière organique en humus). Un horizon organique plus épais maintient l'humidité qui favorise la macrofaune des sols (Izadi et al., 2017).

Les facteurs biotiques exercent une influence importante sur les communautés des organismes des sols. Par exemple, la communauté microbienne des sols a un rôle dans la capacité de la faune des sols à dégrader la litière (Izadi et al., 2017). En retour, la faune des sols contrôle la composition de la communauté microbienne des sols *via* le broutage des bactéries et des champignons (Creamer et al., 2022). Le couvert végétal des sols notamment sa richesse spécifique favorise la richesse de plusieurs groupes d'organismes des sols (Ruf et al., 2003; Decaëns, 2010; Riutta et al., 2012). Enfin, les activités anthropiques, comme les pratiques agricoles, ont une influence non négligeable sur la composition et la structure des communautés d'organismes des sols (Ruf et al., 2003; Castro-Huerta et al., 2015; Fondon et al., 2020).

L'étude de la composition des communautés des organismes des sols et des facteurs qui l'influencent est primordiale dans un contexte d'agroécologie. C'est cette connaissance qui aidera à comprendre comment favoriser les organismes nécessaires aux cultures autant pour leur protection, mais aussi pour favoriser la croissance des plantes. Je vais me focaliser ici sur les nématodes, des acteurs majeurs des sols.

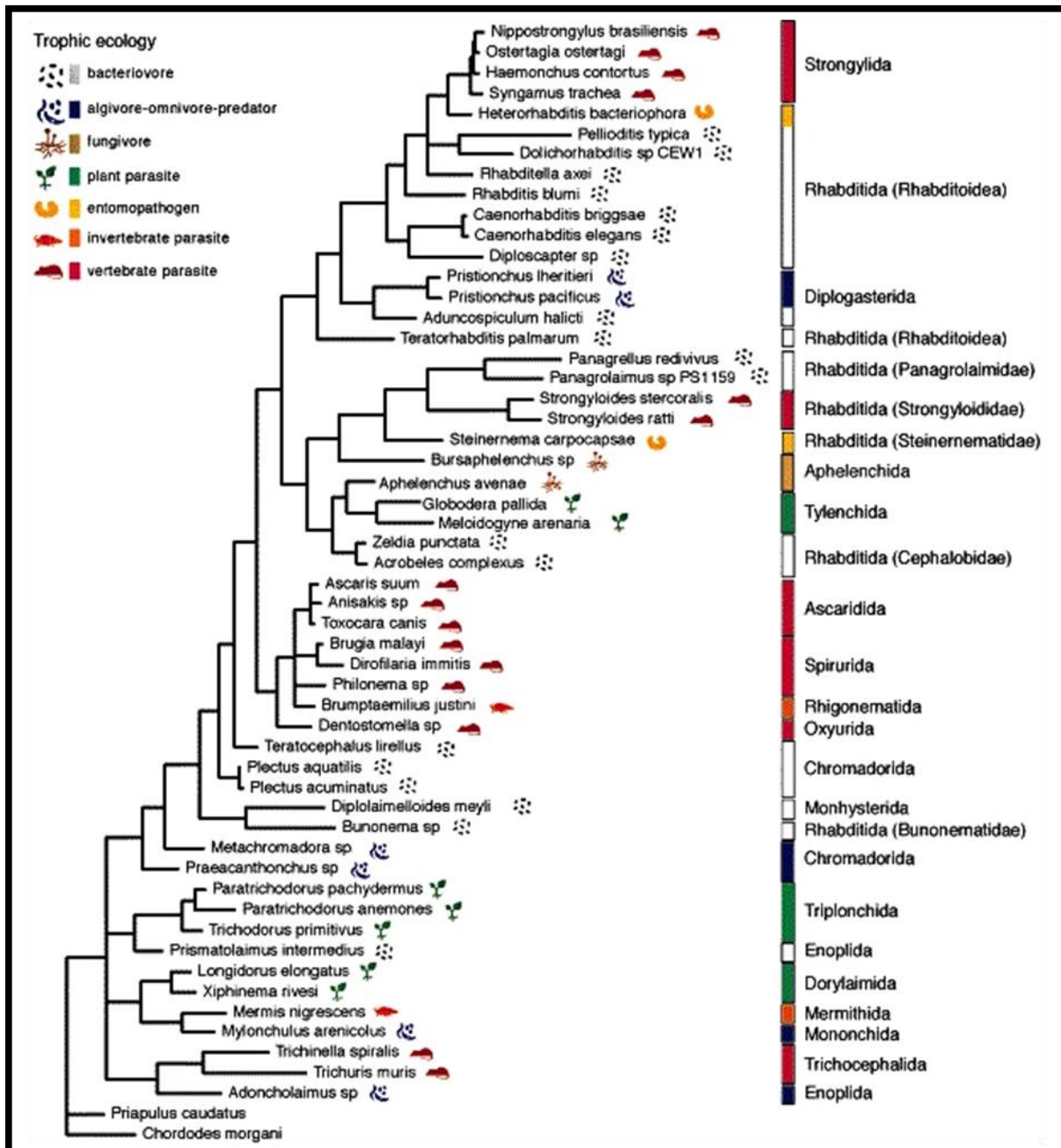


Figure 11 : Ecologie trophique de 53 taxa de nématodes. Les séquences des sous-unités d'ARN ribosomique ont été alignées. Les groupes trophiques sont représentés par les différentes icônes. Figure issue de Blaxter et al., 1998.

### 3. Les nématodes, des organismes très abondants dans les sols

#### a. Le phylum Nematoda

Les nématodes appartiennent aux Ecdysozoa qui regroupent des organismes caractérisés par un exosquelette qui se remplace de manière périodique au cours de leur cycle de vie. Les nématodes sont des vers non segmentés constitués d'un système digestif et excréteur (Kaya and Stock, 1997; Trejo-Meléndez et al., 2024). Le phylum Nematoda est divisé en trois classes (Trejo-Meléndez et al., 2024) :

- Enoplia : nématodes libres marins vivant dans les sédiments qui se nourrissent de diatomés et d'algues marines, espèces de nématodes terrestres et parasites de plantes
- Dorylaimia : nématodes terrestre ou d'eau douce avec des nématodes parasites d'animaux ou de plantes
- Chromadoria : nématodes marins et terrestres, des parasites de plantes et d'animaux. Cette classe contient notamment l'ordre des Rhabditidae

L'espèce de nématode la plus étudiée, notamment dans les disciplines de l'écotoxicologie, qui appartient aux Rhabditidae est *Caenorhabditis elegans* de la toxicologie et c'est également un modèle d'invertébré pour des études physiologiques, génétiques et génomiques (Blaxter and Denver, 2012; Lu et al., 2020). Comme d'autres Rhabditidae, ce nématode a un cycle de vie qui inclut une forme de résistance appelée « dauer larva » au troisième stade du cycle de développement (Trejo-Meléndez et al., 2024). Cette forme de résistance permet aux nématodes de résister à la dessiccation ou à des stress environnementaux. Une fois les conditions de vie redevenues favorables au nématode, il quitte sa forme de résistance (Blaxter and Denver, 2012; Trejo-Meléndez et al., 2024). Si *C. elegans* est très étudié, paradoxalement l'écologie de ce nématode est peu connue, il est retrouvé naturellement dans les végétaux en décomposition (Blaxter and Denver, 2012). Les nématodes se trouvent à tous les niveaux trophiques sous des formes libres ou/et parasites (Figure 11) (Blaxter et al., 1998). Les nématodes libres des sols sont classés en fonction de leurs ressources trophiques en quatre groupes : les nématodes bactérivores, les nématodes phytophages et phytoparasites, et les nématodes prédateurs/omnivores (Lu et al., 2020).

#### b. Quels sont les nématodes qui font partie de la « nématofaune des sols » ?

La biomasse mondiale des nématodes dans le sol représente 0.3 gigatonne soit 82% de la biomasse humaine sur Terre (van den Hoogen et al., 2019). Les populations de nématodes dans les sols comptent jusqu'à 3 millions d'individus par m<sup>2</sup> dans certains sols (Yeates, 2003). Il s'agit des métazoaires les plus abondants dans les sols (Lu et al., 2020), et ont un rôle essentiel dans leurs écosystèmes. Ils contribuent notamment à la minéralisation de l'azote directement et indirectement (Lu et al., 2020). Par exemple

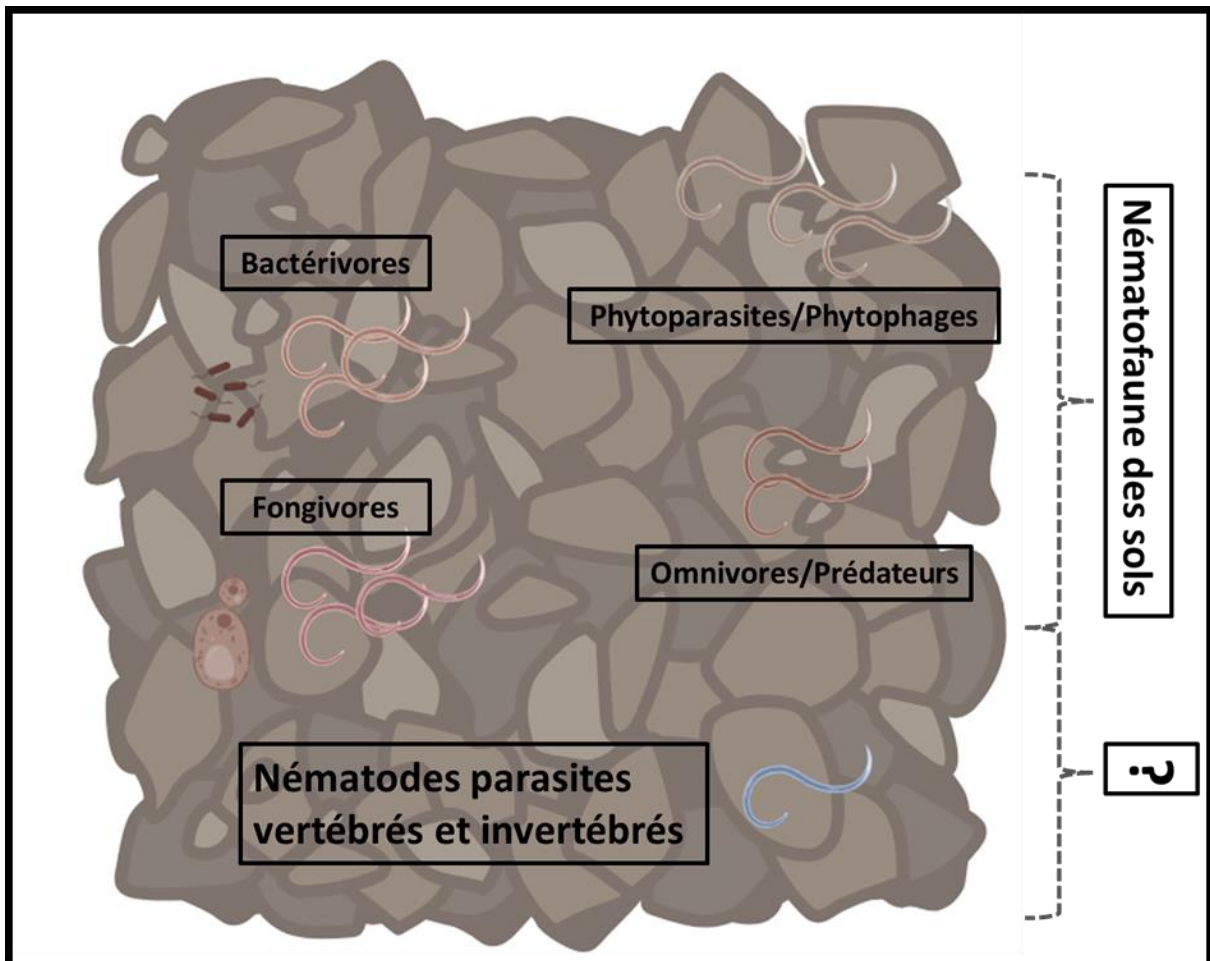


Figure 12 : Les groupes trophiques considérés dans la nématofaune des sols et les nématodes non considérés dans ce groupe.

les nématodes bactérivores peuvent contribuer jusqu'à 19% de la minéralisation de l'azote en broutant les microorganismes décomposeurs, excréant de l'ammonium, et en immobilisant de l'azote dans la biomasse vivante (Neher, 2001). Les différentes familles de nématodes vivants dans les sols ne sont pas présentes dans les mêmes proportions dans tous les sols (Ferris et al., 2001; Blanc et al., 2006; Martin et al., 2022).

Par exemple, les familles de nématodes appartenant aux groupes trophiques des omnivores et des prédateurs sont souvent retrouvées en plus faible proportion par rapport aux autres (Lu et al., 2020).

Les nématodes parasites de vertébrés et d'invertébrés qui ont une partie de leur cycle de vie dans les sols (Figure 12) ne sont usuellement pas intégrés dans la nématofaune des sols (Ferris et al., 2001; Lu et al., 2020; Martin et al., 2022), alors que les phytoparasites le sont. La raison est sans doute pragmatique, c'est-à-dire la difficulté de les détecter dans les sols. En effet ces nématodes sont parfois sous des formes résistantes cryptiques, comme les cystes, les *dauer larvae* des nématodes entomopathogènes (NEPs) ou les œufs dans les sols, qui sont parfois difficilement extractible de sols (Dillman et al., 2012; Marais et al., 2017).

### ***c. Les facteurs qui influencent la composition de la nématofaune des sols***

Les conditions climatiques et géographiques influencent la richesse taxonomique de la nématofaune des sols (Liu, 2021). Les conditions climatiques extrêmes, en particulier, ont tendance à la diminuer (Ekschmitt et al., 2001). L'abondance des nématodes est différente en fonction de la profondeur du sol, ils sont plus abondants dans les 15 premiers centimètres des sols (Zhang et al., 2015; Liu, 2021). Cette distribution verticale pourrait être expliquée par des propriétés des sols différents (quantité de carbone organique, d'azote, pH et texture) (Zhang et al., 2015; Tu et al., 2022). La structure surtout la taille des agrégats modifie la nématofaune des sols. Les nématodes bactérivores, omnivores, et prédateurs sont localisés dans les pores créés par l'agencement de plusieurs agrégats, tandis que les nématodes phytophages sont présents entre les agrégats d'une taille supérieure à 200µm (Blanc et al., 2006). La contamination des sols, par exemple par des métaux lourds, ou leur acidification sont des stress qui peuvent favoriser certains groupes trophiques de nématodes au détriment d'autres (Lu et al., 2020). Par exemple une pollution aux métaux lourds contribuent à une diminution de l'abondance des nématodes prédateurs et omnivores (Chauvin et al., 2020).

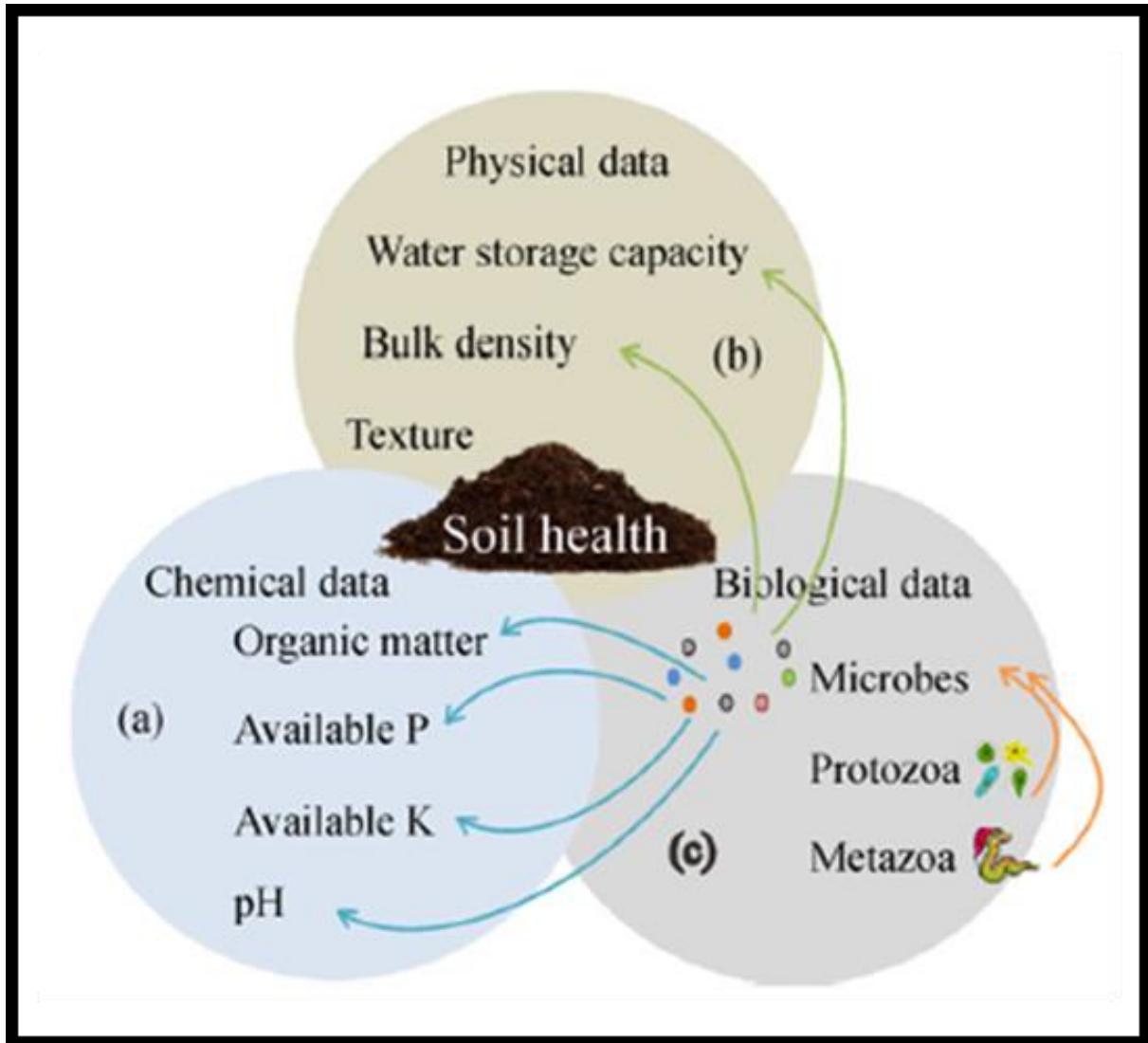
La couverture végétale des sols a un effet structurant sur la nématofaune des sols, en particulier sur les nématodes phytoparasites (Zhang et al., 2015). Par exemple, les cultures de millets augmentent l'abondance des nématodes bactérivores et phytophages qui représentent 45% et 35% de la totalité des nématodes des sols respectivement (Diakhaté et al., 2013). En revanche, des rotations de cultures de banane, papaye et riz favorisent les nématodes bactérivores, prédateurs et omnivores (Lu et al.,





2020). La monoculture de maïs, quant à elle, réduit la diversité des nématodes bactérivores et phytophages (Lazarova et al., 2021). Une augmentation de la diversité dans le couvert végétal, par exemple un patch de plusieurs espèces d'arbres, améliore la richesse taxonomique dans tous les groupes trophiques de nématodes des sols (Tu et al., 2022). En plus du type de cultures les pratiques agricoles peuvent affecter la nématofaune des sols, le labour étant l'une des pratiques la plus défavorable (Lazarova et al., 2021; Puissant et al., 2021). Quant à la fertilisation organique, elle déstabilise la communauté de nématodes, mais augmente l'abondance des nématodes bactérivores et fongivores (Puissant et al., 2021). Les produits phytosanitaires eux aussi exercent une influence sur les nématodes des sols, tels évidemment les nématicides, mais également d'autres biocides qui défavorisent les nématodes fongivores, en diminuant la richesse taxonomique des nématodes et en augmentant la pression phytoparasitaire. En revanche les herbicides ne semblent pas influencer la nématofaune des sols (Puissant et al., 2021).

Les derniers facteurs influençant la structure et la composition de la nématofaune des sols, mais aussi les moins étudiés, sont les facteurs biotiques. Par exemple, les communautés bactériennes des sols qui sont une ressource trophique nécessaire aux nématodes bactérivores influencent leur distribution (Blanc et al., 2006; Lu et al., 2020; Tu et al., 2022). En retour, la nématofaune des sols structure aussi la communauté microbienne des sols (Blanc et al., 2006). Trois mécanismes peuvent expliquer la structuration de la communauté microbienne par les nématodes : 1/ la sélection d'espèces spécifiques pour se nourrir par le prédateur, 2/ une sensibilité différente des bactéries à la prédation, 3/ les effets indirects liés aux conditions de développement des bactéries (ex : nutriments) (Blanc et al., 2006; Zhou, 2019; Tu et al., 2022). Les différentes familles de nématodes des sols peuvent interagir entre elles. Les nématodes prédateurs spécialistes et généralistes régulent et contrôlent les populations de nématodes opportunistes dans les sols (Ferris et al., 2001). De même, l'inoculation dans des sols riches en matières organiques de nématodes *Cephalobidae* et *Rhabditidae* défavorise ces derniers. Un effet de compétition pour les ressources nutritives semble à l'origine de cet effet puisque l'inoculation seulement des *Rhabditidae* dans les mêmes conditions permet leur développement et leur installation dans le sol (Blanc et al., 2006).



**Figure 13 : Les interactions entre les indicateurs physiques, chimiques et biologiques de la santé des sols.** Les indicateurs microbiens sont liés aux indicateurs chimiques des sols (a), aux propriétés physiques des sols (b). La communauté microbienne est contrôlée par les protozoaires et métazoaires (c). Figure issue de Lu et al., 2020.

#### **4. La nématofaune, un indicateur de la qualité biologique des sols**

La nématofaune décrite dans le paragraphe précédent peut être utilisée comme indicateur biologique des sols.

##### ***a. De l'évaluation de la qualité physico-chimique des sols à l'évaluation de leur qualité biologique***

Un concept clé dans l'étude des sols est la qualité des sols. La qualité des sols est la capacité d'un type spécifique de sol à fonctionner dans des écosystèmes naturels ou contrôlés par l'Homme pour maintenir la productivité des plantes et animaux, pour maintenir ou améliorer la qualité de l'air ou de l'eau, et soutenir la santé humaine et l'habitat (Lu et al., 2020; Sagova-Mareckova et al., 2022).

Les propriétés physico-chimiques des sols influencent la composition et la structuration des communautés des organismes des sols, ainsi que leurs contributions dans les processus biologiques des sols et inversement (Creamer et al., 2022). L'analyse des propriétés physiques (capacité de rétention de l'eau, densité apparente, et texture), chimiques (quantité de matière organique, carbone organique, phosphore/potassium disponible, pH), et biologiques (indicateurs biologiques) des sols permettent d'évaluer leur qualité (Figure 13) (Lu et al., 2020).

S'il est facile d'évaluer la qualité physico-chimique des sols en mesurant les paramètres principaux, l'évaluation de la qualité biologique est plus ardue, et demande le développement d'un bioindicateur (espèce vivante qui par sa présence/absence, son abondance/rareté, permet de connaître le degré de pollution) performant. Cette évaluation a commencé dans les années 90, en collectant un minimum de données : la biomasse microbienne, la respiration dans les sols, et la présence d'organismes clés comme les champignons mycorhiziens arbusculaires (Creamer et al., 2022). L'utilisation d'indicateurs biologiques a plusieurs avantages à ne pas négliger : leur sensibilité aux changements du mode de gestion de l'environnement, leur corrélation avec les fonctions bénéfiques des sols et leur utilité pour élucider les processus écosystémiques (Lu et al., 2020). Le questionnement sur le choix du bioindicateur le plus adéquat pour rendre compte de la qualité des sols est toujours d'actualité. Un bioindicateur potentiel doit rendre compte de quatre processus majeurs en lien avec la qualité des sols : la régulation du climat et du carbone, la purification et la régulation de l'eau, le cycle des nutriments, et la régulation des maladies et des ravageurs. Il doit être fiable, sensible et reproductible (Neher, 2001; Mulder et al., 2005; Lu et al., 2020; Sagova-Mareckova et al., 2022). Cependant, la sélection des indicateurs pour évaluer la qualité biologique des sols se base majoritairement sur des critères non scientifiques, par exemple si la méthode est standardisée, sa faisabilité et son coût (Creamer et al., 2022). Pour évaluer de manière plus efficace la qualité des sols des recommandations ont été faites pour utiliser un panel d'indicateurs au lieu d'un unique indicateur biologique (Vrscaj et al., 2008).

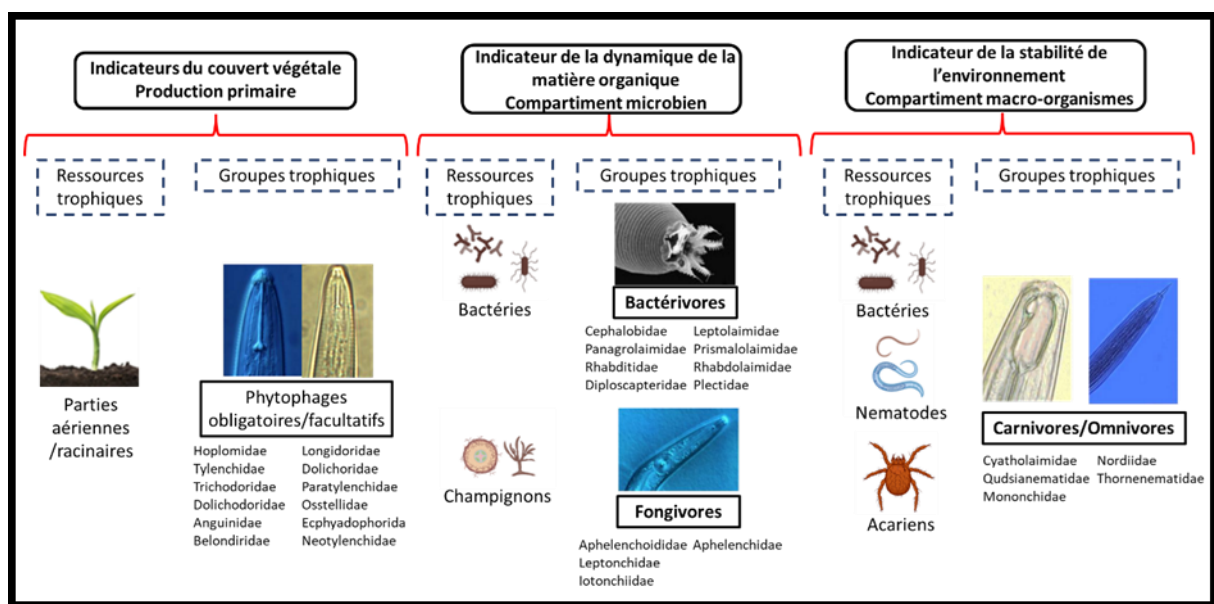


Figure 14 : L'utilisation de la nématofaune pour évaluer la qualité biologique des sols (réalisée à partir de Coll et al., 2013).

Des bioindicateurs, basés sur la présence d'ordres ou d'espèces de la macrofaune ou de la mésofaune, Lumbricidae, Enchytraeidae, Diplopoda, Chilopoda, Isopoda, Carabidae, Oribatida, Gamasina ont été développés. Par exemple, une méthode standardisée ISO (Organisme international pour la standardisation) a été développée depuis 2004 pour échantillonner, identifier les vers de terre, et les utiliser dans le cadre de la bioindication (Ruf et al., 2003; Römbke et al., 2005). Une limite importante à ces méthodes de bioindication, basées sur la présence/absence de taxa, existe quand le taxa est connu pour être présent en faible abondance dans les écosystèmes. Il est difficile dans ce cas de distinguer l'effet d'un écosystème non sain d'un problème de seuil de détection (Ruf et al., 2003). Une solution pour régler ce biais serait d'étudier au niveau de la communauté et/ou d'intégrer des paramètres tels que les stratégies d'histoire de vie, les stratégies de dispersion et/ou le groupe trophique (Ruf et al., 2003).

***b. Le principe de la nématofaune comme outil d'évaluation de la qualité biologique des sols***

L'utilisation de la nématofaune des sols comme outil pour évaluer la qualité biologique des sols est largement acceptée par la communauté scientifique (Lu et al., 2020). Les nématodes, les métazoaires les plus abondants dans les sols, sont ubiquitaires et ont une sensibilité variable aux perturbations physiques ou chimiques des sols (Neher, 2001). Dans des environnements pollués ou fortement perturbés certaines espèces de nématodes sont les derniers animaux à mourir dans les sols (Neher, 2001). D'autres avantages à leur utilisation à la place des micro-organismes pour mesurer la qualité d'un sol sont à citer (Neher, 2001) :

- Les nématodes sont présents à chaque niveau du réseau trophique des sols ce qui en font des représentants de leur source de nourriture (Figure 14).
- Leur temps de génération long permet que la communauté ne fluctue pas trop en fonction de flux de nutriments éphémères comme la fertilisation

Les indices calculés à partir des abondances des nématodes des sols reflètent les perturbations physiques et chimiques ou la stabilité des sols. Ils permettent d'évaluer l'effet d'une pollution particulière sur le réseau trophique des sols (Chauvin et al., 2020; Lu et al., 2020). Pour calculer les indices, les familles de nématodes sont classées de 1 à 5 en fonction de leur stratégie de vie : les colonisateurs ou stratégie R sont placés dans la classe 1 où les nématodes sont caractérisés par un temps de génération court, une grande production de petits œufs, et une exploitation rapide des habitats riches en nutriments ; et les persistants ou stratégie k sont placés dans la classe 5 où les nématodes sont caractérisés par un corps plus grand, une production plus petite d'œufs, une espérance de vie plus longue, et répondent à des ressources trophiques transitoires plus complexes (Ferris et al.,

2001). Les classes 2, 3 et 4 regroupent les familles de nématodes dont les stratégies de vie sont intermédiaires entre les colonisateurs ou les persistants strictes. La classe 1 regroupe en générale les nématodes bactérivores dont la population augmente fortement dans les milieux riches en nutriments, et est résiliente aux environnements perturbés. En revanche la classe 5 rassemble les nématodes omnivores et prédateurs en général réputés comme plus sensibles aux perturbations de l'environnement (Ferris et al., 2001; Lu et al., 2020) (Figure 14).

L'abondance des nématodes dans chaque classe en fonction de leur stratégie de vie permet ensuite de calculer les indices nématofauniques qui sont le reflet de la qualité biologique des sols : l'indice de maturité (IM), l'indice de pression parasitaire des plantes (PPI), l'indice d'enrichissement (IE), l'indice de structure (IS), et l'indice des voies de décomposition (IVD) (Ferris et al., 2001; Yeates, 2003).

Cet outil bien que fortement utilisé n'est pas sans limite. Son principe est essentiellement basé sur la connaissance de la ressource trophique ou la stratégie de vie des nématodes. Or l'écologie de certaines familles de nématodes comme *Tylenchidae*, *Tyloriodae* et *Belondiridae* est peu connue obligeant à une extrapolation pour les classer (Yeates, 2003). Parmi les nématodes bactérivores, on retrouve les familles *Rhabditidae* et *Strongilidae* qui regroupent des espèces ou genre de nématodes qui ne sont pas des bactérivores libres dans les sols tels que les genres *Steinernema* et *Heterorhabditis* qui regroupent des nématodes parasites d'insectes (Dillman et al., 2012).

### **c. Les indices calculés pour rendre compte de la qualité des sols**

Pour rendre compte de la qualité biologique des sols, différents indices sont calculés à partir de l'abondance des nématodes libres des sols (Ferris et al., 2001; Yeates, 2003; Lu et al., 2020) :

- Indice de maturité (IM) : il révèle la perturbation du milieu et le niveau de maturité des communautés de nématodes. Il est calculé à partir de l'abondance des nématodes libres et leur classe sur l'échelle colonisateur/persistant (cp). Plus l'indice est élevé plus l'environnement est stable.

$$\sum Vi \times Pi \text{ avec } Vi : \text{valeur du cp} \\ Pi : \text{proportion de nématodes dans la classe de cp}$$

- Indice d'enrichissement (IE) : il indique la disponibilité des nutriments dans les sols et la réponse des décomposeurs primaires à ces ressources. Il est calculé sur l'abondance des nématodes opportunistes non herbivores. Plus l'indice est élevé plus les nutriments sont disponibles dans les sols.

$$\frac{e}{(e + b) \times 100}$$

$e = \sum Ke \times n$  avec  $Ke$  : coefficient relatif à l'enrichissement  
 $n$  : abondance de la famille considérée

$b = \sum Kb \times n$  avec  $Kb$  : coefficient relatif à la nématofaune de base

- Indice de structure (IS) : il rend compte de la stabilité du milieu et la complexité du réseau trophique des sols. Il se base sur l'abondance des nématodes indicateurs des conditions non perturbées et structurant le réseau trophique. Plus il est élevé et plus le réseau trophique du sol est complexe, et plus le milieu est stable.

$$\frac{s}{s + b} \times 100$$

$s = \sum Ks \times n$  avec  $Ks$  : coefficient relatif à la structure de la nématofaune  
 $n$  : abondance de la famille considérée

$b = \sum Kb \times n$  avec  $Kb$  : coefficient relatif à la nématofaune de base

- Indice des voies de décomposition (IVD) : il informe sur la nature des voies de décomposition dans les sols : bactérienne ou fongique. Il est calculé à partir des abondances des nématodes bactérovores ( $Ba$ ) et des nématodes fongivores ( $Fu$ ). Plus il est élevé plus la voie de décomposition bactérienne est dominante par rapport à celle fongique.

$$\frac{Ba}{Ba + Fu}$$

En plus de ces indices, l'indice de pression parasitaire des plantes (PPI) est utilisé pour rendre compte de la présence des nématodes phytoparasites, et la pression qu'ils exercent dans les cultures. Des indices de diversité usuels sont utilisés pour caractériser la nématofaune des sols : la richesse taxonomique, *i.e.* nombre d'espèces identifiées, et l'indice de diversité de Shannon, *i.e.* nombre d'espèces identifiées et la répartition du nombre d'individu pour chaque espèce (Yeates, 2003; Lu et al., 2020).

## 5. Les outils pour détecter les nématodes dans les sols

La nématofaune est un bioindicateur satisfaisant et reconnu pour l'évaluation de la qualité biologique des sols. Mais aujourd'hui existe-t-il des méthodes efficaces pour détecter et identifier tous les nématodes des sols ? L'avènement des outils moléculaires permet-il d'améliorer le seuil et la sensibilité



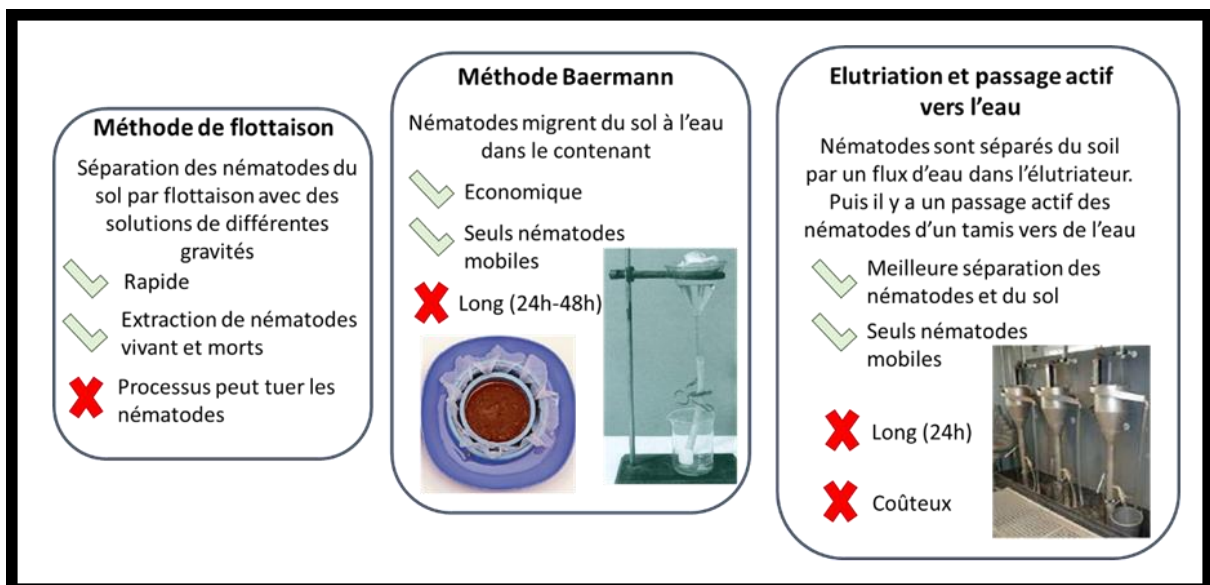


Figure 15 : Les avantages et les limites des trois principales méthodes d'extraction des formes libres des nématodes des sols.

de détection des nématodes dans les sols ? Ou au contraire des verrous empêchent-ils encore une détection fiable, rapide, et sensible avec les méthodes moléculaires ?

#### **a. Les techniques pour extraire les nématodes des sols**

La détection et l'identification des nématodes des sols débutent au préalable par leur extraction des sols ou des racines de plantes. Cette extraction doit débuter dans les premiers jours après l'échantillonnage pour éviter la mort des nématodes, leurs entrées dans des formes de dormance ou inversement ce qui pourraient biaiser les résultats (Min et al., 2012). Il existe aujourd'hui plusieurs méthodes utilisées pour leur extraction qui ont chacune leurs avantages et leurs limites (Kaya and Stock, 1997; Marais et al., 2017) (Figure 15). Les méthodes de Baermann, d'élutriation Oostenbrink, de Flegg ne peuvent être utilisées que pour extraire des nématodes mobiles et actifs. La méthode de flottaison par centrifugation de gradient de sucrose ainsi que celle de décantation et tamisage permettent de collecter les nématodes inactifs voir morts (Kaya and Stock, 1997; Min et al., 2012; Marais et al., 2017). La détection des formes de résistance des nématodes, comme les œufs et les cystes, est plus compliquée, et fait appel à d'autres méthodes comme la méthode avec l'élutriateur de Seinhorst (Marais et al., 2017). Une méthode ISO a été développée pour l'extraction de la nématofaune dans le but d'étudier la qualité biologique d'un sol. Elle recommande l'utilisation de la technique d'élutriation à partir de 100g de sols (Mulder et al., 2005) bien que cette méthode soit biaisée pour l'extraction des cystes des nématodes phytophages. La méthode de Baermann montre une efficacité d'extraction comprise entre 30 et 50% (Qiu et al., 2006; Min et al., 2012). La méthode d'extraction des nématodes doit être choisie en amont de l'étude en fonction de ces objectifs, mais aussi des connaissances sur le modèle biologique et l'environnement.

#### **b. L'apport de l'imagerie pour identifier les nématodes sur critères morphologiques**

L'étape qui suit l'extraction des nématodes est l'identification de leur famille, genre ou espèce. Celle-ci est encore réalisée en grande majorité en identifiant les nématodes sur la base de critères morphologiques. Mais cette méthode est laborieuse, chronophage et non sans risque d'erreurs (Min et al., 2012; Lu et al., 2020). L'avènement du *machine learning* et du *deep learning* utilisés dans le cadre de l'imagerie et de la détection a permis d'améliorer ces étapes d'identification des nématodes par l'œil humain. Des algorithmes ont été créés pour analyser des images d'organismes, et de reconnaître les espèces sur la base de critères morphologiques (Ayan et al., 2020). Des techniques similaires couplées avec de la cytométrie en flux ont été développées pour reconnaître des nématodes appartenant au genre *Steinernema*, *Heterorhabditis* et *Caenorhabditis* (Filgueiras et al., 2022). La détection précoce des nématodes phytoparasites à partir d'images aériennes de symptômes sur des

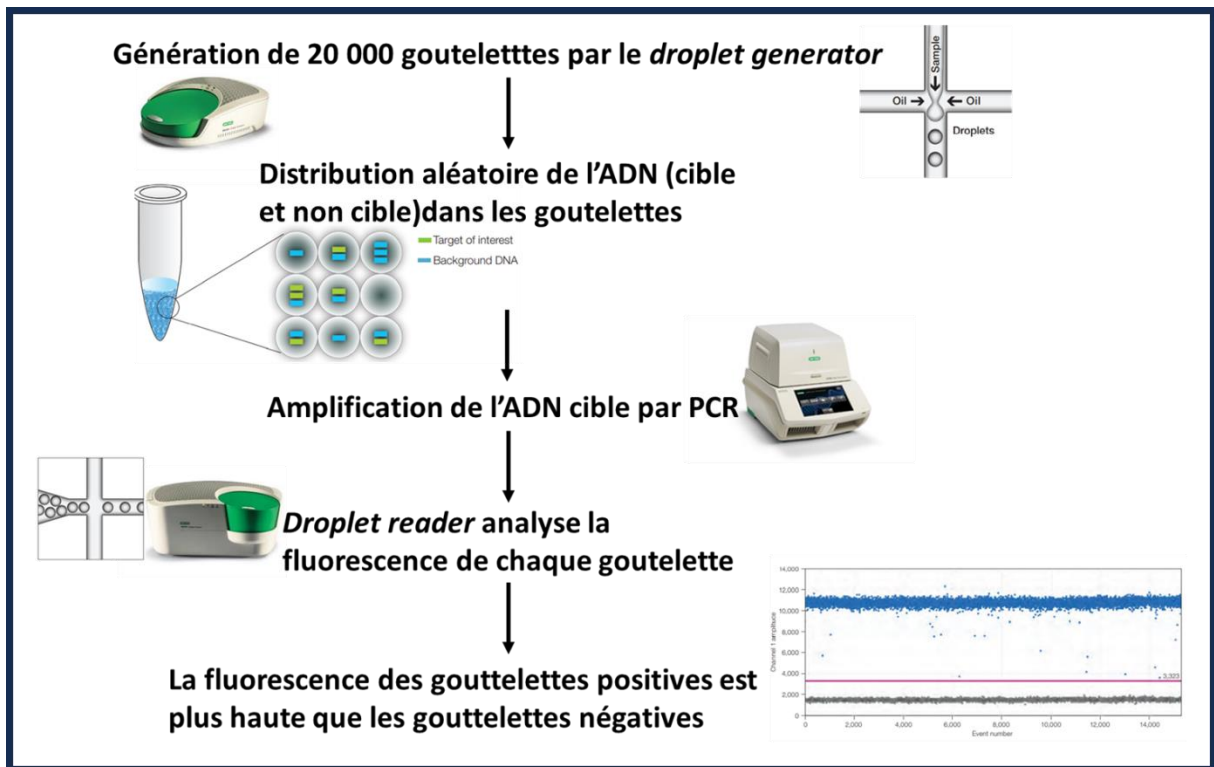


Figure 16 : Principe de la *digital droplet* PCR (ddPCR).

pins et leurs analyses par deux modèles YOLOv4 et GoogLeNET a été développée. Cette technologie permet une détection rapide et automatisée du nématode phytotaparasite à grande échelle (Zhu et al., 2023). Ces outils d'imagerie et de *machine learning* requièrent l'implémentation d'une base de données importante, et une expertise dans les domaines de l'imagerie, la bioinformatique, et sur le ou les organismes à détecter.

### **c. Le piégeage, un outil pour la détection des nématodes parasites**

Il existe dans le Phylum Nematoda des nématodes parasites de vertébrés, *Toxocara canis* (Chen et al., 2018), d'invertébrés, *Steinernema* sp. (Dillman et al., 2012), et de plantes, *Meloidogyne* sp. (Blaxter et al., 1998). Les nématodes phytoparasites peuvent être détectés en utilisant des plantes hôtes pièges. Les nématodes du genre *Pratylenchus* ont une détection plus importante en utilisant leur plante hôte comme piège (Aalders et al., 2017). L'utilisation de piège pour détecter les nématodes parasites n'apporte pas la même capacité de détection selon les espèces, et n'est pas souhaitable quand son écologie est peu connue (Aalders et al., 2017).

Un autre groupe de nématodes parasites est détecté dans les sols par la mise en place de piège, les nématodes entomopathogènes (NEPs). Les NEPs sont des parasites d'insectes qui ont une phase libre dans les sols. Leur détection dans les sols est habituellement faite *ex situ* en utilisant des insectes sensibles, comme *Galleria mellonella*, comme piège pour isoler les NEPs des sols (Bedding and Akhurst, 1975). Tout comme pour le piégeage des nématodes phytoparasites, cette technique a de nombreuses limites et dépend de l'espèce d'insecte piège (Campos-Herrera and Gutiérrez, 2008) ou de la mobilité du NEP (Campbell et al., 2003) (voir Chapitre 1).

### **d. L'apport des outils moléculaires pour améliorer la sensibilité de détection des nématodes du sols ?**

L'essor des outils moléculaires a permis d'améliorer notre capacité à détecter les organismes et à les identifier. L'identification des espèces de nématodes est aujourd'hui possible grâce au développement des méthodes de Polymerase chain Reaction (PCR) et PCR quantitative (PCRq), et des couples d'amorces spécifiques à différentes espèces (Qiu et al., 2006; Rahman et al., 2010; Min et al., 2012; Lu et al., 2020; Chen et al., 2022). L'intérêt de ces méthodes sur les précédentes, c'est qu'elles permettent de détecter des formes inactive ou de dormance qui ne sont pas piégeables ou identifiables morphologiquement (Min et al., 2012). Aujourd'hui la technique de la *digital droplet* PCR (ddPCR) fait partie des méthodes moléculaires les plus sensibles avec un seuil de détection théorique d'un ADN cible dans l'échantillon contre 100 ADNs cibles en PCRq (Chen, 2021). Dans cette technique, les cibles d'ADN sont réparties dans des réactions à répliques multiples dans lesquelles se produit une amplification par PCR. Les réactions avec des cibles d'ADN sont positives et les autres sont négatives

(Figure 16). Le nombre de molécules cibles présentes est calculé sur la base de la loi de distribution Poisson (Hindson et al., 2011; Chen, 2021; Shao et al., 2023).

La détection des œufs de *Meloidogyne enterolobii* dans les sols a montré un seuil plus faible de sensibilité en ddPCR avec une détection de 1 œuf sur 300 à 10 fg/ $\mu$ L-1 d'ADN génomique contre 1 œuf sur 150 à 100 10 fg/ $\mu$ L-1 d'ADN génomique dans les sols que la méthode PCRq (Chen, 2021). L'autre avantage de la ddPCR est la réduction de l'effet de la présence d'inhibiteurs très présents dans les échantillons environnementaux issus des sols (Kim et al., 2014).

Si les outils moléculaires aujourd'hui sont prometteurs pour se passer de l'expertise ou de l'aspect chronophage de l'identification des nématodes sur critères morphologiques, ces outils ont aussi des limites importantes. Leur utilisation requiert le développement de bases de données importantes sur les nématodes, et elle ne permet pas de découvrir et d'identifier de nouvelles espèces (Lu et al., 2020). Une autre limitation est la nécessité d'utiliser une étape préalable d'extraction des nématodes des sols à cause de leur distribution en patch qui nécessite d'utiliser plus qu'un gramme de sol. L'utilisation de gros volume de sols pour l'extraction d'ADN est plus coûteux et nécessite des équipements adaptés (Qiu et al., 2006; Min et al., 2012). Des tests ont été effectués pour extraire l'ADN avec des quantités de sol plus importantes, 10g, montrant une meilleure détection du parasite d'escargot *Phasmarhabditis hermaphrodita* qu'en utilisant 1g de sol (Min et al., 2012). D'autres limites peuvent freiner la détection et la quantification moléculaire des nématodes à partir de sols : 1/ le nématode détecté peut être mort, 2/ différents stades de nématodes coexistent avec des tailles/nombres de cellules différents pouvant biaiser la quantification obtenue par PCRq (Min et al., 2012).

## **Conclusion intermédiaire**

L'agroécologie, le biocontrôle et la lutte biologique pourraient être des solutions pour demain afin d'augmenter les rendements et de protéger efficacement les cultures dans un contexte de changement climatique. En revanche le manque d'unité autour des définitions de ces notions dans la communauté scientifique, entre les pays, mais aussi entre les instances d'un même pays, freine les avancées et les discussions scientifiques sur ces sujets de première importance. Ce manuscrit prend le parti de proposer l'utilisation de la définition de lutte biologique, c'est-à-dire l'usage des êtres vivants ou de substances produites par des organismes vivant pour contrôler des bioagresseurs. Ce cadre est d'autant plus important qu'aujourd'hui la question peut se poser sur l'avenir de la lutte biologique. La lutte biologique existera -t-elle sous la forme d'un panel de produits, pareil à un produit phytosanitaire, mais

plus « naturel » ? A-t-on une connaissance réaliste sur les agents utilisés en lutte biologique ? Leur efficacité au champ ? Leur efficacité en fonction de différentes conditions environnementales ? Leurs effets sur des espèces non-cibles et surtout sur de longues échelles de temps ? Au vu des articles récents et des discussions dans les congrès organisés par IOBC-WPRS (International Organisation for Biological and Integrated Control), aujourd'hui la lutte biologique est envisagée sur une utilisation de produits d'agent vivant comme remplacement à des produits phytosanitaires. Il s'agit d'un premier pas vers l'agroécologie, mais je pense qu'il s'agit de solutions à court et moyen termes. Les discussions avec des représentants de Koppert au congrès « Le 100<sup>e</sup> anniversaire de la découverte du premier NEP, Logroño » et l'article de Lamichhane et al., 2016 semblent montrer que les agriculteurs et les entreprises des produits de lutte biologique recherchent des agents de lutte biologique très généralistes capables de contrôler un nombre très différents de bioagresseurs. Cela me pousse à croire que l'ensemble des enjeux qui se cachent derrière la lutte biologique ne sont pas entièrement compris. La découverte d'un agent de lutte biologique très généraliste permettrait peut-être de contrôler un grand nombre de bioagresseurs avec moins d'effets négatifs sur la santé humaine. Mais je trouve qu'il s'agit alors d'oublier les autres enjeux sur lesquels nous essayons de travailler : réduire nos effets sur la biodiversité, améliorer la santé des écosystèmes, etc... Les effets du relâchement d'un tel agent de lutte biologique sur l'environnement pourraient être aussi importants sur la biodiversité qu'une molécule chimique. Je pense que cette demande d'un unique agent de lutte biologique est irréaliste, mais permet en revanche de se rendre compte qu'il y a sûrement un manque d'échanges entre tous les acteurs de la lutte biologique : scientifiques, entreprises, politiciens et agriculteurs. Les avis des scientifiques semblent converger sur l'avenir d'une lutte biologique efficace : utilisation de différentes méthodes de lutte biologique en simultanée (utilisation de plusieurs agents de lutte biologique, changement des pratiques agricoles), et une gestion de la lutte biologique au niveau régional. Pour autant je ne suis pas certaine que les entreprises, politiciens et agriculteurs soient du même avis ou du moins aient une totale connaissance des arguments scientifiques qui se cachent derrière ces avis. Des récentes études menées auprès des agriculteurs ont montré une opacité pour eux de la lutte biologique que cela soit sur l'efficacité, les conditions d'application, et les moyens existants pour faire de la lutte biologique (Lamichhane et al., 2016; Pressecq et al., 2024). La difficulté autour de la lutte biologique est sa complexité qui demande un effort important d'études pour déterminer l'efficacité de chaque agent de lutte biologique dans toutes les conditions environnementales possibles. A mon sens c'est cette complexité qui est le plus grand défi de la lutte biologique, et le plus grand frein pour son adoption à une grande échelle. J'ai mis en évidence dans ce manuscrit le manque de connaissance sur les effets non-cibles des agents utilisés en lutte biologique par augmentation. C'est une réalité dont la communauté scientifique a connaissance, et qui place ces dernières années l'étude de ces effets au cœur de la recherche sur les agents de lutte biologique. La rédaction de ce manuscrit et la lecture de

la littérature scientifique me poussent à penser que la lutte biologique par augmentation est sûrement une solution à court et moyen terme face aux problématiques des produits phytosanitaires chimiques. Cependant je crois que la lutte biologique par conservation doit être une solution à envisager sur le long terme, et c'est la responsabilité des scientifiques d'améliorer nos connaissances, et surtout de les uniformiser à travers le monde pour accompagner tous les acteurs vers une transition plus durable. A mon sens, sur le long terme la lutte biologique par augmentation deviendrait une solution facultative utilisée dans des cas particuliers, comme lors d'une explosion d'un ravageur dans une région donnée où les agriculteurs appliqueraient un agent de lutte biologique pour aider à le contrôler et réduire les pertes de rendement. Il ne s'agirait donc plus d'une application systématique. Cette vision semble être partagée dans la communauté scientifique, mais il y a manque d'études documentées sur la lutte biologique par conservation, son efficacité et sa faisabilité avant de pouvoir penser à établir ce modèle.

La deuxième thématique abordée dans ce manuscrit au cœur de ma thèse est le biote des sols. Mes recherches bibliographiques ont mis en évidence des différences dans l'étude des organismes des sols avec des clades très étudiés par rapport à d'autres. Des raisons diverses peuvent expliquer cela qui peuvent être liées aux difficultés de détection, d'identification et de méconnaissances sur l'écologie de ces clades peu étudiés. La bonne connaissance de l'ensemble du biote est importante pour identifier les bioagresseurs potentiels, les auxiliaires, mais aussi les leviers que les agriculteurs peuvent utiliser pour diminuer la pression des bioagresseurs. Les questionnements sur la « bonne qualité » des sols sont toujours de mise : quelle référence utiliser ? La communauté scientifique ne semble pas avoir trouvé de points d'accord sur cette définition, mais aussi sur la construction de sols de références. Mais peut être qu'un sol de « bonne qualité » n'existe tout simplement pas ? Après l'analyse que j'ai faite de la littérature, la qualité d'un sol ne peut pas être universelle, elle doit toujours être remise dans le contexte environnemental, par exemple la qualité d'un sol de forêt équatoriale ne pourra pas être comparée à celle d'un sol d'une prairie dans une région tempérée (Vrscaj et al., 2008). Le développement d'une base de données de qualité des sols de référence pour chaque contexte environnemental pourrait être un premier pas pour comparer et interpréter la qualité des sols (Ruf et al., 2003). En plus de cette évaluation de la qualité de sol de référence, il faut utiliser différents indicateurs de la qualité physico-chimique et biologique. Dans le cas de la bioindication, l'utilisation de plusieurs indicateurs seraient un moyen plus efficace pour obtenir une vision plus exhaustive de la qualité biologique d'un sol. L'étude du biote des sols et l'évaluation de la qualité biologique des sols nécessitent une détection optimale de l'ensemble des organismes des sols. Dans ce manuscrit, j'ai développé ce point en prenant l'exemple de la nématofaune des sols utilisés dans le cadre de la bioindication. J'ai mis en évidence les biais liés aux extractions de ces nématodes et leurs identifications sur des critères morphologiques qui empêchaient d'obtenir une image certaine de l'ensemble de la

nématofaune d'un sol. Le développement des outils moléculaires, notamment de la ddPCR, donne des perspectives pour améliorer la description de la présence et l'abondance des nématodes cryptiques. J'ai pris l'exemple des nématodes, mais cela se retrouve chez d'autres organismes ou microorganismes cryptiques des sols. Je trouve que cette amélioration des outils de détection est l'étape primordiale avant d'envisager de chercher à évaluer la qualité d'un sol, et de rechercher la présence de bioagresseurs ou auxiliaires potentiels. Dans ce dernier cas, il est nécessaire que l'absence ou la présence de l'organisme soient confirmées par une méthode de détection sensible et éprouvée ou alors par différentes méthodes de détection.

J'ai choisi de développer les thématiques de la lutte biologique et le biote des sols car les enjeux dégagés dans ces deux thématiques sont liés à mon sujet de thèse, et aux enjeux de mon modèle d'étude les nématodes entomopathogènes (NEPs). Ces nématodes ont une partie de leur cycle de vie dans le sol et sont utilisés en lutte biologique par augmentation. Ce modèle a les mêmes problématiques développées dans les autres parties : est-ce que leur utilisation en lutte biologique est efficace ? est-ce que la description de leur distribution dans les sols est suffisante pour leur utilisation en lutte biologique ? est-ce que les facteurs qui influencent leur distribution, survie et pathogénicité sont disponibles ? Je vais faire dans cette dernière partie de la synthèse bibliographique un état de l'art des connaissances sur les NEPs pour répondre à ces questions et surtout pour savoir s'il est possible aujourd'hui d'envisager une lutte biologique efficace avec les NEPs.



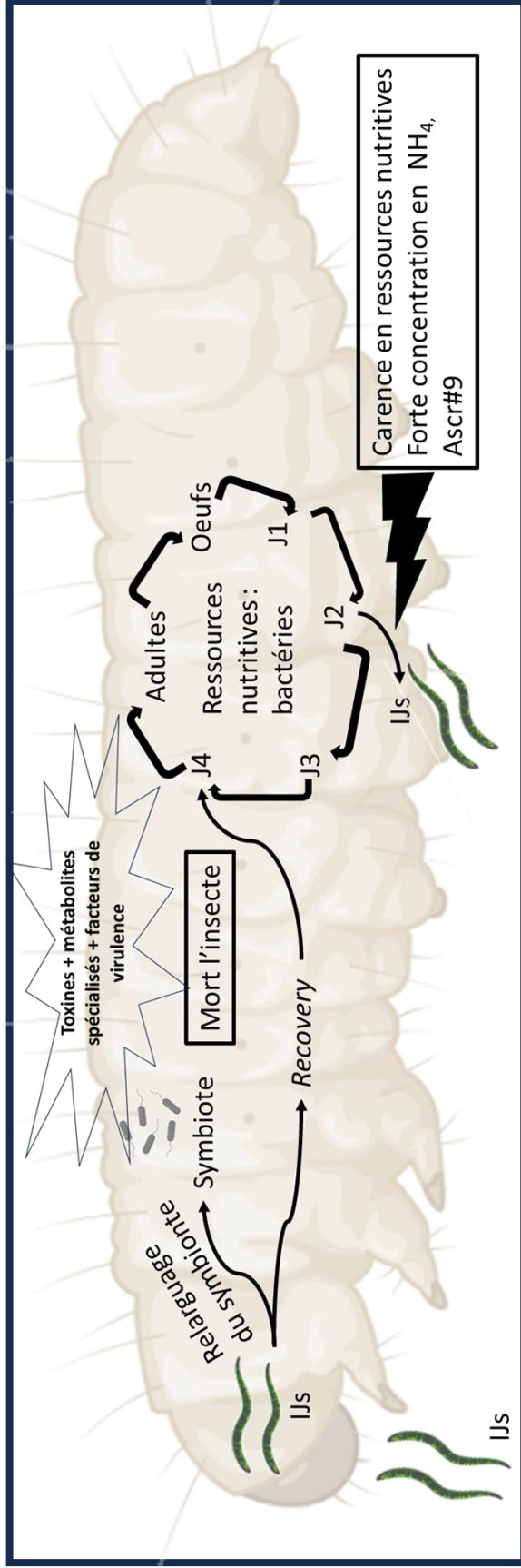


Figure 17 : Cycle de vie des nématodes entomopathogènes (NEPs).

## Partie II : Les NEPs, des macroorganismes du sol, utilisés en lutte biologique pour une protection agro-écologique des cultures

---

### I. Le cycle de vie des NEPs

Les nématodes entomopathogènes (NEPs) sont des nématodes parasites d'insectes qui ont une phase libre dans les sols. Le cycle de vie des NEPs se place dans un contexte d'interaction entre le complexe némato-bactérien, formé par le nématode et ses bactéries associées (symbiotique et microbiote), et l'insecte (Dillman et al., 2012).

#### 1. Le cycle de vie de *Steinernema* sp. et *Heterorhabditis* sp.

Les NEPs sont présents dans les sols sous une forme de résistance appelée juvénile infestant (*infective juvenil* en anglais ou IJ). Il est caractérisé par une double cuticule, et la fermeture de la bouche et de l'anus. L'IJ est associé à une bactérie symbiotique entomopathogène (Gaugler, 2002). L'IJ est une forme de résistance qui permet aux NEPs de persister dans les sols plusieurs mois à quelques années (Gaugler, 2002; Campos-Herrera, 2015). Les IJs pénètrent par les orifices naturels de l'insecte hôte (anus, bouche, spiracles) puis atteignent l'hémolymphe de l'insecte (liquide dans lequel baignent les organes de l'insecte) après le passage de son épithélium intestinal (Goodrich-Blair and Clarke, 2007). Dans le cas des IJs du genre *Heterorhabditis*, les IJs peuvent aussi pénétrer le corps de l'insecte à travers la cuticule grâce à une dent cornée. Dans l'hémolymphe de l'insecte, les IJs relâchent leur bactérie symbiotique, ce qui induit un signal qui n'est pas encore clairement identifié amenant à l'étape de *recovery* ou activation où l'IJ quitte son stade de résistance pour reprendre son cycle de développement. L'IJ se différencie en nématode au stade J4 pour donner ensuite des adultes mâles et femelles dans le cas de *Steinernema*, et hermaphrodite et autofertile à la première génération dans le cas d'*Heterorhabditis*. Les femelles pondent des œufs ou les conservent à l'intérieur de leur corps. Dans ce dernier cas, les œufs éclosent dans l'utérus et les juvéniles de stade 1 (J1) consomment la mère, c'est l'*endotokia matricida* (Dix et al., 1992; Griffin, 2012). A partir du J1, il y a 3 stades larvaires J2, J3 et J4 avant la production de nouveaux adultes (Campos-Herrera, 2015; Heppert et al., 2022) (Figure 17).

Dans le cadavre, les nématodes des différents stades se nourrissent des tissus de l'insecte et des bactéries, notamment de leurs bactéries symbiotiques (Campos-Herrera, 2015; Mucci et al., 2022). Au bout de dix jours dans les conditions de laboratoire, mais ceci n'est pas documenté dans la nature, la diminution des ressources nutritives est à l'origine de la différenciation du stade J2 en stade juvénile infestant, et à la réassociation avec leur bactérie symbiotique (Campos-Herrera, 2015) (Figure 17).

D'autres signaux peuvent être impliqués dans l'émergence des IJs du cadavre. La quantité d'ammonium ou l'accumulation de l'ascaroside ascr#9 (petites molécules de signalisation qui ont des effets sur le comportement et le développement des nématodes) dans le cadavre avancent ou retardent l'émergence des IJs (San-Blas et al., 2008; Hartley et al., 2019) (Figure 17).

Le cycle de vie des NEPs dans le cadavre bien que détaillé depuis longtemps (Dix et al., 1992) reste obscur surtout à deux étapes clés du développement des NEPs : la *recovery* et la réassociation avec la bactérie symbiotique lors de la formation de l'IJ (Campos-Herrera, 2015; Heppert et al., 2022). L'absence de connaissance solide sur ces deux étapes est un frein à la production des NEPs en lutte biologique par augmentation (Shapiro-Ilan et al., 2014).

## 2. Les caractéristiques d'un nématode entomopathogène

Des nématodes libres des sols de genres différents de *Steinernema* et *Heterorhabditis* ont été reportés comme NEP par plusieurs articles : *Oschieus chongmingensis*, *O. carolinensis*, et *Caenorhabditis briggae* (Dillman et al., 2012; Serepa-Dlamini and Gray, 2018; Lephoto and Gray, 2019; Shan et al., 2019). Il a parfois été montré chez ces nématodes une efficacité comparable à celle observée avec les deux genres de NEP *Steinernema* et *Heterorhabditis* contre certains insectes ravageurs (Amuri and Devi, 2020; Trejo-Meléndez et al., 2024). Mais d'autres études ont montré des comportements s'apparentant plus à un comportement de charognard, c'est-à-dire qu'ils profitent du cadavre de l'insecte tué par un autre organisme (Dillman et al., 2012; Zhang et al., 2019).

La description de ces nouveaux genres considérés comme entomopathogène a poussé la communauté scientifique à se demander ce qui caractérisait les nématodes du genre *Steinernema* et *Heterorhabditis*. Les caractéristiques suivantes sont devenues le fondement pour considérer une espèce de nématode comme entomopathogène (Dillman et al., 2012) :

- L'existence d'une symbiose entre le nématode et une bactérie entomopathogène
- La présence d'un unique stade libre de résistance, l'IJ
- L'IJ doit rechercher et pénétrer activement un insecte hôte
- Les bactéries symbiotiques doivent atteindre l'hémolymphe de l'insecte
- La mort de l'insecte doit survenir avant 120h
- La nouvelle génération d'IJ doit être réassociée avec leurs bactéries symbiotiques

Si les mortalités sur certains insectes hôtes ont été montrées pour certaines espèces d'*Oscheius* spp., l'existence d'une bactérie symbiotique et surtout sa réassociation avec la nouvelle génération d'IJs n'ont pas été démontrées chez d'autres nématodes que chez les genres *Steinernema* et *Heterorhabditis*. C'est la raison pour laquelle les nématodes du genre *Oscheius* sp. sont considérés comme des NEP-like ou des nématodes charognards (Dillman et al., 2012; K. Zhang et al., 2019).

En 2024, une revue de la littérature a émis des réserves sur la définition des caractéristiques des NEPs citées ci-dessus car les auteurs considèrent que ces caractéristiques ont été définies à partir d'observations faites sur uniquement 5% des espèces de *Steinernema* et *Heterorhabditis* existantes (Trejo-Melendez, 2023). Les auteurs proposent d'incorporer dans les caractéristiques des NEPs d'autres aspects biologiques comme la plasticité de la virulence, le comportement et les habitats naturels pour compléter le cadre donné par Dillman et al., 2012. Celui-ci est sûrement très réducteur lorsque l'on se rend compte de la diversité des interactions entre les NEPs du genre *Steinernema* et *Heterorhabditis*, leurs symbiotes, et les insectes. Pour considérer un nématode entomopathogène, nous nous intéressons en priorité à savoir si le nématode a un symbiote, et sa capacité à tuer un insecte en moins de 120h. J'identifie deux problèmes à cela : premièrement, l'échec de l'isolement d'un symbiote est possible chez des espèces du genre *Steinernema* et *Heterorhabditis* à cause d'une faible abondance du symbiote, une compétition avec d'autres bactéries présentes dans le nématode et l'insecte (Ogier et al., 2023), alors il n'est pas impossible qu'il y ait le même problème pour d'autres nématodes d'autres genres, deuxièmement, la variabilité de la virulence des espèces de NEPs du genre *Steinernema* et *Heterorhabditis* (développé au paragraphe suivant) fait qu'ils ne sont pas capables de tuer n'importe quel insecte dans n'importe quel contexte en moins de 120h. Je pense qu'il est important de garder ces critères en mémoire pour bien distinguer les nématodes parasites d'insectes des nématodes charognards isolés dans des cadavres d'insectes. Mais il est nécessaire aussi que nous restions prudents, et que nous nous souvenions que l'entièreté du cycle de vie et que les particularités de chaque espèce vis-à-vis de la virulence pour un grand nombre d'insectes ou de leurs interactions avec leurs symbiotes ne sont pas encore totalement connues.

***Des efforts d'études pour élucider l'ensemble du cycle de vie des NEPs restent à faire. Premièrement l'ensemble des facteurs et signaux contribuant à la reprise du cycle de développement des IJs ou au développement des nouveaux IJs et leur émergence doit être mieux cerné. Une meilleure connaissance de la biologie de l'ensemble des espèces de Steinernema et Heterorhabditis existantes permettrait une meilleure réflexion sur les caractéristiques définies en 2012 des NEPs. Plusieurs raisons m'obligent à penser qu'il est***

*nécessaire de réfléchir à ces points précis. Les NEPs sont des agents de lutte biologique, comme développé plus tard, il est donc important de s'assurer que tous les NEPs définis dans la littérature sont des parasites d'insectes, et sur quelle gamme d'insecte ils sont virulents. La connaissance de la biologie des agents de lutte biologique est un prérequis aujourd'hui pour leur utilisation.*

## **II. Les bactéries qui sont associées aux nématodes entomopathogènes**

Intrinsèquement liées au nématode, les bactéries symbiotiques sont au cœur de la définition d'un nématode entomopathogène et de son cycle de vie. Il est donc important de comprendre son rôle dans la *fitness* du nématode et les éventuels bénéfices qu'elle en tire. Des études récentes ont montré l'existence d'un cortège d'autres bactéries que les symbiotes, souvent associées aux NEPs appelé *Frequently Associated Microbiota* (FAM) (Ogier et al., 2020). Cette découverte complexifie les interactions qui ont lieu dans le cadavre de l'insecte en ajoutant un nouvel acteur. L'étude du rôle de la bactérie symbiotique et du FAM dans le cycle de vie et la *fitness* du nématode est un enjeu majeur pour appréhender les facteurs contribuant à la survie, la persistance, et la pathogénicité des NEPs.

### **1. Les symbiotes entomopathogènes**

Une association hautement spécifique existe entre le nématode entomopathogène et sa bactérie symbiotique. Les NEPs appartenant au genre *Steinernema* et *Heterorhabditis* sont associés à des bactéries symbiotiques, de la famille des *Morganellaceae*, les genres *Xenorhabdus* et *Photorhabdus*, respectivement (Boemare et al., 1996; Gaugler, 2002; Machado et al., 2018). Chaque espèce de NEP est associée à une espèce de bactérie spécifique. Par exemple, l'espèce *S. carpocapsae* est associée avec une bactérie de l'espèce *X. nematophila*, et l'espèce *H. bacteriophora* est associée avec une bactérie de l'espèce *P. laumondii*. L'inverse n'est en revanche pas vrai, une espèce de bactérie peut être associée à plusieurs espèces de NEPs. Par exemple, *X. bovienii* est associé avec *S. feltiae* et *S. affine* (Boemare et al., 1996).

Les nématodes du genre *Heterorhabditis* hébergent leurs bactéries symbiotiques dans la lumière de l'intestin tandis que les nématodes du genre *Steinernema* les hébergent dans un réceptacle au niveau de la partie antérieure de l'intestin (Kim et al., 2012). Le nématode, vecteur de la bactérie symbiotique entomopathogène, va permettre l'entrée de la bactérie dans l'hémolymphe de l'insecte où la bactérie

va proliférer. La prolifération bactérienne et la production de facteurs de virulence vont induire une septicémie qui entraînera la mort de l'insecte (Goodrich-Blair, 2007; Goodrich-Blair and Clarke, 2007). De plus les symbiotes pourraient intervenir dans le blocage du système immunitaire de l'insecte. *Xenorhabdus nematophila* libère de nombreux facteurs de virulence comme des toxines, des lipases, des chitinases, des protéases, et des haemolysines (Blackburn et al., 1998; Vigneux et al., 2007; Nielsen-LeRoux et al., 2012). Les symbiotes sécrètent aussi des facteurs de dissuasion contre les charognards (Goodrich-Blair, 2007; Maher et al., 2021). Ils contribuent au succès du nématode dans les compétitions interspécifiques. Par exemple le symbiote de *S. affine* est virulent contre les nématodes *S. feltiae* (Murfin et al., 2019).

Des études ont montré une baisse de la virulence du NEP en absence du symbiote (Gaugler, 2002). En absence du symbiote, *S. riobrave* est incapable de poursuivre son cycle de vie tandis que *S. carpocapsae* et *S. scapterisci* ont une *fitness* réduite avec une diminution du succès parasitaire (nombre de cadavre avec des IJ émergents) (Sicard et al., 2003). Chez *S. carpocapsae*, une corrélation négative a été observée entre le nombre de bactéries hébergées dans le réceptacle et la survie de l'IJ, mais une corrélation positive a été observée entre le nombre de bactéries et le taux de reproduction de l'IJ à la prochaine génération (Griffin, 2012).

Le bénéfice que la bactérie symbiotique tire de sa relation avec le nématode est moins clair. Néanmoins, les bactéries ne sont jamais retrouvées dans l'environnement en dehors de leur hôte. En conséquence, cette relation symbiotique entre le nématode et sa bactérie est qualifiée de relation mutualiste.

## 2. Le FAM (Frequently Associated Microbiota)

Les NEPs ne sont pas seulement associés à leur symbiote, ils hébergent aussi d'autres bactéries qui appartiennent au FAM (*Frequently Associated Microbiota*). Les membres majoritaires qui constituent ce FAM sont : *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pseudomonas* sp., des Rhizobiaceae (*Ochrobactrum*, *Agrobactrum*...) (Ogier et al., 2020). Deux espèces de *Pseudomonas*, *Pseudomonas protegens* et *Pseudomonas chlororaphis*, sont entomopathogènes et pourraient être impliquées dans la mort de l'insecte. Les autres rôles des membres FAM ne sont pas encore élucidés, mais quelques hypothèses peuvent être envisagées. Le FAM pourrait intervenir par exemple dans la destruction des tissus de l'insecte ou l'adaptation des NEPs aux conditions environnementales (Ogier et al., 2020).

Les espèces de bactéries appartenant au genre *Stenotrophomonas* et *Pseudomonas* sont connues pour produire de nombreuses enzymes telles que des protéases, des lipases, et des chitinases qui peuvent

jouer un rôle dans la prévention de la putréfaction du cadavre de l'insecte et/ou dans l'élimination des compétiteurs microbiens dans le cadavre (Ogier et al., 2023).

L'hypothèse privilégiée est que le FAM pourrait contribuer au succès du cycle parasitaire des NEPs dans un environnement naturel dont les conditions sont moins favorables que les conditions de laboratoire (Ogier et al., 2023).

### **III. La pathogénicité des nématodes entomopathogènes contre les insectes**

Dans cette partie, je décrirai les connaissances sur les rôles des deux partenaires du complexe nématobactérien et de leur insecte hôte dans le niveau de pathogénicité des NEPs sur les insectes. Le complexe nématobactérien fait intervenir de nombreux acteurs pouvant participer à la mort de l'insecte. La compréhension de leurs rôles dans la pathogénicité et des facteurs qui influencent cette pathogénicité est primordiale.

#### **1. Comment les NEPs tuent les insectes ?**

Le paragraphe précédent a décrit l'implication des bactéries symbiotiques dans la mort de l'insecte et plusieurs études ont montré que les nématodes axéniques avaient une virulence atténuée contre les insectes (Gaugler, 2002; Sicard et al., 2003). Cependant les IJs axéniques de *S. carpocapsae* ne sont pas avirulents ce qui indique que le nématode a lui aussi un rôle actif dans la mort de l'insecte (Sicard et al., 2003; Lu et al., 2017). Les nématodes du genre *Steinernema* sécrètent des mélanges de petites molécules, protéines, et acides nucléiques ESPs (Excreted/Secreted Products) (Lu et al., 2017; Chang et al., 2019; Kenney et al., 2021). Les ESPs sont toxiques pour les insectes : 10 ng de ces molécules (excrétion de 20 nématodes pendant 24h) permettent de tuer une drosophile adulte. Les sécrétomes de *S. carpocapsae* sont toxiques pour de nombreux insectes (Lu et al., 2017). La phase de *recovery* est déterminante dans la production d'ESPs. Lu et al., 2017 ont montré que les IJs de *S. carpocapsae* sécrètent peu d'ESPs, et des types d'ESPs différents quand ils n'ont pas eu de phase de *recovery*. Certaines espèces de NEPs pourraient dépendre plus du pouvoir entomopathogène de leur symbiote par rapport à d'autres. De plus, les ESPs produits par les NEPs peuvent avoir d'autres rôles que la toxicité contre les insectes comme la tolérance au stress ou la résistance à la dessiccation (Chang et al., 2019).

## 2. Un spectre d'hôte large et spécialisé selon les espèces

Les nématodes entomopathogènes sont capables de tuer un grand nombre d'insectes hôtes appartenant à des ordres très différents (Lépidoptère, Coléoptère, Diptère, Hyménoptère, Isoptère) (Peters, 1996; Lacey et al., 2015).

La majorité des espèces sont décrites comme généralistes, mais quelques espèces ont une gamme d'hôtes plus restreinte. Par exemple, *Steinernema scapterisci* est surtout pathogène pour les Orthoptères, et essentiellement envers les criquets (Nguyen and Smart, 1991). Le symbiote bactérien de cette espèce, *Xenorhabdus innexi*, est pathogène par injection directe chez le criquet, mais présente une virulence très atténuée chez des espèces de Lépidoptères (Kim et al., 2017). De même le succès du *recovery*, différenciation du stade IJ en stade adulte dans l'insecte, est plus grand quand *S. scapterisci* est en contact avec de l'hémolymphe de criquet par rapport à celui d'autres espèces d'insectes (Lu et al., 2017). L'ensemble de ces arguments supporte l'hypothèse que cette espèce a un rang d'hôte spécialiste. Une virulence atténuée a aussi été trouvée contre deux lépidoptères *Galleria mellonella* et *Spodoptera littoralis* du couple *Steinernema weiseri* et son symbiote *X. bovienii* CS03 pouvant suggérer un rang d'hôte plus restreint (Bisch et al., 2015). Cependant, il n'existe encore que peu de données sur les hôtes de l'ensemble des espèces de NEPs décrites.

## 3. Les facteurs qui influencent la pathogénicité des NEPs

La mobilité des NEPs et leur capacité à localiser l'insecte-hôte sont les premiers facteurs qui influencent leur pathogénicité. Deux grandes stratégies pour la localisation et l'infestation d'un insecte hôte ont été décrites : la stratégie de *cruiser foraging* ou stratégie de recherche active, et la stratégie de *ambush foraging* ou stratégie embusquée. La stratégie de la recherche active se caractérise par une mobilité importante dans l'environnement à la recherche d'hôtes potentiels, une plus grande capacité à s'orienter vers des composés volatils. Cette stratégie est particulièrement adaptée pour les insectes-hôtes sédentaires. La stratégie embusquée est caractérisée par une mobilité plus faible, et peu ou pas de réponse aux composés volatils. La nictation est un comportement spécifique des NEPs embusqués, et est particulièrement adaptée aux proies mobiles : l'IJ adopte une posture d'attente en restant droit à la surface du sol et en se balançant sur une courbure de sa queue (Campbell and Gaugler, 1997; Campbell et al., 2003). La stratégie de recherche serait différente en fonction de l'espèce des NEPs (Campbell and Gaugler, 1997), mais aussi en fonction du substrat (Kruitbos et al., 2010), de la présence d'hôte et de sa mobilité (Bal and Grewal, 2015). De plus, au sein d'une même espèce, une proportion des individus présenterait une stratégie différente par rapport aux autres (Bal et al., 2014).



La virulence de la bactérie symbiotique hébergée par les NEPs est un autre facteur déjà en partie évoqué précédemment. La pathogénicité du nématode pour une espèce d'insecte est liée en partie à la virulence de son symbiote (Zervos et al., 1991; Sicard et al., 2003; Kim et al., 2017). La densité des IJs infestants l'insecte hôte peut influencer la capacité des IJs à tuer l'insecte (Miranda et al., 2013; Elbrense et al., 2021). Par exemple plus la concentration d'IJs augmente et plus la mortalité des larves de *Pieris rapae* est importante (Elbrense et al., 2021).

L'insecte hôte lui aussi exerce une influence sur la capacité du nématode à l'infester. L'établissement de l'infection par le nématode dépend de la capacité du complexe némato-bactérien à supprimer ou à contourner les défenses de l'hôte. Les insectes se défendent eux aussi contre les bactéries symbiotiques et les nématodes avec les réponses immunitaires cellulaires innées et humorales (Boemare et al., 1996; Labaude and Griffin, 2018). La survie des insectes est liée à la capacité de leur système immunitaire à encapsuler les nématodes et à supprimer l'infection provoquée par les bactéries. Celles-ci relâchent des produits immunodépresseurs pour passer cette barrière (Kenney and Eleftherianos, 2016). Une diminution de la valeur nutritionnelle du régime alimentaire de l'hôte à cause de l'impact sur le système immunitaire de l'insecte diminue la pathogénicité et le succès reproducteur des NEPs (Miranda et al., 2013). De plus, le stade de l'insecte hôte a lui aussi un effet sur la pathogénicité des NEPs (Miranda et al., 2013; Labaude and Griffin, 2018). Les pupes et les larves d'insecte sont souvent plus susceptibles aux infections des NEPs que les adultes. Ces différences dans la susceptibilité peuvent être le résultat de plusieurs mécanismes comme les différences dans le comportement, le système immunitaire ou les barrières physiques présentes au moment de la pénétration de nématode (Labaude and Griffin, 2018).

La pathogénicité des NEPs est différente selon l'espèce, voire la souche des NEPs et de leur insecte hôte (Fuxa et al., 1988; Rasmann et al., 2005; Toepfer et al., 2005). Par exemple la sensibilité des larves de *Spodoptera littoralis* est différente selon les souches de NEPs utilisées (Campos-Herrera and Gutiérrez, 2008). Les IJs *S. feltiae* causent une mortalité entre 15-40% contre les larves de *Diabrotica virgifera virgifera* tandis que *S. carpocapsae* et *H. bacteriophora* causent des mortalités de 20% et 30% respectivement (Toepfer et al., 2005). En revanche, *S. carpocapsae* et *S. feltiae* provoquent au maximum 10% de mortalité sur les larves de taupins (Campos-Herrera and Gutiérrez, 2009).

Il existe des écarts entre les pathogénicités des NEPs observées en laboratoire et en champ. Par exemple, la pathogénicité contre *Diabrotica virgifera virgifera* des trois espèces de NEPs, *S. feltiae*, *H. bacteriophora* et *H. megidis*, ajoutées dans les cultures de maïs est amoindrie par rapport aux essais en laboratoire (Toepfer et al., 2008). Au contraire, des essais d'application de NEPs en champ diminuent les populations de taupins tandis que les essais en laboratoire montrent des pathogénicités

faibles (Morton and García-del-Pino, 2009). Certains facteurs ont aussi une influence sur la pathogénicité des NEPs en champ. Par exemple, l'augmentation de l'humidité diminue le pouvoir infestant de *S. feltiae* contre *Spodoptera litura* (Kondo and Ishibashi, 1986), et des souches de *S. feltiae* sont avirulentes contre *Galleria mellonella*, espèce habituellement sensible, dans des sols avec un fort pourcentage d'argile (Campos-Herrera and Gutiérrez, 2009).

*De nombreux facteurs, autant biotiques que abiotiques, influencent la pathogénicité des NEPs. La littérature s'est centrée sur la compréhension de ces facteurs pour prévoir la capacité des NEPs à contrôler des insectes ravageurs en lutte biologique.*

*La découverte du FAM a ouvert de nouvelles perspectives sur la compréhension de la pathogénicité et du cycle parasitaire des NEPs. La vision centrée sur la bactérie symbiotique s'est élargie pour intégrer d'autres bactéries. L'élucidation des rôles de ces bactéries pourrait permettre d'améliorer nos compréhensions sur les échecs de certaines espèces ou souches de NEPs contre différents insectes hôtes.*

#### **IV. Les nématodes entomopathogènes en lutte biologique**

Les nématodes entomopathogènes (NEPs) sont des nématodes parasites d'insectes qui ont une phase libre dans les sols. La possibilité de les produire en masse dans des cultures *in vitro* et leur pathogénicité sur une large gamme d'insectes au moins au laboratoire ont ouvert la voie vers leur utilisation en lutte biologique par augmentation (Shapiro-Ilan and Dolinski, 2015).

De nombreuses limites existent en lutte biologique par augmentation comme la variabilité de l'efficacité, le prix ou les effets sur les organismes non-cibles. Des questionnements peuvent se poser sur le potentiel de ces organismes pour dépasser ces problématiques.

##### **1. Comment sont-ils utilisés en lutte biologique ?**

Aujourd'hui l'utilisation des NEPs en lutte biologique passe en grande partie par une production des nématodes *in vitro* en masse dans des fermenteurs (Campos-Herrera, 2015; Cortés-Martinez and Chavarría-Hernandez, 2020) ou à plus petite échelle *in vivo* sur des insectes d'élevages avant de les appliquer dans les champs (Campos-Herrera, 2015; Shapiro-Ilan et al., 2016). Les NEPs sont ensuite

formulés via l'ajout de différentes molécules, par exemple le polypropylène ou le Na-alginate, pour améliorer leurs résistances à différents facteurs environnementaux tels que les UVs et/ou la dessiccation (Peters, 2016).

Selon les cultures, les recommandations sont d'appliquer entre  $10^6$ - $10^{10}$  NEPs par hectare (Lacey and Georgis, 2012), ce qui représente une quantité importante de NEPs.

## 2. Des exemples d'utilisation en lutte biologique

Il existe des exemples de réussite de l'utilisation des NEPs comme agent de lutte biologique pour contrôler les insectes tels que *Diaprepes abbreviatus*, le charançon des agrumes, et *Cydia pomonella*, le carpocapse des pommiers. En effet, ils enregistrent une efficacité de 90% pour contrôler ces deux insectes dans des vergers, et dans le cas de *D. abbreviatus*, les NEPs sont commercialisés depuis 20 ans dans cet objectif (Lacey and Georgis, 2012). D'autres exemples ont été décrits notamment au Venezuela pour remplacer les insecticides chimiques dans des cultures de tomates ou des serres, ou en Espagne dans des vergers d'abricot (Campos-Herrera, 2015).

Sur les 10 produits à base de NEPs commercialisés par e-nema (<https://www.e-nema.de/en/>), entreprise spécialisée dans la production et la vente de NEPs, seul un produit est destiné à l'utilisation en grande culture pour lutter contre le coléoptère *Diabrotica virgifera*, un ravageur dont la larve attaque les racines de maïs (<https://www.e-nema.de/en/nematodes/professionals/products/>). A ma connaissance, la littérature ne fait pas mention ou très peu d'utilisation de NEPs en grande culture. Il est admis que la lutte biologique avec les NEPs est réservée à des cultures à hautes valeurs ajoutées type verger, maraîchage ou dans des espaces fermés comme les serres (Campos-Herrera, 2015).

## 3. Limites de l'utilisation des NEPs en lutte biologique par augmentation

Il existe aujourd'hui de nombreuses limites dans l'utilisation des NEPs commerciaux comme agent de lutte biologique notamment en grande culture. La première est le prix de vente des NEPs qui selon le taux de NEPs à appliquer en champ peut s'avérer être élevé (Askary and Abd-Elgawad, 2021). En effet, de la production, à la formulation jusqu'au stockage de nombreuses étapes doivent être contrôlées pour commercialiser les NEPs (Shapiro-Ilan and Dolinski, 2015), et cela a un coût important pour l'agriculteur (Campos-Herrera, 2015). Par exemple, chez Koppert (<https://retail.koppert.ca/products/capsanem?variant=42713914048747>), entreprise spécialisée dans la commercialisation d'agents de lutte biologique, 50 millions d'individus sont vendus à 39€. Pour un champ d'un hectare l'utilisation des NEPs en lutte biologique coûte de 39€ à 7800€ selon la quantité

de NEPs à appliquer. De plus, la persistance des NEPs commerciaux dans les sols sur de longue période n'est pas assurée, obligeant l'agriculteur à faire plusieurs applications. Différents facteurs expliquent la faible persistance en champ comme les propriétés physico-chimiques des sols (Lacey and Georgis, 2012), les UVs, la température (Shapiro-Ilan et al., 2014) ou encore l'absence d'insecte hôte en dehors du ravageur pour assurer la persistance des populations (Kurtz et al., 2007).

La deuxième limite à l'utilisation des NEPs, imputable a beaucoup de produits de lutte biologique comme vu précédemment, est la variabilité de leur efficacité. Cette variabilité est causée notamment par différents facteurs : l'humidité, la température, le niveau de pathogénicité de la souche de NEP utilisé pour l'insecte cible, et le taux de NEPs appliqué (Lacey et al., 2015).

Enfin, les effets sur des organismes non-cibles de l'application des NEPs sont peu documentés. La plupart des études concluent que les NEPs ont peu d'effet sur les organismes non cibles (Ulug et al., 2014; Lacey et al., 2015; Labaude and Griffin, 2018). Quelques études ont tout de même montré des effets potentiels en laboratoire contre des espèces de coccinelles, d'abeilles et d'isopodes terrestres (Georgis and Gaugler, 1991; Sicard et al., 2008; Khan and Ahmad, 2019). A ma connaissance, aucune d'étude a été faite en champ, or l'ajout massif de NEPs dans le cadre de la lutte biologique peut perturber les réseaux trophiques des sols. Des effets de compétition sont soupçonnés par certains auteurs avec d'autres organismes pour les mêmes ressources trophiques, par exemple avec des parasitoïdes, ou avec des NEPs autochtones (Ulug et al., 2014; Labaude and Griffin, 2018).

*La lutte biologique par augmentation est la stratégie principale mise en place pour utiliser les NEPs comme agent biologique. Il n'existe pas de documentation détaillée sur un exemple de leur utilisation en lutte biologique par conservation, c'est-à-dire l'utilisation de pratiques agricoles favorisant leur présence. Pour envisager cette stratégie, il est nécessaire de connaître la distribution des NEPs autochtones dans les sols, en particulier les sols agricoles, et les facteurs abiotiques et biotiques qui influencent cette distribution.*

*Le spectre d'hôte généraliste pour la plupart des espèces de NEPs amène des questions sur les effets potentiels de l'ajout de NEPs dans des parcelles cultivées, et leurs effets sur des insectes non-cibles. Même si aucune étude n'a montré d'effets non intentionnels dus à l'ajout de NEPs commerciaux dans les cultures, des doutes peuvent subsister d'autant plus au vu du nombre important d'IJs ajoutés dans les cultures. Une solution de lutte biologique par*

*augmentation possible serait de se focaliser sur la production et l'application des espèces de NEPs qui ont des spectres d'hôtes plus restreints.*

*Favoriser la présence des NEPs autochtones, en lutte biologique par conservation, pourrait être une autre solution pour contrer ce type de problème. En effet, nous pouvons faire l'hypothèse que les NEPs autochtones sont adaptés aux espèces d'insectes naturellement présents dans les parcelles y compris les insectes ravageurs. Quant aux relations entre les NEPs autochtones généralistes et les populations d'insectes, elles suivent probablement les schémas des relations proies-prédateurs qui conduisent soit à un équilibre des deux partenaires par régulation naturelle, soit à un changement d'espèce d'hôte préférentiel et donc une spécialisation. Ce n'est pour l'instant que des hypothèses basées sur des équilibres décrits pour d'autres organismes. Des études en microcosme ou des cultures semi-contrôlées permettraient de cerner les dynamiques des populations de NEPs autochtones en réaction aux dynamiques de population de différentes espèces d'insectes.*

*L'ensemble de cette partie montre que malgré une utilisation des NEPs en lutte biologique de nombreuses lacunes sont toujours présentes dans nos connaissances sur cet agent, ce qui freine son adoption à grande échelle. Néanmoins, la distribution planétaire des NEPs et dans de nombreux écosystèmes, notamment dans les sols agricoles, permet d'envisager un développement en lutte biologique par conservation.*

## **V. La distribution des nématodes entomopathogènes autochtones dans les sols**

Le principe de la lutte biologique par conservation est de favoriser les populations autochtones de l'agent biologique. C'est pourquoi, il est intéressant de connaître la distribution naturelle des NEPs dans les sols, en particulier dans les sols agricoles.

### **1. Dans quels continents sont retrouvés les NEPs ?**

Les NEPs sont présents dans tous les continents exceptés en Antarctique. Néanmoins, la diversité des espèces décrites est très hétérogène. Les continents asiatique et africain ont un nombre maximal d'espèces isolées avec 43 espèces en Asie et 30 espèces en Afrique. En Europe, en Amérique du Nord

et du Sud, une vingtaine d'espèces différentes est enregistrée. En Australie, en revanche, seules sept espèces différentes de NEPs ont été décrites (Kanga et al., 2012; Bhat et al., 2020), six en France (Emelianoff et al., 2008), et trois en Belgique (Miduturi et al., 1996, 1997). Mais le manque d'espèces enregistrées ou l'hétérogénéité peuvent provenir de différentes raisons. Il pourrait s'agir de différences dans les conditions climatiques, abiotiques et biotiques en fonction des régions qui influencent la distribution des NEPs. Mais il pourrait s'agir aussi d'une hétérogénéité d'effort d'échantillonnage selon les régions ce qui donnerait une image biaisée de la répartition des NEPs dans les sols. Par exemple, jusqu'en 2020, en France une seule étude de prospection des NEPs a été publiée, quand il en existait huit en Amérique du Nord (Gaugler, 2002; Bhat et al., 2020).

## 2. Dans quels écosystèmes sont décrits les NEPs ?

Les NEPs ont été détectés dans de nombreux écosystèmes : la plage, la prairie, la forêt, les sols cultivés (Tableaux 2 et 3). Certaines espèces semblent être retrouvées dans de nombreux écosystèmes très contrastés de la plage aux forêts, c'est notamment le cas pour *S. feltiae*, *H. bacteriophora*, *H. indica* et *S. affine* (Tableaux 2 et 3). D'autres espèces semblent plus inféodées à des écosystèmes particuliers comme les forêts de conifères ou les vergers pour *S. arenarium* et *S. bicornum* (Stock et al., 1999; Mráček et al., 2005). Enfin, d'autres sont inféodées à des zones géographiques comme *H. zealandica*, espèce retrouvée dans des vergers, prairies et forêts de la Nouvelle-Zélande (Aryal et al., 2022).

Dans des sols agricoles de différents pays, il a été décrit au minimum 16 espèces de NEPs (Sturhan and Mráček, 2000; Mráček et al., 2005; Lawrence et al., 2006; Emelianoff et al., 2008; Kanga et al., 2012; Tarasco et al., 2015; Jaffuel et al., 2018; Dichusa et al., 2021; Aryal et al., 2022). Ce constat permet d'envisager la lutte biologique par conservation dans de nombreux pays. Pour autant, il est nécessaire de préciser que le nombre d'espèces retrouvées dans les sols agricoles est faible par rapport au nombre total d'espèces de *Steinernema* et *Heterorhabditis* enregistrées (100 et 16 respectivement) (Bhat et al., 2020). Le taux de parcelle positive aux NEPs dans les sols agricoles est aussi très variable allant de 10% à 86% (Mráček et al., 2005; Jaffuel et al., 2017; Blanco-Pérez et al., 2020; Dritsoulas et al., 2020).

**Différentes raisons peuvent expliquer cette variabilité. Premièrement, il est fortement possible que les perturbations des sols liées aux pratiques agricoles influencent négativement la diversité des NEPs présents dans les sols. Deuxièmement, les méthodes de détection des nématodes des sols, en particulier des NEPs, limitent possiblement leur découverte dans les sols agricoles en particulier quand ils sont en faible abondance (voir**

**Tableau 2 : Les types d'écosystèmes où différentes espèces de *Steinernema* sp. ont été découvertes dans différentes parties du monde.**

Espèce	Pays	Habitat	Bibliographie
<i>Steinernema</i> <i>sp.</i>	France	Plage, vigne, forêt conifères et pins	(Emelianoff et al., 2008)
	USA		(Stock et al., 1999)
	Belgique		(Miduturi et al., 1997)
<i>S. affine</i>	UK	Prairie, forêt, vigne, parcelles cultivées, prairies, verger	(Torr et al., 2007)
	Portugal		(Blanco-Pérez, 2020)
	Suisse		(Jaffuel et al., 2018)
	République Tchèque		(Mráček et al., 2005)
	Italie		(Tarasco et al., 2015)
	USA		(Stock et al., 1999)
	France		(Emelianoff et al., 2008)
<i>S. kraussei</i>	Allemagne	Forêt, bordures cultures, parcelles cultivées, prairies	(Sturhan and Mráček, 2000)
	Portugal		(Campos-Herrera et al., 2007)
	Suisse		(Jaffuel et al., 2018)
	Canada		(Stock et al., 1999)
<i>S. intermedium</i>	Suisse	Parcelles cultivées, forêt, prairies	(Jaffuel et al., 2018)
<i>S. poinari</i>	Suisse	Parcelles cultivées, forêt, prairies	(Jaffuel et al., 2018)
<i>S. silvaticum</i>	République Tchèque	Parcelles cultivées, prairies	(Mráček et al., 2005)
<i>S. bicornum</i>	République Tchèque	Verger	(Mráček et al., 2005)
<i>S. arebarium</i>	Portugal	Chênaie, pinède, verger	(Campos-Herrera et al., 2019)
<i>S. oregonense</i>	USA	Forêt conifères	(Stock et al., 1999)
<i>S. ichnusae</i>	Italie	Côtes, forêts feuillus	(Tarasco et al., 2015)
<i>S. apuliae</i>	Italie	Prairies, pinèdes, zones humides, côtes	(Tarasco et al., 2015)
<i>S. riojaense</i>	Portugal	Vigne	(Blanco-Pérez, 2020)
<i>S. carpocapsae</i>	Portugal	Prairie, côtes, bordures cultures, parcelles cultivées, verger	(Campos-Herrera et al., 2007)
	Suisse		(Jaffuel et al., 2018)
	Italie		(Tarasco et al., 2015)
	USA		(Stock et al., 1999)
<i>S. feltiae</i>	France	Prairie, vigne, parcelles cultivées, chênaie, pinède, verger, bordures cultures, cave	(Emelianoff et al., 2008)
	Portugal		(Campos-Herrera et al., 2019)
	Portugal		(Blanco-Pérez, 2020)
	Portugal		(Campos-Herrera et al., 2007)
	Suisse		(Jaffuel et al., 2018)
	USA		(Lawrence et al., 2006)
	Espagne		(Morton and García-del-Pino, 2009)
	Australie		(Aryal et al., 2022)
	République Tchèque		(Mráček et al., 2005)
	Italie		(Tarasco et al., 2015)
	Belgique		(Miduturi et al., 1997)

**Tableau 3 : Les types d'écosystèmes où différentes espèces de *Heterorhabditis* sp. ont été découvertes dans différentes parties du monde.**

Espèce	Pays	Habitat	Bibliographie
<i>Heterorhabditis</i> sp.	USA	Côtes	(Stock et al., 1999)
<i>H. bacteriophora</i>	Portugal	Plage, prairie, vigne, parcelles cultivées, chênaie, pinède, verger, bordures de cultures	(Campos-Herrera et al., 2019)
	Portugal		(Blanco-Pérez, 2020)
	Suisse		(Jaffuel et al., 2018)
	USA		(Lawrence et al., 2006)
	Espagne		(Morton and García-del-Pino, 2009)
	Australie		(Aryal et al., 2022)
	Italie		(Tarasco et al., 2015)
	France		(Emelianoff et al., 2008)
<i>H. baujardi</i>	Cameroon	Parcelles cultivées, prairies	(Kanga et al., 2012)
<i>H. megidis</i>	Belgique	Côtes, parcelles cultivées, forêt, prairies	(Miduturi et al., 1997)
	Suisse		(Jaffuel et al., 2018)
	Danemark		(Griffin et al., 1999)
<i>H. indica</i>	Portugal	Chênaie, pinède, verger, vigne, prairies, parcelles cultivées	(Campos-Herrera et al., 2019)
	Philippines		(Blanco-Pérez, 2020)
	Australie		(Dichusa et al., 2021)
<i>H. zealandica</i>	Australie	Verger, prairies, forêts	(Aryal et al., 2022)
<i>H. marelatus</i>	Australie	Verger, prairies, forêts	(Aryal et al., 2022)





*chapitre 1). Troisièmement, le nombre d'études, surtout récentes, portant sur la description des espèces de NEPs dans les sols agricoles est faible. Quatrièmement, la distribution des espèces dans les sols est fonction de différents facteurs biotiques et abiotiques. Ainsi, l'identification des facteurs prépondérants qui expliquent la distribution et la diversité des espèces de NEPs dans les sols, en particulier dans les sols agricoles, est un enjeu majeur.*

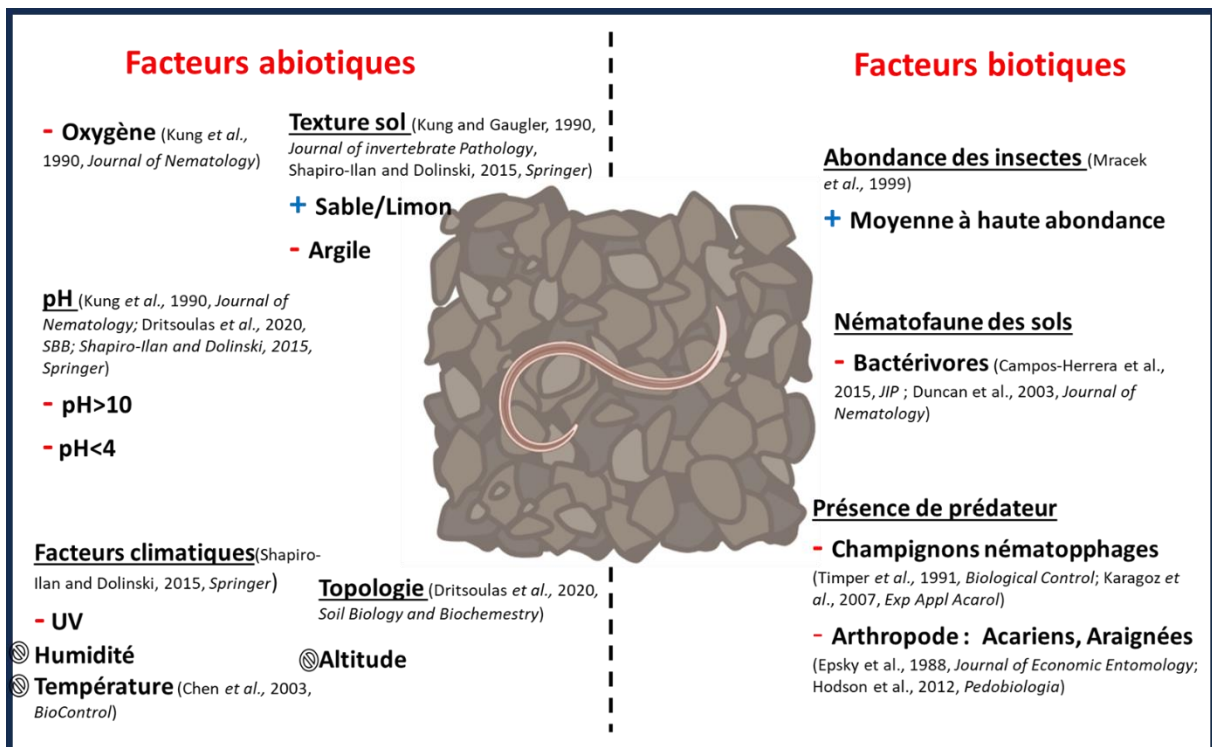
## **VI. Les facteurs qui influencent la distribution des nématodes entomopathogènes dans les sols**

De manière surprenante, la bibliographie disponible sur l'écologie des NEPs enregistre une forte diminution entre 2005 et 2016. Il y a une explosion des études mécanistiques, moléculaires, et surtout des essais en laboratoire de pathogénicité contre des insectes ravageurs de culture. Les études portant sur les facteurs influençant la distribution des NEPs sont très parcellaires, et ne portent pas sur différent contexte pédo-climatique. Il arrive que d'une étude à une autre les facteurs prépondérants affectant la présence des NEPs soient complètement différents. A cela s'ajoute un manque de littérature sur l'effet des pratiques agricoles sur la diversité des NEPs dans les sols.

### **1. Les facteurs abiotiques**

#### ***a. Les conditions climatiques***

La température a un rôle dans le succès ou le temps de l'émergence de nouveaux IJs (succès parasitaire) et le nombre de d'IJs émergents (succès reproducteur) (Molyneux, 1986; Kung et al., 1991; Zervos et al., 1991; Chen et al., 2003; Shapiro-Ilan and Dolinski, 2015). Selon les espèces de NEPs ou l'insecte hôte, le spectre de température, où les NEPs sont actifs, est différent (Chen et al., 2003). Les précipitations, et donc le taux d'humidité des sols, expliquent également grandement la présence/absence des NEPs dans les sols (Campos-Herrera et al., 2007; Shapiro-Ilan and Dolinski, 2015). Un taux d'humidité minimum de 4% est nécessaire pour assurer la survie des NEPs. En revanche, un taux d'humidité trop élevé peut influencer négativement cette survie, en limitant l'oxygène dans les sols (Kung et al., 1990a, 1991).



**Figure 18 : Principaux facteurs qui influencent la présence des NEPs dans les sols.** Les croix bleues indiquent un effet bénéfique du facteur et au contraire les barres rouges indiquent un effet négatif du facteur sur la présence des NEPs.

### **b. La topologie**

Les espèces du genre *Heterorhabditis* sont plus abondantes à des altitudes faibles, en dessous de 300m, tandis que les espèces du genre *Steinernema* sont plus abondantes à plus de 300m d'altitude (Mráček et al., 2005; Campos-Herrera et al., 2007; Dritsoulas et al., 2020).

### **c. Les propriétés physico-chimiques des sols**

Le pourcentage d'argile des sols diminue la survie et la pathogénicité des NEPs dans les sols, car la présence d'argile conduit à une réduction des pores et donc une restriction des mouvements des nématodes (Kung et al., 1990b; Campos-Herrera, 2015; Tarasco et al., 2015; Campos-Herrera et al., 2019a; Dritsoulas et al., 2020). Les sols sableux sont favorables à la présence de *S. glaseri* par rapport aux sols limoneux puisque les IJs de cette espèce sont plus grands, et ont donc besoin de pores plus grands (Kung et al., 1990b). Le pH a également une influence prépondérante (Shapiro-Ilan and Dolinski, 2015; Campos-Herrera et al., 2019a). Ainsi, la gamme de pH tolérée par les *Steinernema* spp. se situe entre 4 et 10 (Kung et al., 1990a). Un pH élevé diminue l'abondance des NEPs dans les sols agricoles (Dritsoulas, 2020). Enfin, la quantité de matière organique dans les sols influence aussi la distribution des espèces de NEPs dans les sols (Kruitbos et al., 2010; Kapranas et al., 2017) (Figure 18).

Il est à noter que selon les études les facteurs qui influencent la distribution des NEPs ne sont pas toujours les mêmes. Par exemple une étude de Dritsoulas et al., 2020 ne retrouve pas d'effet de la température, de l'humidité et du pH des sols de plantation d'agrumes, palmiers, pin et chêne au Portugal sur la présence des NEPs. L'étude de Campos-Herrera et al, 2007 ne retrouve pas d'effet négatif du pourcentage d'argile sur la présence des NEPs. Sans analyse plus poussée, il est donc très difficile d'identifier des paramètres abiotiques universels expliquant la distribution des NEPs.

## **2. Les facteurs biotiques**

### **a. L'abondance et la présence d'insectes**

Il semble que les NEPs sont plus présents dans les sols où une forte ou moyenne abondance d'insectes ont été enregistrées (Mráček and Bečvář, 2000) (Figure 18).

### **b. La présence d'organismes antagonistes aux NEPs**

La présence des NEPs dans les sols est corrélée négativement à la présence de champignons nématophages (Campos-Herrera et al., 2019b), avec certaines espèces de NEPs qui seraient plus sensibles que d'autres (Raja et al., 2021). Par exemple, des sols infestés avec *Hirsutella rhossiliensis* diminuent la survie de *S. carpocapsae*, *S. glaseri*, *H. bacteriophora* (Timper et al., 1991). Des

arthropodes nématophages comme des acariens, des collemboles et des araignées peuvent être des prédateurs des IJs dans les sols (Epsky et al., 1988; Hodson et al., 2012; Raja et al., 2021), avec là encore des effets différents selon les espèces. Par exemple, l'acarien *Sancassania* sp. se nourrit plus des IJs appartenant à l'espèce *S. feltiae* qu'à ceux de l'espèce *H. bacteriophora* (Karagoz et al., 2007) (Figure 18).

Il existe des compétitions interspécifiques avec les nématodes bactérivores, en particulier ceux appartenant au genre *Oscheius*. Ces compétitions ont été observées dans le cadavre par PCRq après que les IJs de NEPs ont tué l'insecte. L'hypothèse est que les nématodes bactérivores opportunistes se nourrissent des bactéries présentes dans le cadavre entraînant une compétition pour la ressource nutritive avec les NEPs (Duncan et al., 2003; Campos-Herrera et al., 2015b, 2019b; Zhang et al., 2019).

Les cadavres infestés par les NEPs réduisent les populations de nématodes phytoparasites (Kenney and Eleftherianos, 2016). L'hypothèse est que cet effet serait indirect et médié par les bactéries symbiotiques qui produisent de nombreux métabolites spécialisés à effet nématicide.

Les différentes espèces de NEPs peuvent également interagir entre elles dans les sols et dans l'insecte hôte soit par des phénomènes de compétition ou des phénomènes de coopération (Alatorre-Rosas and Kaya, 1990; Půža and Mráček, 2009; Griffin, 2012). Par exemple, l'infestation des IJs de *S. affine* sur les larves de *G. mellonella* empêche l'émergence des IJs de *S. kraussei* quelque soit l'ordre dans lequel les IJs sont appliqués (Půža and Mráček, 2009). Une co-injection d'IJs appartenant aux espèces *S. affine* et *S. feltiae* dans une même larve de *G. mellonella* produit des IJs émergents appartenant à l'espèce *S. affine* (Murfin et al., 2019).

Les plantes peuvent sécréter dans les sols, lorsqu'elles sont attaquées par des ravageurs, des composés organiques volatils (VOCs). Ces VOCs ont un pouvoir attractant sur les NEPs augmentant leur mobilité dans les sols (Rasmann et al., 2005; Ali et al., 2010; Oota et al., 2020). Les racines de maïs attaquées par les larves de *Diabrotica virgifera virgifera* émettent du (E)- $\beta$ -caryophyllène qui a un effet attracteur sur les NEPs (Rasmann et al., 2005).

### 3. Les pratiques agricoles

La présence des NEPs dans les sols agricoles varie d'une étude à l'autre. Par exemple, seulement 5 à 10% des parcelles de verger en Italie (Tarasco et al., 2015) sont positives aux NEPs tandis que 80% des parcelles cultivées sont positives au Maroc (Benseddik et al., 2020). Certains produits phytosanitaires diminuent la survie des NEPs : abamectin, acephale, aldirbarb, dodine, fenamiphos, methomyl, parathion, telfubenuron, tandis que d'autres n'ont montré aucune influence : carbaryl, chlorpyrifos,

diméthoate, endosulfan, fonofos, tefluthrin, imidacloprid (Shapiro-Ilan and Dolinski, 2015; Blanco-Pérez, 2020; Özdemir, 2020). La diversité du couvert végétal améliore la présence et la diversité des NEPs dans les sols, par exemple entre les rangs des plans de vignes dans le cas de la viticulture (Blanco-Pérez, 2020). Mais les couverts végétaux avec du pois et de la moutarde ne montrent aucune influence sur la présence des NEPs et leur diversité dans les sols cultivés avec des cultures annuelles (Jaffuel, 2017). L'irrigation des cultures est connue pour favoriser la présence des NEPs (Campos-Herrera et al., 2022).

A ma connaissance ces dernières études sont les seules qui ont décortiqué les effets de pratiques agricoles particulières. Les autres études se sont souvent contentées de préciser la présence des NEPs dans les sols par rapport à d'autres types d'habitats comme des prairies ou de comparer leur présence en fonction des plantes cultivées (Mráček et al., 2005; Lawrence et al., 2006; Campos-Herrera et al., 2007; Morton and García-del-Pino, 2009; Tarasco et al., 2015; Jaffuel et al., 2018; Benseddik et al., 2020; Aryal et al., 2022).

*Il est à noter que les facteurs présentés dans cette partie V. (abiotiques, biotiques et pratiques agricoles) sont rarement étudiés en interaction au sein de la même étude. La rareté de ce type d'étude peut être expliquée autant par la complexité à la réaliser que par la lourdeur du travail à engager pour obtenir suffisamment de données. Pourtant, quelques rares études ont montré que l'influence de la combinaison de plusieurs facteurs n'est pas la même que chaque facteur pris indépendamment, ce qui démontre l'intérêt de ce type d'approche. L'ajout de la matière organique et la texture des sols favorisent ou défavorisent certaines espèces de NEPs. Mais cet ajout peut modifier les communautés de nématodes bactériophages des sols qui sont potentiellement des compétiteurs avec les NEPs dans les cadavres d'insecte.*

## Contexte et objectifs de la thèse

---

Les NEPs parasitent et tuent une large gamme d'espèces d'insectes différentes (Peters, 1996) en moins de 120h (Dillman et al., 2012). Ces deux caractéristiques les rendent intéressants pour leur utilisation en lutte biologique. Aujourd'hui les NEPs sont des agents de lutte biologique par augmentation (ajout d'un organisme dans l'environnement pour contrôler un bioagresseur) dans des cultures à hautes valeurs ajoutées telles que les maraichages, les cultures ornementales et les vergers (Lacey et al., 2015). De nombreuses limites existent dans leur utilisation en lutte biologique par augmentation, le coût et la variabilité de l'efficacité (Campos-Herrera, 2015; Lacey et al., 2015). Cependant, les NEPs sont présents dans tous les continents excepté l'Antarctique (Bhat et al., 2020) ce qui permet d'envisager leur utilisation en lutte biologique par conservation (favorisation par des pratiques agricoles d'un organisme natif pour contrôler le bioagresseur). Aujourd'hui, il s'agit de l'enjeu autour des NEPs et de la lutte biologique. Mais cet enjeu nécessite une bonne connaissance sur leur distribution dans les sols agricoles, les facteurs qui favorisent leur présence, et les facteurs qui influencent leur pathogénicité contre des insectes ravageurs. Plusieurs méthodes existent pour détecter les NEPs dans les sols : le piégeage sur insecte (Bedding and Akhurst, 1975), l'extraction par la méthode de Baermann et l'identification par des critères morphologiques (Curran and Heng, 1992; Kaya and Stock, 1997), et plus récemment la PCR quantitative (PCRq) (Campos-Herrera et al., 2011), chacune de ces méthodes a des limites qui ne permettent pas une détection optimale des NEPs dans les sols agricoles. Certains facteurs abiotiques (température, texture des sols, pH, pratiques agricoles) (Kung et al., 1990a; Shapiro-Ilan and Dolinski, 2015; Matuska-Lyzwa et al., 2024) et biotiques (prédateurs et compétiteurs dans le cadavre de l'insecte) (Campos-Herrera et al., 2015b; Helmberger et al., 2018) influencent la distribution des NEPs. Cependant, les effets de ces facteurs sont très variables. De plus la pathogénicité et la réussite du cycle parasitaire des NEPs sont dépendantes de nombreux facteurs comme l'insecte hôte et le symbiote (Fuxa et al., 1988; Caroli et al., 1996; Sicard et al., 2003). La description d'un microbiote associé aux NEPs appelés FAM (Frequently Associated Microbiota) (Ogier et al., 2020) offre de nouvelles perspectives sur l'implication du FAM sur le cycle parasitaire des NEPs.

La thèse que j'ai menée s'inscrit dans ce contexte et a trois objectifs :

1/ Proposer une nouvelle méthodologie pour améliorer la détection des NEPs en vue de décrire leur présence dans les sols agricoles

Pour répondre à cet objectif, 43 parcelles cultivées en maïs ont été échantillonnées en 2021 dans le Sud-Ouest de la France. Nous avons utilisé trois méthodes différentes pour détecter les NEPs : i)

directement sur les échantillons de sols composites un piégeage avec des cycles multiples sur *Galleria mellonella* ; sur des échantillons de nématodes mobiles extraits des sols ii) par la méthode d'identification sur critère morphologique et iii) par les méthodes moléculaires avec deux techniques moléculaires PCRq et droplet digital PCR (ddPCR).

Les résultats de ce premier objectif sont présentés dans le chapitre 1 et ont fait l'objet d'une première publication.

## 2/ Déterminer les facteurs qui influencent la présence des NEPs

Nous avons collecté des données sur les 43 parcelles sur les propriétés physico-chimiques des sols, les pratiques agricoles menées, et la composition de la nématofaune des sols. Nous avons décidé d'utiliser deux stratégies d'analyses différentes pour dégager les facteurs affectant la présence des NEPs : une stratégie d'analyse facteur par facteur, et une stratégie de modèle prédictif pour étudier l'effet de plusieurs facteurs.

Les résultats de ce deuxième objectif sont présentés dans le chapitre 2 et feront l'objet d'une deuxième publication qui sera soumise en octobre.

## 3/ Déterminer les facteurs qui influencent la réussite du cycle parasitaire des NEPs

Nous avons évalué le cycle parasitaire des isolats de NEPs collectés dans les parcelles cultivées en maïs sur deux insectes ravageurs *Spodoptera littoralis* et *Diabrotica virgifera virgifera*. Puis nous avons déterminés la composition du microbiote des isolats de NEPs par métabarcoding. Nous avons tenté de corréler le cycle parasitaire et les profils microbiens des isolats des NEPs.

Cette dernière partie est toujours en cours d'analyse et le chapitre 3 présentera les premiers résultats obtenus. Cet objectif fera l'objet d'une troisième publication ultérieure.





## Chapitre 1 : Une nouvelle approche méthodologique de détection des nématodes entomopathogènes pour étudier leur distribution dans les cultures de maïs dans le sud-ouest de la France

---

Les nématodes entomopathogènes (NEPs) sont présents dans tous les continents excepté l'Antarctique. Le nombre d'espèces présentes dans les sols est variable d'un continent à l'autre. Par exemple, 43 espèces de NEPs différentes ont été découvertes en Asie contre 7 espèces en Australie (Bhat et al., 2020). Cette hétérogénéité peut être imputée à différents facteurs. Les conditions climatiques, abiotiques et biotiques différentes en fonction des régions peuvent influencer la distribution des NEPs. Mais cette hétérogénéité pourrait aussi s'expliquer par un effort d'échantillonnage différent selon les régions (Bhat et al., 2020). En France seulement 6 espèces ont été recensées à ce jour : *Steinernema carpocapsae*, *Steinernema feltiae*, *Steinernema kraussei*, *Steinernema boemarei*, *Steinernema affine* et *Heterorhabditis bacteriophora* (Emelianoff et al., 2008). A notre connaissance, une seule étude, Emelianoff et al., (2008), a recherché la présence des NEPs dans différents types d'habitats (plages, vignes biologiques, pinèdes, cultures biologiques, prairies) en France. Un manque de prospection en France pourrait être à l'origine d'une faible connaissance sur la distribution des NEPs dans nos sols, et en particulier dans nos sols agricoles. La plupart des études qui décrivent la distribution des NEPs dans les sols utilise une méthode d'isolement indirect pour les détecter : le piégeage avec un insecte. Il consiste en l'ajout de larves d'insectes en laboratoire, en général *Galleria mellonella* (Lepidoptera : Pyralidae), à la surface des échantillons de sols. Le temps de piégeage s'étale généralement sur une période de 4-7 jours selon les études (Bedding and Akhurst, 1975), et est réalisé à l'obscurité. Les cadavres d'insectes parasités sont ensuite récupérés et placés dans des dispositifs de récolte (White, 1927). Les nématodes émergents sont ensuite identifiés et récoltés (Bedding and Akhurst, 1975; Abd-Elgawad, 2021). Cette méthode n'est pas sans limite, plusieurs facteurs sont connus pour influencer le taux de détection, parmi lesquels l'espèce d'insecte utilisée comme piège, la température d'incubation, et l'état d'infectiosité des NEPs (Campos-Herrera and Gutiérrez, 2008; Aryal et al., 2022; Chen et al., 2003). D'autres méthodes ont été utilisées ponctuellement pour détecter les NEPs dans les sols. Par exemple, certains auteurs ont utilisé l'extraction des nématodes des sols par la méthode Funnel Baermann suivie par une identification morphologique sous loupe des NEPs (Curran and Heng, 1992; Sturhan and Mráček, 2000). Depuis 2011, la méthode de PCR quantitative en temps réel (PCRq) a été développée dans un le but de détecter et quantifier les NEPs, préalablement extraits des sols par la technique de centrifugation sur gradient de sucrose, en utilisant des couples d'amorces espèces spécifiques ciblant la région du gène ITS des NEPs (Campos-Herrera et al., 2011; Dritsoulas et al., 2020).

Toutes ces méthodes ont leurs avantages mais aussi leurs limites, conduisant généralement à une sensibilité différente de détection des NEPs dans chacun des cas (Sturhan and Mráček, 2000; Campos-Herrera et al., 2019a; Dritsoulas et al., 2020).

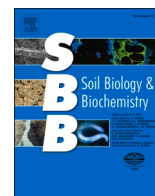
Ce premier chapitre vise à répondre à plusieurs objectifs :

1/ optimiser la méthode d'isolement par piégeage sur *Galleria mellonella* : allongement de la durée de piégeage sur plusieurs semaines et remplacement systématique des cadavres par de nouvelles larves d'insecte

2/ évaluer la méthode d'identification morphologique des NEPs dans des échantillons de nématofaune totale extraite du sol

3/ à partir de ces échantillons de nématodes extraits du sol, comparer la sensibilité de détection de deux méthodes moléculaires : la PCR quantitative en temps réel (PCRq), et la technologie de *droplet digital PCR* (ddPCR) qui n'a encore jamais été testée chez les NEPs.

Ce travail a été valorisé par une publication dans *Soil Biology and Biochemistry* (voir p.75). Dans cette publication, nous avons fait l'hypothèse qu'une approche multiméthode améliorerait notre capacité à détecter la présence et la diversité des NEPs dans les sols agricoles. Pour tester cette hypothèse, nous avons échantillonné 43 parcelles cultivées en maïs dans le sud-ouest de la France, plus précisément dans la région de Pau et d'Orthez. Sur les échantillons de sols composites collectés, trois méthodes différentes ont été utilisées pour évaluer la présence et la diversité de NEPs dans les sols. Pour permettre l'isolement et la caractérisation des NEPs présents dans ces sols cultivés en maïs, la méthode des cycles successifs de piégeage, basée sur l'allongement de la période de piégeage et le remplacement des cadavres d'insectes par de nouvelles larves, a été choisie. L'insecte piège est *Galleria mellonella* qui est un insecte usuellement utilisé pour le piégeage des NEPs. Les deux autres méthodes ont été testées sur des échantillons de nématodes extraits du sol. Dans ces échantillons, les NEPs ont été, d'une part, identifiés morphologiquement, et d'autre part, détectés par des outils moléculaires (PCRq et ddPCR). La combinaison de toutes ces méthodes a permis de détecter la présence de NEPs dans la moitié des parcelles cultivées en maïs. De manière intéressante, l'utilisation de la ddPCR a augmenté notre capacité de détection des NEPs par rapport à la méthode de qPCR. Une combinaison systématique de la méthode de piégeage par cycles multiples et la méthode de ddPCR sur des échantillons de nématodes libres des sols pourrait ainsi permettre d'améliorer la description de la distribution des NEPs dans les sols, en particulier dans les sols agricoles.



## Combining multiple baiting cycles with digital droplet PCR optimizes description of the distribution of entomopathogenic nematodes in French maize fields

Elisabeth Depuydt<sup>a,b</sup>, Jean Claude Ogier<sup>a</sup>, Nusrat Ali<sup>c</sup>, Cécile Villenave<sup>d</sup>, Anne Jimenez<sup>d</sup>, Patrice Mahieu<sup>e</sup>, Brendan Vouadec<sup>a</sup>, Eric Nguema-Ona<sup>b</sup>, Sophie Gaudriault<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> DGIMI, Univ Montpellier, INRAE, Montpellier, France

<sup>b</sup> CMI-Roullier, Plant Nutrition Department, Crop Management Under Biotic and Abiotic Stress Group, Saint Malo, France

<sup>c</sup> CMI-Roullier, Phys-Chem and BioAnalytics Department, Saint Malo, France

<sup>d</sup> ELISOL Environnement, Congénies, France

<sup>e</sup> Chamber of Agriculture, Pau, France

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Entomopathogenic nematodes  
French maize fields  
Multiple baiting cycles  
Quantitative real-time PCR  
Digital droplet PCR

### ABSTRACT

Entomopathogenic nematodes (EPNs) from the genera *Steinernema* and *Heterorhabditis* are soil-dwelling parasites that feed on insect larvae. They are valuable auxiliaries in the fight against insect pests of crops used in market gardening and through the addition of non-native EPNs. However, a better description of the natural distribution of EPNs in agricultural soils will be required to foster their use in crop management programs. The objective of this study was to develop an optimal methodology for obtaining an accurate picture of the presence and diversity of EPNs in the maize fields around Pau in South-West France. We combined different approaches for the detection of EPNs in 43 maize plots. We optimized a method for isolating EPNs directly from soil samples based on multiple baiting cycles with *Galleria mellonella*. With this approach, *Steinernema* and *Heterorhabditis* were isolated from 25.5% to 2.5% of the plots, respectively. We also extracted the soil nematofauna. An initial morphological identification of the EPNs present in these samples led to the detection of *Steinernema* and *Heterorhabditis* in 2.5 % and 7% of the plots, respectively. We then applied molecular detection techniques to the nematofauna samples, focusing on *Steinernema*. We detected *Steinernema* in 16.5% of plots by quantitative real-time PCR (qPCR) and in 35% of plots by digital droplet PCR (ddPCR). We propose a combination of multiple baiting cycles on soil samples with soil nematofauna extraction followed by ddPCR to optimize the detection of EPNs for the analysis of their distribution in agricultural soils.

### 1. Introduction

Entomopathogenic nematodes (EPNs) are soil-dwelling parasites that kill a large range of insects. They are valuable auxiliaries for the biological control of insect pests of crops and are currently used in market gardening, in which non-native EPNs are added to the soil (augmentative biological control) (Lacey et al., 2015). EPNs are present on all continents except Antarctica (Gaugler, 2002; Campos-Herrera, 2015; Bhat et al., 2020). They differ from other scavenging or opportunist insect-parasitic nematodes in two ways: EPNs kill insects rapidly, within five days of infestation, and they have a sustainable mutualistic association with an entomopathogenic bacterium (Dillman et al., 2012).

Only two genera of nematodes, *Steinernema* and *Heterorhabditis*, strictly satisfy this definition. They are associated with bacterial endosymbionts belonging to the genera *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*, respectively (Ogier et al., 2023). EPNs survive in soils as a resistant form, the infective juvenile (IJ). IJs mainly enter the insect host via natural openings (mouth, anus). They then release their entomopathogenic bacteria into the insect hemolymph, leading to septicemia and the death of the insect (Heppert et al., 2022).

The use of EPNs at a non-prohibitive cost on arable crops, including cereals — in conservation biological control, for example — remains a major challenge for the future. To this end, an accurate description of the distribution of native EPNs in agricultural soils is required. The

\* Corresponding author. UMR DGIMI, CC54, Université de Montpellier, Place Eugène Bataillon, 34095, Montpellier, Cedex 05, France.  
E-mail address: [sophie.gaudriault@umontpellier.fr](mailto:sophie.gaudriault@umontpellier.fr) (S. Gaudriault).

occurrence of EPNs in agricultural soils varies widely according to the type of crop, geographic location, and agricultural practices (Lazarova et al., 2021). Moreover, various abiotic and biotic factors (desiccation, UV irradiation, temperature and the presence of predators and competitors) influence the survival of EPNs in soils (Shapiro-Ilan and Dolinski, 2015; Shapiro-Ilan et al., 2016). For example, in the Mediterranean basin and Southern Europe, EPN detection rates range from 0 to 88% of the sampled fields (Campos-Herrera et al., 2007; Emelianoff et al., 2008; Tarasco et al., 2015; Benseddik et al., 2020).

Before 1975, EPN detection in soils was based on searches for infested cadavers on the soil surface. However, an *ex situ* method of baiting with *Galleria mellonella* (Lepidoptera:Pyralidae), a highly susceptible insect, was subsequently developed (Bedding and Akhurst, 1975). Capture efficiencies of 20–40% were reported following the addition of *Galleria mellonella* larvae to soil samples in the laboratory (Bedding and Akhurst, 1975; Fan and Hominick, 1991). In some cases, the use of other insects, such as *Tenebrio molitor* (Coleoptera:Tenebrionidae), as bait resulted in higher levels of capture (Aryal et al., 2022). Multiple baiting cycles with *G. mellonella* on the same soil sample over a period of seven days to one month also increased the number of soils testing positive (Abd-Elgawad, 2020).

In a few studies, EPNs were also detected by direct observation of the nematofauna after extraction from soil samples with a Baermann funnel or flotation techniques (Kaya and Patricia Stock, 1997). The efficacy of EPN detection by direct observation is in the range of 7–70% (Saunders and All, 1982; Curran and Heng, 1992; Sturhan and Mráček, 2000). Molecular detection methods have recently been developed for the description of EPNs following the extraction of the nematofauna from soil samples with a flotation technique. Specific primers have been developed for quantitative real-time PCR (qPCR) to detect several *Steinernema* and *Heterorhabditis* species in these extracts (Campos-Herrera et al., 2011). The use of qPCR techniques increases the sensitivity of detection two- or three-fold relative to baiting, depending on the EPN species considered (Campos-Herrera et al., 2011, 2019a). The use of high-throughput sequencing (HTS) on samples of this kind has also recently been shown to increase further the number of plots testing positive for EPNs relative to qPCR detection (Dritsoulas et al., 2020).

Digital droplet PCR (ddPCR) opened up new possibilities for the absolute quantification of nucleic acids present at low abundance in a given sample (Hindson et al., 2011). This system, based on droplet partitioning, can detect DNA at levels two orders of magnitude lower than can be detected by qPCR (Hindson et al., 2011). This greater sensitivity has led to the widespread use of ddPCR methods for the diagnosis of infectious disease, including the detection of parasitic nematodes or their eggs (Elmahalawy et al., 2018; Baltrušis et al., 2019; Chen et al., 2022; Iamrod et al., 2022). However, to the best of our knowledge, ddPCR methods have never before been used to detect EPNs in soil samples or nematofauna samples extracted from soil.

The objective of this study was to develop an optimal method for obtaining an accurate picture of the presence and diversity of EPNs in maize fields in South-West France. Maize is a crop of considerable economic interest in this region. It is grown in diverse agricultural systems and is subject to pressures due to various crop pests. We used three different methods of EPN detection in maize plots. We first used a method in which nematodes were directly isolated from collected soil samples by multiple cycles of baiting with the insect most commonly used for trapping, *G. mellonella*. We then extracted the nematofauna from the soil samples and performed morphological EPN identification and the molecular EPN quantification based on qPCR and ddPCR.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Sites and sampling design

Soil samples were obtained in summer (June and July) 2021 from maize fields in South-West France. We sampled 43 plots planted with

maize distributed around Pau and Orthez (Fig. 1). This region, Pyrénées-Atlantiques, is characterized by a mean annual temperature of 12.8 °C, and an annual precipitation of 1081.0 mm (Data from Météo France, 1991–2020). We collected 15–20 subsamples of soil from each plot. Subsamples were taken at a depth of 0–20 cm, at randomly selected sites within a representative area of 10 m<sup>2</sup>, with a distance of 1 m between subsamples. The soil subsamples were mixed to form a composite soil sample for each plot. These composite soil samples were sieved (8 mm mesh) to eliminate large elements. About 2 kg of sieved soil was obtained for each plot and was subjected to various analyses (soil physicochemical analysis, baiting of entomopathogenic nematodes, extraction of the mobile nematofauna from soils). Soil physicochemical analysis was performed by SADEF (Aspach-le-Bas France) (SADEF, France). Soil texture analysis for the 43 plots indicated that the soil was mostly loamy, containing 18% ± 4% clay, 56% ± 10% loam and 26% ± 11% sand, with a mean organic carbon content of 2.4% ± 1.2% and a pH of 6.0 ± 0.6.

### 2.2. Baiting of entomopathogenic nematodes with *Galleria mellonella* larvae

A first batch of the composite soil sample was used for the baiting of EPNs with *Galleria mellonella* larvae reared at 28 °C in the dark with honey and pollen. Baiting experiments were performed in duplicate, as described by Abd-Elgawad (2020), but with the following modifications. Three last-instar larvae of *G. mellonella* were added to a 300 g composite soil sample in a plastic box with a lid. Plastic box was placed at 23 °C. Larval mortality was checked every two days over a period of three weeks, with the cadavers systematically removed and replaced with a new insect larva. After three weeks, baiting was stopped when no dead larvae were found after 7 days. Cadavers were placed in a White trap (White, 1927) in the dark at 23 °C and nematode emergence was assessed daily for 30 days. The first generation of IJs emerging from the *G. mellonella* larvae placed on the soil samples is referred to here as G0 (Fig. 2A). The G0 IJs were used for a second round of *G. mellonella* infestation to produce the next generation (G1) of IJs. IJs of *Steinernema* and *Heterorhabditis* were stored in Ringer's solution (Merck) at 9 °C and 15 °C, respectively.

### 2.3. Verification of Koch's postulate

The pathogenicity of EPNs was evaluated on the G1 generation of IJs. We placed 20 *G. mellonella* larvae individually in 1.5 mL tubes lined by filter paper. We added 100 IJs to each tube. The tubes containing the larvae were then placed in the dark at 23 °C and incubated for six days, with larval mortality checked daily. Cadavers were placed in a White trap (White, 1927) and the emergence of IJs was assessed over the next 15 days. The time required for 50% of the larvae to die (LT<sub>50</sub>) was also determined.

### 2.4. Extraction of DNA from nematodes

We extracted genomic DNA from 100 individuals in 1.5 mL Ringer's solution (Merck) as described by Ogier et al. (2019) but with a few modifications. Briefly, for the protein precipitation step, phenol chloroform extraction was replaced by addition of 100 µL protein precipitation solution from the Wizard kit (Promega, France). Samples were incubated on ice for 20 min and were then centrifuged for 10 min at 15,000×g. The supernatant was transferred to a new Eppendorf containing 600 µL isopropanol, which was then placed at –20 °C overnight. The sample was then centrifuged (15,000×g, 30 min). The DNA pellet was washed twice with 70% ethanol, resuspended in 50 µL rehydration solution from the Wizard kit and stored at –20 °C.

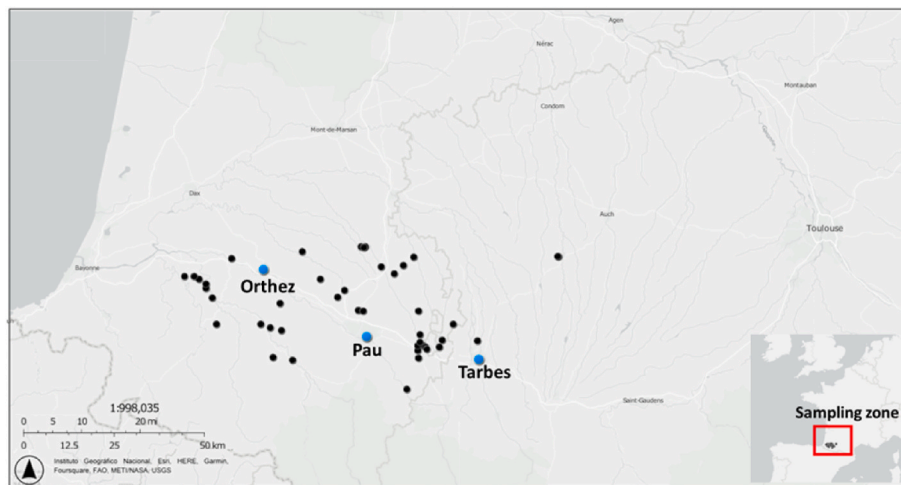


Fig. 1. Distribution of the sampled plots planted with maize in the Pyrénées-Atlantiques area of South-West France. This map was extracted from ArcGIS (<https://doc.arcgis.com/fr>). Black points indicate the locations of the plots sampled. Blue points indicate the main cities.

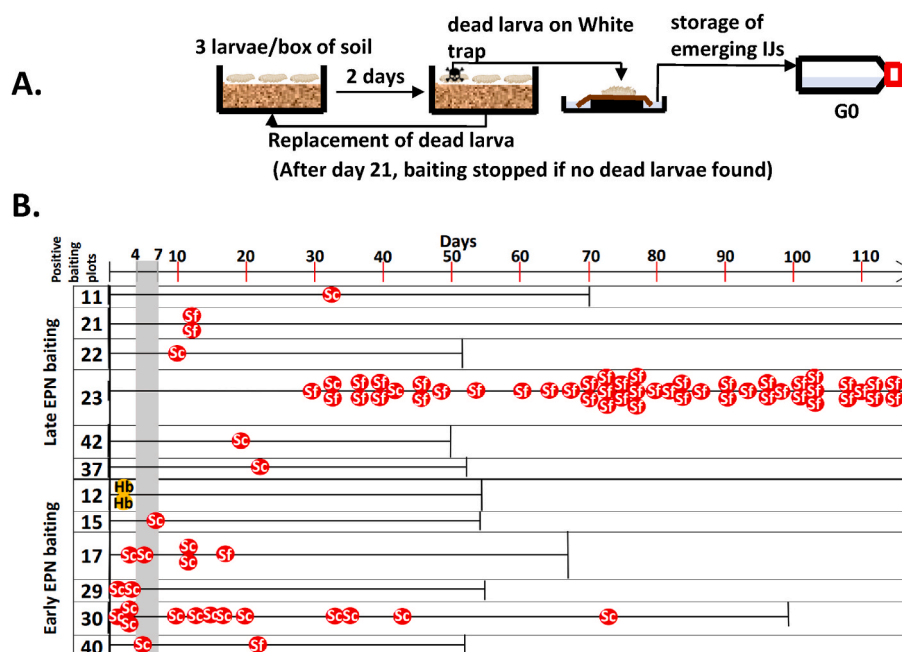


Fig. 2. Baiting of entomopathogenic nematodes (EPNs) in maize plots. A. Schematic diagram showing the principle of multiple baiting cycles with *Galleria mellonella*. *G. mellonella* larvae were placed on the surface of the soil samples in a box. Mortality was checked every two days. Dead larvae were placed on a White trap. Emerging nematodes were then recovered in Ringer solution and stored in flask. This first generation of IJs is referred to as G0. During the first 21 days, each cadaver was replaced by a living larva. After 21 days, insect larvae were replaced only if they died within one week. Baiting was otherwise stopped. B. No Temporal succession of EPN baiting for the 12 positive plots. Twelve of the 43 plots were considered positive for EPNs after identification by sequencing of the ITS region: *Steinernema feltiae* (red circles, Sf), *Steinernema carpocapsae* (red circles, Sc), *Heterorhabditis bacteriophora* (orange circles, Hb). The time period during which EPNs are generally baited (4–7 days) is indicated (gray area), making it possible to define plots on which EPNs were baited early and late.

### 2.5. Molecular identification of G0 IJs

The ITS regions of the nematode ribosomal DNA were amplified in a 50  $\mu$ L reaction mixture with GoTaq polymerase (Promega, France), according to the manufacturer's protocol. The primers used to amplify the ITS region were: ITS\_jc\_F: 5'-GGA-CTG-AGC-TGT-TTC-GAG-A-3' (forward) and ITS\_jc\_R: 5'-TAC-TGA-TAT-GCT-TAA-GTTCAG-CG-3' (reverse), which amplified a fragment of about 850 nucleotides (Rehayem et al., 2018). Amplification was performed in a Bio-Rad thermocycler (Bio-Rad, USA) as follows: 2 min at 95  $^{\circ}$ C followed by 34 cycles of 1 min at 95  $^{\circ}$ C, 30 s at 56  $^{\circ}$ C and 2 min at 72  $^{\circ}$ C and a final elongation step at 72  $^{\circ}$ C for 5 min. The PCR products were analyzed by

electrophoresis in an agarose gel (1% agarose in 1X TAE buffer) to confirm product size and sequenced by Eurofins Genomics (Ebersberg, Germany). ITS sequences were compared with the Genbank international database for taxonomic identification.

### 2.6. Phylogenetic analyses of G0 IJs

Sequence alignments and phylogenetic trees were generated with Seaview Platform version 4.2.12 (Gouy et al., 2010). Sequences were aligned with the MUSCLE algorithm (Edgar, 2004), and phylogenetic trees were obtained with the maximum likelihood method (phyML\_3.0.1) using the GTR model (Guindon and Gascuel, 2003).

Branch support for the maximum likelihood tree was estimated via a bootstrapping procedure (100 replicates). All the nucleotide sequences used for building phylogenetic trees were extracted from public sequence databases or were obtained in this study.

## 2.7. Extraction of the mobile nematofauna from the soil

The nematofauna was extracted from soil samples in two replicates, by the Oostenbrink elutriation-cotton wool filtering method (extraction ISO 23611-4). Briefly, a known weight of fresh soil ( $300 \text{ g} \pm 10 \text{ g}$ ) was transferred to an elutriator, in which upward flow was used to separate nematodes and soil particles. The nematode suspension was filtered through three successive  $50 \text{ }\mu\text{m}$ -mesh sieves to remove fine particles. The particles retained on the sieves were washed and placed on a filter on top of a Petri dish filled with water. After 48 h, the nematodes actively migrated from the filter to the water, which made it possible to ensure that the nematodes were alive and mobile. The water containing mobile nematodes was recovered and is referred to below as the “soil mobile nematofauna sample”. The first replicate was fixed in formaldehyde-glycerol (4%) and used for EPN identification on the basis of morphological criteria. One fifth of the second replicate was used for molecular EPN quantification by qPCR and ddPCR.

## 2.8. Identification of EPNs present in the soil mobile nematofauna on the basis of morphological criteria

One or two slides of mass quantities of nematodes were prepared for each sample of about 500 nematodes and were observed under a light microscope at 400x magnification. This made it possible to study more than 194 nematodes per sample and to detect, identify and count EPNs at genus level according to morphological criteria (Nguyen and Smart, 1996; Hunt and Nguyen, 2016). Mean soil nematode abundance was  $16 \pm 9$  nematodes  $\text{g}^{-1}$  dry soil for these 43 maize plots, with  $10 \pm 7$  free-living individuals and  $6 \pm 3$  plant-feeding individuals per gram of dry soil.

## 2.9. *Steinernema* quantification in the soil mobile nematofauna by quantitative real-time PCR

*Steinernema* ITS regions were quantified in soil mobile nematofauna samples with genus-specific primers targeting a 160-nucleotide fragment: Steiner\_F5' TAT-CAA-GTC-TTA-TCG-GTG-GAT-CAC-T 3' (forward), Steiner\_R3' GAC-CCT-CAA-TTG-AAC-ATA-CTA-ACA-GAT-A 5' (reverse) (Cambon et al., 2020). For the construction of a standard DNA curve, the ITS regions of pure *Steinernema* DNA were amplified in a  $20 \text{ }\mu\text{L}$  reaction with  $10 \text{ }\mu\text{L}$  SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix (Bio-Rad, USA), 300 nM primers and 8.22 ng *Steinernema* DNA. For qPCR, amplification was performed on a CFX96 real-time system (Bio-Rad, USA), as follows: 10 min at  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  followed by 30 cycles of 30 s at  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  and  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  for 1 min. A melting curve analysis was performed at the end of the PCR, to check there was only one amplicon. The size of the amplicons was analyzed with a 4200 TapeStation (Agilent Technologies USA), and the PCR products from pure *Steinernema* samples were purified with the NucleoSpin™ Gel and PCR Clean-up Kit (Macherey-Nagel, Germany). The target abundance for standards was calculated by assuming a molecular mass of 660 Da for double-stranded DNA with the following formulas: gene abundance =  $6.023 \times 10^{23}$  (copies  $\text{mol}^{-1}$ )  $\times$  standard concentration ( $\text{g mL}^{-1}$ )/molecular mass ( $\text{g mol}^{-1}$ ) (Li et al., 2015). The standard curves for qPCR were prepared with 10-fold serial dilutions ranging from  $10^2$  to  $10^7$  target gene copies. Primer specificity was checked beforehand by performing qPCR tests on purified genomic DNA from a panel of entomopathogenic nematodes — *Steinernema carpocapsae*, *Steinernema feltiae*, *Steinernema* sp., *Heterorhabditis bacteriophora* — and DNA from free-living nematodes kindly provided by Jean Trap (IRD, Montpellier, France): *Acrobeloides ellesmerensis*, *Pristionchus pacificus*, *Oscheius akosreti* and *Caenorhabditis*

*elegans*.

Pure DNA from *S. carpocapsae* and *H. bacteriophora* and water were introduced simultaneously with the soil mobile nematofauna samples, as positive, negative and no-template controls, respectively. The ITS regions of these DNAs were amplified in a  $10 \text{ }\mu\text{L}$  reaction mixture containing  $5 \text{ }\mu\text{L}$  SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix (Bio-Rad, USA), 300 nM primers, 4.5 ng DNA, under the same PCR conditions as described above. Samples were quantified against the corresponding standard curve with CFX Maestro Software Version 2.2 (Bio-Rad, USA). Standards, samples and controls were amplified in triplicate. Plots with fewer than 100 ITS copies (confidence level) in the reaction mixture were considered negative.

## 2.10. EPN quantification in the soil mobile nematofauna by digital droplet PCR

*Steinernema* nematodes were quantified with the same primer pairs as for the qPCR analysis. For *Heterorhabditis*, we designed primers as previously described (Cambon et al., 2020) to target a 257 fragment of the ITS region: Hetero\_F5' ATC-GGT-ACC-AAT-GGA-ATC-AGG-CTT-G 3' (forward), Hetero\_R3' ATT-AAG-GCT-CTC-TGC-ATC-AGC-AGA-T 5' (reverse). Pure DNA from *S. carpocapsae* and *H. bacteriophora* and water were introduced simultaneously with the soil mobile nematofauna samples, as positive, negative and no-template controls, respectively. We performed ddPCR on a QX200 system with the EvaGreen assay (Bio-Rad, USA). Each ddPCR mixture contained  $12 \text{ }\mu\text{L}$  ddPCR™ EvaGreen Supermix (Bio-Rad, USA), 400 nM primers and 3 ng DNA template in a final volume of  $22 \text{ }\mu\text{L}$ . The ddPCR reagents were mixed, centrifuged briefly and  $20 \text{ }\mu\text{L}$  of the mixture was transferred to the sample well of a DG8™ cartridge (Bio-Rad, USA). We added  $70 \text{ }\mu\text{L}$  QX200™ droplet generation oil for EvaGreen (Bio-Rad, USA) to the oil wells, and the cartridge was then covered with a DG8™ gasket (Bio-Rad, USA). Droplets were generated with a QX200™ droplet generator (Bio-Rad, USA). Droplets were carefully transferred to 96-well plates and PCR was performed in a CFX96 real-time system (Bio-Rad, USA). The thermal cycling procedure was as follows: 10 min at  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  followed by 30 cycles of 30 s at  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  and  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  for 1 min; for post-PCR cycling the plates were incubated for 5 min at  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  and 5 min at  $90 \text{ }^\circ\text{C}$  for signal stabilization. The temperature ramp rate between PCR steps was  $2 \text{ }^\circ\text{C s}^{-1}$ . Once PCR was complete, the 96-well PCR plate was incubated for 2 h at  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  for droplet stabilization. It was then transferred to a QX200™ droplet reader (Bio-Rad, USA) to count positive and negative droplets. The thresholds separating positive and negative samples were set manually according to the negative control values and reads were analyzed with QuantaSoft™ Analysis Pro software Version 1 (Bio-Rad, USA). Plots with fewer than 100 ITS copies (confidence level) in the reaction mixture were considered negative.

## 3. Results

### 3.1. EPN trapping by multiple baiting cycles with *G. mellonella* on soil from 43 plots planted with maize

Composite soil samples from each plot were collected and brought back to laboratory for EPN trapping in multiple baiting cycles with *G. mellonella* (Fig. 2A). We baited 78 EPN isolates that were distributed in 12 plots, i.e. 28% of the plots (Fig. 2B).

The taxonomic identity of each EPN isolate was determined by sequencing the ITS region, which made it possible to identify three species: *H. bacteriophora*, *S. carpocapsae*, and *S. feltiae* (Fig. 2B, Supplementary Fig. 1 and Supplementary Fig. 2). The distributions of these EPN species were highly heterogeneous: *H. bacteriophora* was identified in only one plot (plot 12), whereas *S. feltiae* and *S. carpocapsae* were identified in 4 and 10 plots, respectively (Fig. 2B). The number of EPN isolates obtained per plot was also highly variable. For example, only one isolate per plot was collected for five plots, whereas 52 EPN isolates

were collected from plot 23 — two isolates of *S. carpocapsae* and 50 of *S. feltiae* — 30 days after the start of baiting (Fig. 2B). It is not currently possible to determine whether the 50 *S. feltiae* isolates in plot 23 originated from the same or different EPN populations.

Baiting times exceeding seven days, the maximum period used in most studies, increased the number of EPN isolates obtained. For example, in plot 30, the number of *S. carpocapsae* isolates was four times higher after 44 days of baiting (Fig. 2B). Longer baiting times also led to larger numbers of plots testing positive. We therefore defined six plots for early EPN baiting (i.e. baiting before 7 days) and six plots for late EPN baiting (first baiting occurring after 7 days) (Fig. 2B). The longer baiting time increased final EPN species diversity, with *S. carpocapsae* isolated before 7 days and *S. feltiae* after 7 days on plots 17 and 40.

Free-living nematodes (FLNs) were also trapped during multiple *G. mellonella*-baiting cycles (Supplementary Fig. 3). FLNs were collected from 90% of the plots, a proportion much higher than that for plots positive for EPNs. Based on the sequence of the ITS region, we identified *Acrobeloides* sp., *Diploscapter* sp., *Pristionchus* sp., *Tylopharynx foetidus*, *Aphelenchus avenae*, *Mesorhabditis* sp., *Rhabditis terricola*, *Oscheius* sp., *Cruzanema* sp. As the dominant genera, *Cruzanema* and *Oscheius* are present in the majority of plots (Supplementary Fig. 3, Supplementary Fig. 4).

We verified Koch's postulate for the 78 EPNs isolated, through *G. mellonella* infestation, as previously described (Campos-Herrera et al., 2015). We found that 88% of EPN killed the insect larvae, multiplied within the cadaver and generated offspring. The majority of the 69 infective isolates had a median lethal time (LT<sub>50</sub>) below five days (35% < 3 days, 30% between 3 and 5 days), but, 35% had an LT<sub>50</sub> greater than 5 days (Fig. 3). This is surprising because, according to the canonical definition of EPNs, they kill insects in less than five days (Dillman et al., 2012). Interestingly, insecticidal LT<sub>50</sub> performances varied between isolates of the same species and from the same plot (e.g. plots 23, 17 and 30) (Fig. 3).

### 3.2. EPN identification on the basis of morphological criteria in the soil mobile nematofauna

The mobile nematofauna extracted from soils was mounted on mass slides and observed under a microscope (up to x400). A mean of 637 ± 382 nematodes was observed per sample for the 43 samples analyzed, corresponding to a mean of 17% ± 9% of the nematodes extracted from 300 g fresh soil. The minimum number of nematodes observed was 194, corresponding to 12% the total number of nematodes in the sample, and

the maximum number of nematodes observed was 1726 (48%) (Supplementary Table 1). *Heterorhabditis* was found in plots 17, 31 and 34, whereas *Steinernema* was detected only in plot 30 despite an intensive analysis for plots 23, 11, 29, 12, and 30, on which *Steinernema* had been detected several times by baiting (Supplementary Table 1). We found that 9.3% of the plots were positive by microscopic observation. When EPNs were found by this technique, their relative abundance within the total nematode community detected was very low (between 0.2 and 2.4% of the soil mobile nematofauna sample).

### 3.3. Molecular detection of EPNs in the soil mobile nematofauna

We focused on the molecular detection of *Steinernema* in soil mobile nematofauna samples. We used a quantification of the ITS region by qPCR to assess the presence of *Steinernema*. We used as confidence level 100 ITS copies/reaction, in the threshold currently used for the real-time qPCR method (Vaerman et al., 2004), with validation based on the use of *Heterorhabditis* DNA and water as negative and no-template controls, respectively (data not shown). *Steinernema* sp. was detected in 16% of the plots by qPCR (Fig. 4). Using the same confidence level for ddPCR, we detected *Steinernema* in 35% of the sampled plots: the seven plots in which it was detected by qPCR plus eight more, corresponding to a 53% increase in detection (Fig. 4). These findings confirm the greater sensitivity of ddPCR relative to qPCR. In terms of absolute quantification, qPCR and ddPCR results for ITS copies were within one order of magnitude for six of seven plots (17, 23, 26, 36, 39 and 43) (Fig. 4).

## 4. Discussion

In this study, we aimed to obtain as accurate a picture as possible of the presence and diversity of EPNs in maize fields in South-West France. We assessed four different methods. The multiple-baiting cycles method resulted in the isolation of *Steinernema* and *Heterorhabditis* from 25.5% to 2.5% of the plot soil samples tested, respectively. Following extraction of the mobile nematofauna from soils, direct observation resulted in the detection of *Steinernema* and *Heterorhabditis* in 2.5% and 7.0% of the plots, respectively. With the use of molecular techniques to target the genus *Steinernema* within the extracted mobile nematofauna population, 16% and 35% of the plots tested positive by qPCR and ddPCR, respectively. None of the plots tested positive by ddPCR when the genus *Heterorhabditis* was targeted (data not shown). The results of the four approaches were not entirely superimposable (Fig. 5), but when all the data for *Steinernema* detection were combined, half the plots tested were

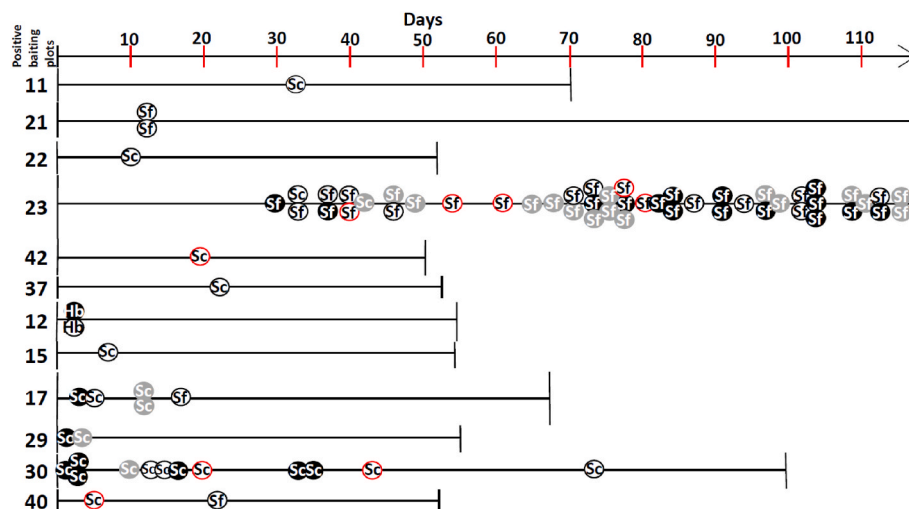
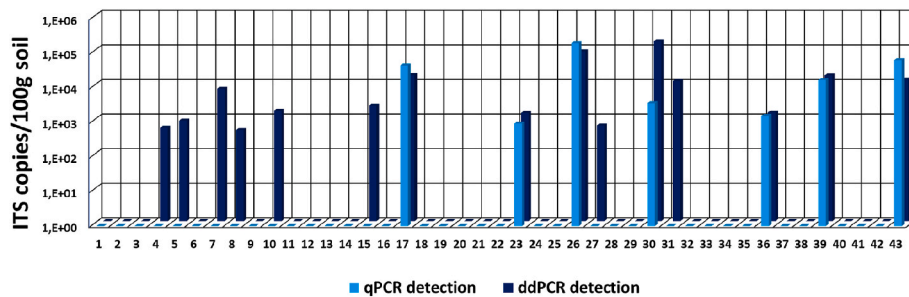


Fig. 3. Pathogenicity to *Galleria mellonella* of the 78 EPN isolates. EPN pathogenicity was evaluated by infestation experiments with *G. mellonella* larvae: no pathogenic infestation at 5 days (white circle with red border), LT<sub>50</sub> ≤ 3 days (black circles), 35 (dark gray circle), LT<sub>50</sub> ≥ 5 days (white circle with a gray border). Hb, *Heterorhabditis bacteriophora*; Sc, *Steinernema carpocapsae*; Sf, *Steinernema feltiae*.





**Fig. 4.** Determination of the copy number of the *Steinerema* ITS in samples from the 43 maize plots by qPCR and ddPCR. Molecular detection techniques were applied to soil mobile nematofauna samples. The number of ITS copies/100 g of soil was determined by qPCR (light blue) and ddPCR (dark blue). Plots with fewer than 100 ITS copies in the reaction mixture were considered negative.

positive. By comparison with other studies based on classical EPN baiting in agricultural soils performed in the Mediterranean basin and the South of France, our detection rates are fairly high. For example, EPNs were found in 88% of organic vineyard plots, but in 0% of organic vegetable plots in the South of France (Emelianoff et al., 2008) and in 20% of stone-fruit orchard plots in Spain (Morton and García-del-Pino, 2009). A combination of classical baiting and qPCR resulted in positive results for 19% of citrus orchard plots tested in Portugal (Campos-Herrera et al., 2019a).

We performed indirect isolation from soil samples with *G. mellonella* as an insect bait, as routinely performed since 1975, but with multiple baiting cycles and an increase in baiting time beyond seven days. Our approach increased the number of plots testing positive by 50% and increased the number of EPN isolates per plot, consistent with previous findings (Abd-Elgawad, 2020). It is noteworthy that in our study the EPN baiting led to very rare *Heterorhabditis* isolation while we isolated a high number of *Steinerema* isolates. This latter genus mainly adopts ambusher behaviour in its foraging strategy (Campbell et al., 2003). Modifying the baiting method, by inverting soil samples so that the bait insects are under the soil or by using mobile insect baits could improve the baiting of *Heterorhabditis* species, this genus having mainly a cruiser type foraging strategy (Campbell et al., 2003).

As in previous studies, we regularly baited FLNs, including *Cruzema* and *Oscheius* species in particular, with *G. mellonella* larvae (Duncan et al., 2003; Campos-Herrera et al., 2012; Zhou et al., 2017; Serpa-Dlamini and Gray, 2018; Al-Zaidawi et al., 2019; Castro-Ortega et al., 2020; Ghavamabad et al., 2021). *Oscheius* spp. have been shown to compete with EPNs for insect cadavers (Campos-Herrera et al., 2015; Zhang et al., 2019). We assume that the replacement of the *G. mellonella* cadavers with new live insect larvae in the multiple-baiting cycle method depletes the soils of FLNs, thereby decreasing the competitive pressure exerted on EPNs, potentially accounting for the late EPN baiting observed for six of the 12 positive plots. Interestingly, *H. bacteriophora* was never detected by baiting on the same plots as *Steinerema*, and when both *S. carpocapsae* and *S. feltiae* were baited on the same plot, these two species were often isolated at different time points. These findings may reflect competition between EPNs (Alatorre-Rosas and Kaya, 1990; Půža and Mráček, 2009). Our method should help to unravel the interactions between the different EPN species coexisting on the same plot.

During the multiple baiting cycles, numerous *Steinerema* isolates were obtained over time for certain plots (Fig. 2). For isolates from the same plot, intraspecific variation in insecticidal performance was observed (see for example plots 17, 23 and 30, Fig. 3). At this stage of the analysis, it is not possible to determine whether these isolates originated from the same or different *Steinerema* populations. EPIC-PCR analysis of an intron of the  $\beta$ -tubulin gene was used in a previous study to delineate different intraspecific populations of *S. feltiae* from Bull Island in Ireland (Rolston et al., 2009). This method could be applied to individual isolates from plots with remarkably large numbers of EPN

isolates, to determine whether multiple EPN colonization events occurred in the plots studied.

In complement to the indirect EPN-baiting method, we experimented direct EPN-detection methods following extraction of the mobile nematofauna from the soils. Unlike the samples obtained with the flotation techniques used in other studies (Curran and Heng, 1992; Jaffuel et al., 2016, 2018; Campos-Herrera et al., 2019a), our soil mobile nematofauna samples contained only living, mobile nematodes, because isolation was dependent on the migration of the nematode from the filter to the water during the last stage of preparation (Marais et al., 2017). Our approach is not without bias, as the attraction of EPNs relies on living insects (Zhang et al., 2021) and the EPN mobility depends on the insect species (Campbell et al., 2003) or the substrate (Kruitbos et al., 2010). Further optimization of our method could involve the use of more adapted attractants for the last step of the soil mobile nematofauna.

In soil mobile nematofauna samples, we applied two types of detection methodology, morphological observation and molecular detection. With morphological observation, the rate of detection of EPNs was low, despite intensive efforts (9.5% of plots positive) and *Heterorhabditis* was the dominant genus identified. This result is surprising since molecular detection did not confirm the presence of this genus in the samples. This discrepancy is likely due to difficulty to distinguish *Heterorhabditis* from other close nematodes, whereas the morphological identification of *Steinerematids* is more accurate with their distinctive intestinal receptacle (Kim et al., 2012).

Over the last decade, qPCR-based methods have been developed for the molecular detection of EPNs in the soil nematofauna extracted from soil (Campos-Herrera et al., 2011, 2019b, 2019a; Jaffuel et al., 2016, 2018; Blanco-Pérez et al., 2020; Dritsoulas et al., 2020). Contrary to the findings of other studies (Campos-Herrera et al., 2011, 2019a), in our hands, qPCR methods for *Steinerema* detection did not increase sensitivity (16.5% of plots positive) relative to baiting (25.5% of positive plots) (Fig. 4). With the objective of increasing the sensitivity of molecular EPN detection, we therefore tested ddPCR on the soil mobile nematofauna with the primers specific for *Steinerema* ITS previously used for qPCR. The ddPCR method detected EPNs in all the plots in which they were detected by qPCR, but also in eight additional plots for which baiting failed to isolate EPNs (Fig. 4). We, therefore, conclude that ddPCR was more sensitive than qPCR for detecting EPNs in soil mobile nematofauna samples. This technique is, thus, of interest for use in future studies.

## 5. Conclusion

Given the relatively low abundance of EPNs in the total nematofauna community of the soil, the isolation and detection of these species are not obvious. Our findings demonstrate the benefits of combining several methods for detecting EPNs. In light of our results, we propose this methodology for EPN detection and studies of EPN distribution in agricultural soils. This methodology is based on the use of multiple

	Soil		Soil mobile nematofauna	
	Baiting	Morphological	qPCR <i>Steinernema</i> sp.	ddPCR <i>Steinernema</i> sp.
1				
2				
3				
4				■
5				■
6				
7				■
8				■
9				
10				■
11	■			
12	■			
13				
14				
15	■			■
16				
17	■	■	■	■
18				
19				
20				
21	■			
22	■			
23	■		■	■
24				
25				
26			■	■
27				■
28				
29	■			
30	■		■	■
31		■		■
32				
33				
34		■		
35				
36			■	■
37	■			
38				
39			■	■
40	■			
41				
42	■			
43			■	■

Fig. 5. Comparison EPN detection rates with the four methods. We tested soil samples for the presence of *Steinernema* sp. (red squares) and *Heterorhabditis* sp. (orange squares) by multiple baiting cycles with *G. mellonella* and morphological observations of the soil mobile nematofauna samples. We also used qPCR and ddPCR to test for *Steinernema* sp. in soil mobile nematofauna samples.

baiting cycles on soil samples and ddPCR on extracted nematofauna samples. The EPN baiting on soil samples could be further optimized to enlarge diversity of isolated EPN. For example, procedures that targets different foraging strategies could be developed. Insects from different orders could be used to capture specialized EPNs. Molecular detection of EPN could also be optimized by perfecting the EPN-soil extraction methods, such as the use of efficient EPN attractants. An accurate picture of distribution of EPNs is crucial to improve our understanding of the abiotic and biotic factors affecting the presence and survival of EPNs in fields. These advances are necessary for the promotion and adoption of native EPNs as conservation biological control agents against crop pests.

## Funding

This study was funded by the French National CIFRE (*Industrial Conventions for Training through Research*) grant 2020/1240 to CMI-Roullier (Centre Mondial de l'Innovation- Groupe Roullier). Complementary financial support under the framework of CIFRE 2020/1240 was provided by CMI-Roullier to DGIMI, University of Montpellier, INRAE.

## CRediT authorship contribution statement

**Elisabeth Depuydt:** Conceptualization, Formal analysis, Investigation, Methodology, Writing – original draft. **Jean Claude Ogier:** Conceptualization, Formal analysis, Investigation, Methodology, Supervision, Writing – review & editing. **Nusrat Ali:** Formal analysis, Methodology, Writing – original draft. **Cécile Villenave:** Conceptualization, Formal analysis, Supervision, Writing – review & editing. **Anne Jimenez:** Formal analysis, Methodology. **Patrice Mahieu:** Methodology. **Brendan Vouadec:** Methodology. **Eric Nguema-Ona:** Conceptualization, Formal analysis, Funding acquisition, Supervision, Writing – review & editing. **Sophie Gaudriault:** Conceptualization, Formal analysis, Funding acquisition, Supervision, Writing – review & editing.

## Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

## Data availability

Data will be made available on request.

## Acknowledgments

We thank Jean Trap for providing free-living nematodes, Sylvie Pagès for expertise, advice and help in the handling of EPNs, Raphaël Bousquet, Dylan Valenza and Gaëtan Clabots for providing *Galleria mellonella*, and Sandrine Jaguelin for setting up qPCR tests. We thank Lisa Cabre for helpful comments on the manuscript.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2023.109275>.

## References

- Abd-Elgawad, M.M.M., 2020. Can rational sampling maximise isolation and fix distribution measure of entomopathogenic nematodes? *Nematology* 22, 907–916. <https://doi.org/10.1163/15685411-00003350>.
- Alatorre-Rosas, R., Kaya, H.K., 1990. Interspecific competition between entomopathogenic nematodes in the genera *Heterorhabditis* and *Steinernema* for an insect host in sand. *Journal of Invertebrate Pathology* 55, 179–188. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(90\)90053-9](https://doi.org/10.1016/0022-2011(90)90053-9).

- Al-Zaidawi, J.B., Karimi, J., Moghadam, E.M., 2019. Molecular characterizations of the entomopathogenic nematodes, *Heterorhabditis bacteriophora* and *Oscheius myriophilus* from Iraq. Egyptian J. Biol. Pest. Control 29, 38. <https://doi.org/10.1186/s41938-019-0136-6>.
- Aryal, S., Nielsen, U.N., Sumaya, N.H., De Faveri, S., Wilson, C., Riegler, M., 2022. Isolation and molecular characterization of five entomopathogenic nematode species and their bacterial symbionts from eastern Australia. BioControl 67, 63–74. <https://doi.org/10.1007/s10526-021-10105-7>.
- Baltrušis, P., Halvarsson, P., Höglund, J., 2019. Molecular detection of two major gastrointestinal parasite genera in cattle using a novel droplet digital PCR approach. Parasitology Research 118, 2901–2907. <https://doi.org/10.1007/s00436-019-06414-7>.
- Bedding, R.A., Akhurst, R.J., 1975. A simple technique for the detection of insect parasitic rhabditid nematodes ub soil. Nematologica 109–116.
- Benseddik, Y., Boutaleb Joutei, A., Blenzar, A., Ezrari, S., Molina, C.M., Radouane, N., Mokriani, F., Tahiri, A., Lahlali, R., Dababat, A.A., 2020. Occurrence and distribution of entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) in Morocco. Biocontrol Science and Technology 30, 1060–1072. <https://doi.org/10.1080/09583157.2020.1787344>.
- Bhat, A.H., Chaubey, A.K., Askary, T.H., 2020. Global distribution of entomopathogenic nematodes, *Steinernema* and *Heterorhabditis*. Egyptian J. Biol. Pest. Control 30, 31. <https://doi.org/10.1186/s41938-020-0212-y>.
- Blanco-Pérez, R., Sáenz-Romo, M.G., Vicente-Díez, I., Ibáñez-Pascual, S., Martínez-Villar, E., Marco-Mancebón, V.S., Pérez-Moreno, I., Campos-Herrera, R., 2020. Impact of vineyard ground cover management on the occurrence and activity of entomopathogenic nematodes and associated soil organisms. Agriculture, Ecosystems & Environment 301, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2020.107028>.
- Cambon, M.C., Lafont, P., Frayssinet, M., Lanois, A., Ogier, J.-C., Pagès, S., Parthuisot, N., Ferdy, J.-B., Gaudriault, S., 2020. Bacterial community profile after the lethal infection of *Steinernema-Xenorhabdus* pairs into soil-reared *Tenebrio molitor* larvae. FEMS Microbiology Ecology 96. <https://doi.org/10.1093/femsec/faa009>.
- Campbell, J.F., Lewis, E.E., Stock, S.P., Nadler, S., Kaya, H.K., 2003. Evolution of host search strategies in entomopathogenic nematodes. Journal of Nematology 35, 142–145.
- Campos-Herrera, R. (Ed.), 2015. Nematode Pathogenesis of Insects and Other Pests: Ecology and Applied Technologies for Sustainable Plant and Crop Protection. Springer International Publishing, Cham. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-18266-7>.
- Campos-Herrera, R., Blanco-Pérez, R., Bueno-Pallero, F.Á., Duarte, A., Nolasco, G., Sommer, R.J., Rodríguez Martín, J.A., 2019a. Vegetation drives assemblages of entomopathogenic nematodes and other soil organisms: evidence from the Algarve, Portugal. Soil Biology and Biochemistry 128, 150–163. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2018.10.019>.
- Campos-Herrera, R., El-Borai, F.E., Duncan, L.W., 2012. Wide interguild relationships among entomopathogenic and free-living nematodes in soil as measured by real time qPCR. Journal of Invertebrate Pathology 111, 126–135. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2012.07.006>.
- Campos-Herrera, R., Escuer, M., Labrador, S., Robertson, L., Barrios, L., Gutiérrez, C., 2007. Distribution of the entomopathogenic nematodes from La rioja (northern Spain). Journal of Invertebrate Pathology 95, 125–139. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2007.02.003>.
- Campos-Herrera, R., Johnson, E.G., El-Borai, F.E., Stuart, R.J., Graham, J.H., Duncan, L.W., 2011. Long-term stability of entomopathogenic nematode spatial patterns in soil as measured by sentinel insects and real-time PCR assays. Annals of Applied Biology 158, 55–68. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2010.00433.x>.
- Campos-Herrera, R., Píza, V., Jaffuel, G., Blanco-Pérez, R., Cepulyté-Rakauskienė, R., Turlings, T.C.J., 2015. Unraveling the intraguild competition between *Oscheius* spp. nematodes and entomopathogenic nematodes: implications for their natural distribution in Swiss agricultural soils. Journal of Invertebrate Pathology 132, 216–227. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.10.007>.
- Campos-Herrera, R., Stuart, R.J., Pathak, E., El-Borai, F.E., Duncan, L.W., 2019b. Temporal patterns of entomopathogenic nematodes in Florida citrus orchards: evidence of natural regulation by microorganisms and nematode competitors. Soil Biology and Biochemistry 128, 193–204. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2018.10.012>.
- Castro-Ortega, I. del R., Caspeta-Mandujano, J.M., Suárez-Rodríguez, R., Peña-Chora, G., Ramírez-Trujillo, J.A., Cruz-Pérez, K., Sosa, I.A., Hernández-Velázquez, V.M., 2020. *Oscheius myriophila* (Nematoda: rhabditida) isolated in sugar cane soils in Mexico with potential to be used as entomopathogenic nematode. Journal of Nematology 52, 1–8. <https://doi.org/10.21307/jofnem-2020-073>.
- Chen, Y., Long, H., Feng, T., Pei, Y., Sun, Y., Zhang, X., 2022. Development of a novel primer–TaqMan probe set for diagnosis and quantification of *Meloidogyne enterolobii* in soil using qPCR and droplet digital PCR assays. International Journal of Molecular Sciences 23, 11185. <https://doi.org/10.3390/ijms231911185>.
- Curran, J., Heng, J., 1992. Comparison of three methods for estimating the number of entomopathogenic nematodes present in soil samples. J. Nematol., Soc. Nematol. 24, 170–176.
- Dillman, A.R., Chaston, J.M., Adams, B.J., Ciche, T.A., Goodrich-Blair, H., Stock, S.P., Sternberg, P.W., 2012. An entomopathogenic nematode by any other name. PLoS Pathogens 8, e1002527. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002527>.
- Dritsoulas, A., Campos-Herrera, R., Blanco-Pérez, R., Duncan, L.W., 2020. Comparing high throughput sequencing and real time qPCR for characterizing entomopathogenic nematode biogeography. Soil Biology and Biochemistry 8.
- Duncan, L.W., Dunn, D.C., Bague, G., Nguyen, K.G., 2003. Competition between entomopathogenic and free-living bacterivorous nematodes in larvae of the weevil *Diaprepes abbreviatus*. Journal of Nematology 35, 187–193.
- Edgar, R.C., 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. Nucleic Acids Research 32, 1792–1797. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>.
- Elmahalawy, S.T., Halvarsson, P., Skarin, M., Höglund, J., 2018. Droplet digital polymerase chain reaction (ddPCR) as a novel method for absolute quantification of major gastrointestinal nematodes in sheep. Veterinary Parasitology 261, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.07.008>.
- Emelianoff, V., Le Brun, N., Pagès, S., Stock, S.P., Tailliez, P., Moulia, C., Sicard, M., 2008. Isolation and identification of entomopathogenic nematodes and their symbiotic bacteria from Hérault and Gard (Southern France). Journal of Invertebrate Pathology 98, 211–217. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2008.01.006>.
- Fan, X., Hominick, W.M., 1991. Efficiency of the Galleria (wax moth) baiting technique for recovering infective stages of entomopathogenic rhabditids (Steinernematidae and Heterorhabditidae) from sand and soil. Nematol 14, 381–387.
- Gaugler, R. (Ed.), 2002. Entomopathogenic Nematology. CABI Pub, New York.
- Ghavamabad, R.G., Talebi, A.A., Mehrabadi, M., Farashiani, M.E., Pedram, M., 2021. First record of *Oscheius myriophilus* (Poinar, 1986) (Rhabditida: rhabditidae) from Iran; and its efficacy against two economic forest trees pests, *Cydalima perspectalis* (Walker, 1859) (Lepidoptera: crambidae) and *Hyphantria cunea* (Drury, 1773) (Lepidoptera: erebidae) in laboratory condition. Journal of Nematology 53, 1–16. <https://doi.org/10.21307/jofnem-2021-035>.
- Gouy, M., Guindon, S., Gascuel, O., 2010. SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. Molecular Biology and Evolution 27, 221–224. <https://doi.org/10.1093/molbev/msp259>.
- Guindon, S., Gascuel, O., 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. Systematic Biology 52, 696–704. <https://doi.org/10.1080/10635150390235520>.
- Heppert, J.K., Ransone, E.M., Grossman, A.S., Mauer, T.J., Goodrich-Blair, H., 2022. Nematodes as models for symbiosis. In: Nematodes as Model Organisms. CAB International, pp. 82–126.
- Hindson, B.J., Ness, K.D., Masquelier, D.A., Belgrader, P., Heredia, N.J., Makarewicz, A. J., Bright, I.J., Lucero, M.Y., Hiddessen, A.L., Legler, T.C., Kitano, T.K., Hodel, M.R., Petersen, J.F., Wyatt, P.W., Steenblock, E.R., Shah, P.H., Bousse, L.J., Troup, C.B., Mellen, J.C., Wittmann, D.K., Erndt, N.G., Cauley, T.H., Koehler, R.T., So, A.P., Dube, S., Rose, K.A., Montesclaros, L., Wang, S., Stumbo, D.P., Hodges, S.P., Romine, S., Milanovich, F.P., White, H.E., Regan, J.F., Karlin-Neumann, G.A., Hindson, C.M., Saxonov, S., Colston, B.W., 2011. High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. Analytical Chemistry 83, 8604–8610. <https://doi.org/10.1021/ac202028g>.
- Hunt, D.J., Nguyen, K.B., 2016. In: J Hunt&K. D., Nguyen, B. (Eds.), Advances in Entomopathogenic Nematodes Taxonomy and Phylogeny. Leiden-Boston.
- Iamrod, K., Chaidee, A., Rucksaken, R., Kopolrat, K.Y., Worasith, C., Wongphutorn, P., Intuyod, K., Pinalor, S., Sithithaworn, J., Sithithaworn, P., Hongsrichan, N., 2022. Development and efficacy of droplet digital PCR for detection of *Strongyloides stercoralis* in stool. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 106, 312–319. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.21-0729>.
- Jaffuel, G., Blanco-Pérez, R., Hug, A.-S., Chiriboga, X., Meuli, R.G., Mascher, F., Turlings, T.C.J., Campos-Herrera, R., 2018. The evaluation of entomopathogenic nematode soil food web assemblages across Switzerland reveals major differences among agricultural, grassland and forest ecosystems. Agriculture, Ecosystems & Environment 262, 48–57. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2018.04.008>.
- Jaffuel, G., Mäder, P., Blanco-Pérez, R., Chiriboga, X., Fliessbach, A., Turlings, T.C.J., Campos-Herrera, R., 2016. Prevalence and activity of entomopathogenic nematodes and their antagonists in soils that are subject to different agricultural practices. Agriculture, Ecosystems & Environment 230, 329–340. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2016.06.009>.
- Kaya, H.K., Patricia Stock, S., 1997. Techniques in insect nematology. In: Manual of Techniques in Insect Pathology. Elsevier, pp. 281–324. <https://doi.org/10.1016/B978-012432555-5/50016-6>.
- Kim, S.K., Flores-Lara, Y., Stock, S.P., 2012. Morphology and ultrastructure of the bacterial receptacle in *Steinernema* nematodes (Nematoda: Steinernematidae). Journal of Invertebrate Pathology 110, 366–374.
- Kruitbos, L.M., Heritage, S., Hapca, S., Wilson, M.J., 2010. The influence of habitat quality on the foraging strategies of the entomopathogenic nematodes *Steinernema carpocapsae* and *Heterorhabditis megidis*. Parasitology 137, 303–309. <https://doi.org/10.1017/S0031182009991326>.
- Lacey, L.A., Grzywacz, D., Shapiro-Ilan, D.I., Frutos, R., Brownbridge, M., Goettel, M.S., 2015. Insect pathogens as biological control agents: back to the future. Journal of Invertebrate Pathology 132, 1–41. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.07.009>.
- Lazarova, S., Coyne, D., Rodríguez, G., Peteira, M.G.B., Ciancio, A., 2021. Functional diversity of soil nematodes in relation to the impact of agriculture—a review. Diversity 13, 64–86. <https://doi.org/10.3390/d13020064>.
- Li, J., Nedwell, D.B., Beddow, J., Dumbrell, A.J., McKew, B.A., Thorpe, E.L., Whitby, C., 2015. *amoA* gene abundances and nitrification potential rates suggest that benthic ammonia-oxidizing bacteria and not archaea dominate N cycling in the colne estuary, United Kingdom. Applied and Environmental Microbiology 81, 159–165. <https://doi.org/10.1128/AEM.02654-14>.
- Marais, M., Swart, A., Fourie, H., Berry, S.D., Knoetze, R., Malan, A.P., 2017. Techniques and procedures. In: Fourie, H., Spaull, V.W., Jones, R.K., Daneel, M.S., De Waele, D. (Eds.), Nematology in South Africa: A View from the 21st Century. Springer International Publishing, Cham, pp. 73–117. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-44210-5\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-319-44210-5_4).

- Morton, A., García-del-Pino, F., 2009. Ecological characterization of entomopathogenic nematodes isolated in stone fruit orchard soils of Mediterranean areas. *Journal of Invertebrate Pathology* 102, 203–213. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.08.002>.
- Nguyen, K.B., Smart, G.C., 1996. Identification of entomopathogenic nematodes in the steinernematidae and heterorhabditidae (nematoda: rhabditida). *Journal of Nematology* 28, 286–300.
- Ogier, J.-C., Akhurst, R., Boemare, N., Gaudriault, S., 2023. The endosymbiont and the second bacterial circle of entomopathogenic nematodes. *Trends in Microbiology* 31, 629–643. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2023.01.004>.
- Ogier, J.-C., Pagès, S., Galan, M., Barret, M., Gaudriault, S., 2019. rpoB, a promising marker for analyzing the diversity of bacterial communities by amplicon sequencing. *BMC Microbiology* 19, 171. <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1546-z>.
- Pūža, V., Mráček, Z., 2009. Mixed infection of *Galleria mellonella* with two entomopathogenic nematode (Nematoda: rhabditida) species: *Steinernema affine* benefits from the presence of *Steinernema krausei*. *Journal of Invertebrate Pathology* 102, 40–43. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.06.005>.
- Rehayem, M., Noujeim, E., Nemer, N., Pagès, S., Ogier, J.-C., Thaler, O., Duvic, B., 2018. New insights in biocontrol strategy against *Cephalcia tannourinensis*, the principal insect defoliator of Lebanese cedars. *Forest Science* 64, 383–391. <https://doi.org/10.1093/forsci/fox018>.
- Rolston, A., Meade, C., Boyle, S., Kakouli-Duarte, T., Downes, M., 2009. Intraspecific variation among isolates of the entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae* from Bull Island, Ireland. *Nematology* 11, 439–451. <https://doi.org/10.1163/156854109X447015>.
- Saunders, M.C., All, J.N., 1982. Laboratory extraction methods and field detection of entomophilic rhabditoid nematodes from soil. *Environmental Entomology* 11, 1164–1165. <https://doi.org/10.1093/ee/11.6.1164>.
- Serepa-Dlamini, M.H., Gray, V.M., 2018. A new species of entomopathogenic nematode *Oscheius safricana* n. sp. (Nematoda: rhabditidae) from South Africa. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 51, 309–321. <https://doi.org/10.1080/03235408.2018.1475281>.
- Shapiro-Ilan, D., Dolinski, C., 2015. Entomopathogenic nematode application technology. In: Campos-Herrera, R. (Ed.), *Nematode Pathogenesis of Insects and Other Pests*. Springer International Publishing, Cham, pp. 231–254. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-18266-7\\_9](https://doi.org/10.1007/978-3-319-18266-7_9).
- Shapiro-Ilan, D.I., Morales-Ramos, J.A., Rojas, M.G., 2016. In vivo production of entomopathogenic nematodes. In: Glare, T.R., Moran-Diez, M.E. (Eds.), *Microbial-Based Biopesticides, Methods in Molecular Biology*. Springer New York, New York, NY, pp. 137–158. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6367-6\\_11](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6367-6_11).
- Sturhan, D., Mráček, Z., 2000. Comparison of the *Galleria* baiting technique and a direct extraction method for recovering *Steinernema* (Nematoda: rhabditida) infective-stage juveniles from soil. *Folia Parasitologica* 47, 315–318. <https://doi.org/10.14411/fp.2000.055>.
- Tarasco, E., Clausi, M., Rappazzo, G., Panzavolta, T., Curto, G., Sorino, R., Oreste, M., Longo, A., Leone, D., Tiberi, R., Vinciguerra, M.T., Triggiani, O., 2015. Biodiversity of entomopathogenic nematodes in Italy. *Journal of Helminthology* 89, 359–366. <https://doi.org/10.1017/S0022149X14000194>.
- Vaerman, J.L., Saussoy, P., Ingargiola, I., 2004. Evaluation of real-time PCR data. *Journal of Biological Regulators & Homeostatic Agents* 18, 212–214.
- White, G.F., 1927. A method for obtaining infective nematode larvae from cultures. *Science* 66, 302–303. <https://doi.org/10.1126/science.66.1709.302-a>.
- Zhang, K., Baiocchi, T., Lu, D., Chang, D.Z., Dillman, A.R., 2019. Differentiating between scavengers and entomopathogenic nematodes: which is *Oscheius chongmingensis*? *Journal of Invertebrate Pathology* 167, 107245. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2019.107245>.
- Zhang, X., Li, L., Kesner, L., Robert, C.A.M., 2021. Chemical host-seeking cues of entomopathogenic nematodes. *Curr. Opin. Insect Sci.* 44, 72–81.
- Zhou, G., Yang, H., Wang, F., Bao, H., Wang, G., Hou, X., Lin, J., Yedid, G., Zhang, K., 2017. *Oscheius microvilli* n. sp. (nematoda: rhabditidae): a facultatively pathogenic nematode from chongming Island, China. *Journal of Nematology* 49, 33–41. <https://doi.org/10.21307/jofnem-2017-044>.



## Résultats supplémentaires

Dans l'article publié, les résultats de détection des IJs avec les méthodes moléculaires se concentrent uniquement sur la détection des genres *Steinernema* et *Heterorhabditis* avec des couples d'amorces spécifique des deux genres de NEPs et préalablement développés au laboratoire.

Dans cette partie « résultats supplémentaires », nous discuterons dans un premier temps des résultats obtenus en ddPCR avec les amorces spécifiques du genre *Heterorhabditis*, et en particulier le choix du seuil de détection. Dans un deuxième temps, nous discuterons des résultats obtenus pour la détection des espèces *S. carpocapsae*, *S. feltiae* et *H. bacteriophora*, à la fois par les méthodes de PCRq et ddPCR. Pour ce chapitre concernant la détection spécifique des NEPs, nous avons utilisé des couples d'amorces décrits dans la littérature (Campos-Herrera et al., 2011), ou développés au laboratoire DGIMI par Jean-Claude Ogier (données non publiées). Nous avons testé différentes approches moléculaires : PCRq Taqman, PCRq SybrGreen et ddPCR. Enfin, dans une troisième partie, nous évaluerons si ces tests supplémentaires peuvent répondre aux questions suivantes :

1/ Est on capable d'identifier les espèces détectées dans les parcelles en utilisant des couples d'amorces espèces-spécifiques ?

2/ Est-ce que l'utilisation d'autres couples d'amorces change notre capacité de détection des NEPs dans les échantillons de nématodes extraits des sols ?

### **I. Détection moléculaire par ddPCR au niveau du genre avec les amorces spécifiques du genre *Heterorhabditis***

Dans l'article « Depuydt et al., 2024 », nous avons utilisé un couple d'amorces spécifique du genre *Heterorhabditis* pour détecter ce genre dans les 43 extractions de nématodes réalisées à partir des échantillons de sols composites. Par souci d'homogénéisation avec la détection du genre *Steinernema*, nous avons fixé pour *Heterorhabditis* un seuil de détection en qPCR et en ddPCR à 100 copies ITS dans le volume réactionnel (d'une part, il s'agit de la limite de détection usuelle pour la PCRq et d'autre part, 70 copies ITS était détectées dans le contrôle négatif (ADN d'*H. bacteriophora*) pour *Steinernema* en ddPCR), c'est-à-dire qu'il fallait au moins 100 copies de la cible pour considérer l'échantillon comme positif. La fixation de ce seuil m'avait conduit à conclure qu'aucune parcelle n'était positive à *Heterorhabditis* sp. (Figure 19).

Néanmoins, dans le cas de la détection d'*Heterorhabditis* sp., le nombre de copies d'ITS est de 3 dans le contrôle négatif, soit à un niveau très inférieur à l'intervalle de confiance utilisé (Figure 19).

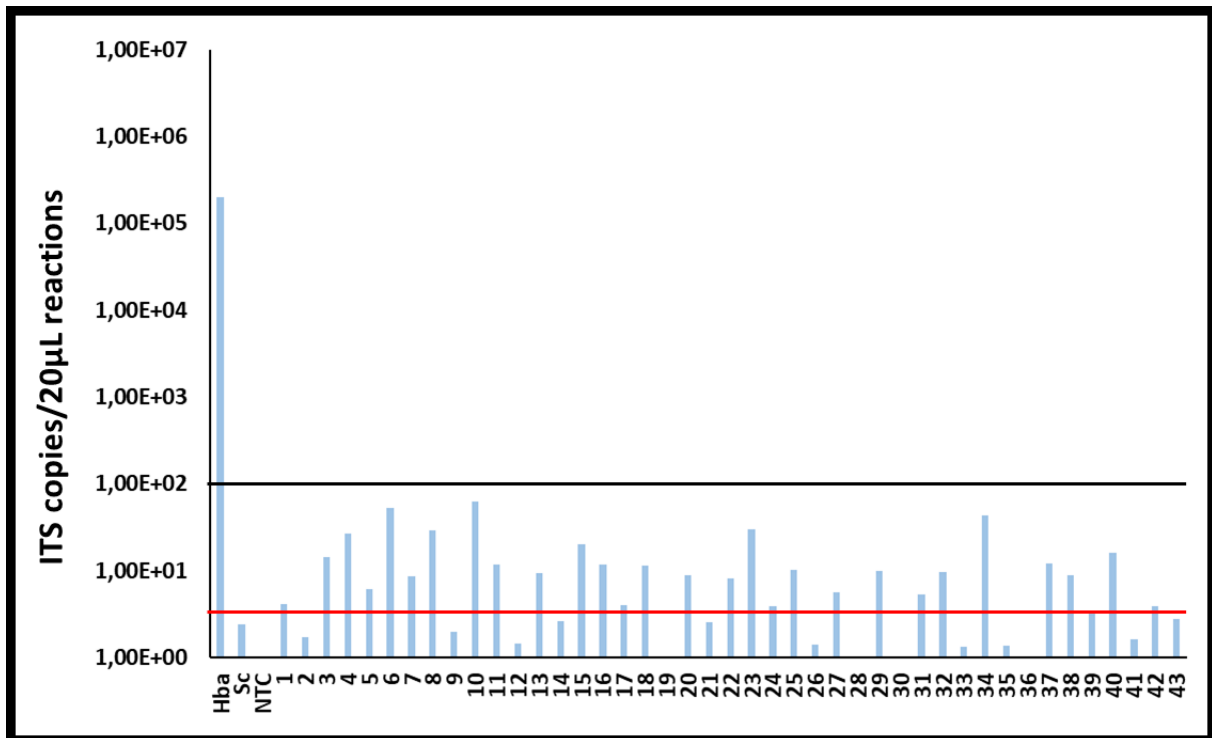


Figure 19 : Détermination du nombre de copies ITS des nématodes *Heterorhabditis* sp. dans les 43 parcelles cultivées en maïs par ddPCR. L'évaluation du nombre de copies ITS d'*Heterorhabditis* sp. a été faite dans les échantillons de nématodes mobiles et actifs du sol par ddPCR avec les couples d'amorces Hetero. L'intervalle de confiance est fixé à 100 copies ITS, ligne noire, et 5 copies ITS, ligne rouge. Les contrôles négatifs et positives ont été faits avec les ADNs de *S. carpocapsae* (Sc) et *H. bacteriophora* (Hba). Le contrôle eau est représenté sous le terme NTC (No template control).

La détermination de ce seuil est très importante car elle conditionne les résultats dans le cas de la détection d'*Heterorhabditis* sp. en ddPCR. En théorie, le seuil de détection de la ddPCR est une copie de l'ADN cible dans un volume réactionnel. Contrairement à la qPCR où le seuil usuellement utilisé est fixé à 100 copies d'ADN cible, il n'y a pas de consensus clair pour la ddPCR. Les études définissent leur seuil de détection en fonction des résultats des amplifications dans les contrôles négatifs et positifs ou en les comparant à ceux obtenus par la technique de la PCRq (Elmahalawy et al., 2018; Chen, 2021; Kokkoris et al., 2021). Il est recommandé de fixer des seuils propres à chaque expérience en fonction des résultats obtenus pour les contrôles afin d'éviter les faux positifs ou négatifs dans le cas de la ddPCR (Kokkoris et al., 2021). Dans notre étude, nous avons donc convenu que le seuil doit être fixé indépendamment pour chaque couple d'amorce en fonction du nombre de copies dans les contrôles négatifs.

Pour la détection du genre *Steinernema* nous avons fixé le seuil à 100 ITS copie car le nombre de copies ITS dans le contrôle négatif était à 70 avec un seuil à 100 copies ITS soit 143% au-dessus du nombre de copies ITS du contrôle négatif. Si le seuil est ré-évalué au-dessus de 143% du contrôle négatif (soit 5 copies ITS), *Heterorhabditis* sp. est présent dans 56% des parcelles (Figure 19).

Une seule parcelle est positive en piégeage, la parcelle 12, soit 2% de parcelles positives à *Heterorhabditis* sp. en piégeage contre 56% en ddPCR. L'unique parcelle positive en piégeage est négative en ddPCR. La méthode de piégeage des NEPs est connue pour ne capturer que 20 à 40% des NEPs présents dans les sols (Bedding and Akhurst, 1975). Nous avons utilisé pour le piégeage un insecte sensible mobile *Galleria mellonella*. Cet insecte, mobile dans le sol, pourrait favoriser le piégeage des espèces de NEPs comme *S. carpocapsae* qui suivent une stratégie de recherche de l'hôte appelé *ambusher* ou stratégie embusquée, au détriment des espèces telles que *H. bacteriophora* qui suivent une stratégie dit *cruiser* ou stratégie de recherche active (Campbell et al., 2003). Ces différences de détection peuvent aussi être expliquées par la nature des échantillons utilisés dans les deux cas. Le piégeage est réalisé directement sur le sol composite tandis que la détection moléculaire est réalisée sur des échantillons de nématodes extraits des sols par la méthode d'élutriation suivie d'une étape de migration des nématodes vers l'eau. Or, les NEPs ont une mobilité qui va dépendre de l'espèce d'insecte présent ou du substrat utilisé (Campbell et al., 2003; Kruitbos et al., 2010; Zhang et al., 2021), et cette migration obligatoire vers l'eau pourrait être faible et variable en fonction des espèces de NEPs, pouvant ainsi générer des biais lors de l'étape de détection moléculaire qui suit.



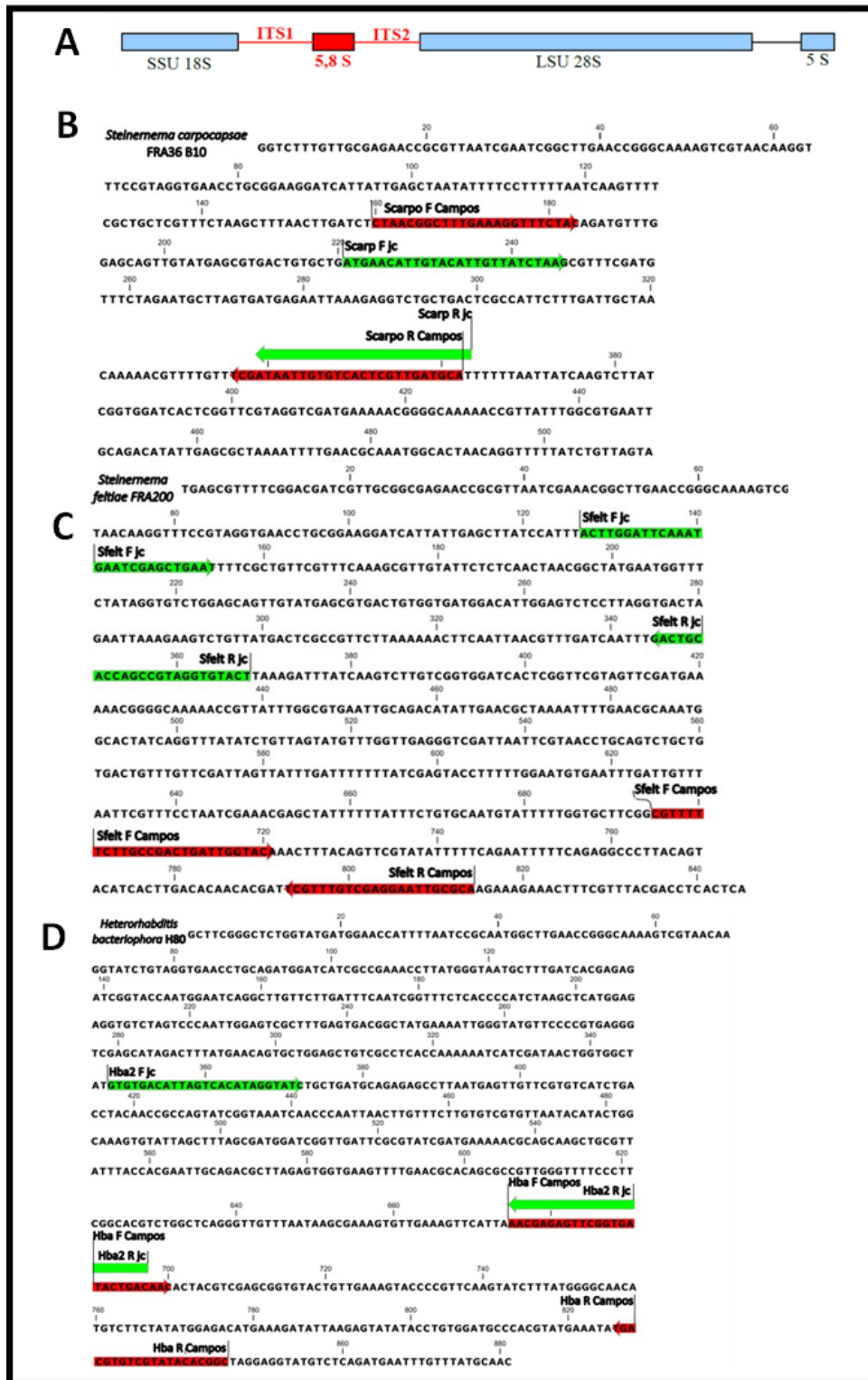


Figure 20 : Schéma des régions ITS où les différents couples d’amorces s’hybrident. Schéma de la région ITS des nématodes entomopathogènes (A). Séquences des régions ITS de différentes espèces de NEPs : *S. carpocapsae* (B), *S. feltiae* (C) et *H. bacteriophora* (D), et localisation des couples d’amorces espèces spécifiques : publiés par Campos-Herrera et al., 2011 (Rouge), et dessinés par Jean Claude Ogier (Vert).

## II. Détection moléculaire des NEPs au niveau de l'espèce

Pour aller plus loin dans la détection des NEPs et leur identification, nous avons testé les méthodes moléculaires au niveau de l'espèce. Nous nous sommes concentrés sur la détection des espèces qui avaient préalablement été isolées par la méthode de piégeage : *S. carpocapsae*, *S. feltiae* et *H. bacteriophora*. Deux couples d'amorces étaient disponibles pour chacune de ces espèces : 1/ des couples d'amorces publiés pour une détection des NEPs en qPCR Syber Green et TaqMan dans l'article Campos-Herrera et al., 2011, 2/ des couples d'amorces dessinés par Jean-Claude Ogier au laboratoire DGIMI.

### 1. Caractéristique et contrôle qualité des amorces espèces spécifiques

Les six couples d'amorces utilisés dans cette étude ciblent tous la région ITS des trois espèces de NEPs (A, Figure 20). Pour la détection de l'espèce *S. carpocapsae*, les couples d'amorces Scarpo Campos (Campos-Herrera et al., 2011) et Scarp jc, dessinés au laboratoire, ciblent la même région de la position 59<sup>ème</sup> paire de base (pb) à la 363<sup>ème</sup> pb de la séquence ITS de *S. carpocapsae* (B, Figure 20). Pour la détection de l'espèce *S. feltiae*, les régions ciblées sont différentes entre le couple d'amorces Sfelt Campos (695<sup>ème</sup> à 815<sup>ème</sup> pb de la séquence ITS de *S. feltiae*) de celui dessiné au laboratoire DGIMI Sfelt jc (127<sup>ème</sup> à 368<sup>ème</sup> pb de la séquence ITS de *S. feltiae*) (C, Figure 20). Pour la détection de l'espèce *H. bacteriophora*, les régions ciblées sont différentes entre le couple d'amorces Hba Campos (675<sup>ème</sup> à 845<sup>ème</sup> pb de la séquence ITS de *H. bacteriophora*) de celui dessiné au laboratoire DGIMI Hba2 jc (348<sup>ème</sup> à 697<sup>ème</sup> pb de la séquence ITS de *H. bacteriophora*) (D, Figure 20).

Un premier contrôle qualité des six couples d'amorces a été fait par Jean Claude Ogier par une méthode *in silico* (logiciel CLC Genomics), en testant les hybridations croisées potentielles avec les séquences d'ADN des régions ITS de différentes espèces de NEPs et de nématodes libres des sols (Tableau 4). Les amorces Scarpo Campos, Scarp jc et Sfelt jc ne présentent pas de risques d'hybridations croisées avec des ADNs de nématodes non-cibles (Tableau 4). Les amorces Hba Campos et Hba2 jc peuvent potentiellement s'hybrider avec la séquence ITS de *H. zealandica* (Tableau 4). Cette espèce de NEPs a été décrite en Chine, Thaïlande, Australie, Nouvelle Zélande et Russie (Bhat et al., 2020), mais jamais en France (Emelianoff et al., 2008), ce qui permet de diminuer le risque potentiel d'hybridation croisée avec cette espèce dans nos échantillons. L'amorce Sfelt Campos présente un risque d'hybridation croisée avec la séquence ITS de *Acrobelloides nanus* (Tableau 4), ce qui représente un risque non négligeable de faux positifs avec ce couple d'amorce, étant donné la présence importante de ce nématode libre dans les sols.



**Tableau 4 : Contrôle qualité de l'hybridation in silico entre les couples d'amorces et des séquences d'ADN des régions ITS de différents nématodes.** Plusieurs espèces de NEPs du genre *Steinernema* ont été testées (a) *S. carpocapsae* AII AY230164, *S. carpocapsae* FRA36B10, *S. feltiae* FRA200, *S. feltiae* ITS-MA12ITA11, *S. feltiae* Bodega, *S. feltiae* FR44, *S. affine* FRA43 Cha, *S. affine*, *S. boemari* FRA48, *S. glaseri* SK39. Des espèces de NEPs du genre *Heterorhabditis* ont été testées (b) : *H. bacteriophora* FRA40, *H. bacteriophora* Green, *H. bacteriophora* H80, *H. bacteriophora* HP88, *H. bacteriophora* FRA51, *H. georgiana* USAGA02, *H. indica* Onir 40, et *H. zealandica* HE48. Puis plusieurs espèces de nématodes libres des sols ont aussi été testées (c) : *Acrobelloides nanus* KY828308, *A. saeedi* isolate KMW, *Acrobelloides* sp. BBu1, *Caenorhabditis elegans* X5005, *Cruznama* sp. GD5, *Cruznama* sp. CS50, *Oscheius* sp., *O. tipulae*, *Oscheius* sp. CS43, *O. chongmingensis* isolate SC13, *O. microvilli* BJA19, *O. myriophilus* JLSY003, *Pellioiditis marina*, *P. typica*, *Pratylenicus goodeyi*, *P. goodeyi* KM874803, *Pristionchus maupasii* PO143, *Pristionchus pacificus* JN039364, *P. pacificus* P2333 et *Rhabditis terricola* XJ89.

	Amorces Campos et al, 2011			Amorces DGIMI		
	Scarpo	Sfelt	Hba	Scarp	Sfelt	Hba2
Hybridation in silico dans les régions ITS au sein du genre <i>Steinernema</i> <sup>a</sup>	<i>S. carpocapsae</i>	<i>S. feltiae</i> <i>S. carpocapsae</i> (Identité des séquence des amorces avec la région ITS : 74-68%)	Aucune	<i>S. carpocapsae</i>	<i>S. feltiae</i>	Aucune
Hybridation in silico dans les régions ITS au sein du genre <i>Heterorhabditis</i> <sup>b</sup>	Aucune	Aucune	<i>H. bacteriophora</i> <i>H. zealandica</i>	Aucune	Aucune	<i>H. bacteriophora</i> <i>H. zealandica</i>
Hybridation in silico dans les régions ITS chez d'autres espèces de nématodes <sup>c</sup>	Aucune	Partielle avec <i>Acrobelloides nanus</i> (56-68%)	Aucune	Aucune	Aucune	Aucune

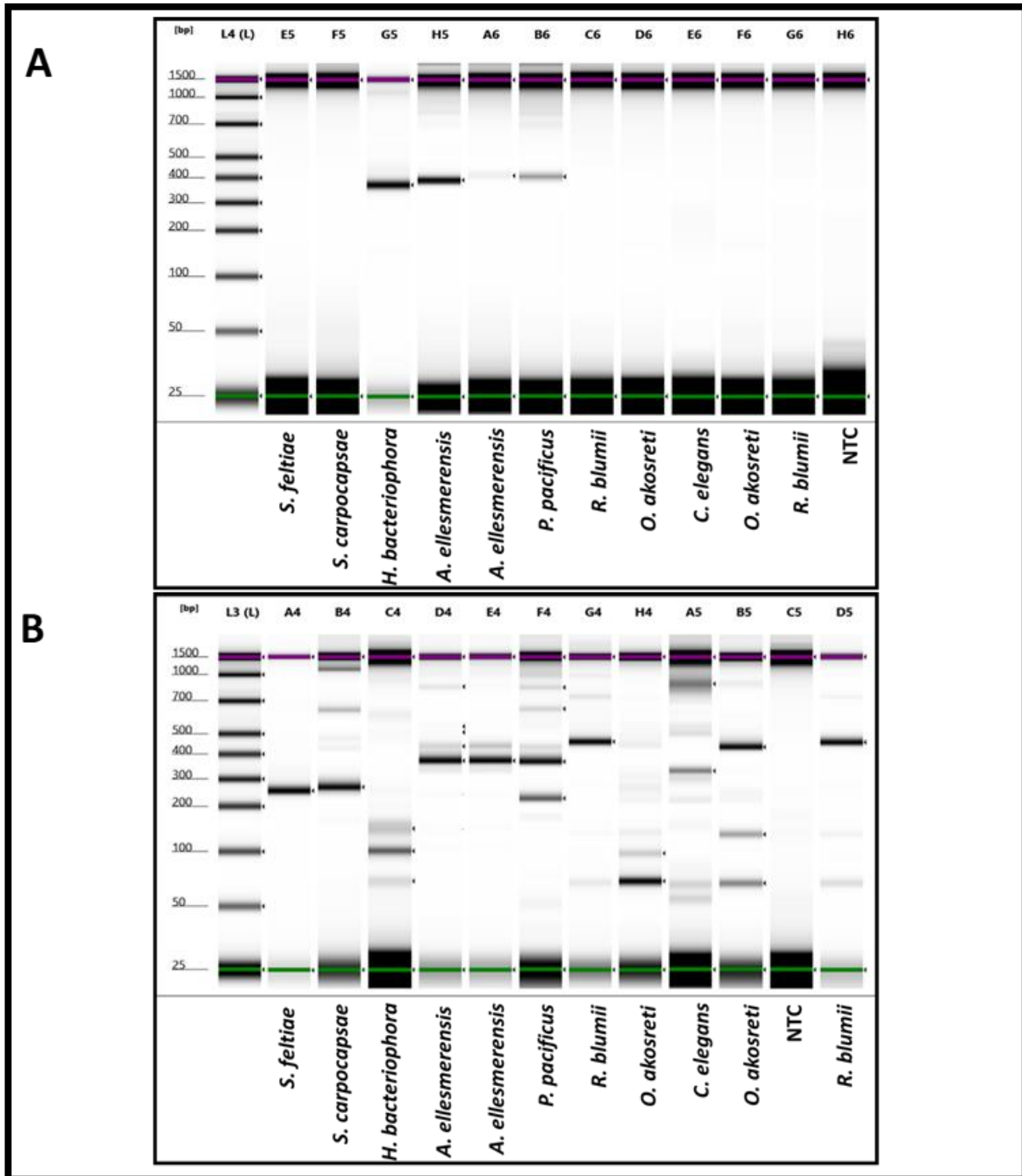


Figure 21 : Spécificité des couples d'amorces DGIMI testés sur des ADNs de nématodes entomopathogènes (NEPs) et nématodes libres des sols (FLNs). Les ADNs de NEPs (*S. feltiae*, *S. carpocapsae* et *H. bacteriophora*) et les ADNs de FLNs (*Acrobeloides ellesmerensis*, *Pristionchus pacificus*, *Rhabditis blumii*, *Oscheius akosreti* et *Caenorhabditis elegans*) ont été utilisés pour tester la spécificité des couples d'amorces Hba2\_jc (A) et Sfelt\_jc (B), ciblant *Heterorhabditis bacteriophora* et *Steinernema feltiae* respectivement en PCRq. La taille des amplicons obtenus est visualisée à l'aide de la 4200 TapeStation.

Un deuxième contrôle qualité a été réalisé expérimentalement pour les trois couples d'amorces DGIMI non publiés. Ils ont été testés en qPCR avec des ADNs cibles et non cibles de plusieurs espèces de NEPs et nématodes libres des sols pour détecter d'éventuelles hybridations aspécifiques : *S. feltiae*, *S. carpocapsae*, *H. bacteriophora*, *Acrobelloides ellesmerensis*, *Pristionchus pacificus*, *Oscheius akosreti* et *Caenorhabditis elegans*. Les amplifications issues des PCRq avec les deux autres couples d'amorces ont été analysées pour vérifier leur taille par migration sur 4200 TapeStation. Le couple d'amorces Scarp a donné des amplifications avec tous les ADNs cibles et non cibles ainsi que dans le contrôle eau ou NTC (No template control) où l'ADN est remplacé par de l'eau. Ce résultat a été réitéré dans un deuxième réplica. Une contamination des tubes contenant les amorces avec de l'ADN est donc fortement probable, ce couple d'amorce n'a donc pas été conservé pour la suite des expérimentations. Des amplicons d'une taille de 400pb avec l'ADN d'*A. ellesmerensis* et *P. pacificus* sont visibles sur gel avec le couple d'amorces Hba2\_jc ce qui présente un risque élevé de faux positifs (A, Figure 21). Des amplicons de tailles très diverses sont présents avec tous les ADNs testés avec le couple Sfelt jc (B, Figure 21). Pour ce dernier couple d'amorces, il serait potentiellement possible d'augmenter la température d'hybridation pour éliminer ces bandes artéfactuelles. Cependant, dans la technique ddPCR n'importe quel amplicon obtenu, quel que soit sa taille, a une fluorescence plus forte et sera donc comptabilisé comme positif. Pour cette raison le couple d'amorce Sfelt jc a été écarté pour déterminer la présence d'espèce de NEPs.

Pour résumer, le contrôle d'hybridation par la méthode *in silico* n'a pas révélé de problèmes majeurs d'hybridation aspécifique entre les amorces et les séquences d'ADN des nématodes non-cibles. Les trois couples d'amorces Scarpo Campos, Sfelt Campos et Hba Campos sont déjà publiés et utilisés depuis 2011 en PCRq TaqMan (Campos-Herrera et al., 2011, 2019b, 2019a; Blanco-Pérez et al., 2020; Dritsoulas et al., 2020). Contrairement aux amorces dessinées au laboratoire nous n'avons pas pu vérifier l'absence d'amplicon dans les contrôles d'ADN de nématodes non-cibles avec ces trois couples d'amorces publiés. Les tests sur les couples d'amorces du laboratoire DGIMI montrent une différence entre les prédictions *in silico* et les résultats obtenus sur gel notamment sur les hybridations aspécifiques. Il est ainsi de première importance de vérifier par PCRq et migration sur gel l'absence d'amplicon aspécifique dans le cas de la technique de ddPCR. Nous avons donc choisi d'utiliser uniquement les trois couples d'amorces de Campos-Herrera et al., 2011 avec la méthode de PCRq qui est la technique pour laquelle ils ont été développés, testés et publiés. Le couple d'amorce Hba2 jc dessiné par Jean-Claude Ogier est gardé pour détecter des *H. bacteriophora* par ddPCR.

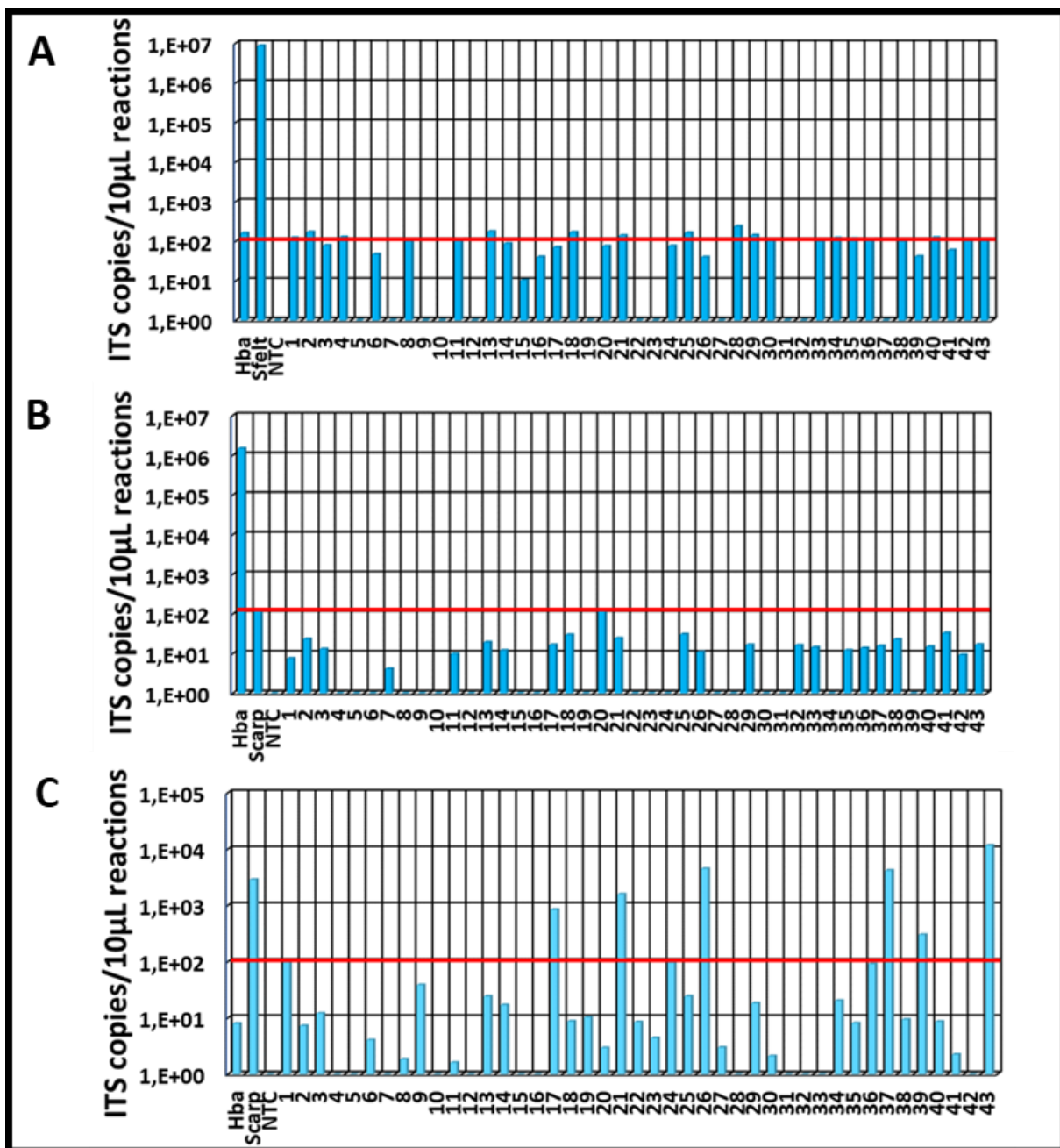


Figure 22 : Détermination du nombre de copies ITS des nématodes *Steinernema feltiae*, *Heterorhabditis bacteriophora* et *Steinernema carpocapsae* dans les 43 parcelles cultivées en maïs par PCRq. L'évaluation du nombre de copies ITS de *S. feltiae* (A), *H. bacteriophora* (B), et *S. carpocapsae* (C), a été faite dans les échantillons de nématodes mobiles et actifs du sol par PCRq avec les couples d'amorces Sfelt campos, Hba campos et Scarp campos respectivement issus de Campos *et al.*, 2011. Le seuil de confiance définit à 100 ITS copies est indiqué sur la figure par la ligne rouge. Les contrôles négatifs et positives ont été faits avec les ADNs de *S. carpocapsae* (Scarp), *S. feltiae* (Sfelt) et *H. bacteriophora* (Hba). Le contrôle eau est nommé NTC.

## **2. Détection moléculaire au niveau de l'espèce avec trois couples d'amorces publiés en PCRq**

En suivant la méthodologie décrite dans l'article Campos et al., 2011, nous avons commencé par utiliser la méthode PCRq TaqMan pour détecter les NEPs avec les trois couples d'amorces Scarp Campos, Sfelt Campos et Hba Campos. Mais ces premiers essais de PCRq TaqMan n'ont pas été concluants. Une absence totale de fluorescence a été enregistrée, suggérant une inhibition de l'hybridation de la sonde Taqman sur sa séquence d'ADN cible à la suite de la présence d'inhibiteurs dans nos échantillons de nématodes mobiles extraits des sols. Pour pallier cette difficulté, nous nous sommes orientés vers la technologie Syber Green. Les détails de la méthodologie utilisée pour réaliser la PCRq Syber Green sont décrits dans l'article (p.4). Les séquences des primers et les programmes PCR utilisés sont présentés dans l'Annexe 1.

Les nombres de copies ITS dans les contrôles négatifs des PCRq ciblant Scarpo, Sfelt et Hba sont respectivement de 8, 160 et 124 copies ITS dans les volumes réactionnels (Figure 22). Il est admis dans la littérature que le seuil de détection de la PCRq est de 100 ITS copies, et qu'en dessous de ce seuil la détection de l'ADN n'est plus fiable. Dans nos conditions d'utilisation des couples d'amorces Sfelt et Hba, les contrôles négatifs dépassent 100 copies ITS, les rendant peu fiables pour la détection des espèces *S. feltiae* et *H. bacteriophora* dans nos échantillons de NEPs mobiles extraits des sols. Le dépassement du seuil de 100 ITS copies dans les contrôles négatifs peut être expliqué par différentes hypothèses : 1/ hybridation aspécifique avec des espèces de nématodes des sols malgré une faible probabilité prévue par l'analyse in silico, 2/ mauvaise optimisation du programme PCRq augmentant les hybridations aspécifiques.

En revanche le nombre de copies ITS dans le volume réactionnel de Scarpo est en dessous de 100 copies ITS, validant ainsi les résultats de la détection par PCRq de l'espèce *S. carpocapsae* dans nos échantillons de NEPs mobiles extraits des sols. Par approche moléculaire, *S. carpocapsae* a été détecté dans six parcelles correspondant à 14% de parcelles positives pour la présence de cette espèce (C, Figure 22), contre 23% de parcelles positives par la méthode de piégeage.

## **3. Détection moléculaire au niveau de l'espèce *H. bacteriophora* avec un couple d'amorce dessiné au laboratoire en ddPCR**

Les détails de la méthodologie utilisée pour réaliser la ddPCR sont décrits dans l'article (p.4). Les séquences et les programmes suivis sont présentés dans l'Annexe 1. Le contrôle négatif, *i.e.* ADN de *S. carpocapsae*, a 2,48 copies ITS dans le volume réactionnel (Figure 23). La réévaluation du seuil, pour



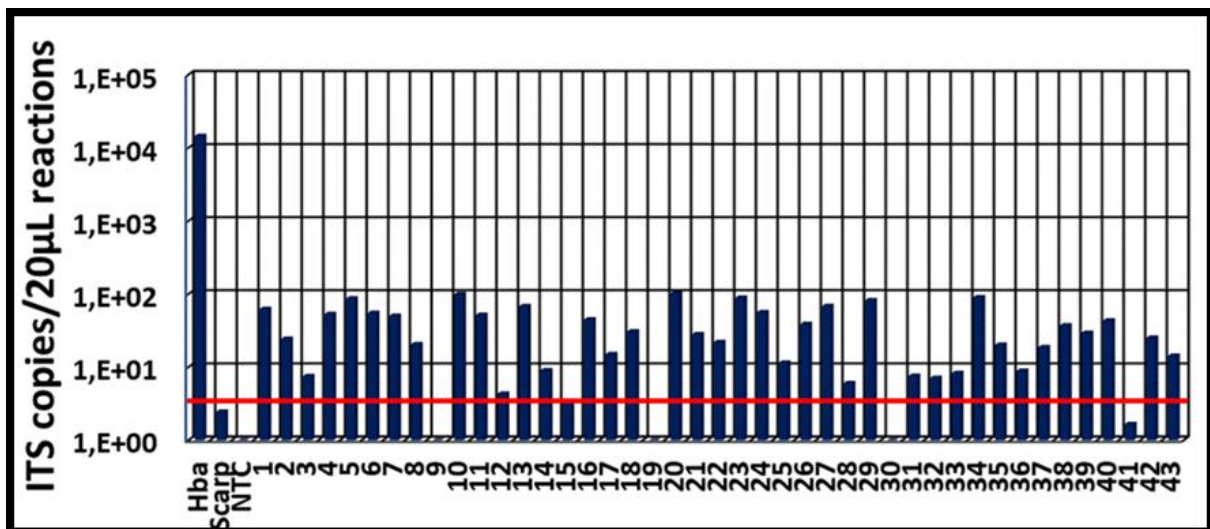


Figure 23 : Détermination du nombre de copies ITS des nématodes *Heterorhabditis bacteriophora* dans les 43 parcelles cultivées en maïs par ddPCR. L'évaluation du nombre de copies ITS a été faite dans les échantillons de nématodes mobiles et actifs du sol par ddPCR avec le couple d'amorce Hba2\_jc dessiné par Jean Claude Ogier. Le seuil de confiance défini à 5 ITS copies est indiqué sur la figure par la ligne rouge. Les contrôles négatifs et positifs ont été faits avec les ADNs de *S. carpocapsae* (Scarp) et *H. bacteriophora* (Hba). Le contrôle eau est nommé NTC (No Template control).

que le nombre de copies ITS dans les parcelles considérées comme positives soit 143% supérieur au contrôle négatif, fixe un seuil à 5 copies ITS dans le volume réactionnel. *H. bacteriophora* a été détecté dans 37 parcelles sur les 43 parcelles échantillonnées soit 86% de parcelles positives (Figure 23). Le fort taux de détection dans les sols en faible abondance de *H. bacteriophora* a été rapportée précédemment (Campos-Herrera et al., 2015). L'inefficacité de la détection d'*H. bacteriophora* par la méthode de piégeage pourrait être causée par leur faible abondance dans les parcelles, mais permis par une méthode plus sensible comme la ddPCR. Cependant, il est nécessaire de préciser que la parcelle 12, positive en piégeage, est pourtant négative en ddPCR ce qui ne permet pas de conclure de manière certaine sur un lien entre efficacité du piégeage et abondance des IJs dans les sols. De plus, des faux positifs pour certaines parcelles sont possibles puisqu'il y a des hybridations aspécifiques des amorces Hba2 jc avec les ADNs d'*A. ellesmerensis* et *P. pacificus*

Pour résumer sur les six couples d'amorces testés au départ, trois couples d'amorces publiés et trois couples dessinés au laboratoire, seulement deux couples d'amorces ont pu être utilisés jusqu'à la détection des espèces dans les échantillons (Tableau 5). Il s'agit du couple d'amorce publié Scarpo Campos ciblant *S. carpocapsae* utilisé en PCRq, et le couple d'amorce non publié Hba2 jc ciblant *H. bacteriophora* utilisé en ddPCR.

### **III. Usage de plusieurs couples d'amorces, espèce et genre spécifique pour augmenter la capacité de détection moléculaire des NEPs**

#### **1. Comparaison de la détection espèce spécifique et genre spécifique pour *Steinernema* sp.**

La convergence entre les couples d'amorces genre spécifique, ciblant *Steinernema* sp., et espèce spécifique, ciblant *S. carpocapsae*, peut être investiguée. En PCRq, les parcelles 23, 30 et 36 sont positives uniquement à *Steinernema* sp. alors qu'au contraire les parcelles 21 et 37 sont uniquement positives à *S. carpocapsae* (Figure 24). L'absence de *S. carpocapsae* dans les parcelles où des nématodes du genre *Steinernema* sp. sont détectés, pourrait indiquer la présence d'autres espèces dans ces parcelles. Les observations inverses (les parcelles 21 et 37) peuvent être expliquées par plusieurs hypothèses : 1/ des couples d'amorces différents ont des capacités d'hybridation à l'ADN cible différentes, 2/ la présence d'inhibiteurs dans les échantillons peut affecter différemment les couples



**Tableau 5 : Synthèse des résultats obtenus avec les six couples d'amorces espèces spécifiques testés.** Les lettres ND signifient que le couple d'amorce n'a pas été testé pour cette technique. Le signe moins signifie que le test avec le couple d'amorce n'est pas concluant et le signe plus que le test est concluant.

	Couples d'amorces publiés (Campo s-Herrera et al., 2011)			Couples d'amorces développés à DGIMI (Jean-Claude Ogier)				
	<i>S. carpocapsae</i>	<i>S. feltiae</i>	<i>H. bacteriophora</i>	<i>S. carpocapsae</i>	<i>S. feltiae</i>	<i>H. bacteriophora</i>	<i>Steinermema</i>	<i>Heterorhabditis</i>
PCRq TaqMan				ND	ND	ND	ND	ND
PCRq SyberGreen	+	Contrôle négatif > 10	Contrôle négatif > 1	ND	ND	ND	+	
ddPCR	ND	ND	ND	ND	ND	+	+	+

**Figure 24 : Synthèse des détections genre spécifique et espèce spécifique.** En rouge la détection des NEPs du genre *Steinernema* sp. en PCRq et ddPCR, et en vert la détection de *S. carpocapsae* en PCRq. En orange la détection d'*Heterorhabditis* sp. en ddPCR, et en violet celle de *H. bacteriophora* en ddPCR.

	<i>Steinernema</i> sp. (PCRq)	<i>Steinernema</i> sp. (ddPCR)	<i>S. carpocapsae</i> (PCRq)	<i>Heterorhabditis</i> sp. (ddPCR)	<i>H. bacteriophora</i> (ddPCR)
43	Red	Red	Green		Purple
42					Purple
41					
40				Orange	Purple
39	Red	Red	Green		Purple
38				Orange	Purple
37			Green	Orange	Purple
36	Red	Red			Purple
35					Purple
34				Orange	Purple
33					Purple
32				Orange	Purple
31		Red		Orange	Purple
30	Red	Red			
29				Orange	Purple
28					Purple
27		Red		Orange	Purple
26	Red	Red	Green		Purple
25				Orange	Purple
24					Purple
23	Red	Red		Orange	Purple
22				Orange	Purple
21			Green		Purple
20				Orange	Purple
19					
18				Orange	Purple
17	Red	Red	Green		Purple
16				Orange	Purple
15		Red		Orange	
14					Purple
13				Orange	Purple
12					
11				Orange	Purple
10		Red		Orange	Purple
9					
8		Red		Orange	Purple
7		Red			Purple
6				Orange	Purple
5		Red			Purple
4		Red		Orange	Purple
3				Orange	Purple
2					Purple
1					Purple

d'amorce et les réactions de PCRq, 3/ la présence de faux positifs avec les amorces espèce-spécifique ou de faux négatif avec les amorces genre.

## **2. Comparaison de la détection espèce spécifique et genre spécifique chez *Heterorhabditis* sp.**

Sur les 38 parcelles positives à *Heterorhabditis* sp. ou *H. bacteriophora* en ddPCR, 21 parcelles sont convergentes entre les deux couples d'amorces. Seule la parcelle 15 est uniquement positive en ddPCR à *Heterorhabditis* sp., ce qui pourrait nous faire suspecter la présence d'autres espèces du genre *Heterorhabditis* (Figure 24). En revanche il y a 16 parcelles qui ne sont positives qu'à *H. bacteriophora* (Figure 24). Les mêmes hypothèses peuvent être avancées pour expliquer ce résultat que celles de *Steinernema* et *S. carpocapsae*.

Pour résumer la détection avec des couples d'amorces spécifiques a soulevé des interrogations sur la présence de faux positifs et/ou négatifs dans la détection des espèces dans les parcelles. A ce stade il est plus sûr de statuer sur la présence d'une espèce si les couples d'amorces espèces et genre concordent sur sa présence dans la parcelle. Une approche multi-amorces pour la détection des IJs en PCRq ou en ddPCR semble importante pour améliorer la sensibilité et la robustesse des résultats obtenus.

## **IV. Conclusion**

Dans ces résultats supplémentaires, seules les détections de *S. carpocapsae* en PCRq et *H. bacteriophora* en ddPCR ont pu être investiguées. Il serait intéressant d'utiliser les amorces Scarpo Campos pour détecter *S. carpocapsae* en ddPCR et augmenter la capacité de détection de cette espèce. Pour la ddPCR, une réflexion a été menée afin de déterminer un seuil de détection qui soit le plus fiable possible. La détection de l'espèce *S. feltiae* n'a pas pu être effectuée en PCRq et en ddPCR avec les deux types d'amorces utilisés. Et avec les autres couples d'amorces étudiés, des faux positifs (hybridation aspécifique des amorces) ne sont également pas à exclure. La technologie TaqMan® pourrait être utilisée en PCRq et en ddPCR pour résoudre les problèmes liés à la spécificité et/ou aux hybridations aspécifiques réduisant les amplifications dans les contrôles négatifs (Houghton and Iii, 2006). Des sondes TaqMan® ont été dessinées pour plusieurs espèces de NEPs dont *S. carpocapsae*, *S. feltiae* et *H. bacteriophora* (Campos-Herrera et al., 2011). Dans nos conditions, le recours à cette technique ne pourra se faire sans diminuer la présence des inhibiteurs dans les échantillons. La dilution des ADNs



extraits ou l'ajout d'albumine dans le mélange réactionnel PCR peuvent être testés (Garland et al., 2010; Wang et al., 2017). Les inhibiteurs de PCR dans le mélange réactionnel peuvent aussi conduire à des faux négatifs (Wang et al., 2017). L'évaluation de l'influence des inhibiteurs de PCR sur l'obtention de faux négatifs pourrait être aussi investiguée avec un contrôle positif interne d'inhibition de PCR (Hartman et al., 2005).

L'ensemble de ce chapitre a mis en évidence l'intérêt des approches multi méthodes et multi-amorces pour augmenter la sensibilité de détection des NEPs dans les sols. Les méthodes de piégeage et moléculaires se sont montrées complémentaires pour la détection des NEPs dans les sols à cause de l'utilisation d'échantillons de différentes natures. L'originalité de ce travail a été la démonstration de l'intérêt de la ddPCR par rapport à la PCRq pour améliorer la sensibilité de détection des IJs. Les premiers essais avec les amorces espèces spécifiques semblent suggérer que l'utilisation de différents couples d'amorces pourraient permettre d'aller plus loin dans la détection et l'identification des NEPs avec les méthodes moléculaires. Nous proposons ainsi l'utilisation combinée du piégeage sur *G. mellonella* et de la ddPCR sur des extraits de nématodes mobiles des sols pour détecter les IJs dans les sols.

L'amélioration des méthodes de détections des NEPs est une étape essentielle pour approfondir nos connaissances sur leur distribution dans les sols agricoles, et leur utilisation en biocontrôle par conservation. D'autres méthodes alternatives au piégeage sont également possibles. Par exemple, une approche de cytométrie en flux et d'imagerie, appelée « Smart Soil Organism Detector, SOD », a été récemment développée pour identifier rapidement les organismes du sol. Cette nouvelle approche a détecté et identifié avec succès 13 souches d'*Heterorhabditis* sp., *Steinernema* sp. et *Caenorhabditis* sp. dans 99% des cas (Filgueiras et al., 2022).



## Chapitre 2 : Facteurs qui influencent la présence des NEPs dans les sols agricoles

---

### Introduction

Dans le premier chapitre, j'ai décrit la distribution des NEPs dans les sols cultivés en maïs dans le Sud-Ouest de la France. Nous avons décrit que la moitié des parcelles prospectées étaient positives aux NEPs. Le nombre de parcelles positives aux NEPs est très hétérogène selon les études (Mráček et al., 2005; Lawrence et al., 2006; Emelianoff et al., 2008; Pilz et al., 2014; Jaffuel et al., 2017; Campos-Herrera et al., 2019b; Blanco-Pérez, 2020; Daramola, 2021; Lazarova et al., 2021). Par exemple, des NEPs ont été décrits dans 86% des sols agricoles au Maroc (Benseddik et al., 2020) alors qu'ils ont été décrits dans 3.3% des sols cultivés et 5.10% des vergers en Italie (Tarasco et al., 2015). De nombreux facteurs biotiques tels que la présence de prédateurs (champignons nématophages, acariens...) (Epsky et al., 1988; Karagoz et al., 2007; Hodson et al., 2012; Raja et al., 2021), compétiteurs (Free-living nematodes, FLNs) (Duncan et al., 2003; Campos-Herrera et al., 2015b), ou l'abondance d'insectes hôtes (Mráček and Bečvář, 2000) et abiotiques tels que la texture des sols, le pH, la température (Kung et al., 1990a, 1990b, 1991; Shapiro-Ilan and Dolinski, 2015; Matuska-Lyzwa et al., 2024) influencent la présence, l'abondance et la survie des NEPs dans les sols. Dans les sols agricoles, l'effet des pratiques des agriculteurs sur la présence des NEPs a été moins investigué par la communauté scientifique. La diminution de la survie des NEPs a été montrée par application directe de produits phytosanitaires sur les IJs (Shapiro-Ilan and Dolinski, 2015; Özdemir, 2020; Matuska-Lyzwa et al., 2024) ou en testant l'effet après application de produits phytosanitaires dans des parcelles de vigne en condition contrôlée (Blanco-Pérez, 2020). Une autre pratique agricole qui favorise la présence des NEPs et modifie la diversité des espèces dans les sols, est la diversification du couvert végétal des parcelles de vigne (Blanco-Pérez, 2020).

A ma connaissance, peu d'études se sont intéressées à dégager les facteurs les plus importants pour expliquer la distribution des NEPs dans les sols agricoles dans des contextes non contrôlés. Les études s'intéressant aux effets des pratiques agricoles sont réalisées dans des conditions semi-contrôlées pour réduire le nombre de variables qui varient simultanément, à savoir la comparaison de deux parcelles semblables avec pour seule différence la pratique agricole testée. Si cette approche expérimentale permet de faciliter l'analyse et la compréhension des effets des pratiques agricoles sur les NEPs, en réalité, d'une culture à une autre, une combinaison de facteurs peut amener des effets différents.

L'objectif de ce chapitre 2 est ainsi d'identifier les facteurs prépondérants, parmi lesquels les paramètres physico-chimiques du sol, la composition de la nématofaune de sols, les indices de qualité

biologique des sols qui en découlent, et les pratiques agricoles, qui expliquent la distribution des NEPs dans les sols cultivés en maïs dans un contexte non contrôlé. Pour mener à bien cet objectif, deux stratégies ont été menées : 1/ une analyse mono-factorielle pour dégager les variables les plus corrélées avec la présence des NEPs, et 2/ une approche de prédiction par modélisation pour obtenir les meilleurs prédicteurs de la présence des NEPs dans notre contexte.

Cette étude est présentée dans la suite de ce chapitre et fait l'objet d'une publication dont je suis premier auteur en cours de préparation et que nous comptons soumettre en octobre à *Soil Biology and Biochemistry* (SBB).

## Single-factor analysis and predictive modelling to identify the best predictors of the presence of entomopathogenic nematodes in maize fields

Depuydt Elisabeth, Villenave Cécile, Fontez Bénédicte, Chauvin Camille, Cabre Lisa, Nguema-Ona Eric, Gaudriault Sophie et Ogier Jean-Claude

### Abstract

Entomopathogenic nematodes (EPNs) are soil-dwelling parasites that have a large range of insect hosts and are distributed in all continents except in Antarctica. Their use in augmentative biological control is often limited to greenhouses. A recent challenge is the use of EPNs in conservation biological control, *id est* the use of different agricultural practices to promote their presence in field soils. This goal requires a good understanding of their distribution in agricultural soils, which was shown to be variable depending on different abiotic and biotic factors and for which the effect of agricultural practices on the EPN presence was poorly examined. The aim of this study is to identify the main factors influencing the EPN presence among soil properties, agricultural practices and soil nematofauna. To achieve this objective, two strategies were used: 1/ a single-factor analysis to identify the variables most correlated with the presence of EPNs, and 2/ a predictive modelling approach to obtain the best predictors of the presence of EPNs. We applied these strategies on data from a previous study describing the presence of *Steinernema* in maize fields in Southwestern France using either baiting or molecular detection methods (Depuydt et al., 2024, *Soil Biology and Biochemistry*, **189**: 109275). The single-factor analysis reveals several soil variables correlated with the presence of EPNs (coarse loam, moisture, dry matter, pH, CaO, MgO, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> and Na<sub>2</sub>O), but the main effect was observed with an agricultural practice, when the plot was under monoculture for five years. After the selection of four representative variables (diversity of the mean crop, average MWD (Mean Weight Diameter), the diversity of plant cover and CaO), the predictive modelling did not identify any effect of soil properties but showed a negative correlation between the presence of *Steinernema* sp. and the switch of crop over the five years, and a positive correlation with cover crop diversity. Interestingly, the two approaches, single-factor analysis and predictive modelling converge on the positive effect of monoculture during five years on the *Steinernema* sp. presence, which suggests that this is a major factor explaining the *Steinernema* presence in maize fields in South-Western France.

## Introduction

Increasing food supplies is a major challenge, given that the world's population is set to rise to 9.7 billion by 2050 (United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division, 2022). To meet this challenge, we need to increase crop yields. Added to this are the human health and environmental issues associated with the use of chemical pesticides (Alavanja et al., 2003; Date et al., 2004; Davis, 2019).

Biological control is an alternative solution for controlling crop pests using a living agent (Stenberg et al., 2021). In 2015, the global market for biological control products was worth \$1.7 billion, or 2% of the market for crop protection products excluding herbicides (Lenteren et al., 2018). However, biocontrol has still major limitations, including product price (Lamichhane et al., 2016; Pressecq et al., 2024), efficacy variability (Stewart, 2001; Collier and Steenwyk, 2004; Lamichhane et al., 2016), or potential non target effects (Hajek et al., 2016).

A recent challenge is the use of native auxiliary in conservation biological control, *id est* the use of different agricultural practices to promote their presence in field soils. This kind of biological control requires a good knowledge of species distribution in crops. Some studies have investigated the effects of plant diversification on the abundance of natural enemies of crop pests. For example, the increase in forest and semi-natural areas correlates with a decrease in the abundance of aphids or the herbivory of the coleoptera *Meligethes aeneus* (Bianchi et al., 2006; Veres et al., 2013; Snyder, 2019). However, there are still very few studies on the influence of biotic and abiotic factors and agricultural practices on the presence of agricultural beneficials.

Entomopathogenic nematodes (EPNs) are soil-dwelling parasites belonging to *Steinernema* and *Heterorhabditis* genera. They are biological control agent with a large range of insect hosts used in augmentative biological control (Lacey et al., 2015). EPNs generally kill insect larvae in less than 120 hours and they have a sustainable mutualistic association with an entomopathogenic bacterium: *Xenorhabdus* sp. for *Steinernema* sp. and *Photorhabdus* sp. for *Heterorhabditis* sp. (Dillman et al., 2012; Ogier et al., 2023). EPNs are present in soils on the resistant forms called infective juvenil (IJ). IJs penetrate in their host by natural openings (mouth, anus) and release their entomopathogenic bacteria in the insect hemolymph , leading to septicemia and the death of the insect (Heppert et al., 2022).

In agricultural soils, the EPN presence is variable (Lazarova et al., 2021). Different factors were described to impact the presence, abundance or survival of EPNs in the soils (Shapiro-Ilan and Dolinski, 2015; Shapiro-Ilan et al., 2016). The presence and survival of IJs depends largely on soil texture, with the optimum soil having a higher percentage of loam and sand than clay (Kung et al., 1990b; Stock et al., 1999; Morton and García-del-Pino, 2009; Kanga et al., 2012; Jaffuel et al., 2018; Campos-Herrera

et al., 2019a). However, certain species such as *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema kraussei* have sometimes been found in soils with a higher percentage of clay (Mráček et al., 2005; Jaffuel et al., 2018). The effect of pH has also been investigated by different studies, which have shown that EPNs have been found in pH ranges from 4 to 8 (Miduturi et al., 1996; Stock et al., 1999; Morton and García-del-Pino, 2009; Kanga et al., 2012; Jaffuel et al., 2018; Campos-Herrera et al., 2019b). The quantity of organic matter of the soils hosting EPNs varies from 0.84% to 7.5% (Miduturi et al., 1996; Stock et al., 1999; Morton and García-del-Pino, 2009; Kanga et al., 2012). On the contrary, soil content of Zn, Fe, P and Mg do not seem to have any impact on the presence of EPNs (Campos-Herrera et al., 2019a). The climatic factors, temperature and rainfall, also influence the abundance of the EPNs in the soils (Campos-Herrera et al., 2007; Shapiro-Ilan and Dolinski, 2015; Jaffuel et al., 2018). Soil altitude modifies the distribution and abundance of EPNs species (Campos-Herrera et al., 2007, 2019a; Jaffuel et al., 2018; Dritsoulas et al., 2020). For example, in forests and orchards, *Heterorhabditis baujardi* was found at altitudes of 480m and 730m, while *Steinernema* sp. was isolated at altitudes of 82m and 539m (Kanga et al., 2012). Biotic factors influence the EPN presence as well as the competition between EPNs and opportunistic bacterial feeder nematode in the insect cadaver (Duncan et al., 2003; Campos-Herrera et al., 2015b), and the presence of various nematode predators (Hodson et al., 2012; Raja et al., 2021). In addition to relationships with opportunistic nematodes, positive correlations between the presence of EPNs and nematode fungus feeder have already been reported (Campos-Herrera et al., 2019b). However, to our knowledge, there is no study on the relation between EPN presence and the composition and abundance of the whole soil nematofauna, among which predator and omnivore nematodes. By studying the abundance of soil nematodes, ecological indexes can be calculated, which reflect the biological quality of soils (Ferris et al., 2001; Lu et al., 2020). For example, structure and maturity indices are indicative of soil disturbance and stability. The higher they are, the more stable the environment, with a complex food web where omnivorous and predatory nematode trophic groups are more abundant (Ferris et al., 2001; Lu et al., 2020). Finally, a few studies have investigated the effect of the agricultural practices on the EPNs presence. The use of a cover crops in a plot increases the persistence of EPNs (Jaffuel et al., 2017). The diversity of the plants used in these vegetal covers affects the distribution of EPN species in vineyard (Blanco-Pérez, 2020). The application of pesticide in the plots decreases the EPN presence in the vineyard (Blanco-Pérez, 2020; Blanco-Pérez et al., 2022b; Matuska-Łyżwa et al., 2024). Fertilization does not have a clear effect on the presence of EPNs in grass cover ley, maize and winter wheat crops (Jaffuel et al., 2017), but toxicity on *H. bacteriophora* and *S. feltiae* for phosphorus nitrogen and diammonium phosphate fertilization was reported (Matuska-Łyżwa et al., 2024). The presence of *S. feltiae* is most important in the integrate practice management (IPM) vineyard (shredded pruning residues, straw, spent mushroom compost) than conventional vineyard (herbicide treatment, tilling) (Blanco-Pérez et al., 2022a). The positive effect of crop irrigation on EPN

abundance has also been demonstrated (Campos-Herrera et al., 2022). All these studies on agricultural practices were carried out on experimental platforms, in which only a few predefined parameters vary (controlled experiments).

Realistically, many factors may play a role in the distribution of EPNs in agricultural soils. To our knowledge, no study has attempted to identify the predominant factors influencing the presence of EPNs among abiotic, biotic and agricultural practice variables. The aim of this study is therefore to identify the agricultural practices, the soil properties, the nematode trophic group and the nematode ecological indexes that explain the most the EPN presence in an uncontrolled experiment. To achieve this objective and identify robust predictors of EPN presence, two strategies were used: 1/ an single-factor analysis to identify, from among 42 variables, those most correlated with the presence of EPNs, and 2/ after selecting 4 representative variables from the previous 42, a predictive modelling approach for the presence of EPNs. We applied our strategy on data from our previous study describing the presence of *Steinernema* in maize fields in Southwestern France using either baiting or molecular detection methods (Depuydt et al., 2024). In this previous work, where sampling was carried out on plots from a network of farmers with contrasting agricultural practices, we detected EPN in 50% of the maize fields.

## **Materials and methods**

### **Choice of the plots and soil sampling methods**

Soil sampling was performed in June and July 2021 in corn fields in the South West of France. The selection of 41 plots was based on three agricultural systems: conventional for the plots with tilling and use of agrochemical products (n=13); conservation for the plots without tilling and use of agrochemical products (n=15); and organic for the plots with tilling and without use of agrochemical products (n=13).

The methodology to collect soil samples was performed as previously described (Depuydt et al., 2024). Briefly, in each plot, a representative area of 100 m<sup>2</sup> was delimited and 20 soil subsamples of 25 cm of depth were collected. These subsamples were mixed to form a composite soil sample which was sieved to an 8 mm mesh.

### **Characterization of agricultural practices**

A survey was carried out with each farmer to find out the technical itineraries followed for each plot. We retained five main agricultural practices or variables: i) vegetal diversity, including the diversity of

**Table 6: Agricultural practices in the 41 plots cultivated in maize.** The five agricultural practices explored were detailed with the description of the variable, their groups and the number of plots in each group

Practices	Abbreviation	Description	Categories	Number of plots
<i>Crop diversity</i>				
Diversity of the mean crop over the last 5 years	RoTf	number of switch of crops during the 5 years before sampling	No - Monoculture	22
			Low - -3 switch of plant	5
			High - + 3 switch of plant	6
			NA	7
			No - no cover crop	3
Diversity of soil cover	DsC	number of plant species used as cover crops during the year of sampling	Low - 1 plant species	14
			Medium - 2 plant species	10
			High - + 3 plant species	13
			NA	1
<i>Tillage</i>				
Soil tillage intensity	Stl	depth of tillage the year of sampling	No tillage - tillage<10 cm	18
			Tillage - tillage> 10 cm	23
			NA	0
<i>Fertilization</i>				
Type of fertilization	ToF	type of fertilization used the year of sampling	Organic and mineral	15
			Mineral	13
			Organic	10
			NA	3
<i>Crop protection</i>				
Pesticide treatment	PT	presence of pesticide treatment the year of sampling	With	26
			Without	13
			NA	2

the mean crop (RoTf) and cover crop diversity (DsC); ii) soil disturbance, measured by soil tillage intensity (StI); iii) fertilization, categorized by the type of fertilization (ToF) and iv) crop protection, measured by the use of chemical products (PT). The details of the parameters of each variable and the number of plots in each parameter are presented in Table 6.

### **Characterization of soil physico-chemical properties of composite soil samples**

A total of 25 soil physico-chemical properties were assessed by SADEF (Aspach-les-bain, France): texture (sand, loam, clay), soil bulk density, mean weight diameter MWD (fast MWD, low MWD, medium MWD, mechanic MWD), moisture, dry matter, pH, organic matter, organic carbon, nitrogen, carbon/nitrogen, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, cation exchange capacity (CEC), inorganic ions (K<sub>2</sub>O, MgO, CaO, Na<sub>2</sub>O). The details of the average and standard deviation of the soil characteristic values for the 41 plots are detailed in the Supplemental Table 1.

### **Characterization of soil nematofauna parameters of soil mobile nematofauna samples**

Mobile nematofauna was extracted from composite soil samples by Oostenbrink elutriation coupled with cotton-wool filter method (extraction ISO 23611-4). Briefly, 300g of fresh soil was poured into an elutriator. Nematodes were separated from soil particles by water flow and nematode suspension was filtered on three successive 50 µm sieves to remove fine particles. Particles on the sieves were placed, after to be washed, on a filter on top of Petri dish filled with water. After 48h, soil nematodes actively migrate from the filter to the water. On these soil mobile nematofauna samples, nematodes were identified by morphological identification. One mass slide was realized for each sample. An average of 242 nematodes were identified by slide under light microscope at 400x magnification and family level was assessed using morphological criteria (Bongers, 1989). The taxa were distributed in the different trophic group: opportunistic bacterial feeders (OpBa), no opportunistic bacterial feeders (NopBa), total bacterial feeders (Ba), fungal feeders (Fu), facultative plant feeders (Fpf), obligate plant- feeders (Pf), total plant feeders (TotPf), omnivores and carnivores (OmCa), total soil nematodes (TotNem).

For each composite sample, nematode ecological indexes were measured to characterize the biological quality of the soils. The taxa of soil nematodes are classified in the colonizer-persister scale (cp) ranged of 1 from 5 (Ferris et al., 2001). For example, the bacterial feeders with a cp of 1 are classed in the functional guild Ba<sub>1</sub> and those with a cp of 5 in the functional guild Ba<sub>5</sub>. Seven nematode ecological indexes were calculated as follows (Ferris et al., 2001; Yeates, 2003):





Maturity index ( $MI = \sum V_i \times P_i$ ) where  $V_i$  is the value of the cp for the taxon  $i$  and  $P_i$  is the proportion of the nematodes in the cp class for the taxon  $i$ . A low value of MI indicates a disturbed environment whereas a high value indicates a stable environment.

Enrichment index ( $EI = e / (e + b) \times 100$ ) where  $e = \sum K_e \times n$ ,  $b = \sum K_b \times n$ ,  $K_e$  is an enrichment coefficient,  $K_b$  soil nematode coefficient and  $n$  the abundance of the taxon. A high value of EI indicates a high nutrient availability in the soil.

Structure index ( $SI = s / (s + b) \times 100$ ) where  $s = \sum K_s \times n$ ,  $b = \sum K_b \times n$ ,  $K_s$  is a structure coefficient,  $K_b$  soil nematode coefficient and  $n$  the abundance of the taxon. A high value indicates a complex trophic web and a stable environment. Nematode Channel Ratio ( $NCR = Ba / (Ba + Fu)$ ) where  $Ba$  is a bacterivore nematode abundance and  $Fu$  a fungivore nematode abundance. A high value of NCR indicates a mainly bacterial decomposition pathway.

The Shannon's index ( $H$ ) calculated on the family diversity of the nematofauna was also determined.

The details of the average and standard deviation of the nematode abundance for each trophic group and indexes for the 41 plots were given in the Supplemental Table 1.

### **Isolation and detection of *Steinernema* sp.**

The methods and results of the detection of *Steinernema* sp. in the 41 plots cultivated in maize were described in a precedent study (Depuydt et al., 2024). Two methods were used to detect *Steinernema* sp.: i) a direct strategy by using multiple baiting cycles in the composite soil samples and ii) an indirect strategy by molecular detection (qPCR and ddPCR) in the soil mobile nematofauna sample extracted by elutriation followed by active move from water.

### **Statistical analysis**

The statistical analyses described were carried out using the R studio Software (v. R 4.3.3).

The correlation test and graphs were generated with the package corrplot (Wei and Simko, 2024).

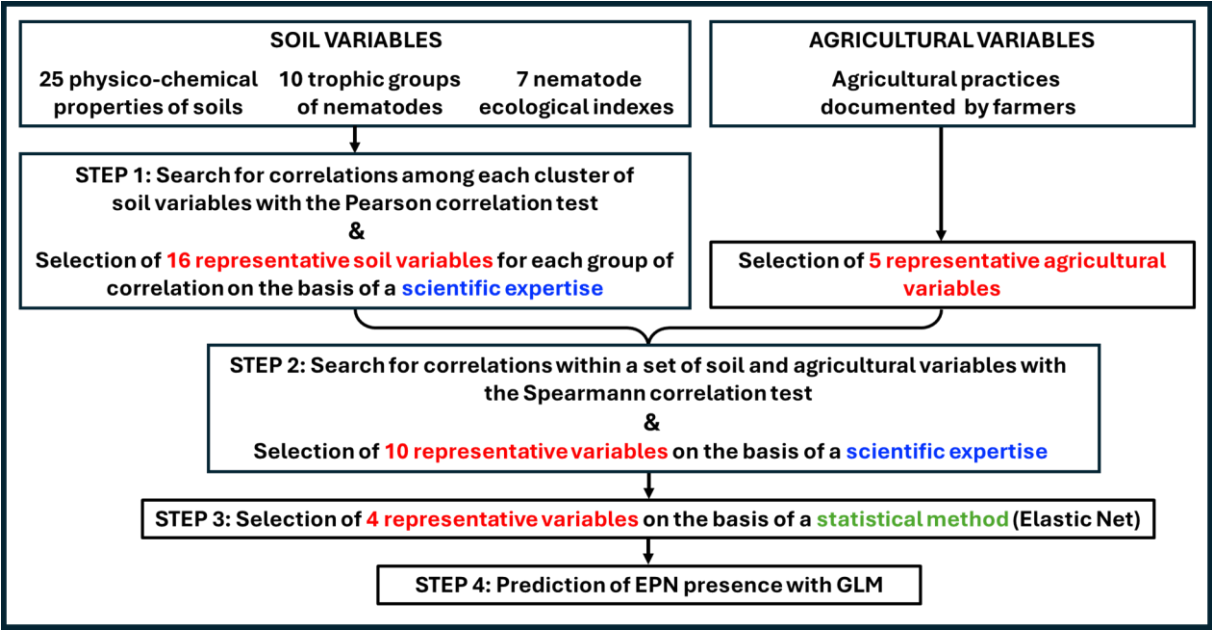


Figure 25: Schematic representation of the methodology leading to the predictive modelling used in the study.

## **Single-factor analyze of the variables explaining the presence of *Steinernema* sp. in maize fields according to the detection method**

For each soil explanatory variable (physico-chemical properties, abundance of nematode trophic groups and nematode ecological indices), the correlation between a variable and the *Steinernema* detection was determined with a Spearman correlation test. The effect of the agricultural practices on the *Steinernema* sp. presence was tested by a Chi-square test ( $\chi^2$ ) test (Agresti, 2007).

## **Predictive modelling of the *Steinernema* sp. presence in maize fields**

The steps leading to the development of a predictive model for the detection of EPNs are described in Figure 25. In STEP 1, a reduction of the number of the soil explanatory variables (25 physico-chemical properties of soils, 10 trophic groups of nematofauna, 7 nematode ecological indexes) was carried out. Correlation groups were determined with a Pearson correlation test (absolute value of the correlation coefficient  $> 0.4$ ). Then, within each correlation group, 16 representative variables were selected based on scientific expertise. In STEP 2, we added five agricultural practices that were documented by the farmers for all the plots and reduced again the number of variables to 10 by using another correlation analysis (Spearman correlation test due to the presence of both quantitative and qualitative variables) followed by a selection based on a scientific expertise. In STEP 3, we again carried reduction by selecting four representative variables based on a statistical method, an ElasticNet analysis with the package `glmnet` (Friedman et al., 2010). In STEP 4, a Generalized Linear Model (GLM) was performed with the four variables. The GLM was based on the binomial law and logit link with the package `lme4` (Bates et al., 2014). The cumulated effect of the qualitative variables was calculated with the function `predict` of the package `stats`. The deviance of model residuals and different index of the model predictive quality (Area Under the Curve, AUC; Error rate; Precision; Recall model index, F1 score, Akaike Information Criterion, AIC) were checked. A cross validation of the model with the K-fold method was performed to validate the prediction of the model.

**Table 7: Physico-chemical parameters of soils correlated with *Steinernema* sp. presence.** *Steinernema* sp. were detected with three methods: baiting, molecular, and both methods. We tested the correlation with Spearman's test between the presence of EPNs and properties of soils. Correlations highlighted in dark black shows the highest level of correlation.

	Baiting		Molecular		Both methods	
	Value correlation	p. value	Value correlation	p. value	Value correlation	p. value
Average MWD	-0.04	0.82	0.09	0.57	0.04	0.81
<b>Coarse loam</b>	<b>0.23</b>	<b>0.15</b>	<b>0.27</b>	<b>0.08</b>	<b>0.34</b>	<b>0.03</b>
Organic carbone	-0.07	0.66	-0.06	0.71	-0.002	0.99
<b>CaO</b>	-0.15	0.36	<b>- 0.37</b>	<b>0.02</b>	<b>-0.27</b>	<b>0.08</b>
<b>Moisture</b>	-0.02	0.91	<b>-0.25</b>	<b>0.11</b>	-0.05	0.74
<b>Dry Matter</b>	0.02	0.91	<b>0.25</b>	<b>0.11</b>	0.05	0.74
Fast MWD	-0.01	0.94	-0.007	0.97	-0.09	0.58
Low MWD	-0.16	0.32	0.16	0.33	0.01	0.93
Mecanic MWD	-0.03	0.86	0.05	0.77	0.06	0.71
Density	0.07	0.65	0.10	0.54	0.05	0.78
Clay	0.005	0.98	-0.02	0.88	-0.03	0.86
Fine loam	-0.04	0.82	0.04	0.83	0.13	0.41
Loam	0.05	0.77	0.12	0.46	0.20	0.20
Fine sand	0.17	0.29	-0.08	0.62	-0.07	0.64
Coarse sand	-0.10	0.52	-0.10	0.53	-0.16	0.33
Sand	0.02	0.90	-0.06	0.73	-0.11	0.49
<b>pH</b>	-0.13	0.43	<b>-0.28</b>	<b>0.08</b>	-0.17	0.30
Organic matter	-0.07	0.66	-0.06	0.70	-0.004	0.98
Nitrogen	-0.07	0.69	-0.08	0.62	-0.02	0.88
C/N	-0.05	0.74	0.02	0.92	0.03	0.87
<b>P<sub>2</sub>O<sub>5</sub></b>	-0.17	0.28	<b>0.22</b>	<b>0.18</b>	-0.13	0.40
CEC	-0.11	0.49	-0.15	0.35	-0.11	0.48
K <sub>2</sub> O	-0.20	0.22	-0.08	0.60	- 0.10	0.54
<b>MgO</b>	<b>-0.21</b>	<b>0.18</b>	0.01	0.93	-0.04	0.79
<b>Na<sub>2</sub>O</b>	0.17	0.27	0.03	0.87	<b>0.27</b>	<b>0.09</b>

## Results/Discussion

### Single-factor analysis of the soil properties impacting the *Steinernema* sp. presence in maize fields

Means and standard deviation of soil properties as well as the presence of EPNs in the 41 plots are described in Supplementary Table 1. For each plot, we tested correlations between these variables by considering a correlation tendency when the correlation coefficient is between 0.2-0.5 and displays an associated p. value below 0.2 (Table 7).

Four properties were positively correlated with the *Steinernema* sp. presence: coarse loam and Na<sub>2</sub>O for both detection methods, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> and dry matter when EPNs were detected by molecular methods. Moisture, CaO, MgO and pH were all negatively correlated with the presence of *Steinernema* sp. and only CaO was significantly correlated with both detection methods (Table 7). A positive and a negative impact of loamy and clay soils, respectively, on the EPNs presence has been shown in previous studies (Kung et al., 1990b; Labaude and Griffin, 2018). In our case, clay content is low in all plots, *id est* 176‰ ± 40 compared to loam (563‰ ± 98) and sand (261‰ ± 107). These weak values likely explain that we did not detect a clay negative effect on the *Steinernema* presence (Supplementary Table 1). High moisture percentage negative effect on EPN presence has been observed in another study, which was explained by a limitation of the oxygen in soil. Similarly, it has been demonstrated previously a pH effect on the presence of *Steinernema* sp. (Jaffuel et al., 2018; Labaude and Griffin, 2018; Campos-Herrera et al., 2019a; Dritsoulas, 2020). Interestingly, we identify for the first time an effect of the dry matter, MgO, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> and Na<sub>2</sub>O on the EPNs presence, although the effect of these variables on the life cycle of EPNs are not clear at that time.

### Single-factor analysis of the nematofauna variables impacting the *Steinernema* sp. presence in maize fields

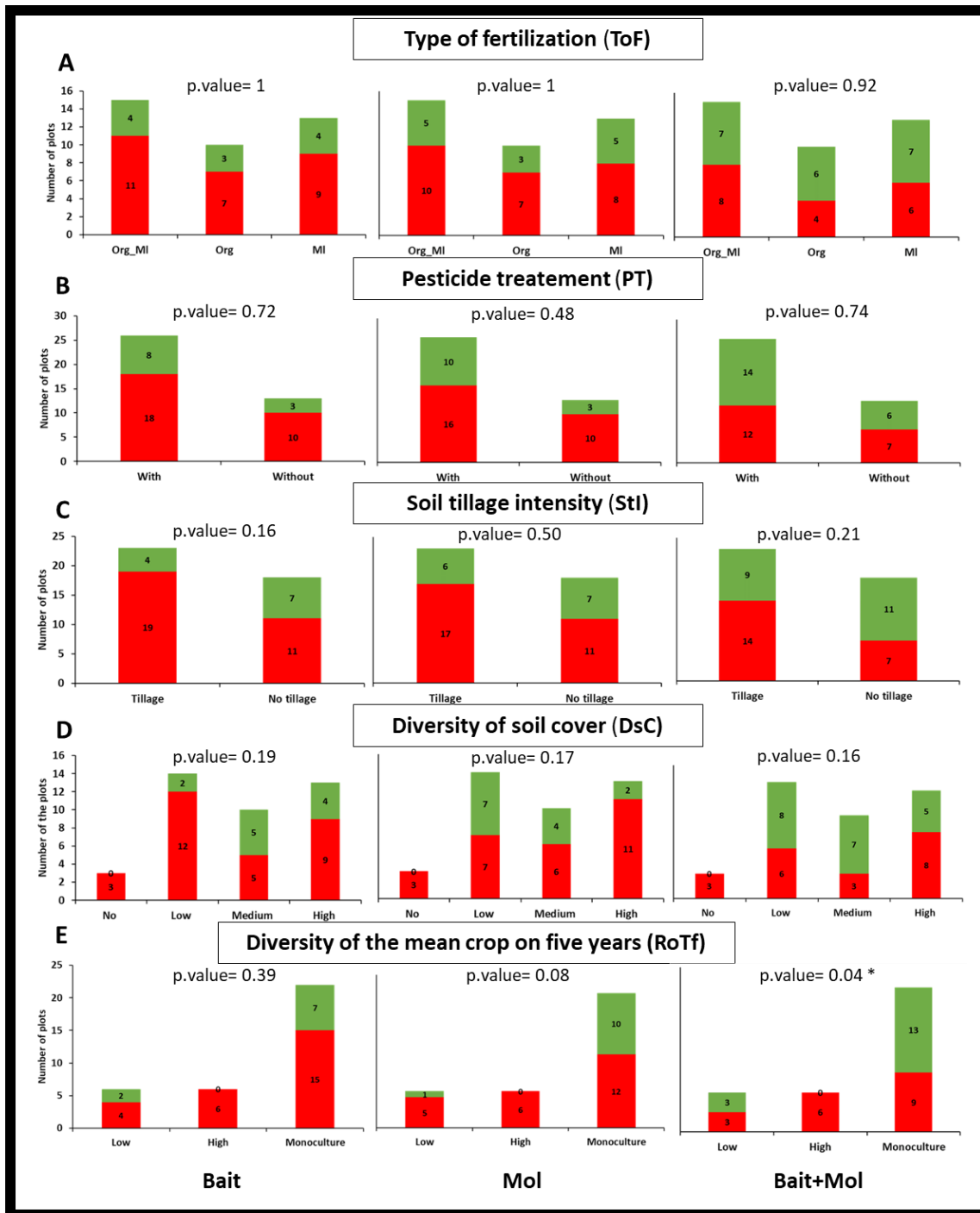
Means and standard deviation of soil nematofauna variables are described in Supplementary Table 1 and correlation tendencies with the *Steinernema* sp. presence were evaluated as described above (Table 8). The Shannon's index (H) and taxonomy richness were slightly correlated with *Steinernema* detection by baiting method. This was not the case for the indexes that reflect the complexity of the nematode community, SI and MI, but the values of these indexes were close between the plots where *Steinernema* sp. were detected (48 ± 15 and 2 ± 0.3) or not (44 ± 14 and 2 ± 0.3) (Supplementary Table 1). Taken together, these results suggest that the higher the diversity of all nematode communities, the



**Table 8: Nematode trophic groups, nematode ecological index correlated with *Steinernema* sp. presence.** *Steinernema* sp. were detected with three methods: baiting, molecular, and both methods. We tested the correlation with Pearson's test between the presence of *Steinernema* sp. and different parameters : structure index (SI), enrichment index (EI), nematode channel ratio (NCR), Shannon's index (H), pressure phytophagous index (PPI), maturity index (MI), nematode richness index (Richness), opportunistic bacterial feeders (OpBa), no opportunistic bacterial feeders (NopBa), total bacterial feeders (Ba), fungal feeders (Fu), facultative plant feeders (Fpf), obligate plant- feeders (Pf), total plant feeders (TotPf), omnivores and carnivores (OmCa), total soil nematodes (TotNem). Correlations highlighted in dark black shows the highest level of correlation.

	Baiting		Molecular		Both methods	
	Value correlation	p. value	Value correlation	p. value	Value correlation	p. value
OpBa	-0.05	0.75	-0.01	0.93	0.10	0.93
OmCa	0.02	0.92	0.03	0.87	0.05	0.87
<b>NopBa</b>	0.09	<b>0.56</b>	<b>-0.25</b>	<b>0.12</b>	<b>-0.17</b>	<b>0.12</b>
Ba	-0.05	0.77	-0.07	0.66	0.02	0.66
Fu	0.12	0.47	0	1	0.15	1
FLNs	-0.06	0.73	-0.06	0.70	0.04	0.70
Pf	0.18	0.26	-0.07	0.66	0.14	0.66
<b>Fpf</b>	<b>0.29</b>	<b>0.07</b>	-0.04	0.83	0.15	0.83
<b>TotPf</b>	<b>0.32</b>	<b>0.04</b>	0	1	0.27	1
TotNem	0.10	0.54	-0.06	0.70	0.14	0.70
SI	0.07	0.65	-0.009	0.96	0.04	0.96
EI	-0.09	0.57	0.06	0.69	0.16	0.69
NCR	-0.15	0.34	-0.11	0.48	-0.17	0.48
<b>H</b>	<b>0.19</b>	<b>0.24</b>	-0.007	0.97	-0.006	0.97
PPI	0.06	0.72	-0.07	0.68	0.07	0.68
MI	0.14	0.38	-0.06	0.70	-0.08	0.70
<b>Richness</b>	<b>0.33</b>	<b>0.04</b>	0.07	0.67	0.07	0.67





**Figure 26: Repartition of positive (green) and negative (red) plots for the *Steinerema* detection in the soils cultivated in maize according five agricultural practices and to the detection method.** Repartition is shown as barplots according to (A) the type of fertilization (ToF), (B) the pesticide treatment (PT), (C) the soil tillage intensity (StI), (D) the diversity of soil cover (DsC), (E) the the diversity of the mean crop on the last five years (RoF). Bait: baiting method. Mol: molecular method; Both: addition of both methods. We tested the difference of repartition between positive and negative plots according to values of agricultural variables with a Chi square test ( $\chi^2$ ). p. value is indicated for each barplot and tagged with \* when the difference is significant ( $<0.05$ ).

greater the presence of *Steinernema* sp. with infective ability. This could be explained by a reduction in the competitive pressure that may arise in the cadaver with certain species of nematodes bacterial feeders (Duncan et al., 2003; Campos-Herrera et al., 2015b).

If we consider the standard deviations, the means of nematode trophic groups between the different plots were closed (Supplementary Table 1). However, we observed correlations for three nematode trophic groups. The higher the facultative plant feeders (Fpf) and the total plant feeders (TotPf), the higher the *Steinernema* sp. presence detected by baiting method. On the contrary, the higher the non-opportunistic bacterial feeders (NopBa), the smaller the *Steinernema* presence detected by both methods. Interestingly, we did not observed a negative correlation between *Steinernema* presence and nematode plant feeders contrary to what has been described with *Meloidogyne* sp. (Kenney and Eleftherianos, 2016).

### **Single-factor analysis of the agricultural practices impacting the *Steinernema* sp. presence in maize fields**

We studied the impact of five agricultural practices: the diversity of the mean crop over the last 5 years (RoTf), the diversity of cover crops (DsC), the soil tillage intensity (StI), the type of fertilization (ToF) and the pesticide treatment (PT), on the presence of *Steinernema* sp. in soils cultivated in maize. *Steinernema* sp. was detected by either baiting, molecular analysis or by both methods (baiting and molecular analysis). The nature of ToF (Org-Mi, Org or Mi) and the use of PT showed no significant impact on the *Steinernema* sp. presence (Figure 26A and 26B). These results are consistent with other studies for ToF (Blanco-Pérez et al., 2022a; Matuska-Łyżwa et al., 2024), but not congruent with other studies for PT where authors have observed negative effect of pesticides treatments on EPN presence (Blanco-Pérez, 2020) and on EPN survival (Shapiro-Ilan and Dolinski, 2015; Özdemir, 2020; Matuska-Łyżwa et al., 2024). A possible explanation of the divergent results about PT is likely the type of pesticides used or the concentration used in the plots (Matuska-Łyżwa et al., 2024).

Albeit differences are not statistically significant, StI and DsC displayed a slight impact on the presence of *Steinernema* sp. (Figure 26C and 26D). For StI, the trend is a negative effect of tillage on *Steinernema* detection mainly with baiting method, but no clear effect of StI on the presence of *Steinernema* with molecular methods. The tillage is known to disadvantage the soil nematofauna (Lazarova et al., 2021; Puissant et al., 2021) but this has never been shown on EPNs (Blanco-Pérez, 2020). For DsC, the trend is a positive effect of a high diversity of the cover crop on *Steinernema* detection, but the number of plots without cover crop is not large enough to robustly conclude. Previous studies have indeed shown



a positive effect of cover crop on the distribution or persistence of EPNs (Jaffuel et al., 2017; Blanco-Pérez et al., 2020).

The only agricultural practice that displays a statistical effect on *Steinernema* sp. detection is RoTf. Indeed, when the EPN were detected with both baiting and molecular methods, the monoculture is associated with positive plots of *Steinernema* sp. (p. value=0.04) (Figure 26E).

When variables are considered separately, correlations between soil properties, nematofauna variables, agricultural practices, with the exception of RoTf, and the presence of *Steinernema* sp. are low and not statistically significant. We decided therefore to develop a predictive modelling approach, which uses a combination of variables and could potentially detect cumulative effects.

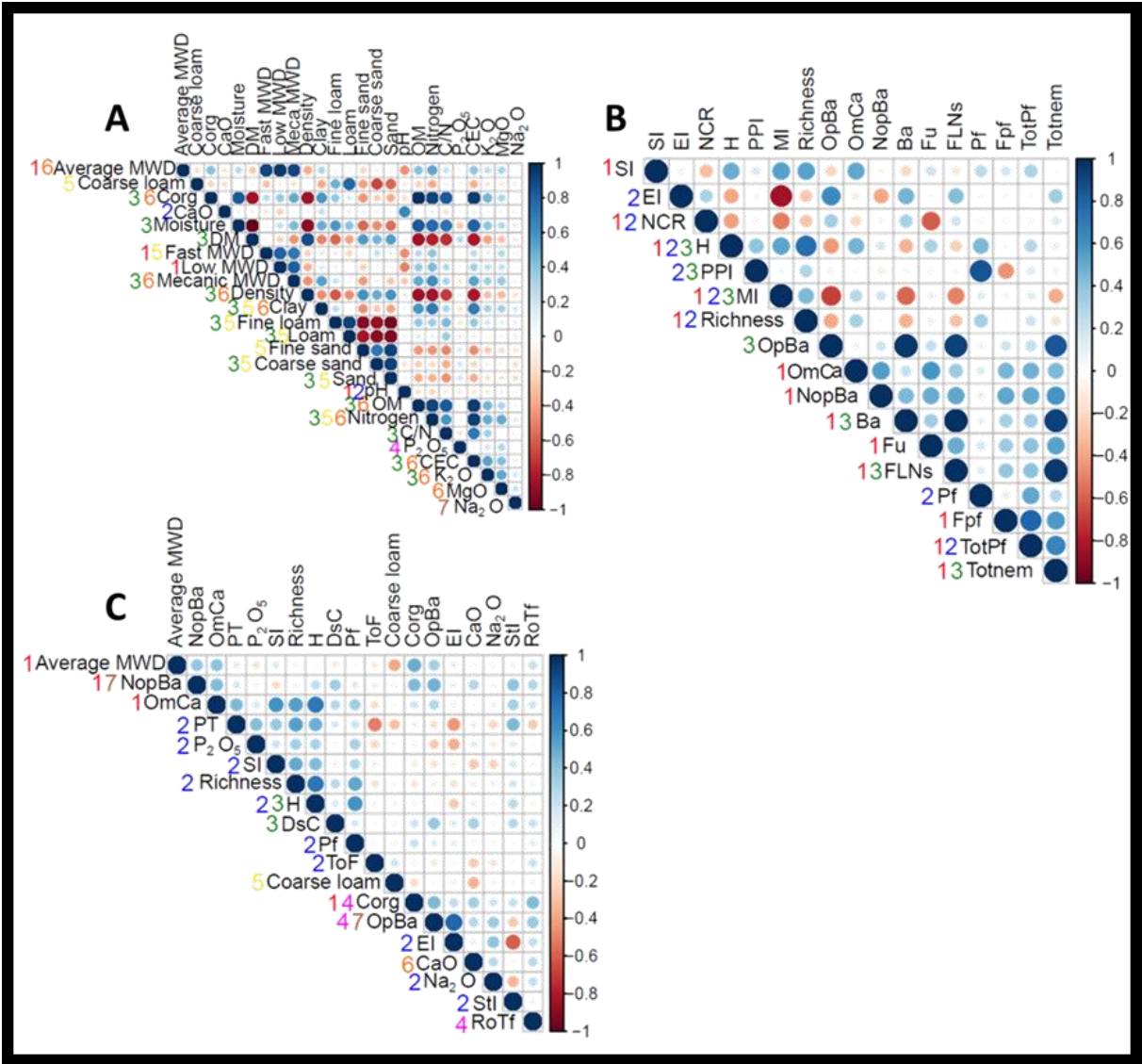
### **Selection of the most representative explanatory variables for the *Steinernema* sp. presence in maize fields**

Before using a predictive model for the *Steinernema* sp. presence in maize fields, we needed to drastically reduce the number of variables (42 soil explanatory variables and 5 agricultural variables; STEP 1 to 3 of Figure 25).

For soil physico-chemical properties, we defined seven groups of correlated variables with the Pearson correlation test (A, Figure 27). We selected a representative variable to cover all the correlation groups: average MWD, CaO, Na<sub>2</sub>O, Corg, coarse loam and P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (A, Figure 27). Moreover, the variables Corg and coarse loam were chosen because they have been described previously as having an impact on the presence of EPNs in soils (Kung et al., 1990b; Kapranas et al., 2017). The variables average MWD, CaO, Na<sub>2</sub>O and P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> were not described as having an impact on the EPN presence, but they represent important parameters of physico-chemical quality of the soil, such as soil structure and inorganic ions. In addition, they were poorly correlated with the explanatory variables of the other correlation groups.

For nematode trophic groups, we obtained three correlation groups (B, Figure 27). We chose to keep the NopBa (correlation group 1) and OpBa (correlation group 3) since some bacterial feeder nematodes were known to compete with EPNs in insect cadavers (Duncan et al., 2003; Campos-Herrera et al., 2015) and the OmCa (correlation group 1) because it is representative of the complex food web of the soil nematofauna (Ferris et al., 2001; Lu et al., 2020). Finally, we complete the representativeness by selecting also Pf (correlation group 2) and TotPf (correlation groups 1 and 2).

The nematode ecological indexes fell in the same three correlation groups as the nematode trophic groups (B, Figure 27). We selected SI to assess the impact of the structure, H and Richness to evaluate



**Figure 27: Correlation analysis between explanatory variables**

**A. Graphical representation of the result of the Pearson correlation test between the 25 physico-**

**chemical properties of soils.** The soil properties evaluated were: average MWD (Av MWD), coarse loam, organic carbon (Corg), CaO, moisture, dry matter (DM), fast MWD, low MWD, mechanic MWD, density, clay, fine loam, loam, fine sand, coarse sand, sand, pH, organic matter (OM), nitrogen, the ratio carbon/nitrogen (C/N), P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, CEC, K<sub>2</sub>O, MgO, Na<sub>2</sub>O.

**B. Graphical representation of the result of the Pearson correlation test between the 10 nematode trophic groups and 7 nematode ecological indexes.**

The parameters evaluated were: structure index (SI), enrichment index (EI), nematode channel ratio (NCR), Shannon's index (H), pressure phytophagous index (PPI), maturity index (MI), nematode richness index (Richness), opportunistic bacterial feeders (OpBa), no opportunistic bacterial feeders (NopBa), total bacterial feeders (Ba), fungal feeders (Fu), facultative plant feeders (Fpf), obligate plant- feeders (Pf), total plant feeders (TotPf), omnivores and carnivores (OmCa), total soil nematodes (TotNem).

**C. Graphical representation of the result of the Spearman correlation test between the 16 soil variables and the five agricultural variables.**

The soil variables evaluated were: average MWD, CaO, Na<sub>2</sub>O, Corg, coarse loam, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, OmCa, NopBa, Pf, TotPf, OpBa, SI, H, N, EI, PPI. The five agricultural variables were: the diversity of the mean crop on the last five years (RoTf), diversity of soil cover (DsC), soil tillage intensity (StI), type of fertilization (ToF) and pesticide treatment (PT).

The circles indicate the nature of the correlation, negative, blue, and positive, red. The value of the correlation is represented by the size of the circle; the larger the circle, the greater the value of the correlation. In each panel, the number refers to a correlation group.



the impact of diversity of the nematofauna and EI for the influence of the organic enrichment of the soil. As EPNs are known to influence obligate plant- feeders (Kenney and Eleftherianos, 2016), we also selected the PPI index.

After selecting these 16 representative soil variables (STEP 1 of Figure 25), we gathered them with the five agricultural variables, for which we had values for all plots following the survey of farmers. We again searched for correlations within this set of soil and agricultural variables (STEP 2 of Figure 25). Among the 7 correlation groups (C, Figure 27), we selected 10 representative variables based on scientific expertise: StI, OpBa, OmCa, RoTf, medium MWD, SI, DsC, coarse loam, Corg, CaO. We finally used a statistical method (ElasticNet) to further reduce the number of variables to be used in the predictive model (STEP 3 of Figure 25). After calculating the contribution coefficient for each of the 10 variables (0.26 StI, 0.0007 OpBa, 0.0025 OmCa, 1.19 medium MWD, 0.00009 SI, 0.54 DsC, 0.017 coarse loam, -0.05 Corg, -0.42 CaO, -0.85 RoTf), we chose the 4 variables with the highest absolute coefficients (STEP 4 of Figure 25), two qualitative variables RoTf and DsC, and two quantitative variables medium MWD and CaO.

### **Building a predictive model for the presence of *Steinernema* in maize fields**

We modelled the detection of *Steinernema* sp. (both detection methods were additionned) with the four variables selected above. First, we assessed the robustness of the variables for the *Steinernema* detection. When the two qualitative variables are not cumulated, no variable displayed a significant effect on the *Steinernema* detection (p. value > 0.05) and the confidence intervals of probability were quite large (Table 9). However, we observed a trend for the parameter RoTf High (p. value = 0.07). So, in one plot with a high level of crop rotation, there is 1.45 time less chance of detecting *Steinernema* than a plot that has been monocultured for five years (Table 9). We go further by assessing the effects of the two qualitative variables when they are cumulated (Table 10). We looked for the best compromise between probability and confidence interval. This compromise was found for DsC Medium and RoTf High (probability = -1.45; confidence interval = [-3.1; 0.21]) (Table 10), which means that with medium diversity of cover crop and a high number of diversities of the mean crop, there is 1.45 fewer chance of detecting *Steinernema* in the plots.

We then looked at the model's predictive capacity. We obtained a medium error rate of 33% (% of cases for which the model was able to correctly predict the detection of *Steinernema* sp.) and a precision index of 0.75. The recall index of 1 showed that the model did not seem to generate false positive and the F1 score of 0.86 indicated a good performance of the model. After cross validation, the RMSE and the MAE (less sensitive to outliers than RMSE) indexes indicated a mean deviation between the actual



**Table 9: Probabilities, confidence intervals and p. value of each parameter of the quantitative and qualitative variables after modelling the detection of *Steinernema* sp. with a Generalized Linear Model (GLM), based on the binomial law and logit link.**

<b>variable</b>	<b>qualitative parameter</b>	<b>Probability</b>	<b>Confidence Interval</b>	<b>p. value</b>
<b>Average MWD</b>		0.06	[-1.5; 1.6]	0.99
<b>CaO</b>		0.06	[-1.4; 1.5]	0.28
<b>Dsc</b>	<b>High</b>	1.73	[-1.66; 5.12]	0.99
	<b>Medium</b>	2.60	[-2.49 ; 7.69]	0.99
	<b>Low</b>	1.69	[-1.62; 4.99]	0.99
<b>RoTf</b>	<b>High</b>	-1.45	[1.39; -4.29]	0.07
	<b>Low</b>	0.28	[-0.27; 0.83]	0.42

**Table 10: Probabilities and confidence intervals of the cumulated effect of the two qualitative variables.** The probabilities and confidence intervals were calculated from the coefficients for the two qualitative variables obtained after modelling the detection of *Steinernema* sp. with a Generalized Linear Model (GLM), based on the binomial law and logit link.

	<b>Probability</b>	<b>Confidence Interval</b>
<b>DsC Low</b>		
<b>RoTf Low</b>	0.28	[-2.22; 2.79]
<b>RoTf High</b>	-1.45	[-476; 481]
<b>DsC Medium</b>		
<b>RoTf Low</b>	2.60	[-476; 481]
<b>RoTf High</b>	-1.45	[-3.11; 0.21]
<b>DsC High</b>		
<b>RoTf Low</b>	0.28	[-2.22; 2.79]
<b>RoTf High</b>	1.73	[-477; 480]

value and predicted value of 0.52 and 0.43 units, respectively, which is correct for a prediction. Altogether, the parameters of the model show that the predictive ability of the model is sufficiently robust for determining *Steinernema* sp. presence in maize fields.

For the future, the predictive capacity of the model could be improved by increasing the number of plots. Indeed, in our study, the weak number of plots, 41, limits the number of variables that could be integrated in the model (here only four). The limitation of the variable number generates an important bias when selecting representative ones, for example when scientific expertise is lacking. Moreover, variables which were not investigated may have a significant effect on the presence of EPNs. Indeed, it has been previously shown that the presence of insects (Mráček and Bečvář, 2000), nematophagous fungi (Timper et al., 1991), mites (Epsky et al., 1988; Hodson et al., 2012) and springtails (Hodson et al., 2012) have an influence on EPNs (Raja et al., 2021; Matuska-Łyżwa et al., 2024).

In this study, we analyzed a *Steinernema* survey in an uncontrolled experiment. In this condition, we identified two main limitations. First, the collection of data on agricultural practices from farmers may lead to an uncomplete dataset, which reduces the number of analyzable plots. Second, it may generate a disequilibrium in the qualitative variables such as agricultural practices, which alters the modelling power. It would be therefore informative to complete our study by conducting additional experiments under controlled conditions with a small but complete dataset of variables.

## Conclusion

This study searched for identifying predictors for the presence *Steinernema* in maize fields. We carried out this work with two parallel analyses. A correlation analysis between each of the 42 single-factors and the result of the *Steinernema* detection confirms a positive effect of coarse loam and a negative effect of moisture and pH, as previously shown. Additionally, we identified a positive effect of dry matter, MgO, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, Na<sub>2</sub>O, nematode Shannon's index and nematode taxonomic richness and a negative effect of MgO, CaO and a high number of rotations for the five years. Till now, these variables have never been described as influencing the presence of EPNs. We also carry out predictive modelling based on two quantitative variables and two qualitative variables identified as representative variables of the 42 single-factors. We obtained again a negative impact of a high number of crop rotations especially in condition of medium diversity of cover crop. In conclusion, our two approaches converge about the deleterious effect of a high number of different crops in the rotation on *Steinernema* detection. We assume that either rotations change insect species that may be undesirable hosts for EPNs, or increasing plant diversity via rotations increases the presence of other insect natural enemies, resulting in more competition against EPNs, or the plant species used are unfavorable to EPNs.

**Supplementary Table 1: Data of the physico-chemical properties of soils, abundance of nematode trophic groups, nematode ecological index and agricultural practices.** Three methods of EPN detection: baiting (Bait), molecular (Mol), and both methods (Both). Means and standard deviations of each variable in the plots with or without EPNs were calculated with each detection method. The raw data was listed. The file can be viewed via the link: [Supptable1.xlsx](#).

## Conclusion

Cette étude a permis de montrer que la présence de *Steinernema* sp. est favorisée par l'absence de rotation de culture principale pendant cinq ans, *i.e.* monoculture de maïs. Il s'agit ici du seul facteur qui ressort significativement pour expliquer la distribution de *Steinernema* sp. dans les parcelles cultivées en maïs. Il est nécessaire de souligner les nombreuses limites de l'étude et de la stratégie d'analyse. L'objectif de cette étude était de proposer une vision intégrée des facteurs influençant la présence des NEPs en s'intéressant aux facteurs classiques les propriétés physico-chimiques des sols et des variables moins étudiées avec les pratiques agricoles, les groupes trophiques de nématodes, et les indices nématofauniques. Nous avons décidé de choisir des parcelles avec des pratiques agricoles contrastées, mais dans un même bassin avec des propriétés physico-chimiques similaires pour nous focaliser sur la description des effets de variables moins décrites. Il n'est donc pas étonnant que nous n'ayons pas mis en évidence des effets de ces paramètres sur la présence des NEPs. De plus, nous avons réalisé cette étude sur un petit nombre de parcelles (41) par rapport un grand nombre de variables explicatives (environ une centaine étudiée) ce qui nous oblige à réduire ces variables. Nous avons choisi de faire une sélection selon notre expertise dans le domaine, mais cela peut amener un biais important pour les variables très peu étudiées dans notre contexte, comme la nématofaune des sols. De plus, l'enquête menée auprès des agriculteurs pour obtenir l'itinéraire technique des parcelles (=ensemble des pratiques agricoles réalisées dans la parcelle) n'a pas permis d'amener des informations complètes pour l'ensemble des parcelles. Ces données manquantes ont elles aussi réduit le jeu de données.

Cette étude met en évidence la difficulté d'étudier la présence d'organismes dans des contextes non contrôlés surtout quand la connaissance approfondie des facteurs qui peuvent affecter leur présence est manquante. Dans le cas des NEPs, peu d'études se sont intéressées aux effets des différentes pratiques agricoles dans différents contextes pédo-climatiques. Cette approche est intéressante dans le cas de l'utilisation des NEPs en lutte biologique par conservation, pour dégager les facteurs qui impactent le plus la distribution et la survie des NEPs dans des contextes naturels où les effets des facteurs sur la présence des NEPs peuvent se combiner ou se compenser. Dans notre étude nous avons mis en évidence que parmi toutes les pratiques agricoles le facteur explicatif de la présence était la monoculture, et non l'utilisation de produits phytosanitaires ou la diversité du couvert végétal contrairement à d'autres études (Blanco-Pérez, 2020; Matuska-Łyżwa et al., 2024).

Il serait important de reproduire cette étude dans d'autres contextes pédoclimatiques, en augmentant le nombre de parcelles, et/ou en sélectionnant un nombre réduit de variables agricoles pour obtenir un jeu de données complet plus simple à analyser. Le premier changement à faire pour réitérer cette étude serait de fournir un questionnaire simplifié pour le renseignement des pratiques agricoles effectuées sur les parcelles. La deuxième chose serait d'aller plus en détail sur les effets intégrés des

pratiques agricoles, des propriétés physico-chimiques et de la nématofaune sur la présence des NEPs. Pour cela il serait nécessaire d'échantillonner un nombre plus important de parcelles agricoles dans différents bassins géographiques et dans différentes cultures. Un projet à débiter dans cet objectif, OptiNEPs où le nombre de parcelles échantillonné est plus grand, plus d'une centaine, situées dans le Nord-Ouest et Est, le Sud Est de la France, et avec deux cultures différentes pomme de terre et verger pommier.



## Chapitre 3 : Influence du microbiote et de la phylogénie des nématodes entomopathogènes sur leur cycle parasitaire selon l'insecte hôte utilisé

---

### Introduction

Les deux premiers chapitres se sont intéressés à décrire la distribution des nématodes entomopathogènes (NEPs) dans une quarantaine de sols cultivés en maïs de la région de Pau, et à déterminer les facteurs biotiques et abiotiques des sols ainsi que les pratiques culturales qui influencent leur présence dans les sols cultivés en maïs. Dans ce 3<sup>ème</sup> chapitre, nous allons nous intéresser aux facteurs qui influencent la réussite du cycle parasitaire des NEPs vis-à-vis de deux insectes ravageurs de cultures de maïs, la Spodoptère litorale (*Spodoptera litoralis*) et la Chrysomèle du maïs (*Diabrotica virgifera virgifera*). Et nous nous focaliserons plus spécifiquement sur l'influence de la composition et la diversité de leur microbiote sur la réussite de leur cycle parasitaire.

Les NEPs sont plutôt considérés comme des organismes généralistes avec un large spectre d'hôtes d'insectes. Les espèces *Steinernema carpocapsae*, *Steinernema feltiae*, *Heterorhabditis bacteriophora*, par exemple, infestent autant les Lépidoptères, les Coléoptères, les Hyménoptères que les Diptères (Peters, 1996; Lacey et al., 2015). Cependant, des espèces de NEPs spécialistes sont également décrites, comme *Steinernema scapterisci* dont la pathogénicité et la réussite du cycle parasitaire sont meilleures sur les Orthoptères que sur les Lépidoptères (Nguyen and Smart, 1991; Lu et al., 2017), et *Steinernema scarabaei* qui a une pathogénicité et un nombre d'IJs émergents plus important avec des larves de scarabées que de Lépidoptères (Koppenhöfer and Fuzy, 2003). Parmi les espèces généralistes, le niveau de pathogénicité des NEPs est variable selon l'insecte hôte, mais aussi selon l'espèce de NEP. Par exemple, l'infestation avec *S. feltiae* cause 100% de mortalité chez des larves de la Noctuelle rayée, *Spodoptera litura*, (Lépidoptère) (Fuxa et al., 1988) tandis que cette espèce cause seulement 20% de mortalité chez les larves du Ténébrion meunier, *Tenebrio molitor*, (Coléoptère) (Caroli et al., 1996) ou entre 15-100% de mortalité chez les larves de *Diabrotica virgifera virgifera* (Dv) (Coléoptère) (Rasman et al., 2005; Toepfer et al., 2005). En revanche *H. bacteriophora* a une plus grande pathogénicité contre *T. molitor*, en causant jusqu'à 100% de mortalité des larves (Caroli et al., 1996; Susurluk, 2006). *Heterorhabditis amazonensis* tue 85% et 46% des larves de taupins, *Agriotes diaperinus*, et des adultes de la Punaise verte, *Diceraeus melacanthus* (Guide et al., 2022). Enfin, il existe des différences de pathogénicité intra-espèces des NEPs (Campos-Herrera and Gutiérrez, 2009). Une grande variabilité est également observable selon les études.



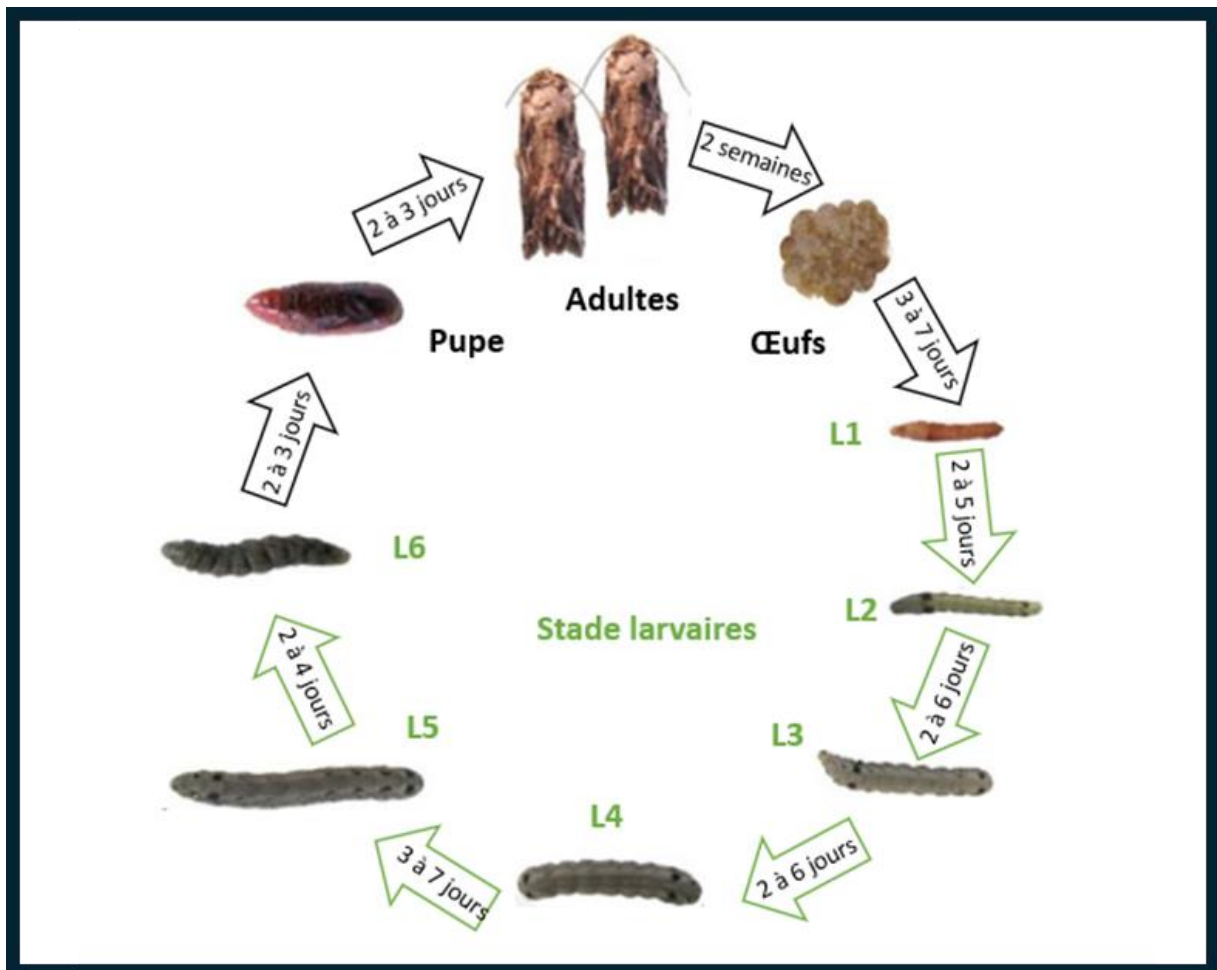


Plusieurs facteurs environnementaux peuvent influencer la réussite du cycle parasitaire des NEPs comme la température, le substrat dans lequel se déroule l'infestation, le stade larvaire de l'insecte. Ainsi, *H. bacteriophora* cause une plus grande mortalité des larves de *T. molitor* à 24°C qu'à 12°C (Susurluk, 2006). La mortalité des larves de *S. littoralis* causée par une infestation avec *S. feltiae* est plus élevée dans des substrats sablo-limoneux (Campos-Herrera and Gutiérrez, 2009). Les pupes et les larves sont souvent plus susceptibles aux NEPs que les adultes (Miranda et al., 2013; Labaude and Griffin, 2018).

Il existe un lien entre la virulence du nématode vis-à-vis des insectes et celle de son symbiote (Zervos et al., 1991; Sicard et al., 2003; Kim et al., 2012b). *Steinernema weiseri* a une virulence atténuée contre *Galleria mellonella* et *S. littoralis*. Après injection directe dans leur hémolymphe son symbiote, *Xenorhabdus bovienii* CS03, a montré aussi une virulence atténuée contre *G. mellonella* et *S. littoralis* (Bisch et al., 2015). L'absence du symbiote (nématodes aposymbiotiques) diminue aussi la *fitness* du nématode, en particulier la réussite parasitaire et le nombre d'IJs émergents (Sicard et al., 2003). Jusqu'à récemment, la virulence et la réussite du cycle parasitaire étaient vu sous le prisme d'une relation tripartite entre l'insecte, le nématode et son symbiote bactérien. La description d'une association entre le nématode et d'autres bactéries que le symbiote, le FAM (Frequently Associated Microbiota), a complexifié cette vision (Cambon et al., 2020; Ogier et al., 2020, 2023; Ruiu et al., 2022). Après injection dans l'hémolymphe de larves de Lépidoptères, certains membres du FAM appartenant au genre *Pseudomonas* ont montré une activité entomopathogène (Lysenko and Weiser, 1974; Ruiu et al., 2022). La présence de leur *Serratia liquefaciens* et *Pseudomonas fluorescens* dans l'insecte a permis l'émergence d'une nouvelle génération d'IJs de *S. carpocapsae* aposymbiotique (Ogier et al., 2023). Ce type d'interaction n'est pas une preuve de leur réelle implication dans la *fitness* du nématode, mais peut laisser supposer que le FAM pourrait intervenir dans le cycle parasitaire des NEPs (Ogier et al., 2023).

L'objectif de ce chapitre est de déterminer les liens entre le cycle parasitaire des NEPs et leur phylogénie et/ou la composition et la diversité du FAM. Nous pouvons distinguer trois sous-objectifs : 1/ évaluation du cycle parasitaire des isolats de NEPs collectés dans les parcelles cultivées en maïs sur deux insectes ravageurs de maïs *S. littoralis* et DvV, 2/ détermination d'un effet des espèces/isolats de NEPS sur leur cycle parasitaire, 3/ détermination d'une corrélation entre la composition et la diversité du microbiote et le cycle parasitaire des NEPs.

Dans un premier temps nous avons testé la pathogénicité et la réussite du cycle parasitaire de différents isolats des trois espèces de NEPs isolées des sols cultivés avec du maïs (voir chapitre 1) *S. carpocapsae*, *S. feltiae* et *H. bacteriophora*, sur deux insectes ravageurs de maïs *S. littoralis* et DvV. Les larves de *S. littoralis* ont été choisies, bien qu'elles ne soient pas naturellement présentes dans les sols mais



**Figure 28 : Cycle de vie de *Spodoptera littoralis*.** Figure réalisée par Brendan Vouadec, stagiaire de Master 1 que j'ai encadré durant le Printemps 2022 (d'après Chen et al., 2016).

retrouvées dans les parties aériennes du maïs, en particulier les feuilles, car il s'agit de l'insecte modèle élevé au laboratoire DGIMI, et dont les bio-essais d'infestation par les NEPs sont standardisés. Les larves de Dvv sont naturellement présentes dans les sols mais elles ne sont pas élevées au laboratoire DGIMI et le bio-essais d'infestation par les NEPs a nécessité un développement méthodologique pour des essais en microcosme. Les performances du cycle parasitaire sur *S. littoralis* et *D. virgifera* ont été comparées entre les isolats pour évaluer si un lien existait entre ces performances et les espèces de NEPs. Dans un second temps, nous avons décrit la composition et la diversité du FAM chez les trois espèces de NEPs *S. carpocapsae*, *S. feltiae* et *H. bacteriophora*. Dans un troisième temps, nous avons essayé d'étudier si un lien existait entre la diversité du microbiote et le cycle parasitaire des NEPs sur *S. littoralis*.

Les travaux réalisés pour ce troisième chapitre ne sont pas encore finalisés. En effet, des essais supplémentaires avaient été reprogrammés pour compléter ces premiers résultats et seront analysés par la suite pour une publication ultérieure. Pour cette raison cette troisième et dernière partie est rédigée sous la forme d'un chapitre.

## **Matériels et méthodes**

### **I. Bio-essais sur *Spodoptera littoralis***

#### **1. Elevage des larves de *Spodoptera littoralis***

Pour les tests de pathogénicité, des larves de *Spodoptera littoralis* au stade L6 sont utilisées (Figure 28). *S. littoralis* est élevé à l'insectarium DGIMI sur un milieu artificiel, le Poitout (Poitout et al., 1972), à 23°C avec une photopériode de L16 : D8 et une humidité de 40%.

#### **2. Description des isolats de NEPs**

Les isolats de NEPs utilisés pour évaluer la pathogénicité ont été isolés dans les 43 parcelles cultivées en maïs échantillonnées dans le Sud-Ouest de la France (voir Chapitre 1). Les performances du cycle parasitaire ont été évaluées sur 29 isolats différents : 12 isolats appartenant à l'espèce *Steinernema carpocapsae* (Sc), 15 appartenant à l'espèce *Steinernema feltiae* (Sf) et 2 appartenant à l'espèce *Heterorhabditis bacteriophora* (Hb). Parmi ces 29 isolats, six d'entre eux (Cifre002, Cifre003, Cifre005, Cifre008, Cifre046 et Cifre055) ont été testés par Brendan Vouadec, stagiaire de Master 1 que j'ai encadré durant le Printemps 2022. Le panel des isolats a été choisi selon deux critères : 1/ Avoir une représentation de chacune des trois espèces isolées, 2/ Tester des isolats originaires des différentes



parcelles. Une souche de la collection de DGIMI FRA241 appartenant à l'espèce *S. carpocapsae* a été utilisée comme référence car les performances de son cycle parasitaire sur *S. littoralis* se situent dans la moyenne selon les tests effectués au laboratoire DGIMI.

### **3. Essais des performances du cycle parasitaire des NEPs sur *Spodoptera littoralis***

Chaque isolat, le contrôle négatif et la souche de référence ont été testés sur 20 larves d'insecte (stade L6). Chaque larve a été placée dans un puit d'une plaque 12 puits sur un papier filtre inoculé avec 100 IJs ou 100µL de Ringer pour le contrôle négatif. Les plaques ont ensuite été incubées à 23°C à l'obscurité. La mortalité des larves de *S. littoralis* a été vérifiée tous les jours pendant 6 jours. Les cadavres ont été placés sur des dispositifs de récolte (White, 1927). Les émergences ont été vérifiées tous les jours pendant 30 jours.

Trois paramètres pour évaluer la pathogénicité et le déroulement du cycle parasitaire des IJs ont été mesurés : la survie des larves de *S. littoralis*, le succès parasitaire (nombre d'émergence/nombre de cadavres), et le succès reproducteur (nombre d'IJs émergents/mL) après 10, 20 et 30 jours post-infestation.

Les essais ont été faits en un réplica, excepté pour les six isolats testés par Brendan Vouadec (Cifre002, Cifre003, Cifre005, Cifre046 et Cifre055) pour lesquels trois réplicas ont été faits.

## **II. Bio-essais sur *Diabrotica virgifera virgifera***

### **1. Maintien au laboratoire des larves jusqu'au stade L3**

Les individus *Diabrotica virgifera virgifera* (Dvv) ont été réceptionnés au stade œufs (en provenance du laboratoire CABI (Hongrie)) puis élevés au laboratoire jusqu'au stade L3 (Figure 29). Le protocole suivi pour faire l'élevage a été développé au laboratoire par Alexandra Puisnel, étudiante en Master 1 pendant le Printemps 2021. Des boîtes plastiques (type alimentaire) d'élevage ont été remplies avec 2-3 cm de terreau autoclavé dans lesquelles une dizaine de graines de maïs ont été plantées et arrosées avec 60 mL d'eau. Ces boîtes plastiques d'élevage ont été placées à 25°C à l'obscurité dans une étude à 60% d'humidité pendant 14 jours avant la réception des œufs de Dvv afin de permettre la germination des graines de maïs et le développement du système racinaire dont se nourrissent les larves de Dvv (Figure 30).

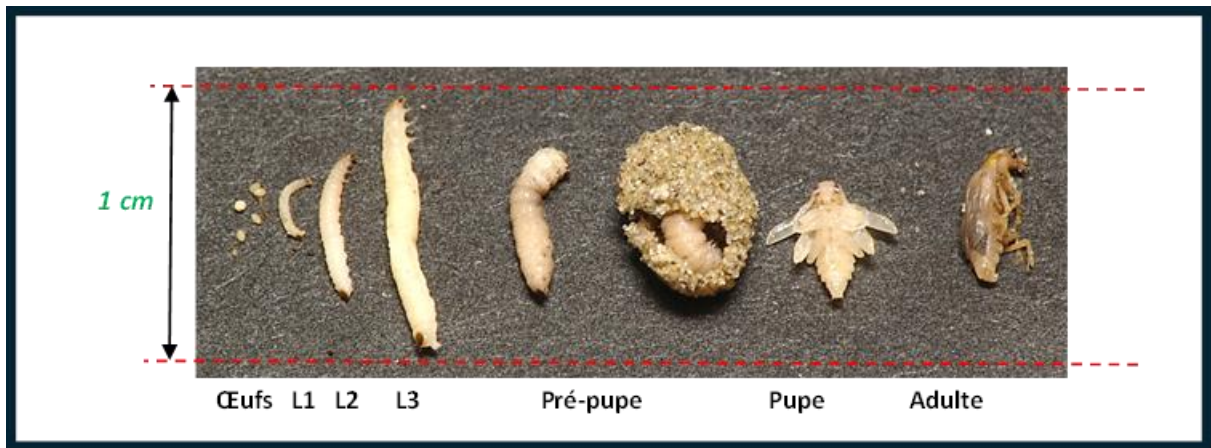


Figure 29 : Photographie des différents stades de développement de *Diabrotica virgifera virgifera* fournie par Mr Stephan Toepfer.

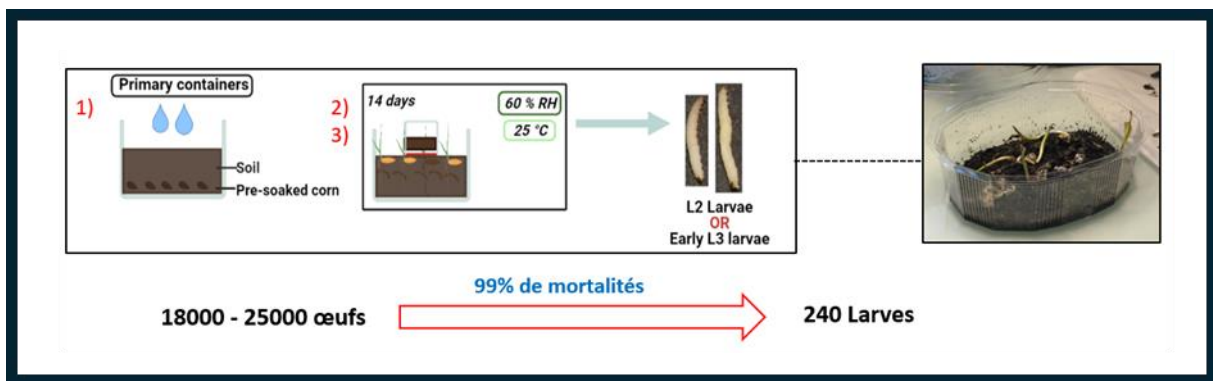


Figure 30 : Schéma de la méthode pour obtenir les boîtes d'élevage de *Diabrotica virgifera virgifera*.

Schéma issu du rapport de Master 1 d'Alexandra Puisnel (Printemps 2021).



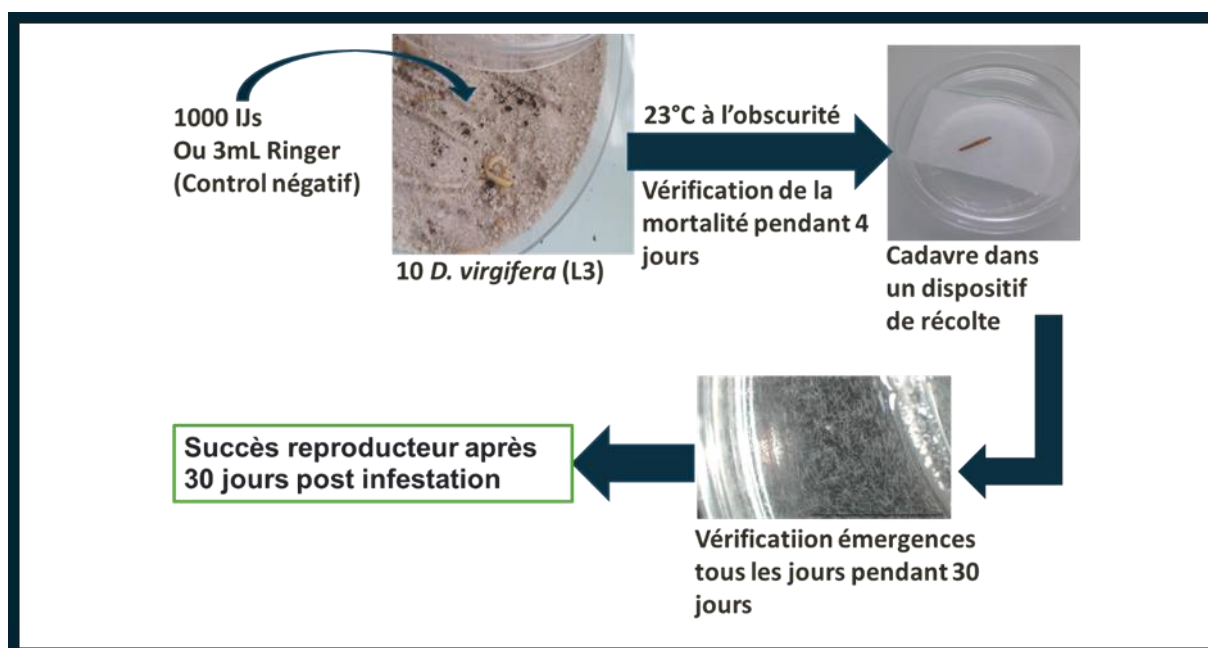


Figure 31 : Schéma des essais pour évaluer la pathogénicité contre *Diabrotica virgifera virgifera*.

Les œufs sont ajoutés à la surface du terreau, et des racines de maïs fraîches sont régulièrement ajoutées pour maintenir les larves en vie. A partir de 15 jours, les larves au stade L3 qui sont identifiées sur la base de leur longueur (0,5 à 1 cm) sont recherchées dans les boîtes.

## **2. Description des isolats de NEPs**

Les isolats de NEP utilisés pour évaluer la pathogénicité ont été isolés dans les 43 parcelles cultivées en maïs échantillonnées dans le Sud-Ouest de la France (voir Chapitre 1). En raison du caractère chronophage et délicat de l'élevage et des patho-essais avec Dvv, seulement 18 isolats de NEPs ont été testés : 2 Hb, 8 Sc et 8 Sf. Parmi ces 18 isolats, 6 d'entre eux (Cifre002, Cifre003, Cifre005, Cifre008, Cifre046 et Cifre055) ont été testés par Brendan Vouadec. Le choix des isolats à tester repose sur les mêmes critères que pour les essais avec *S. littoralis*.

Une souche de référence appartenant à la collection a aussi été testée : HT01 de l'espèce *H. bacteriophora* car les performances de son cycle parasitaire sur Dvv se situent dans la moyenne selon les tests effectués au laboratoire DGIMI.

## **3. Essais des performances du cycle parasitaire des NEPs sur Dvv**

Les essais sont réalisés sur 10 larves de Dvv au stade L3 pour chaque isolat. Une solution de 3mL de Ringer contenant 1000 IJs (IJs remplacés par du liquide de Ringer dans le contrôle négatif) a été versée dans une boîte de Pétri (30\*35 mm) contenant du sable et une racine de maïs. Les 10 larves de Dvv ont été ensuite placées sur la surface du sable, et le dispositif a été mis dans une étuve à 60% d'humidité à 23°C à l'obscurité. La mortalité des larves de Dvv a été vérifiée tous les jours pendant quatre jours. Les cadavres ont été placés sur des dispositifs de récolte (White, 1927). Les émergences ont été surveillées tous les jours pendant 30 jours post-infestation (Figure 31).

Les trois mêmes paramètres que pour les patho-essais sur *S. littoralis* ont été mesurés, sauf le succès reproducteur (nombre d'IJs émergents/mL) qui n'a été mesuré qu'après 30 jours post-infestation.

Les essais ont été faits en un réplica excepté pour les six isolats testés par Brendan Vouadec qui ont été testés en triplica.

### III. Description du microbiote bactérien des IJs

Le microbiote de 40 isolats de NEPs a été décrit dans cette partie en prenant en priorité les isolats dont leurs performances parasitaires ont été testées sur *S. littoralis* ou Dvv.

L'ADN bactérien a été extrait en suivant le protocole décrit dans Ogier et al., 2019. Environ 500-2000 IJs ont été rincés avec un fin filet d'eau pour éliminer les bactéries qui se trouvent dans la solution de conservation ou à la surface des IJs. Les IJs ont ensuite été transférés dans un tube à vis en plastique de 15 mL. Un choc thermique est appliqué pour tuer les IJs en plaçant les tubes à -80°C pendant une nuit, suivi d'une incubation à 90°C pendant 20 minutes. Les tubes sont centrifugés pendant 10 minutes à 3000 g à 4°C. Après élimination du surnageant, le culot de nématodes est repris dans 200 µL de tampon Quick Extract (Epi-centre, USA), 20 µL d'EDTA 0.5M pH8 et 2 µL de Ready-Lyse Lysozyme Solution (Epi-centre, USA). La solution obtenue est transférée dans un tube de 2 mL à vis dans lequel 5 billes en verre (1 mm de diamètre) sont ajoutées. Les nématodes sont ensuite broyés au Fast Prep (MP Biomedicals, Illkirch-Graffenstaden, France) à 7,5 ms pendant 40 secondes, répété trois fois. Les tubes sont laissés à incuber à température ambiante pendant deux heures puis 20 µL de protéinase K à 20 mg/ml sont ajoutés dans les tubes. Ils sont ensuite incubés pendant 2h à 55°C avec une agitation à 1400 rpm au bain marie sec. Un dernier cycle de Fast Prep est appliqué à 7,5 ms pendant 40 secondes pour lyser les dernières cellules éventuellement intactes. 20 µL de RNase à 20 mg/mL (Invitrogen PureLink™ RNaseA, France) sont ajoutés dans les tubes qui sont mis à incuber à 37°C pendant 15 minutes.

Les protéines sont précipitées en ajoutant 100 µL de solution de précipitation des protéines du Kit Wizard (Promega, France) par une incubation de 15 minutes dans la glace. Les tubes sont centrifugés pendant 10 minutes à 15000g à 4°C. Le surnageant contenant l'ADN bactérien est transféré dans un tube Eppendorf contenant 600 µL d'isopropanol. Après un mélange par inversion, les tubes sont placés à -20°C toute une nuit pour permettre la précipitation de l'ADN. Les tubes sont centrifugés à 15000 g pendant 20 minutes puis les culots d'ADN sont lavés à l'éthanol 70%. Pour cela, le culot est re-suspendu avec 500 µL d'éthanol à 70%, centrifugé à 4°C pendant 15 minutes à 15 000 g et le surnageant enlevé. Ces étapes sont répétées une deuxième fois.

Une région du gène *rpoB* des bactéries a été amplifiée en suivant le protocole décrit dans Ogier et al., 2019. Une première amplification PCR a été réalisée dans un thermocycleur Bio-Rad avec l'ADN polymérase haute-fidélité iProof (BioRad). Un programme de 35 cycles avec une température d'hybridation à 60°C pendant 43 secondes a été suivi. La présence et la taille des amplicons ont été analysées par électrophorèse sur gel d'agarose. Des contrôles négatifs constitués d'eau milliQ ou de Ringer ont été faits pour s'assurer de l'absence d'ADNs contaminants dans les échantillons. Les

amplicons ainsi obtenus ont été purifiés, multiplexés puis séquencés par la plateforme Genseq (Montpellier), avec la technologie Illumina Miseq (MiSeq Reagent Kit v3).

Le pipeline FROGS a été utilisé pour obtenir une table d'abondance des OTUs à partir des séquences brutes (Escudié et al., 2018). Une première étape a permis d'enlever les séquences qui ne correspondaient pas au couple de primers de la région *rpoB*, soustraire les séquences des amorces de la séquence cible et enlever les séquences contenant des bases ambiguës. L'algorithme Swarm (Mahé et al., 2014) a été utilisé pour regrouper les séquences en cluster puis l'algorithme VSEARCH permet de détecter et enlever les séquences chimériques (Rognes et al., 2016). Un filtre a été appliqué pour éliminer les clusters avec une abondance de séquences inférieure à 0,005% par rapport au nombre de séquences totales. Les séquences ont été assignées sur le plan taxonomique avec l'outil RDP Classifier (Cole et al., 2006). A la fin une table d'ASVs est ainsi obtenue.

#### **IV. Analyses statistiques**

Les tests statistiques ont été effectués avec le logiciel R studio (v. R 4.3.3).

##### **1. Performances parasitaires des NEPs sur *S. littoralis* ou Dvv**

Les différences significatives dans la survie des larves et du succès parasitaire des IJs ont été évaluées en utilisant le Cox proportional hazard models (Therneau and Grambsch, 2000) avec le package survival (Therneau et al., 2024). Les souches de références utilisées sont FRA241 dans le cas des essais sur *S. littoralis*, et HT01 dans le cas des essais Dvv.

Les comparaisons des succès reproducteurs entre les différents isolats ont été faites en utilisant un test de Kruskal-Wallis suivi du test de Dunn pour les comparaisons deux à deux.

##### **2. Recherche d'une corrélation entre les profils de microbiote et la phylogénie des NEPs**

Ces analyses statistiques ont été faites en collaboration avec avec Nathalie Vialanex et Elise Maigne de l'unité MIAT (INRAE) à Toulouse. Les isolats appartenant à la même espèce et la même parcelle ont été regroupés comme des répliques biologiques. La profondeur de séquençage a été corrigée en utilisant la méthode clr. Les analyses statistiques et les figures ont été réalisées avec les packages Phyloseq, Vegan et Ampvis 2 (Dixon, 2003; McMurdie and Holmes, 2013).

**Tableau 11 : Cinétique de mortalité des larves de *Spodoptera littoralis* selon l'isolat de NEP.** Les lettres indiquent la classe de pathogénicité des isolats créée avec le Cox proportional hazard models regroupant les isolats qui induisent une cinétique de mortalité des larves de *S. littoralis* : classe A, supérieure à celle avec FRA241 ; classe B, équivalente à celle avec FRA241 ; et classe C, inférieure à celle avec FRA241. Les valeurs dans le tableau indiquent l'exp(coef) à partir duquel les différences de cinétique de mortalité entre l'isolat et FRA241 sont déduites : exp(coef)<1 la cinétique de mortalité des larves est plus faible avec l'isolat que la souche de référence, exp(coef)=1 la cinétique de mortalité des larves est équivalente entre l'isolat et la souche de référence, exp(coef)>1 la cinétique de mortalité est plus haute avec l'isolat que la souche de référence. Les espèces sont indiquées par des abréviations Sc, *S. carpocapsae* ; Sf, *Steinernema feltiae* ; Hb, *Heterorhabditis bacteriophora*. Le niveau de significativité est indiqué par les étoiles (les 3 réplicas cumulés de FRA241 ont été utilisés comme référence) : p.value<0.001\*\*\*; p.value <0.01\*\*; p.value<0.05\*.

Isolats	Parcelles	Mortalité		
		A	B	C
Cifre002 (Hb)	12	1.49121**		
Cifre005 (Sc)	17	6.661***		
Cifre007 (Sc)	17	3.168***		
Cifre043 (Sc)	29	7.991***		
Cifre046 (Sc)	30	7.023***		
Cifre048 (Sc)	30	3.07360***		
Cifre051 (Sc)	30	5.643***		
Cifre055 (Sc)	30	2.26966***		
Cifre003 (Hb)	12		1.15839	
Cifre006 (Sc)	17		0.59508	
Cifre032 (Sc)	23		1.30717	
Cifre047 (Sc)	30		1.36568	
Cifre070 (Sf)	23		1.30717	
Cifre077 (Sf)	23		0.74577	
Cifre008 (Sc)	17			0.31152***
Cifre012 (Sc)	22			0.08041***
Cifre010 (Sf)	21			0.09499***
Cifre019 (Sf)	23			0.09828***
Cifre021 (Sf)	23			0.01752***
Cifre034 (Sf)	23			0.31623***
Cifre035 (Sf)	23			0.53892**
Cifre036 (Sf)	23			0.62354*
Cifre063 (Sf)	23			0.17051***
Cifre064 (Sf)	23			0.01752***
Cifre065 (Sf)	23			0.58856*
Cifre072 (Sf)	23			0.03676***
Cifre073 (Sf)	23			0.03507***
Cifre074 (Sf)	23			0.63063*
Cifre075 (Sf)	23			0.10886***

Un test de student modéré a été utilisé pour tester une corrélation entre les profils de microbiote et la phylogénie des NEPs. Des tests ANOVA ont été utilisés pour évaluer l'effet de l'espèce de NEPs sur l' $\alpha$ -diversité des bactéries du microbiote (=nombre d'espèces de bactéries dans un réplica biologique) et sur la  $\beta$ -diversité (=diversité des espèces entre les réplicas biologiques appartenant à des espèces différentes).

### **3. Analyse du lien entre les performances du cycle parasitaire des NEPs sur *S. littoralis* et la diversité du microbiote**

Ces analyses statistiques ont également été faites avec Nathalie Vialanex et Elise Maigne. Le lien entre les performances du cycle parasitaire des NEPs sur *S. littoralis* et la diversité du microbiote a été déterminé en créant un modèle qui pioche aléatoirement pour chaque isolat, une larve et les données de cycle parasitaire des IJs associés (survie, succès parasitaire et succès reproducteur). Le modèle tourne ensuite 100 fois pour obtenir une estimation de la p-value et son intervalle de confiance pour chaque paramètre du cycle parasitaire.

## **Résultats**

### **I. Evaluation des performances du cycle parasitaire des NEPs sur deux ravageurs de culture de maïs**

#### **1. Evaluation de la pathogénicité et de la réussite du cycle parasitaire des NEPs sur *Spodoptera littoralis***

La survie des larves d'insecte, a été évaluée en comparant la survie des larves d'insectes infestées par les isolats de NEPs à celle des larves infestées par la souche de référence du laboratoire *S. carpocapsae* FRA241. Les larves de *S. littoralis* dans le contrôle négatif sont restées en vie jusqu'à six jours post infestation. Trois classes de pathogénicité ont été créées regroupant les isolats qui induisent une cinétique de mortalité des larves de *S. littoralis* (i) supérieure à FRA241 (classe A, Tableau 11), (ii) équivalente à FRA241 (classe B, Tableau 11), et inférieure à FRA241 (classe C, Tableau 11). Les isolats les plus pathogènes (classe A) appartiennent tous à l'espèce *S. carpocapsae*, excepté un isolat appartenant à *H. bacteriophora* (Tableau 11). Au contraire les isolats les moins pathogènes (classe C) appartiennent tous à l'espèce *S. feltiae* (Tableau 11). Nous avons regardé s'il y avait une convergence entre la classe de pathogénicité des isolats contre *S. littoralis* et les résultats de pathogénicité obtenus lorsque nous avons testé les Postulats de Koch sur un autre Lépidoptère *Galleria mellonella* dans le

**Tableau 12 : Cinétique d'émergence des IJs infestant les larves de *Spodoptera littoralis*.** La cinétique d'émergence a été évaluée tous les jours après infestation jusqu'à 30 jours post infestation. Les lettres indiquent la classe de cinétique d'émergence des isolats créée avec le Cox proportional hazard models regroupant les isolats qui induisent une cinétique d'émergence des nouveaux IJs du cadavre : classe A, supérieure à celle de FRA241 ; classe B, équivalente à celle de FRA241 ; et classe C, inférieure à celle de FRA241. Les valeurs dans le tableau indiquent l'exp(coef) à partir duquel les différences de cinétique d'émergence des nouveaux IJs entre l'isolat et FRA241 sont déduites : exp(coef)<1 la cinétique d'émergence des nouveaux IJs est plus faible avec l'isolat que la souche de référence, exp(coef)=1 la cinétique d'émergence des nouveaux IJs est équivalente entre l'isolat et la souche de référence, exp(coef)>1 la cinétique d'émergence des nouveaux IJs est plus haute avec l'isolat que de la référence. Les espèces sont indiquées par des abréviations Sc, *S. carpocapsae* ; Sf, *Steinernema feltiae* ; Hb, *Heterorhabditis bacteriophora*. Le niveau de significativité est indiqué par les étoiles (les 3 répliques cumulés de FRA241 ont été utilisés comme référence) : p.value<0.001\*\*\*; p.value <0.01\*\*; p.value<0.05\*.

Isolats	Succès parasitaire		
	A	B	C
Cifre002 (Hb)	1.55**		
Cifre003 (Hb)	1.509**		
Cifre005 (Sc)	1.976***		
Cifre007 (Sc)	2.057**		
Cifre046 (Sc)	2.51***		
Cifre048 (Sc)	1.63*		
Cifre051 (Sc)	3.189***		
Cifre070 (Sf)	9.704***		
Cifre074 (Sf)	1.64*		
Cifre077 (Sf)	2.719***		
Cifre043 (Sc)		8.60e-1	
Cifre047 (Sc)		1.25	
Cifre055 (Sc)		1.209	
Cifre021 (Sf)		3.25e-8	
Cifre035 (Sf)		6.77e-1	
Cifre036 (Sf)		1.072	
Cifre064 (Sf)		3.251e-8	
Cifre065 (Sf)		7.94e-1	
Cifre075 (Sf)		3.251e-8	
Cifre006 (Sc)			3.35e-1***
Cifre008 (Sc)			4.303e-2***
Cifre012 (Sc)			8.36e-2***
Cifre032 (Sc)			5.13e-1**
Cifre019 (Sf)			7.35e-2***
Cifre010 (Sf)			0.139***
Cifre034 (Sf)			2.45e-1***
Cifre063 (Sf)			1.18e-1***
Cifre072 (Sf)			2.500e-2***
Cifre073 (Sf)			2.412e-2***

chapitre 1. Il n'y a pas de convergence claire entre les résultats obtenus contre *S. littoralis* et *G. mellonella*, mais il est nécessaire de souligner que sur *S. littoralis* une cinétique a été mesurée tandis que sur *G. mellonella* il s'agit d'une  $TL_{50}$  (temps nécessaire pour obtenir 50% de mortalité).

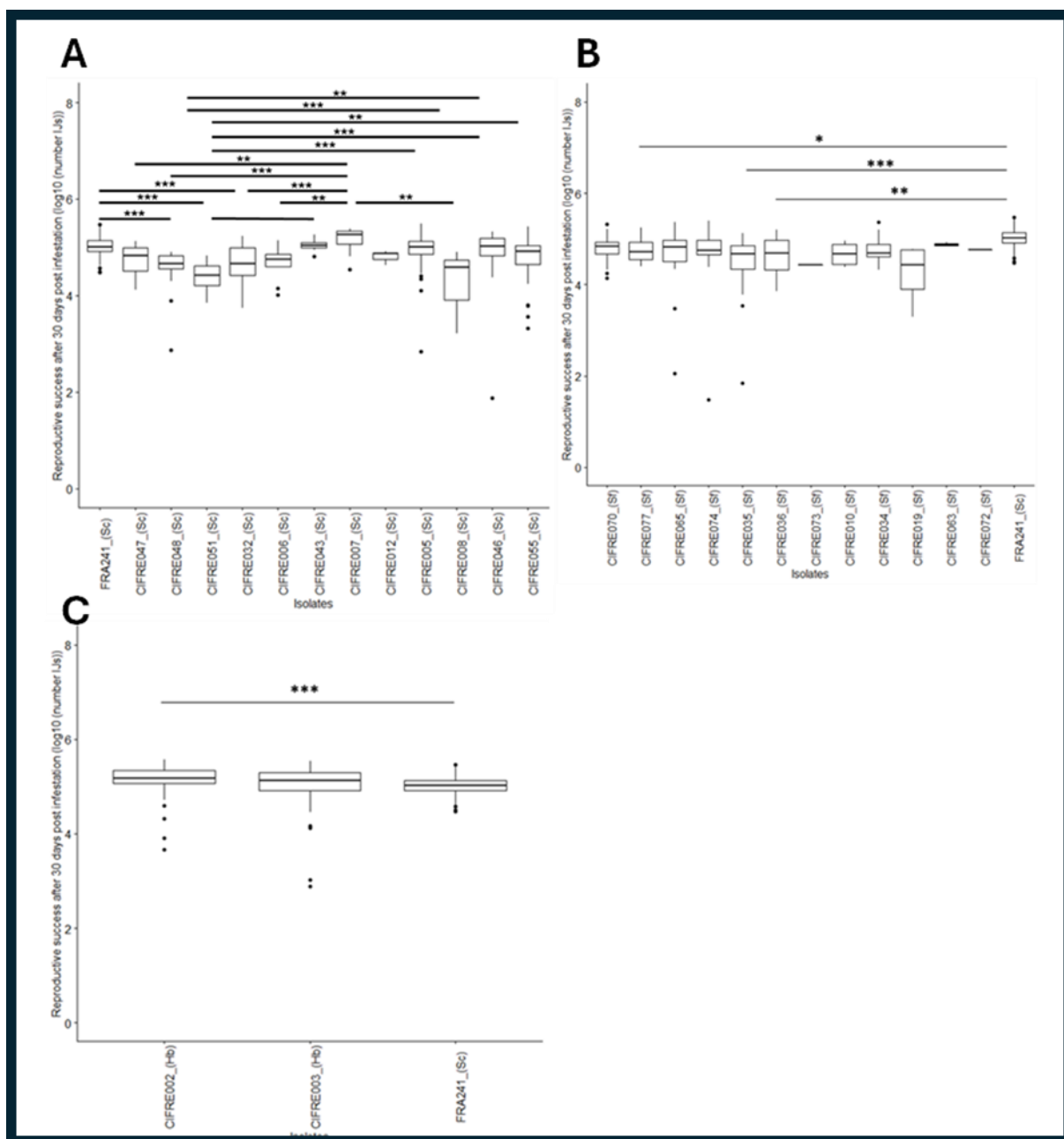
Le succès parasitaire a été évalué en comparant la cinétique d'émergence des nouveaux IJs des isolats de NEPs à celle des nouveaux IJs de la souche de référence du laboratoire *S. carpocapsae* FRA241. Trois classes ont été créées regroupant les isolats qui ont une cinétique d'émergence (i) supérieure à FRA241 (classe A, Tableau 12), (ii) équivalente à celui de FRA241 (classe B, Tableau 12), et inférieure à FRA241 (classe C, Tableau 12). Les espèces des isolats sont plus hétérogènes dans les différentes classes de cinétique d'émergence par rapport aux résultats de pathogénicité. Dans la classe avec une cinétique d'émergence supérieure à FRA241, les deux isolats d'*H. bacteriophora*, cinq isolats de *S. carpocapsae* et trois isolats de *S. feltiae* sont retrouvés (A, Tableau 12). En revanche dans la classe cinétique d'émergence équivalente à FRA241, une majorité d'isolats de *S. feltiae* est retrouvée (B, Tableau 12). En comparant les isolats appartenant aux trois classes de pathogénicité et de succès parasitaire, nous observons que leur répartition est équivalente. Les isolats qui ont une cinétique d'émergence supérieure à celle de FRA241 ont aussi un pouvoir pathogène supérieur ou égal à FRA241 excepté pour Cifre074 (Sf) (A, B Tableaux 11 et 12). Les isolats qui ont une cinétique d'émergence égale ou inférieure à celle de FRA241 sont les isolats qui ont une pathogénicité égale ou inférieure à FRA241 excepté pour Cifre055 (Sc) et Cifre043 (Sc). Les isolats avec une cinétique d'émergence inférieure à FRA241 sont les isolats au pouvoir pathogène inférieur à FRA241, excepté Cifre006 (Sc) et Cifre032 (Sc) (C, Tableaux 11 et 12).

Le succès reproducteur a été comparé entre tous les isolats testés après 10, 20 et 30 jours post infestation. Les succès reproducteurs après 10 et 20 jours post infestation donnent des résultats équivalents aux différences obtenues après 30 jours post infestation, pour cette raison je ne présente que les résultats à 30 jours. Le succès reproducteur est équivalent entre les trois espèces de NEPs (Figure 32). Seule une différence de succès reproducteur est visible entre la souche de référence et certains isolats des espèces *S. feltiae* et *H. bacteriophora*, aucune variabilité de succès reproducteur n'est visible entre les isolats (B et C, Figure 32). En revanche, une grande variabilité entre les isolats de *S. carpocapsae* est observable (A, Figure 32). Il y a des isolats qui ont un succès reproducteur quasiment trois à quatre fois plus élevé, par exemple Cifre007 avec  $164\,275 \pm 63\,547$  IJs/mL et Cifre048 avec  $47\,863 \pm 23\,625$  IJs/mL.

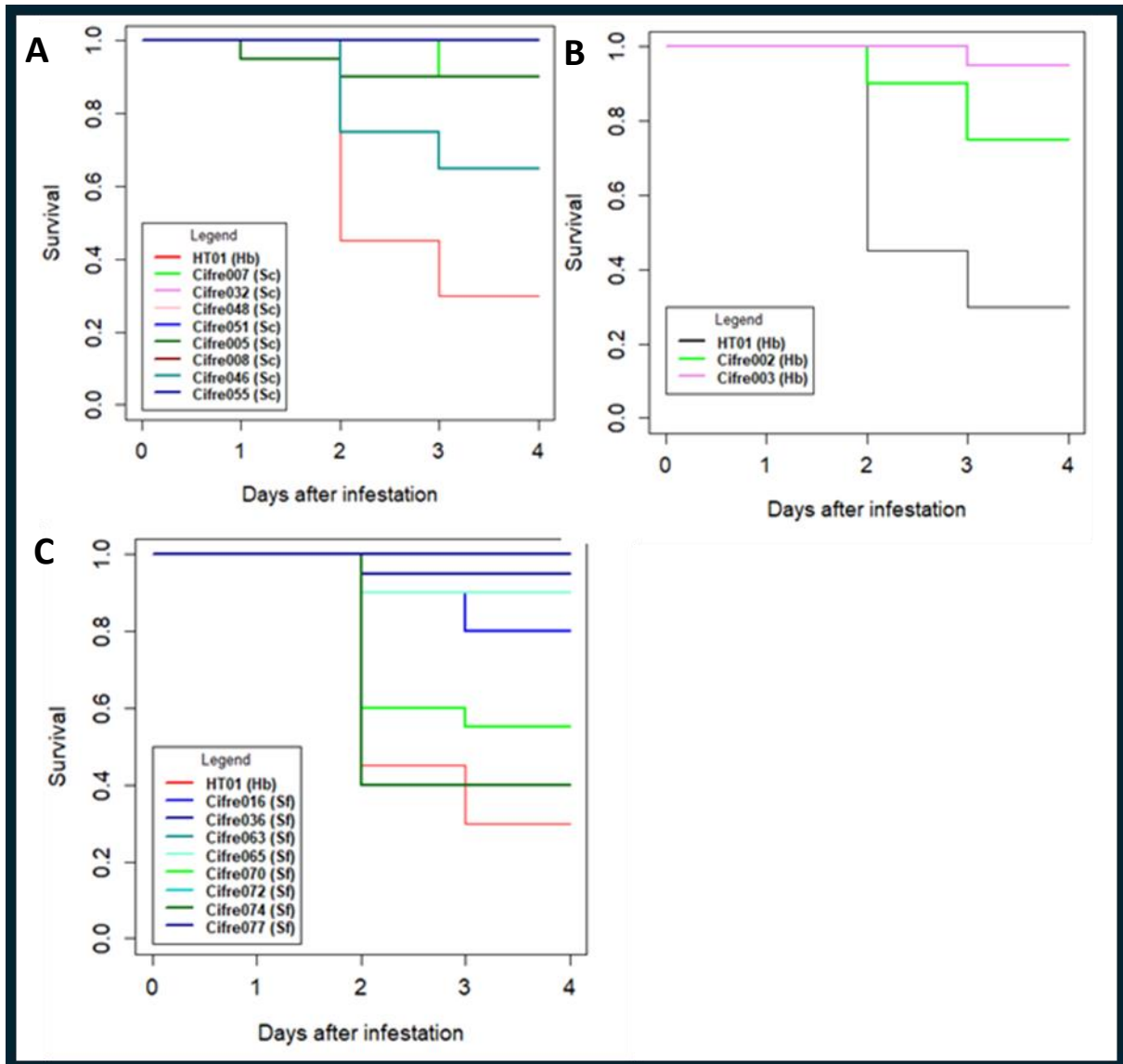
Il est à noter que la variabilité de la pathogénicité, du succès parasitaire et du succès reproducteur entre les isolats sont plus importants pour l'espèce *S. carpocapsae*. Ceci pourrait être expliqué par le







**Figure 32 : Succès reproducteur des isolats de NEPs en fonction de leur espèce.** Le succès reproducteur est représenté en log du nombre d'IJs émergents par mL après 30 jours post infestation. Les espèces sont indiquées par des abréviations Sc, *Steinernema carpocapsae*; Sf, *Steinernema feltiae*; Hb, *Heterorhabditis bacteriophora*. Les comparaisons deux à deux tu succès reproducteur ont été testées avec un Dunn Test. Les étoiles représentent le niveau de significativité : \*,  $0,5 < p. \text{value} < 0,01$  ; \*\*,  $0,01 < p. \text{value} < 0,001$  ; \*\*\*,  $p. \text{value} < 0,001$ . **A. Succès reproducteur des isolats appartenant à l'espèce *S. carpocapsae*.** **B. Succès reproducteur des isolats appartenant à l'espèce *S. feltiae*.** **C. Succès reproducteur des isolats appartenant à l'espèce *H. bacteriophora*.**



**Figure 33 : Survie des larves de *Diabrotica virgifera virgifera* infestées avec les NEPs.** La survie des larves a été évaluée en utilisant une estimation de Kaplan-Meier. Les espèces sont indiquées par des abréviations Sc, *Steinernema carpocapsae*; Sf, *Steinernema feltiae*; Hb, *Heterorhabditis bacteriophora*.  
**A.** Survie des larves infestées avec les isolats de l'espèce *S. carpocapsae*. **B.** Survie des larves infestées avec les isolats *H. bacteriophora*. **C.** Survie des larves infestées avec les isolats de l'espèce *S. feltiae*.

fait que les isolats de *S. carpocapsae* proviennent de différentes parcelles tandis que les isolats de *S. feltiae* et *H. bacteriophora* proviennent de parcelles identiques.

## 2. Evaluation de la pathogénicité et de la réussite du cycle parasitaire des NEPs sur *Diabrotica virgifera virgifera*

L'évaluation de la pathogénicité des isolats contre les larves de Dvv a été réalisée en comparant la survie des larves infestées avec les isolats et la survie des larves infestées avec la souche de référence HT01 (Hb). Les larves de Dvv dans le contrôle négatif sont restées en vie jusqu'à quatre jours post infestation (Figure 33). Les larves de Dvv infestées par les isolats Cifre007 (Sc), Cifre016 (Sf), Cifre036 (Sf), Cifre051 (Sc) et Cifre065 (Sf) ont une survie plus élevée, supérieure à 60%, par rapport aux larves de Dvv infestées avec HT01, survie à 40% après 4 jours post infestation (Cox proportional hazard model : p-value : 0,02092 ; 0,03101 ; 0,00311 ; 0,02411 ; 0,00203 respectivement) (A, Figure 33). Les deux isolats de *H. bacteriophora* Cifre002 et Cifre003 ont une très faible pathogénicité sur les larves de Dvv par rapport à HT01 (B, Figure 33). La survie des larves infestées avec Cifre074 (Sf) et Cifre070 (Sf) semble être proche de celles infestées par HT01 entre 40-50% de survie après 4 jours post infestation (C, Figure 33). La survie des larves de Dvv des autres isolats de *S. feltiae* est proche de 100% (C, Figure 33).

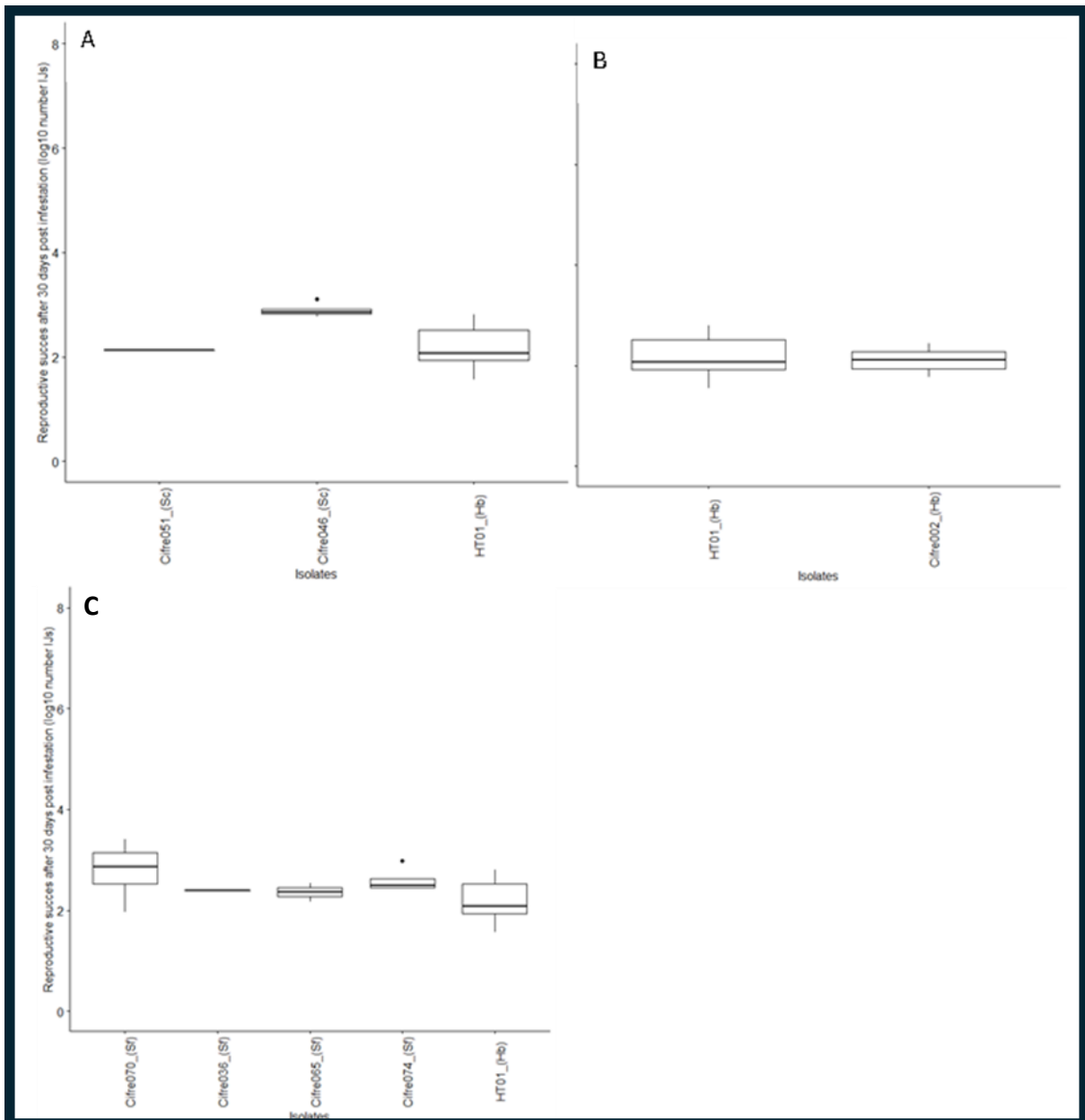
Le succès parasitaire des isolats appartenant à l'espèce *S. feltiae* après 13 jours post infestation est supérieur à celui des autres isolats appartenant aux espèces de *S. carpocapsae* et *H. bacteriophora* (Tableau 13). Trois sur cinq isolats appartenant à l'espèce de *S. carpocapsae* ont un succès parasitaire à 0 (Tableau 13). Cifre002 (Hb) a un succès parasitaire deux fois moins important que celui de la souche de référence HT01 (Tableau 13). Les deux isolats les plus pathogènes vis-à-vis des larves de Dvv, Cifre070 (Sf) et Cifre074 (Sf), ont un succès parasitaire de 1 et 0,60 après 13 jours post infestation respectivement (Tableau 13).

Le succès reproducteur des isolats est similaire entre tous les isolats quel que soit l'espèce de NEPs (Figure 34). Il y a une tendance pour un succès reproducteur plus grand pour les isolats Cifre070 (Sf) et Cifre046 (Sc), avec une médiane de 30 IJs par mL après 30 jours post infestation contre 20 IJs par mL pour les autres isolats (Figure 34).

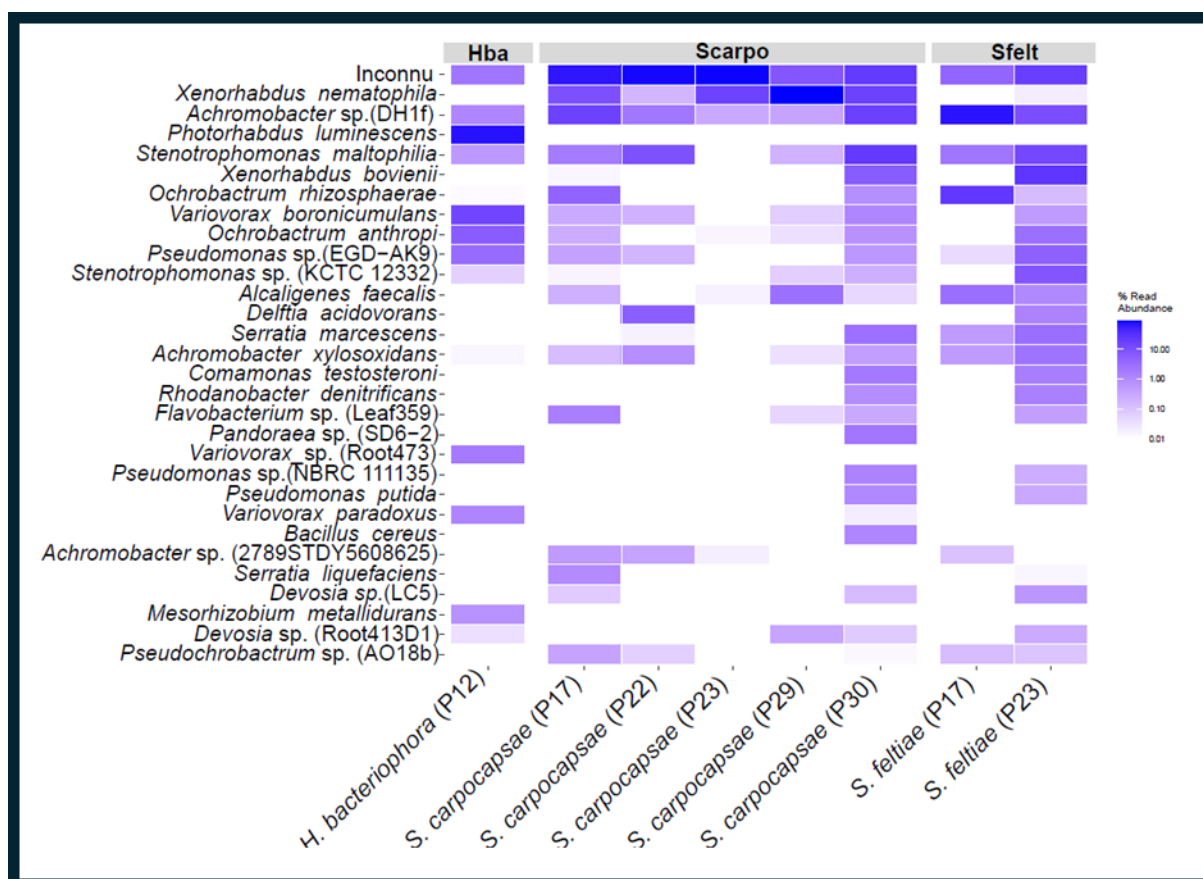
Seulement deux isolats Cifre070 (Sf) et Cifre074 (Sf) ont réduit quasiment de moitié la survie des larves de Dvv après 4 jours post infestation. Ces deux isolats ont montré un succès parasitaire proche de 1, mais un succès reproducteur équivalent aux autres isolats. Dans les bio-essais sur *S. littoralis* Cifre070 était placé dans la classe de pathogénicité B, et Cifre074 dans la classe pathogénicité C, ce qui ne permet pas de conclure pour une différence de préférence d'hôte.

**Tableau 13 : Succès parasitaire après 3 jours post infestation des NEPs infestés sur *Diabrotica virgifera virgifera*.** Le succès parasitaire a été évalué tous les jours après infestation jusqu'à 30 jours post infestation.

Espèce	Isolat	Succès parasitaire après 13 jours post infestation	Nombre de larves mortes
<i>Steinernema feltiae</i>	Cifre070		1 4/10
	Cifre036		1 1/10
	Cifre065		1 1/10
	Cifre074	0.60	5/10
	Cifre016		0 2/10
<i>Steinernema carpocapsae</i>	Cifre051		1 1/10
	Cifre046	0.57	7/20
	Cifre007		0 1/10
	Cifre005		0 2/20
	Cifre055		0 1/20
<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	Cifre002	0.4	5/20
	Cifre003		0 1/20
	HT01	0.85	14/20



**Figure 34 : Succès reproducteur des NEPs infestés sur les larves de *Diabrotica virgifera virgifera*.** Le succès reproducteur est représenté en log du nombre d'IJs émergents par mL après 30 jours post infestation. Les espèces sont indiquées par des abréviations Sc, *Steinernema carpocapsae*; Sf, *Steinernema feltiae*; Hb, *Heterorhabditis bacteriophora*. **A. Survie des larves infestées avec les isolats de l'espèce *S. carpocapsae*.** **B. Survie des larves infestées avec les isolats *H. bacteriophora*.** **C. Survie des larves infestées avec les isolats de l'espèce *S. feltiae*.**



**Figure 35 : Proportion normalisée des espèces de bactéries composant le microbiote des isolats de NEPs testés.** La profondeur de séquençage a été corrigée en utilisant la méthode Clr. Les OTUs du microbiote des isolats provenant d'une même parcelle ont été additionnés pour avoir un réplica biologique par parcelle.

Ces bio-essais des isolats de NEPs sur *S. littoralis* et DvV n'ont pas montré une corrélation claire entre l'espèce de NEPs et ses performances parasitaires sur les deux insectes. Il semble y avoir une légère tendance pour une plus grande pathogénicité contre les larves de *S. littoralis* des isolats appartenant à l'espèce *S. carpocapsae* contrairement à ceux de l'espèce *S. feltiae*. De plus seuls deux isolats ont montré une pathogénicité contre les larves de DvV sur les 18 testés. Au vu de ces résultats d'autres facteurs semblent influencer le cycle parasitaire des NEPs.

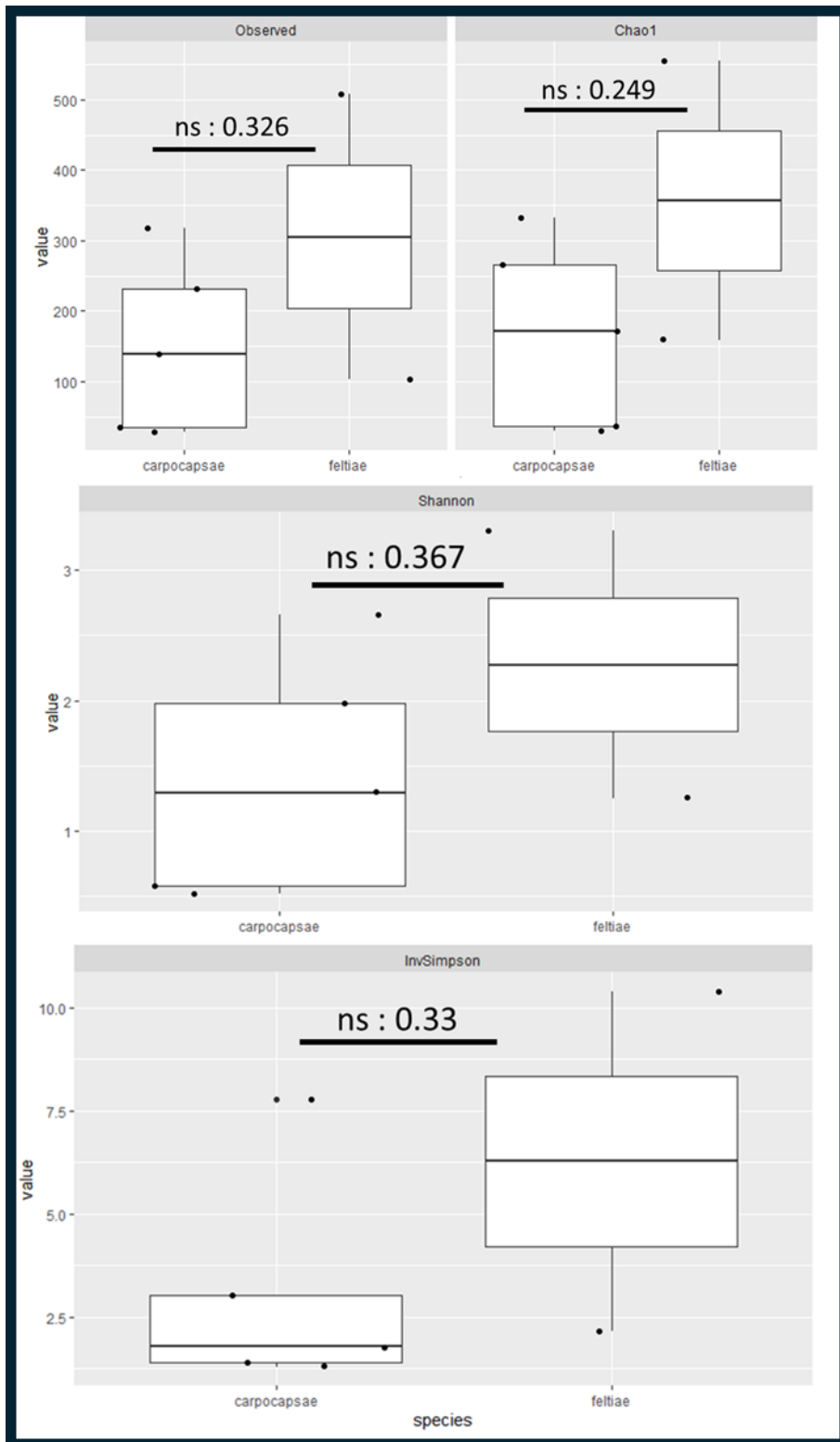
## II. Profil de microbiote et phylogénie des NEPs

Pour cette partie, les OTUs des microbiotes des différents isolats appartenant à une même espèce et provenant d'une même parcelle ont été additionnés pour obtenir un réplica biologique, soient 8 réplicas biologiques différents : 5 de *S. carpocapsae*, 2 de *S. feltiae* et 1 de *H. bacteriophora*. Les 30 OTUs les plus abondants du microbiote de chaque réplica biologique ont été représentés sur une heatmap (Figure 35). Les symbiotes *Photorhabdus luminescens*, *Xenorhabdus nematophila* et *Xenorhabdus bovienii* sont retrouvés chez *H. bacteriophora*, *S. carpocapsae* et *S. feltiae* respectivement (Figure 35). *Xenorhabdus bovienii* est retrouvé aussi dans les isolats de *S. carpocapsae* de la parcelle 30 ce qui nous fait soupçonner un mélange d'espèces dans certains isolats originaire de cette parcelle (Figure 35).

### 1. Comparaison des microbiotes entre les genres *Heterorhabditis* et *Steinernema*

Le nombre de réplicas biologique est très déséquilibré entre chaque espèce de NEP, néanmoins, une première analyse visuelle des heatmap permet d'observer que le microbiote du seul réplica biologique de *H. bacteriophora* a une composition en espèces de bactéries légèrement différente par rapport à celle de *S. carpocapsae* et *S. feltiae* (Figure 35). Seulement deux OTUs sont uniquement présents dans le microbiote d'*Heterorhabditis* : *Variovorax putida* et *Mesorhizobium metallidurans*. En revanche 12 OTUs sont présents uniquement dans le microbiote de *Steinernema* : *Ochrobactrum rizhosphaerae*, *Alcaligenes faecalis*, *Deftia acidovorans*, *Serratia marescens*, *Comomonas testeroni*, *Rhodanobacter denitrificans*, *Flavobacterium* sp., *Pandoreae* sp, *Pseudomonas putrida*, *Bacillus cereus*, *Serratia liquefacens* (Figure 35). Cependant, il est difficile de tirer des conclusions claires sur les différences de





**Figure 36 : L' $\alpha$ -diversité du microbiote des IJs de *Steinernema* en fonction de leur espèce.** Quatre indices ont été calculés : la richesse taxonomique, Observed ; Chao, Chao1 ; Shannon ; l'inverse de Simpson, InvSimpson. La différence des indices en fonction des deux espèces *S. carpocapsae* et *S. feltiae*. La significativité des différences a été testée avec un test ANOVA.

microbiote entre le genre *Steinernema* et *Heterorhabditis* car le genre *Heterorhabditis* est représenté par un unique réplica biologique.

## 2. Comparaison des microbiotes entre espèces au sein du genre *Steinernema*

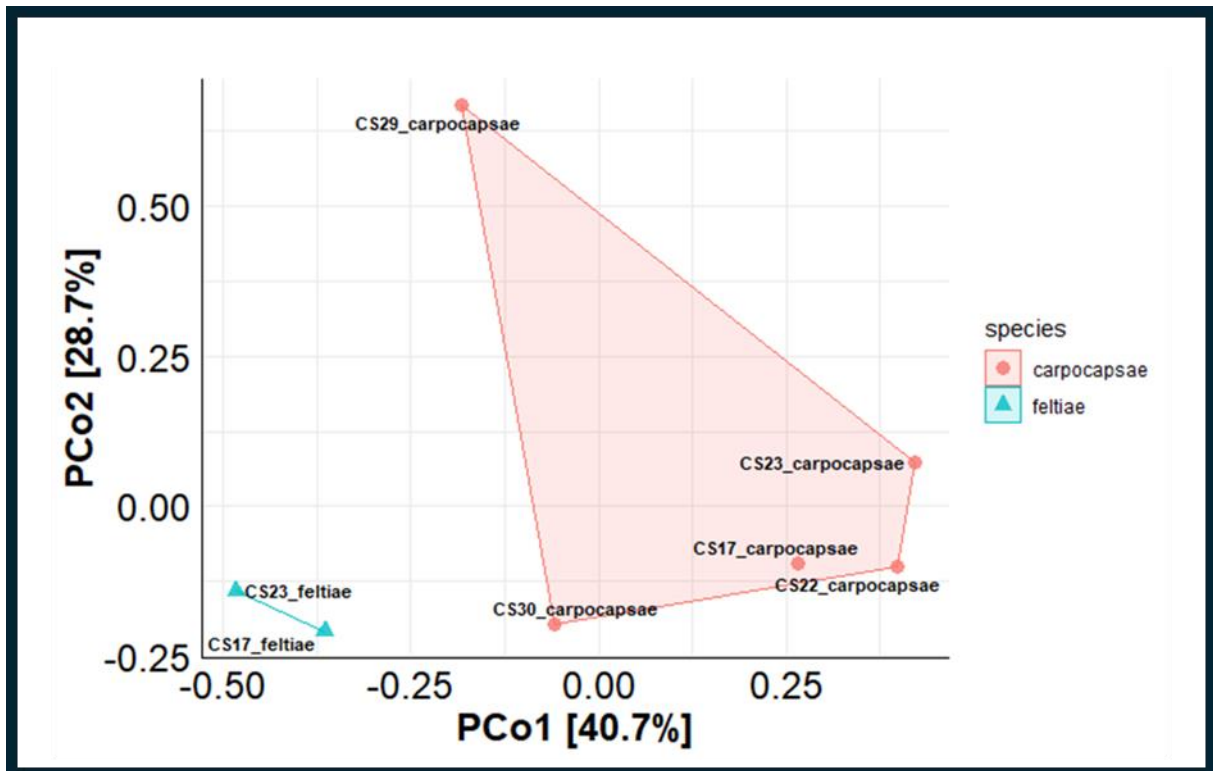
Une analyse visuelle des heatmap des réplicas biologiques des *Steinernema* montre que les espèces de *Pandorea* sp., *Bacillus cereus*, *Serratia liquefaciens* sont présentes dans le microbiote de *S. carpocapsae*, mais pas dans celui de *S. feltiae* (Figure 35). En revanche, les tests de student modéré ne trouvent pas de différence de profils microbiens (composition en espèces du microbiote) selon les deux espèces *S. carpocapsae* et *S. feltiae* ( $p.value > 0.05$ ). Une grande variabilité dans la composition du microbiote est visible entre les réplicas biologiques appartenant à une même espèce de NEPs (Figure 35). Par exemple les bactéries présentes dans le microbiote de *S. carpocapsae*, et non *S. feltiae*, sont présentes uniquement dans un réplica biologique d'une même parcelle.

Pour aller plus loin, l' $\alpha$ -diversité des microbiotes de chaque espèce de *Steinernema* et la  $\beta$ -diversité entre les deux espèces ont été calculées. Une tendance est observée pour une moins grande richesse taxonomique dans le microbiote de *S. carpocapsae* que dans celui de *S. feltiae* selon les quatre indices d' $\alpha$ -diversité (richesse taxonomique, Chao, Shannon, et l'inverse de Simpson), mais aucune différence n'est statistiquement significative (Figure 36). Il est à noter que l'inverse de Simpson est plus faible pour *S. carpocapsae* que pour *S. feltiae* indiquant un microbiote dominé par un groupe d'espèces bactériennes (Figure 36). La  $\beta$ -diversité a été évaluée avec l'indice de dissimilarité de Bray Curtis et représenté sur une PCoA. 40,7% des différences entre les communautés de bactéries sont expliquées par la phylogénie des NEPs (Figure 37). La structure des microbiotes des espèces *S. feltiae* et *S. carpocapsae* est significativement différente (ANOVA,  $p.value = 0,047$ ). Le réplica biologique *S. carpocapsae* de la parcelle 29 a un microbiote éloigné par rapport aux autres réplicas biologiques de la même espèce ce qui peut expliquer une valeur de  $p.value$  proche du seuil usuel de 0,05.

## III. Existe-t-il un lien entre le cycle parasitaire des NEPs et la diversité de leur microbiote ?

Cette question a été traitée en utilisant les résultats de la pathogénicité et de la réussite du cycle parasitaire des isolats infestés sur *S. littoralis*. Les raisons guidant ce choix sont : 1/ Le plus grand nombre d'isolats testé par rapport à Dvv, 2/ la standardisation du patho-essai de *S. littoralis* plus





**Figure 37 :  $\beta$ -diversité du microbiote des NEPs en fonction de leur espèce.** Les distances entre les communautés microbiennes ont été calculées avec l'indice de dissimilarité de Bray-Curtis. Le test ANOVA a été utilisé pour tester les différences entre les espèces *S. carpocapsae* et *S. feltiae* ( $p$ -value=0,04762).

**Tableau 14 : Lien entre l'α-diversité du microbiote des NEPs (Richesse taxonomique, Chao1, Shannon et inverse de Simpson) et la réussite de leur cycle parasitaire (mortalité des larves de *Spodoptera littoralis* infestées avec les isolats de NEPs, le succès parasitaire des isolats, le succès reproducteur des isolats après 30 jours post infestation).** Le lien a été testé par un modèle statistique. Le principe du modèle est de piocher aléatoirement une larve par isolat et les données du cycle parasitaire associées, puis de les corrélérer avec les données d'α-diversité du microbiote. Cette pioche aléatoire de larve est répétée 100 fois permettant d'obtenir une estimation et un intervalle de confiance associés à la pathogénicité de l'isolat. Les étoiles indiquent une significativité : \* p.value<0,5, \*\* p.value <0,01.

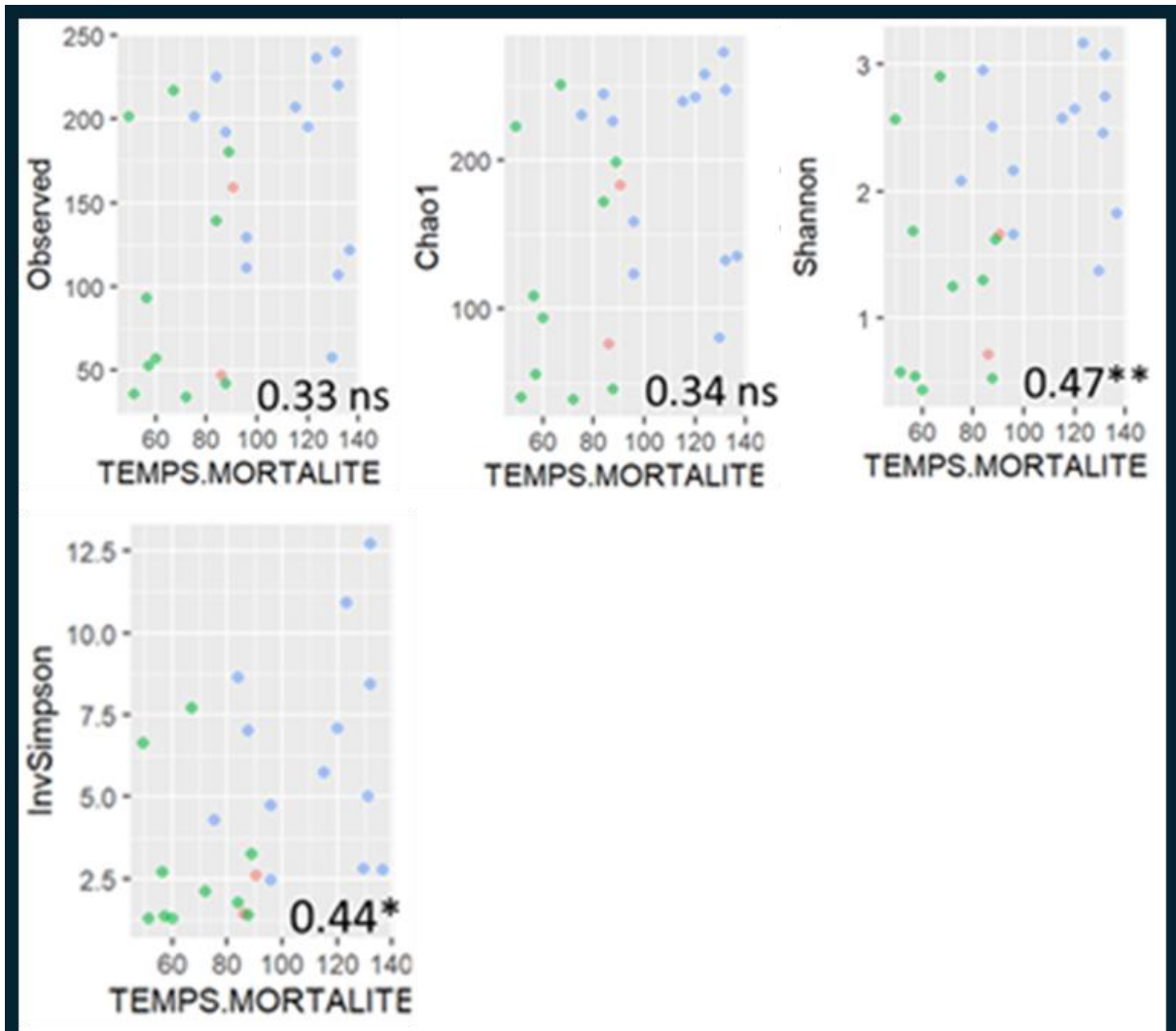
	Mortalité (p-value)	Emergence IJs (p-value)	Succès reproducteur (p-value)
Richesse taxonomique	0,53	0,42	0,54
Chao1	0,53	0,42	0,54
Shannon	0,53	0,42	0,54
Inverse de Simpson	0,53	0,72	0,54
Effet espèce IJ	0,79	0,79	0,049

maîtrisé que celui de Dvv, 3/ il y a plus de différences entre les isolats dans les essais avec *S. littoralis* qu'avec Dvv.

La complexité des données, notamment la différence de nombre de répliques techniques entre la majorité des isolats (1 réplique) et les six isolats (3 répliques) testés par M. Vouadec, et de la question scientifique ont obligé à créer un modèle spécifique. Pour évaluer le lien entre cycle parasitaire sur *S. littoralis* et l' $\alpha$ -diversité du microbiote des NEPs, ce modèle pioche aléatoirement pour chaque isolat une larve et les données de cycle parasitaire des IJs associés (survie, succès parasitaire et succès reproducteur). Il corrèle ensuite ces paramètres à l' $\alpha$ -diversité du microbiote de l'isolat infestant. En faisant tourner 100 fois le modèle, les estimations de la p.valeur et de son intervalle de confiance, associées aux paramètres de pathogénicité et de la réussite du cycle parasitaire des isolats, peuvent être déterminés.

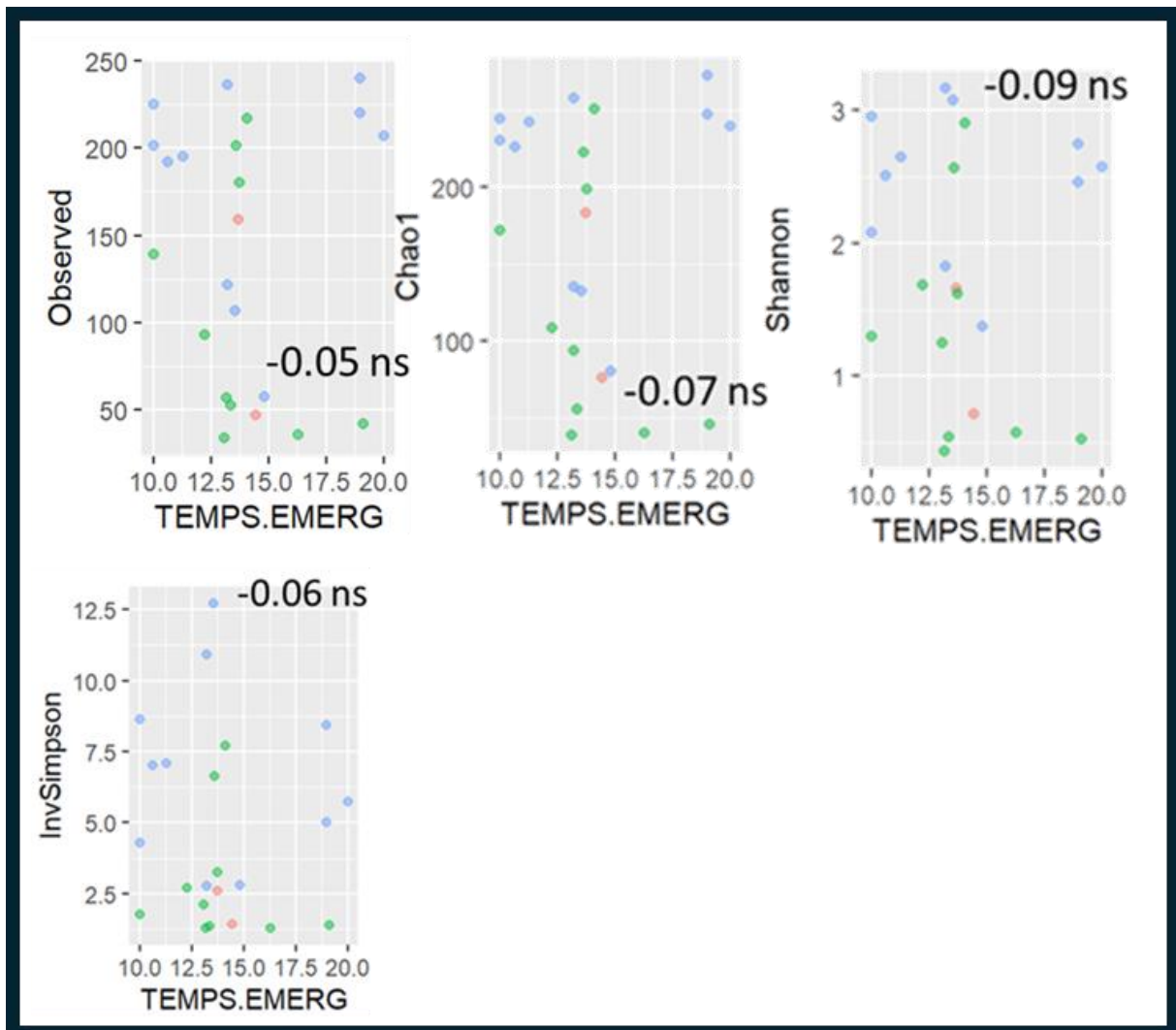
L' $\alpha$ -diversité du microbiote, les indices de la richesse taxonomique, Chao, Shannon et l'inverse de Simpson, n'est pas différente selon le niveau de pathogénicité, de succès parasitaire et de succès reproducteur des NEPs (Tableau 14). En ajoutant l'espèce en covariable supplémentaire, une différence significative existe dans le succès reproducteur après 30 jours post infestation en fonction de l'espèce de NEPs utilisée (Tableau 14).

En plus de l'étude de l'influence des trois paramètres de pathogénicité et du succès du cycle parasitaire, nous avons regardé si le temps de mortalité des larves de *S. littoralis* et le temps pour obtenir une nouvelle émergence d'IJs étaient corrélés aux valeurs des indices de l' $\alpha$ -diversité du microbiote (Figures 38 et 39). Des corrélations apparaissent entre le temps de mortalité des larves d'insecte et l'indice de Shannon de 0,47 et l'inverse de Simpson à 0,44 (Figure 38). Un temps faible de mortalité est corrélé avec des indices de Shannon et de l'inverse de Simpson plus faibles, c'est-à-dire une communauté microbienne dominée par une ou plusieurs espèces bactériennes. Et, plus les indices sont hauts plus le temps pour qu'une larve meurt augmente, c'est-à-dire quand les communautés microbiennes ont une répartition spécifique plus répartie (Figure 38). Néanmoins, les corrélations sont significatives, mais la distribution des points laisse suggérer que la corrélation n'est pas stricte, et il semble y avoir un effet de l'espèce sur le temps de mortalité (Figure 38). Le temps d'émergence de la nouvelle génération d'IJs n'est corrélé avec aucun des indices de l' $\alpha$ -diversité du microbiote des IJs, et il ne semble pas non plus avoir un effet de l'espèce des IJs sur le temps d'émergence (Figure 39).



**Figure 38 : Corrélation entre le temps de mortalité des NEPs et l'α-diversité du microbiote des NEPs.**

Quatre indices ont été calculés : la richesse taxonomique, Observed ; Chao, Chao1 ; Shannon ; l'inverse de Simpson, InvSimpson. Les couleurs des points représentent les espèces de NEPs *Heterorhabditis bacteriophora*, rouge, *Steinernema carpocapsae*, vert, *Steinernema feltiae*, vert. Les étoiles indiquent une significativité (p-value < 0,01).



**Figure 39 : Corrélation entre le temps d'émergence des NEPs et l' $\alpha$ -diversité du microbiote des NEPs.**

Quatre indices ont été calculés : la richesse taxonomique, Observed ; Chao, Chao1 ; Shannon ; l'inverse de Simpson, InvSimpson. Les couleurs des points représentent les espèces de NEPs *Heterorhabditis bacteriophora*, rouge, *Steinernema carpocapsae*, vert, *Steinernema feltiae*, vert. Les étoiles indiquent une significativité ( $p$ -value < 0,01).



## Discussion

Dans ce chapitre nous avons décrit et comparé la composition et la diversité du microbiote entre les trois espèces *S. carpocapsae*, *S. feltiae* et *H. bacteriophora* de NEPs retrouvées dans les sols cultivés en maïs. Le symbiote entomopathogène a été retrouvé en haute abondance comparé aux autres bactéries associées spécifiquement à son espèce de NEPs, excepté pour les isolats de la parcelle 30, *X. nematophila* avec les IJs *S. carpocapsae*, *X. bovienii* avec les IJs de *S. feltiae* et *P. luminescens* avec *H. bacteriophora*. Ces associations sont celles décrites dans la littérature, mais la présence de *X. bovienii* dans le réplica biologique *S. carpocapsae* de la parcelle 30 est inattendue (Boemare et al., 1996; Ogier et al., 2023). Dans la méthode de piégeage, des co-infestations entre différentes espèces de NEPs peuvent apparaître conduisant à des mélanges d'espèces parmi les nouveaux IJs émergents (Půža and Mráček, 2009; Campos-Herrera, 2019b). Dans notre cas, les résultats de séquençage ITS ont identifié tous les isolats de la parcelle 30 en *S. carpocapsae*, mais au moins un isolat de la parcelle 30 a pu présenter un mélange avec des IJs, en faible abondance, appartenant à l'espèce *S. feltiae*. De plus, dans cette analyse 6 isolats de la parcelle 30 ont été regroupés en un réplica biologique pouvant augmenter artificiellement le nombre d'OTUs de *X. bovienii*. L'analyse de la  $\beta$ -diversité du FAM a montré une différence entre le microbiote de *S. carpocapsae* et *S. feltiae*, en revanche la dissimilarité avec celui de *H. bacteriophora* n'a pas été testée dans cette étude. Pour décrire le FAM associé à *S. feltiae* et *H. bacteriophora*, il serait nécessaire de compléter ces résultats par des études de FAM d'IJs provenant d'autres localités et d'autres contextes environnementaux par un travail similaire à ce qui a été mené pour la description du FAM de *S. carpocapsae* (Ogier et al., 2020).

La pathogénicité et la réussite du cycle parasitaire ont été testées sur une espèce de Lépidoptère *S. littoralis* et une espèce de Coléoptère Dv. Parmi tous les isolats testés, la pathogénicité contre *S. littoralis* est plus importante pour les IJs des espèces *S. carpocapsae* et *H. bacteriophora* par rapport à l'espèce *S. feltiae*. La sensibilité des larves de *S. littoralis* à *S. feltiae* et *S. carpocapsae* a déjà été reportée, mais la pathogénicité de *S. feltiae* était améliorée dans les substrats sablo-limoneux (Caroli et al., 1996; Campos-Herrera and Gutiérrez, 2009). En revanche la pathogénicité des IJs appartenant à l'espèce *H. bacteriophora* est plus faible par rapport aux espèces *S. feltiae* et *S. carpocapsae* contre *Spodoptera litura* et la *Spodoptera exigua* (Noctuelle exigüe) (Caroli et al., 1996). Une variabilité de la pathogénicité des isolats *S. carpocapsae* et *S. feltiae* contre *S. littoralis* est visible avec des isolats moyennement pathogènes et d'autres très peu pathogènes. Les isolats de l'espèce *S. carpocapsae* provenaient parfois de parcelles différentes, mais aucun lien clair ne peut être déterminé entre le niveau pathogénicité de l'isolat et sa parcelle d'origine. Les isolats des espèces *S. feltiae* et *H. bacteriophora* sont originaires des parcelles 23 et 12 respectivement, mais ils ne montrent pas des niveaux de pathogénicité similaires entre les isolats de la même espèce. Ces résultats obtenus

confirment les tests de pathogénicité contre *G. mellonella* où une variabilité entre les isolats d'une même parcelle a été reportée (Depuydt et al., 2024). Cela peut supporter l'hypothèse de la coexistence de plusieurs populations au sein d'une même parcelle (Rolston et al., 2009). La pathogénicité des isolats est plus faible contre Dvv, avec seulement deux isolats appartenant à l'espèce *S. feltiae* qui atteignent une mortalité entre 60-50%. Les isolats des espèces *S. carpocapsae* et *H. bacteriophora* ont montré une faible pathogénicité avec environ 5% de mortalité des larves infestées de Dvv, par rapport à celles infestées avec *S. feltiae* qui ont une mortalité à 30%, comme reporté précédemment (Toepfer et al., 2005). Une autre étude a reporté des pourcentages de mortalité (70-100%) plus élevés pour les larves de stade 2 et 3 de Dvv infestées avec *S. feltiae* et *H. bacteriophora* (Rasmann et al., 2005). Le succès reproducteur des IJs infestés sur Dvv est équivalent pour tous les isolats et est faible autour d'une centaine d'IJ maximum par larve, contrairement à ce qui a pu être trouvé pour *S. feltiae* environ 2204 IJs par larve (Toepfer et al., 2005). L'isolat Cifre074, appartenant à l'espèce *S. feltiae*, a la pathogénicité la plus élevée contre les larves de Dvv parmi tous les isolats, mais une pathogénicité plus faible contre *S. littoralis*. Cette différence de pathogénicité pourrait être un début de spécialisation pour certains ordres d'insectes comme il a été montré pour d'autres espèces de NEPs (Bisch et al., 2015; Kim et al., 2017; Lu et al., 2017). Les différences de pathogénicité peuvent être liées à d'autres facteurs tels que le substrat, sable pour les essais de Dvv et papier filtre pour *S. littoralis*. Le taux de pénétration des IJs des larves de *Agriotes ipsilon* (Taupins) est 14% fois plus important sur un substrat sable que papier (Caroli et al., 1996).

Un autre facteur, qui pourrait affecter la pathogénicité et la réussite du cycle parasitaire des NEPs, peut être la composition et la diversité du FAM. Dans cette étude, aucun lien entre la composition et la diversité du FAM et la pathogénicité ou la *fitness* des NEPs n'a pu être démontré. Les tests sur *S. littoralis* ont été réalisés en condition de laboratoire en appliquant les IJs directement sur la larve d'insecte facilitant l'infestation de la larve par les NEPs. Or, l'hypothèse suggérée est que le FAM contribuerait au cycle parasitaire des NEPs quand ils sont dans des conditions environnementales moins favorables (Ogier et al., 2023).

Les expérimentations et les analyses réalisées dans ce chapitre ont de nombreuses limites. La sélection des isolats pour la description du microbiote a amené un déséquilibre dans le nombre d'isolats testés par parcelle. Ce déséquilibre a pu amener un déséquilibre sur la description du microbiote entre les répliques biologiques. Par exemple, la diversité du microbiote du réplica biologique de *S. feltiae* de la parcelle 23 paraît plus grande, mais un nombre plus important d'isolats a été regroupé pour faire ce réplica augmentant la profondeur de séquençage. De plus, deux problèmes ont été soulevés pour l'analyse de la pathogénicité et de la réussite du cycle parasitaire sur *S. littoralis*. En premier, ces tests n'ont pas été faits avec le même nombre de répliques techniques pour tous les isolats, et une grande



variabilité était observable entre les réplicas techniques des six isolats testés en triplicas. En deuxième, le nombre d'isolats pour former le réplica biologique par espèce et par parcelle était différent selon les isolats. Par exemple le réplica biologique de la parcelle 23 de l'espèce *S. feltiae* regroupait 30 isolats contre 3 maximum pour les autres réplicas biologiques. Cette différence crée des biais dans la profondeur de séquençage entre les réplicas biologiques. Pour ces deux raisons, il est nécessaire de refaire les bio-essais sur *S. littoralis* et l'analyse du microbiote des IJs en améliorant la sélection des isolats.

## **Conclusion**

Dans ce chapitre il n'a pas été possible de faire un lien entre la diversité du microbiote et le cycle parasitaire des NEPs sur *S. littoralis*. La difficulté des analyses et l'hétérogénéité du nombre d'isolats dans les parcelles peuvent être l'origine de ce résultat. En 2019, un article a été publié sur une nouvelle méthode d'analyse du microbiote (Massol et al., 2019). Le principe de cette méthodologie est dans un premier temps de créer des profils microbiens similaires entre les échantillons, puis dans un second temps de découvrir si ces profils microbiens sont liés à un facteur particulier comme la phylogénie, le régime alimentaire, etc (Massol et al., 2019; Ravigné et al., 2022). Dans le cas de ce chapitre, des profils microbiens pourraient être recherchés en fonction du microbiote de tous les isolats de NEPs puis corréler ces profils avec la pathogénicité, le succès parasitaire et le succès reproducteur des NEPs. La difficulté pour l'application de cette méthode est la forme des données du cycle parasitaire des NEPs qui nous sert de facteur à corréler à nos profils microbiens. Actuellement nos données sont des variables quantitatives continues, or la méthode décrite, par Massol et al., 2019, est conçue pour des facteurs sous forme de variables qualitatives discontinues. Cela nécessite une étape supplémentaire pour créer des classes de pathogénicité, de succès parasitaire et de succès reproducteur.

Ce travail pourrait aussi être combiné à d'autres projets d'études du microbiote d'isolats d'origines différentes pour étudier les effets de l'environnement sur les NEPs, par exemple le bassin géographique d'origine ou la texture des sols. Dans ce cas, il sera peut-être plus simple d'utiliser la méthode proposée par Massol et al., 2019 pour corréler des profils microbiens aux facteurs environnementaux.

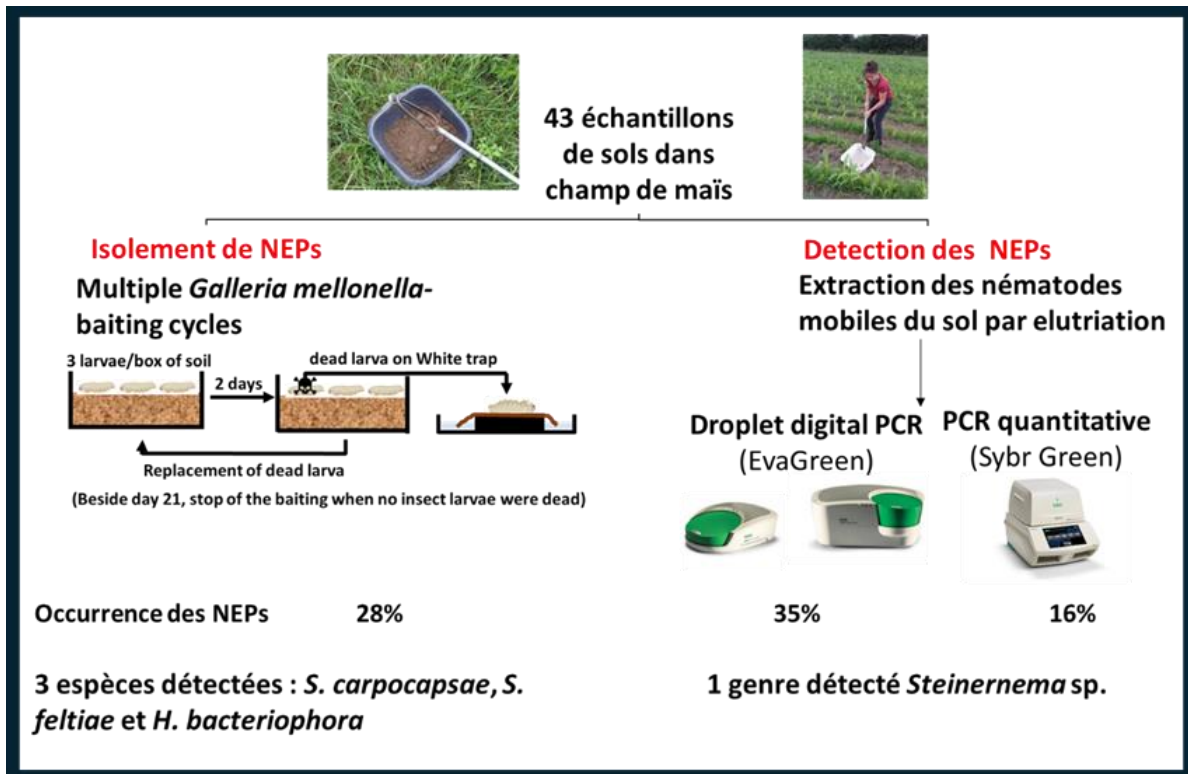


Figure 40 : Schéma de la méthodologie et des résultats de la détection des NEPs dans les sols cultivés en maïs.

## Discussion Générale

---

Nous avons essayé de répondre à trois objectifs pendant cette thèse : 1/ proposer une meilleure méthodologie pour détecter les NEPs natifs et décrire leur distribution dans les sols agricoles, 2/ identifier les facteurs biotiques et abiotiques ainsi que les pratiques agricoles qui influencent la présence des NEPs dans les sols agricoles, 3/ déterminer les facteurs, phylogénie et microbiote, qui influencent la réussite du cycle parasitaire des NEPs.

Le premier chapitre propose d'utiliser une approche multi-méthodes pour optimiser la description des NEPs dans les sols. Nous avons utilisé plusieurs méthodes : sur les échantillons de sols, un piégeage par cycle multiple sur *G. mellonella*, et sur des échantillons de nématodes mobiles extraits des sols les techniques de PCRq et ddPCR (Figure 40). La combinaison de l'ensemble de ces méthodes a permis d'atteindre une détection des NEPs dans 50% des parcelles cultivées en maïs contre 35% maximum en utilisant une seule méthode (Figure 40). L'ensemble des méthodes existantes, extraction des nématodes des sols et identifications morphologiques, piégeage sur insecte, méthodes moléculaires, pour détecter les NEPs ont des limites (Fan and Hominick, 1991; Campos-Herrera and Gutiérrez, 2008; Marais et al., 2017; Dritsoulas et al., 2020). Les méthodes moléculaires paraissent être plus sensibles que la méthode de piégeage pour détecter les NEPs puisqu'elles permettent de s'affranchir des problèmes liés à l'insecte piège utilisé, la mobilité des NEPs, les températures d'activités des espèces (Campos-Herrera et al., 2011, 2019a). Dans notre cas, la méthode de PCRq n'a pas été plus sensible que la méthode de piégeage ce qui a déjà été reporté pour la détection de *H. bacteriophora* (Campos-Herrera et al., 2019a) (Figure 40). De plus, le piégeage des NEPs dans les sols offrent un avantage substantiel par rapport aux méthodes moléculaires, il permet de collecter les isolats pour évaluer leurs caractéristiques par la suite. L'obtention des isolats permet d'évaluer leur pathogénicité, par exemple à travers le test des postulats de Koch (Campos-Herrera et al., 2015b) ou sur d'autres insectes ravageurs de culture (Campos-Herrera and Gutiérrez, 2009; Nouh, 2021), d'isoler leurs symbiotes et afin de les caractériser sur le plan taxonomique et mécanistique (Pagès and Ginibre, 2006), de rechercher les différences génomiques entre les isolats (Lu et al., 2016) ou les différences génétiques révélatrices de l'existence de différentes populations (Rolston et al., 2009). L'évaluation des caractéristiques des NEPs permet de comprendre leur état physiologique et leur capacité à contrôler les insectes ravageurs de culture. Pour ces raisons, la méthode de piégeage est indispensable pour étudier les NEPs dans un contexte plus général que leur distribution dans les cultures. De plus, ce travail a confirmé l'intérêt d'utiliser la méthode de piégeage par cycles multiples sur *G. mellonella* (qui s'étale sur une longue période de 20 à 100 jours) plutôt que la méthode classique de piégeage (qui s'étale sur une courte



période de 5 à 10 jours) pour augmenter le nombre de parcelles positives, la diversité des NEPs isolés et le nombre d'isolats collectés.

Le deuxième apport de ce travail est l'utilisation de la ddPCR pour détecter les NEPs qui améliore le taux de détection par rapport à la PCRq (Figure 40). En plus d'offrir une meilleure détection, les méthodes moléculaires permettent d'évaluer l'abondance des IJs dans les sols. Les études qui utilisent la PCRq pour détecter les NEPs déterminent aussi leur abondance dans les sols à l'aide d'une gamme étalon d'échantillons contenant différentes concentrations d'IJs (Campos-Herrera et al., 2011a). La technique de la ddPCR permet de s'affranchir de l'utilisation d'une gamme étalon (Gutiérrez-Aguirre et al., 2015), mais dans notre cas deux limites ont empêché la quantification absolue des IJs dans les sols. La première limite est l'absence de connaissance sur le nombre de copies de la région ITS (région cible des amorces utilisées) dans le génome des NEPs. La deuxième limite est l'incertitude sur le nombre de cellules somatiques d'un nématode puisque en théorie un nématode est composé d'environ 959 cellules dont le nombre peut varier selon l'espèce du nématode, sa taille et son stade (Min et al., 2012). La mesure de l'abondance des IJs dans les sols à différentes périodes de l'année permettrait d'estimer la persistance des populations détectées dans les parcelles, et sur la favorabilité de l'habitat pour les NEPs. En effet, l'abondance d'un organisme dans un environnement peut informer sur l'adéquation entre cet organisme et son environnement (Weber et al., 2017), et ainsi sur la persistance de leur population dans les sols (Araujo et al., 2002).

L'identification au niveau de l'espèce a été réalisée par le séquençage de la région ITS des isolats obtenus par la méthode de piégeage, mais elle n'a pas donné de résultats probants avec les méthodes moléculaires (Figure 40). Il est pourtant essentiel de pouvoir caractériser les NEPs au niveau de l'espèce. En effet, les espèces ont des différences dans les caractéristiques de leur habitat préférentiel (Mráček et al., 2005; Kanga et al., 2012; Shapiro-Ilan and Dolinski, 2015; Jaffuel et al., 2018; Dritsoulas et al., 2020) et présentent des pathogénicités variables contre les insectes (Salvadori et al., 2012; Yağci et al., 2022; Geisert et al., 2023). Certaines espèces comme *S. scapteresci* ont des spectres d'hôtes plus spécialisés envers les orthoptères (Kim et al., 2017; Lu et al., 2017), alors que d'autres espèces dites généralistes présentent un spectre d'hôte plus large. De plus, de futures investigations des espèces de NEPs présentes dans les sols cultivés pourraient compléter l'inventaire des espèces présentes en France dont seulement six sont répertoriées (*S. carpocapsae*, *S. feltiae*, *S. kraussei*, *S. affine*, *S. poinarii*, *H. bacteriophora*) (Emelianoff et al., 2008).

**Ce premier travail a permis de proposer une nouvelle méthode, combinaison du piégeage par cycle multiple et ddPCR, à la communauté scientifique pour améliorer la détection des**



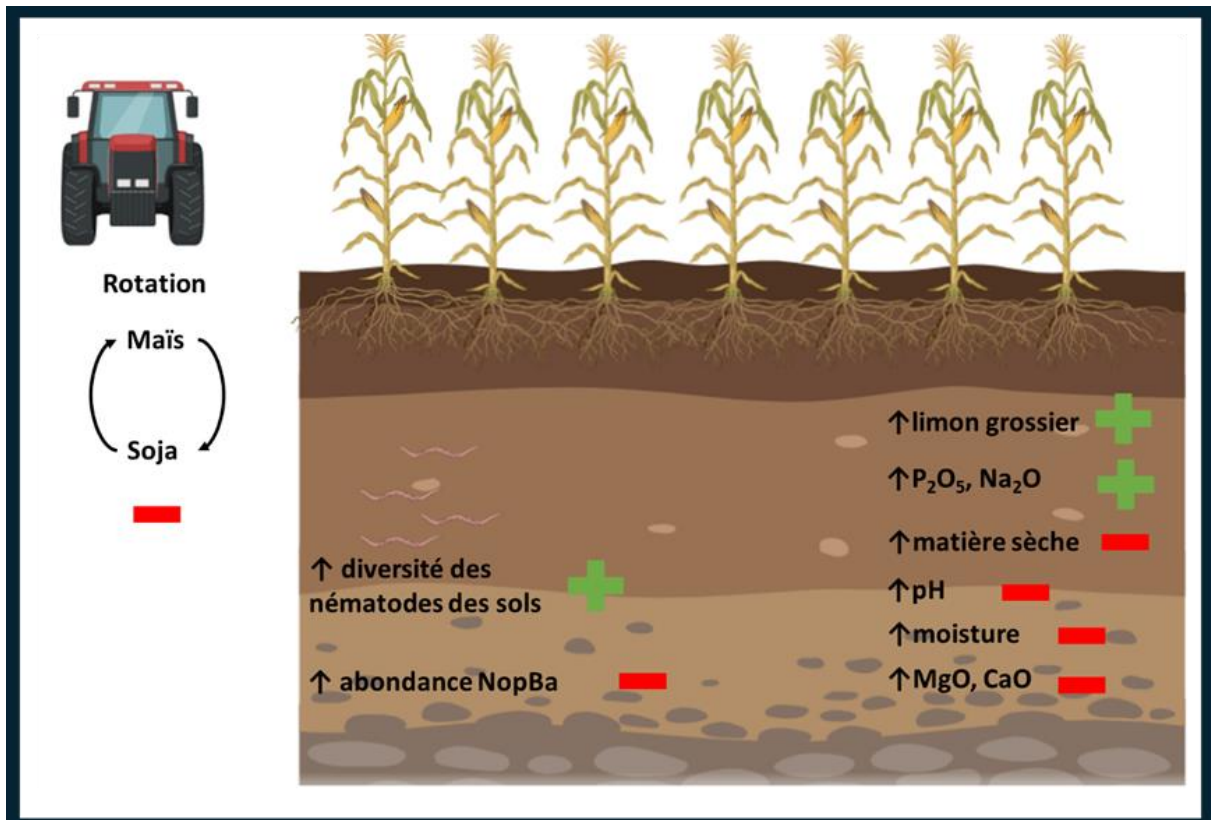


Figure 41 : Schéma résumé des facteurs qui influencent la présence de *Steinernema* sp. dans les sols cultivés en maïs. Les traits rouges indiquent un effet négatif du facteur sur la présence de *Steinernema* sp., les croix vertes signifient un effet positif sur la présence de *Steinernema* sp. L'abréviation NopBa signifie les nématodes bactérivores non opportunistes.

**NEPs nécessaires pour la description de leur distribution dans les sols agricoles, et qui est un prérequis de la lutte biologique par conservation. Nous avons pointé quelques pistes d'amélioration pour cette méthode qui peuvent faire l'objet d'un futur projet scientifique au laboratoire. En tant que doctorante Cifre, je discuterai aussi de l'intérêt de cette thèse pour une entreprise. Une meilleure connaissance de la distribution des NEPs natifs dans les sols agricoles permettrait une meilleure expertise agroécologique des auxiliaires naturellement présents dans les sols, et surtout rassure sur la possibilité d'un futur marché. En effet, une entreprise qui ne souhaite pas intervenir dans de la production et de la vente directe de NEPs, mais par exemple développer des produits innovants pour favoriser leur présence dans les sols agricoles, via le développement de molécules attractives (Zhang et al., 2021), doit être certaine que des NEPs natifs sont présents dans ces sols. De plus, cela peut ouvrir de nouvelles portes vers le développement ou l'amélioration d'offres de services possibles pour la communauté agricole telles que des diagnostics de la présence et/ou de l'abondance des NEPs dans les sols.**

Le deuxième chapitre de la thèse s'est intéressé à déterminer les facteurs qui influencent la présence des NEPs dans les sols cultivés en maïs en utilisant deux approches d'analyses : l'analyse facteur par facteur et la modélisation pour l'étude multifactorielle. Nous avons fait l'échantillonnage une seule année en début de l'été 2021, puis nous avons déterminé les facteurs qui influençaient la distribution des NEPs détectés. L'approche d'analyse facteur par facteur a mis en évidence des corrélations entre la présence de *Steinernema* sp. dans les sols cultivés en maïs et des variables de propriétés physico-chimiques sol : la matière sèche, l'humidité, le pH, la quantité de limon grossier, le MgO, le P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, le CaO, et le Na<sub>2</sub>O (Figure 41). La deuxième stratégie d'analyse par modélisation prédictive retrouve le même effet avec un effet synergique quand un couvert d'espèces végétales diversifiées est utilisé. La distribution des NEPs est changeante selon les saisons voir les mois de l'année (Campos-Herrera, 2015; Campos-Herrera et al., 2019b), la réalisation d'échantillonnages à différentes saisons ou années permettrait d'étudier les dynamiques des populations des NEPs dans les parcelles de maïs. Il pourrait être intéressant de faire un suivi de la présence des NEPs sur plusieurs mois voire années pour vérifier la persistance d'une population stable dans le temps. De plus, l'échantillonnage réalisé n'est pas sans biais. Plusieurs prélèvements de sols dans une zone représentative de la parcelle ont été réalisés, ce qui est préconisé dans le cas des nématodes à cause de leur distribution en patch dans les sols (Min et al., 2012; Abd-Elgawad, 2021). Il est possible d'améliorer ce protocole d'échantillonnage en récupérant deux échantillons composites par parcelles. Dans ce cas, la parcelle est séparée en deux et dans chaque

partie une zone représentative de la partie de la parcelle est dessinée. Dans chaque zone plusieurs prélèvements sont effectués pour faire un échantillon composite de chaque partie de la parcelle. Les NEPs sont ensuite détectés dans les deux échantillons composites. Il s'agit d'une procédure qui a déjà été utilisée dans des études de prospection sur les NEPs (Jaffuel et al., 2018; Campos-Herrera et al., 2019a; Blanco-Pérez, 2020; Dritsoulas et al., 2020).

Nous nous sommes concentrés sur un bassin géographique avec des propriétés des sols similaires pour nous focaliser sur les effets des pratiques agricoles sur la présence des NEPs dans les sols. Contrairement à d'autres études (Jaffuel et al., 2018; Blanco-Pérez, 2020; Blanco-Pérez et al., 2022b), nous nous sommes basés sur un réseau d'agriculteurs pour faire les prélèvements avec des pratiques contrastées et hétérogènes. La difficulté rencontrée a été d'obtenir les informations requises dans l'enquête ce qui a conduit à avoir un jeu de données incomplet. Le questionnaire fourni aux agriculteurs demandait un grand nombre d'informations (surface de la parcelle, IFT, nom et dose de tous les produits phytosanitaires appliqués sur cinq ans, le nom des cultures principales sur cinq ans, les espèces utilisées en couvert végétal sur cinq ans, la dose et la nature des fertilisants utilisés sur cinq ans, la profondeur du labour sur les cinq ans, présence de ravageur connu, irrigation...). Malgré un accompagnement pour les aider à répondre à ce questionnaire, il est possible que le trop grand nombre d'informations demandées ait freiné les agriculteurs à répondre à l'ensemble des questions. Un questionnaire plus ciblé sur les pratiques d'importances aurait été peut-être mieux rempli. Aujourd'hui, les pratiques agricoles à cibler, que nous préconiserions, seraient la profondeur du labour, le type de fertilisation (organique ou minérale), l'IFT, les espèces végétales utilisées en plus de la culture principale, la présence ou l'absence de rotation et sur combien d'années. Malgré ces difficultés, l'effet majoritaire qui ressort dans notre étude, trouvé avec les deux stratégies d'analyses, est la favorisation de la présence de *Steinernema* sp. dans les parcelles en monoculture de maïs pendant cinq ans (Figure 41). La principale hypothèse que nous avançons pour expliquer ce résultat est que la diversité végétale plus importante dans les cultures avec des rotations change fréquemment les espèces d'insectes ce qui peut réduire les hôtes les plus optimaux disponibles pour les NEPs. L'augmentation de la diversité végétale améliore la diversité des insectes et celle de leurs prédateurs naturels (Letourneau et al., 2011; Snyder, 2019) ce qui pourrait augmenter les compétitions interspécifiques avec les NEPs pour les ressources nutritives. Notre étude a remonté les pratiques sur cinq ans, l'alternance de culture principale est peut-être une pratique récente (moins de dix ans) ce qui n'a pas permis aux NEPs de s'acclimater à la nouvelle diversité d'insectes hôtes et de compétiteurs. Pour valider cette hypothèse, il serait intéressant de tester dans des parcelles contrôlées les effets des changements de culture sur la dynamique de présence des NEPs, voir, leur abondance et des insectes associés aux parcelles sur plusieurs années.

Une autre hypothèse est que la culture utilisée en alternance, en général le soja (8 parcelles avec au moins un changement en soja sur les 11 parcelles qui ont au moins un changement de culture sur les 5 ans), n'est pas favorable à la présence de NEPs dans les sols. Il est connu que les sols cultivés avec différentes plantes n'hébergent pas la même diversité d'espèces de NEPs. Il y a une différence entre les sols cultivés avec des cultures annuelles et pérennes (Mráček et al., 2005; Emelianoff et al., 2008; Tarasco et al., 2015). Et, dans les cultures annuelles, par exemple, il y a plus d'espèces de NEPs dans les cultures de blé d'hiver que de maïs (Jaffuel et al., 2016). De nombreuses études se sont intéressées aux cultures pérennes telles que les vergers, peu sur les cultures annuelles, et parmi celles-ci les précisions sur le type culture sont vagues, par exemple les termes suivants sont très utilisés : airs agricoles, cultures annuelles, champs, ect (Mráček et al., 2005; Lawrence et al., 2006; Tarasco et al., 2015; Benseddik et al., 2020). La réalisation d'autres campagnes d'échantillonnage en utilisant les mêmes stratégies d'analyses dans différentes cultures agricoles en France, par exemple des cultures de choux, de soja et/ou des vignes, permettrait de mieux identifier les communautés d'espèces de NEPs associées à chaque culture.

En plus des facteurs abiotiques, nous avons regardé si des facteurs biotiques, ici la composition de la nématofaune, affectaient la présence de *Steinernema* sp. Une plus grande diversité des nématodes des sols est corrélée positivement avec la présence des NEPs dans les sols tandis que l'abondance des nématodes bactérivores non opportunistes est corrélée négativement (Figure 41). L'hypothèse qui peut être avancée est que l'augmentation de la diversité des espèces de nématodes des sols diminue les compétitions interspécifiques qui ont été décrites entre les NEPs et les nématodes bactérivores dans les cadavres d'insecte (Duncan et al., 2003; Campos-Herrera et al., 2015b). L'étude n'a pas permis de mettre en évidence d'autres interactions entre les différents groupes trophiques de nématodes des sols et les NEPs. La recherche des interactions entre les groupes trophiques des nématodes et les NEPs en champ est compliquée au vu des nombreux facteurs qui influencent les communautés de NEPs (Labaude and Griffin, 2018; Matuska-Lyzwa et al., 2024), mais aussi celles des nématodes des sols (Puissant et al., 2021). Pour pallier à ce problème, des essais en microcosme (petit contenant avec un système très simplifié qui respecte la composition du sol sans la partie minérale associée à la roche mère, une composition biotique à la diversité réduite et sans le système racinaire des plantes) et/ou en mésocosme (cylindre large rempli de sols provenant de l'environnement et contenant l'ensemble de la communauté des sols mais placés sous des conditions climatiques contrôlées) peuvent être effectués (Verhoef, 1996). Les mésocosmes ont été déjà utilisés dans le cas par exemple d'études sur la nématofaune des sols en fonction de l'amendement apporté (Tabarant et al., 2011) ou en fonction des microarthropodes des sols (Taylor et al., 2010). De la même manière, des sols contenant différentes communautés de nématodes pourraient être mis en contact avec différentes espèces de NEPs et à



différentes concentrations pour évaluer les dynamiques simultanées des populations de la nématofaune et des NEPs. A noter que dans les mésocosmes, il faut que l'ensemble des niveaux des réseaux trophiques des sols soit représenté, mais avec une diversité plus faible (Verhoef, 1996). Ces études en mésocosme pourraient être ainsi complétées avec une espèce de champignon nématophage connu pour prédateur des NEPs (Timper et al., 1991; Matuska-Łyzwa et al., 2024), des représentants de chaque groupe trophique de nématodes des sols (Lu et al., 2020), une espèce d'insecte ravageur connue pour être un hôte potentiel des NEPs (Peters, 1996; Toepfer et al., 2008), et une espèce végétale cultivée.

Un facteur biotique qui n'a pas été abordé dans cette étude est l'échantillonnage des espèces d'insectes présentes dans les parcelles et leur abondance. La présence des NEPs est favorisée par l'agrégation des insectes dans une parcelle (Mráček and Bečvář, 2000), mais à ma connaissance aucune étude n'a investigué la relation entre la présence des NEPs et/ou des espèces de NEPs et des changements des communautés d'espèces d'insectes. Il serait intéressant d'aller plus loin en échantillonnant et identifiant les espèces de NEPs et d'insectes en parallèle sur différents types de parcelles.

**Ce deuxième travail a apporté une réflexion sur : 1/ le choix des échantillonnages à effectuer en fonction de la question posée, 2/ la meilleure méthodologie à suivre pour déterminer les facteurs influençant la présence des NEPs, 3/ les essais à mettre en place pour mieux étudier les relations biotiques entre les NEPs et les autres organismes des sols. Les principales limites de ce travail sont le faible nombre de parcelles de l'étude, et l'homogénéité des propriétés physico-chimiques entre les parcelles empêchant d'observer des effets importants pour ces facteurs. Ces réflexions autour des choix des parcelles ont permis d'aider à orienter d'autres projets tels qu'OptiNEPs porté par le laboratoire DGIMI. Ainsi, les collectes de sols dans le projet OptiNEPs ont été réalisées dans différents bassins géographiques répartis sur tout le territoire français (Sud Est de la France, Sud-ouest, Nord-Ouest et Nord-Est) et dans deux cultures différentes : les pommes de terre et les vergers de pommiers. De plus, les études en mésocosme pour étudier les relations entre les membres de la nématofaune et les NEPs pourraient faire l'objet de futur projet au laboratoire DGIMI. Pour une entreprise, les résultats obtenus rendent difficile le développement d'un produit pour contrecarrer les effets négatifs des facteurs environnementaux, excepté pour le pH. En revanche si nous considérons que le développement de la lutte biologique par conservation pourrait changer le mode économique des entreprises de biocontrôle, ce travail à une valeur importante. En**

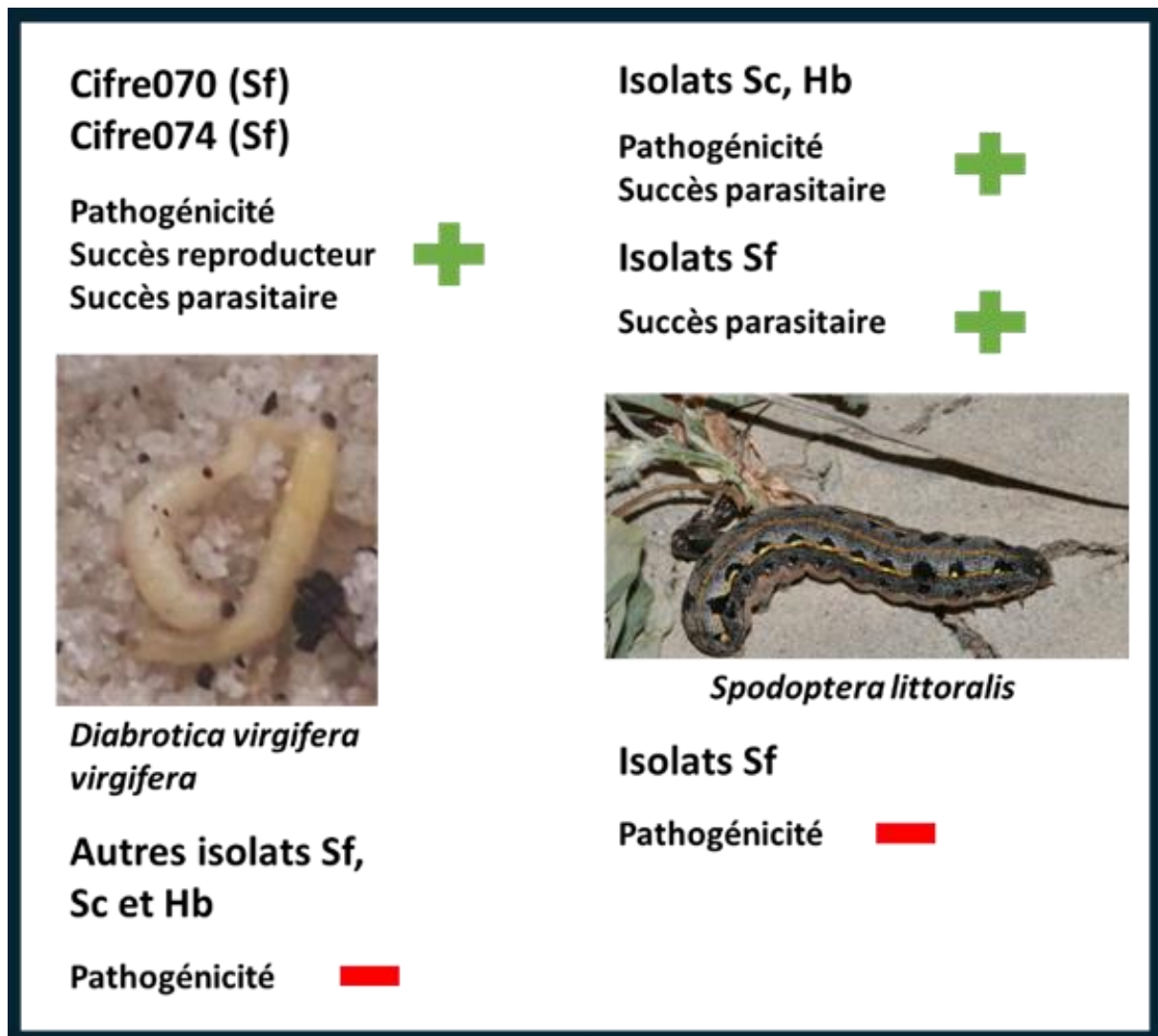


Figure 42 : Pathogénicité, succès parasitaire et succès reproducteur des NEPs infestant deux insectes ravageurs du maïs *Spodoptera littoralis* et *Diabrotica virgifera virgifera*. Trois espèces de NEPs ont été utilisées pour les infestations (*Steinernema carpocapsae*, Sc, *Steinernema feltiae*, Sf, et *Heterorhabditis bacteriophora*, Hb). Les signes indiquent l'effet de l'espèce sur les paramètres suivis pathogénicité, succès parasitaire (nombre d'émergence/nombre de cadavre), succès reproducteur (nombre d'IJs émergents/mL), positif, croix verte, négatif trait rouge. La photographie de la larve de *S. littoralis* appartient à la photothèque de DGIMI et celle de larve de DvV a été prise par Elisabeth Depuydt.

effet l'entreprise pourrait vendre des conseils sur les changements de pratiques agricoles à apporter pour améliorer la présence des NEPs natifs dans les sols. Cela peut se traduire par la vente d'outils d'aide à la décision (OAD) à destination des agriculteurs. Ces OADs aideraient les agriculteurs à prendre des décisions sur les pratiques agricoles à appliquer sur la parcelle grâce à des étapes de décisions où l'utilisateur choisit une option selon les probabilités d'obtenir le résultat souhaité (Rose et al., 2016; Rupnik et al., 2019). Le développement d'un OAD performant nécessiterait une base de données importante concaténant de nombreuses études sur les facteurs qui influencent la distribution des NEPs et leur pathogénicité dans tous les contextes pédoclimatiques et agronomiques possibles.

Le troisième chapitre s'est intéressé à savoir si un lien existait entre le cycle parasitaire des NEPs sur *S. littoralis* et la diversité de leur microbiote. Si aucun lien entre le microbiote et le cycle parasitaire des NEPs n'a pu être démontré, l'influence de l'insecte hôte sur la réussite du cycle parasitaire des NEPs et le lien entre la phylogénie des NEPs et leur pathogénicité ont pu être confirmés (Figure 42). Seulement deux espèces d'insectes ont été utilisées, le stade L6 de la larve de *S. littoralis*, un ravageur foliaire du maïs qui n'est naturellement pas en contact avec les NEPs, et le stade L3 de la larve du ravageur des racines de maïs Dvv présente naturellement dans les sols. L'évaluation de la pathogénicité des NEPs sur ces deux espèces a fait l'objet de plusieurs études (Toepfer et al., 2005, 2008; Kurtz et al., 2007; Campos-Herrera and Gutiérrez, 2009; Sobhy et al., 2020; Nouh, 2021; Yağci et al., 2022; Geisert et al., 2023), mais leur occurrence dans le Sud-Ouest de la France est faible pour *S. littoralis* (ElShahed et al., 2023) et quasiment inexistante pour Dvv (Sivčev et al., 2012). Il aurait été intéressant de tester le cycle parasitaire des NEPs collectés contre des espèces d'insectes natives des parcelles échantillonnées. L'espèce d'insecte ravageur du maïs la plus citée pour être présent dans les parcelles par les agriculteurs interrogés est le taupin, *Agriotes* sp. Des essais dans la littérature sur cet insecte montrent un taux de mortalité de 0 à 20% après 7 jours post infestation avec les espèces de *S. carpocapsae*, *S. feltiae* et *H. bacteriophora* (Campos-Herrera and Gutiérrez, 2009; Morton and Garcia-del-Pino, 2017), et des taux de mortalité plus importants avec d'autres isolats de ces mêmes espèces, jusqu'à 100% après 48h post inoculation (Caroli et al., 1996) et 75% de mortalité après 28 jours post inoculation (Öğretmen et al., 2020). La difficulté est qu'il n'y a pas d'élevage de cet insecte possible en laboratoire, juste des maintiens après collecte sur le terrain. Or le cycle de vie des espèces d'*Agriotes* sp. est long entre 1 et 2 ans selon les espèces, les différences entre les stades sont peu visibles, et l'identification des espèces de taupins est compliquée pour des non-initiés (Traugott et al., 2015).



Une amélioration de la méthodologie des patho-essais avec les larves de Dvv permettrait d'obtenir des patho-essais standards avec un insecte présent naturellement dans les sols. Cela pourrait être nécessaire dans le cas des études sur le lien entre le cycle parasitaire des NEPs et le microbiote pour deux raisons. La première est que la sensibilité de *S. littoralis* au nématode ou à son symbiote est peut-être trop grande pour observer un effet du microbiote. L'hypothèse est que le microbiote des NEPs pourrait avoir un rôle dans le cycle parasitaire quand les conditions environnementales sont non favorables aux NEPs (Ogier et al., 2023). La deuxième raison est l'adaptation à différents insectes hôtes. Les profils de microbiote sont peut-être différents selon les capacités des NEPs à réussir leur cycle parasitaire sur des ordres d'insectes différents. De plus, l'évaluation du cycle parasitaire et du microbiote sur les insectes ont été faites après deux infestations sur des larves de *G. mellonella* pour leur maintien en vie en laboratoire. Une infestation sur une larve d'insecte produit des IJs issus de plusieurs générations qui se sont succédées dans le cadavre d'insecte (Campos-Herrera, 2015). Le microbiote des IJs des souches de *S. carpocapsae* de la collection, IJs issus de plusieurs infestations successives sur les larves de *G. mellonella*, a des espèces bactériennes communes avec des isolats fraîchement collectés des sols, mais présente une diversité très réduite par rapport aux isolats naturels (Ogier et al., 2020). Il est possible que des différences dans la diversité des espèces bactériennes ou leur abondance entre les isolats soient effacées au fur et à mesure des infestations sur les larves de *G. mellonella* effectuées pour le maintien des IJs en laboratoire. Pour tester cette hypothèse, il faudrait réitérer des échantillonnages pour récupérer de nouveaux isolats, évaluer le microbiote immédiatement après l'isolement et après chaque infestation sur *G. mellonella* pour identifier les changements dans le microbiote des NEPs. Finalement, l'évaluation de l'étude entre microbiote et cycle parasitaire pourrait être reconduite sur des isolats fraîchement collectés du terrain juste après l'isolement des NEPs. Puis l'évaluation de leur pathogénicité pourrait être faite sur des larves de Dvv dans des microcosmes pour maximiser les chances de percevoir des différences dans la composition du microbiote.

Cependant, la corrélation entre une diversité ou une composition du microbiote avec la pathogénicité, le succès parasitaire et/ou le succès reproducteur n'offre pas une preuve d'un lien de cause à effet. Pour confirmer l'influence de certains taxa du microbiote sur le cycle parasitaire des NEPs des expériences de réassociation de ces taxa avec des nématodes axéniques peuvent être effectués, similaires à ce qui a déjà été fait avec le symbiote (Sicard et al., 2003).

Les effets des facteurs environnementaux sur le microbiote des NEPs n'ont pas été investigués en détail. A l'image d'autres organismes, nous pouvons supposer que les facteurs environnementaux et en particulier les composantes microbiennes des sols (Brinker et al., 2019) influencent la communauté microbienne des NEPs. Pour étudier cela, le microbiote d'isolats provenant de sols aux propriétés

physico-chimiques contrastées pourraient être décrit ainsi que les communautés microbiennes de ces sols. Des liens entre les propriétés physico-chimiques des sols, leurs communautés microbiennes, l'espèce de NEPs et son FAM pourraient être mis en évidence.

**Ce dernier travail est moins abouti que les précédents, mais il a permis de développer un patho-essai sur Dvv au laboratoire DGIMI, et d'ouvrir de nouvelles pistes pour l'étude du rôle du microbiote sur le cycle parasitaire qui est une thématique en développement au laboratoire. Pour l'entreprise, la connaissance de l'adéquation entre le profil microbien du nématode et sa pathogénicité contre différents insectes ravageurs peut avoir des applications lointaines. La connaissance des interactions entre ces trois parties peut amener à développer des produits pour modifier les facteurs environnementaux et/ou la communauté microbienne des sols pour favoriser l'apparition d'un profil microbien fortement pathogène contre un ordre spécifique d'insecte ravageur.**

Pour conclure, cette thèse a tenté de répondre à l'enjeu de l'utilisation des NEPs en lutte biologique par conservation. La réalisation de ce projet de recherche a répondu en partie aux deux premiers objectifs : le développement de nouvelles méthodes performantes pour détecter l'agent de lutte biologique natif et la détermination des facteurs biotiques et abiotiques qui les favorisent dans les cultures. L'atteinte du troisième objectif, l'étude de l'entomopathogénicité de l'agent de lutte biologique vis-à-vis des insectes ravageurs, a été commencée au cours de cette thèse. Ces résultats ouvrent des perspectives intéressantes autant pour la communauté scientifique qui étudient les NEPs que pour les entreprises qui s'intéressent à la lutte biologique avec les NEPs.

D'une manière générale, pour terminer ce manuscrit et ces trois ans de thèse, je conclurai que pour envisager une lutte biologique par conservation, une augmentation des projets de recherche de cette envergure à de nombreux agents de lutte biologique potentiels constitue le défi de demain.

## Références bibliographiques

---

- Aalders, L.T., McNeill, M.R., Bell, N.L., Cameron, C., 2017. Plant parasitic nematode survival and detection to inform biosecurity risk assessment. *NeoBiota* 36, 1–16. doi:<https://doi.org/10.3897/neobiota.36.11418>
- Abd-Elgawad, M.M.M., 2021. Optimizing Sampling and Extraction Methods for Plant-Parasitic and Entomopathogenic Nematodes. *Plants* 10, 629. doi:[10.3390/plants10040629](https://doi.org/10.3390/plants10040629)
- Agresti, A., 2007. Introduction to Categorical Data Analysis, Second. ed, Wiley series in probability and statistics. Wiley.
- Alatorre-Rosas, R., Kaya, H.K., 1990. Interspecific competition between entomopathogenic nematodes in the genera *Heterorhabditis* and *Steinernema* for an insect host in sand. *Journal of Invertebrate Pathology* 55, 179–188. doi:[10.1016/0022-2011\(90\)90053-9](https://doi.org/10.1016/0022-2011(90)90053-9)
- Alavanja, M., C.R., Samanic, C., Dosemeci, M., Lubin, J., Tarone, R., Lynch, C., F., Knott, C., Thomas, K., Hoppin, J., A., Barker, J., Coble, J., Sandler, D., P., Blair, A., 2003. Use of Agricultural Pesticides and Prostate Cancer Risk in the Agricultural Health Study Cohort. *American Journal of Epidemiology* 157, 800–814. doi:[10.1093/aje/kwg040](https://doi.org/10.1093/aje/kwg040)
- Ali, J.G., Alborn, H.T., Stelinski, L.L., 2010. Subterranean Herbivore-induced Volatiles Released by Citrus Roots upon Feeding by *Diaprepes abbreviatus* Recruit Entomopathogenic Nematodes. *Journal of Chemical Ecology* 36, 361–368. doi:[10.1007/s10886-010-9773-7](https://doi.org/10.1007/s10886-010-9773-7)
- Amuri, B., Devi, G., 2020. Bio efficacy of *Heterorhabditis bacteriophora* and *Oscheius chongmingensis* against *Helopeltis theivora* and *Andraca bipunctata*. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 9, 2460–2473. doi:[10.20546/ijcmas.2020.904.295](https://doi.org/10.20546/ijcmas.2020.904.295)
- Antunes, P.M., Lehmann, A., Hart, M.M., Baumecker, M., Rillig, M.C., 2011. Long-term effects of soil nutrient deficiency on arbuscular mycorrhizal communities. *Functional Ecology* 26, 532–540. doi:[10.1111/j.1365-2435.2011.01953.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2011.01953.x)
- Araujo, M.B., Williams, P.H., Fuller, R.J., 2002. Dynamics of extinction and the selection of nature reserves. *The Royal Society* 269, 1971–1980.
- Aryal, S., Nielsen, U.N., Sumaya, N.H., De Faveri, S., Wilson, C., Riegler, M., 2022. Isolation and molecular characterization of five entomopathogenic nematode species and their bacterial symbionts from eastern Australia. *BioControl* 67, 63–74. doi:[10.1007/s10526-021-10105-7](https://doi.org/10.1007/s10526-021-10105-7)

- Askary, T.H., Abd-Elgawad, M.M.M., 2021. Opportunities and challenges of entomopathogenic nematodes as biocontrol agents in their tripartite interactions. *Egyptian Journal of Biological Pest Control* 31, 42. doi:10.1186/s41938-021-00391-9
- Asshoff, R., Scheu, S., Eisenhauer, N., 2010. Different earthworm ecological groups interactively impact seedling establishment. *European Journal of Soil Biology* 46, 330–334. doi:10.1016/j.ejsobi.2010.06.005
- Ayan, E., Erbay, H., Varçin, F., 2020. Crop pest classification with a genetic algorithm-based weighted ensemble of deep convolutional neural networks. *Computers and Electronics in Agriculture* 179, 1–10. doi:https://doi.org/10.1016/j.compag.2020.105809
- Ayuke, F.O., Karanja, N.K., Muya, E.M., Musombi, B.K., Mungatu, J., Nyamasyo, G.H.N., 2009. Subtropical Agroecosystems. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 11, 371–384.
- Bal, H.K., Grewal, P.S., 2015. Lateral Dispersal and Foraging Behavior of Entomopathogenic Nematodes in the Absence and Presence of Mobile and Non-Mobile Hosts. *PLOS ONE* 10, e0129887. doi:10.1371/journal.pone.0129887
- Bal, H.K., Taylor, R.A.J., Grewal, P.S., 2014. Ambush Foraging Entomopathogenic Nematodes Employ ‘Sprinters’ for Long-Distance Dispersal in the Absence of Hosts. *Journal of Parasitology* 100, 422–432. doi:10.1645/12-165.1
- Baratange, M., Cardoso, J., Robin, D.C., Marchand, P.A., 2023. Implementation of Biocontrol Macro-Organisms in France. *Ecologies* 4, 478–498. doi:https://doi.org/10.3390/ecologies4030031
- Bates, D.M., Maechler, M., Bolker, B., Walker, S., Christensen, R.H.B., Singmann, H., Dai, B., Grothendieck, G., 2014. Package lme4: Linear Mixed-Effects Models Using Eigen and S4. *Journal of Statistical Software*.
- Bedding, R.A., Akhurst, R.J., 1975. A simple technique for the detection of insect parasitic rhabditid nematodes in soil. *Nematologica* 21, 109–116.
- Begg, G.S., Cook, S.M., Dye, R., Ferrante, M., Franck, P., Lavigne, C., Lövei, G.L., Mansion-Vaquie, A., Pell, J.K., Petit, S., Quesada, N., Ricci, B., Wratten, S.D., Birch, A.N.E., 2017. A functional overview of conservation biological control. *Crop Protection* 97, 145–158. doi:10.1016/j.cropro.2016.11.008
- Benjamin, V., Germain, A.M., Jacques, D.E., 2022. Contribution to the characterization of quaternary surface sediments of the southern part of the Marais Poitevin (Poitou-Charentes-France). *European Scientific Journal* 18, 211–239. doi:https://doi.org/10.19044/esj.2022.v18n40p211

- Benseddik, Y., Boutaleb Joutei, A., Blenzar, A., Ezrari, S., Molina, C.M., Radouane, N., Mokrini, F., Tahiri, A., Lahlali, R., Dababat, A.A., 2020. Occurrence and distribution of entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) in Morocco. *Biocontrol Science and Technology* 30, 1060–1072. doi:10.1080/09583157.2020.1787344
- Bhat, A.H., Chaubey, A.K., Askary, T.H., 2020. Global distribution of entomopathogenic nematodes, *Steinernema* and *Heterorhabditis*. *Egyptian Journal of Biological Pest Control* 30, 31. doi:10.1186/s41938-020-0212-y
- Bianchi, F.J.J.A., Booij, C.J.H., Tschardtke, T., 2006. Sustainable pest regulation in agricultural landscapes: a review on landscape composition, biodiversity and natural pest control. *Proceedings of The Royal Society* 2736, 1715–1727. doi:10.1098/rspb.2006.3530
- Bisch, G., Pagès, S., McMullen, J.G., Stock, S.P., Duvic, B., Givaudan, A., Gaudriault, S., 2015. *Xenorhabdus bovienii* CS03, the bacterial symbiont of the entomopathogenic nematode *Steinernema weiseri*, is a non-virulent strain against lepidopteran insects. *Journal of Invertebrate Pathology* 124, 15–22. doi:10.1016/j.jip.2014.10.002
- Blackburn, M., Golubeva, E., Bowen, D., Ffrench-Constant, R.H., 1998. A Novel Insecticidal Toxin from *Photorhabdus luminescens*, Toxin Complex a (Tca), and Its Histopathological Effects on the Midgut of *Manduca sexta*. *APPL. ENVIRON. MICROBIOL.* 64, 3036–3041.
- Blanc, C., Sy, M., Djigal, D., Brauman, A., Normand, P., Villenave, C., 2006. Nutrition on bacteria by bacterial-feeding nematodes and consequences on the structure of soil bacterial community. *European Journal of Soil Biology* 42, S70–S78. doi:https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2006.06.003
- Blanco-Pérez, R., Sáenz-Romo, M.G., Vicente-Díez, I., Ibáñez-Pascual, S., Martínez-Villar, E., Marco-Mancebón, V.S., Pérez-Moreno, I., Campos-Herrera, R., 2020. Impact of vineyard ground cover management on the occurrence and activity of entomopathogenic nematodes and associated soil organisms. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 301, 1–12. doi:10.1016/j.agee.2020.107028
- Blanco-Pérez, R., Vicente-Díez, I., Pou, A., Pérez-Moreno, I., Marco-Mancebón, V.S., Campos-Herrera, R., 2022a. 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* 192, 1–11. doi:https://doi.org/10.1016/j.jip.2022.107781
- Blanco-Pérez, R., Vicente-Díez, I., Ramos-Saez de Ojer, J.L., Marco-Mancebón, V.S., Pérez-Moreno, I., Campos-Herrera, R., 2022b. Organic viticulture enhanced the activity of native entomopathogenic

- nematodes in DOCa Rioja soils (North of Spain). *Agriculture, Ecosystems and Environment* 332, 1–13. doi:<https://doi.org/10.1016/j.agee.2022.107931>
- Blaxter, M., Denver, D.R., 2012. The worm in the world and the world in the worm. *BMC Biol* 10, 1–3. doi:<https://doi.org/10.1186/1741-7007-10-57>
- Blaxter, M.L., Ley, P.D., Garey, J.R., Liu, L.X., Vanfleteren, J.R., Mackey, L.Y., Dorris, M., Frisse, L.M., Vida, J.T., Thomas, W.K., 1998. A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. *Nature* 392, 71–75. doi:<https://doi.org/10.1038/32160>
- Boemare, N., Laumond, C., Mauleon, H., 1996. The Entomopathogenic Nematode-Bacterium Complex: Biology, Life Cycle and Vertebrate Safety. *Biocontrol Science and Technology* 6, 333–346. doi:[10.1080/09583159631316](https://doi.org/10.1080/09583159631316)
- Bongers, T., 1989. The nematodes of the Netherlands (V. d. H. J, Trans.), In B. museum. ed. London-Wageningen.
- Bos, L., Parlevliet, J.E., 1995. CONCEPTS AND TERMINOLOGY ON PLANT PEST RELATIONSHIPS: Toward Consensus in Plant Pathology and Crop Protection. *Annual Rev. Phytopatol* 33, 69–102.
- Bouwman, H., 2011. DDT and Malaria Prevention: Addressing the Paradox. *Environmental Health Perspectives* 119, 744–747. doi:[10.1289/ehp.1002127](https://doi.org/10.1289/ehp.1002127)
- Brinker, P., Fontaine, M.C., Beukeboom, L.W., Falcao Salles, J., 2019. Host, Symbionts, and the Microbiome: The Missing Tripartite Interaction. *Trends in Microbiology* 27, 480–488. doi:[10.1016/j.tim.2019.02.002](https://doi.org/10.1016/j.tim.2019.02.002)
- Calo, L.O., Caldeira, M.V.W., Camara, R., Castro, K.C., de Lima, S.S., Pereira, M.G., de Aquino, A.M., 2022. Epigeal fauna and edaphic properties as possible soil quality indicators in forest restoration areas in Espírito Santo, Brazil. *Acta Oecologica* 117, 1–10. doi:<https://doi.org/10.1016/j.actao.2022.103870>
- Cambon, M.C., Lafont, P., Frayssinet, M., Lanois, A., Ogier, J.-C., Pagès, S., Parthuisot, N., Ferdy, J.-B., Gaudriault, S., 2020. Bacterial community profile after the lethal infection of *Steinernema-Xenorhabdus* pairs into soil-reared *Tenebrio molitor* larvae. *FEMS Microbiology Ecology* 96, fiae009. doi:[10.1093/femsec/fiae009](https://doi.org/10.1093/femsec/fiae009)
- Campbell, J.F., Gaugler, R.R., 1997. Inter-specific variation in entomopathogenic nematode foraging strategy : dichotomy or variation along a continuum ? *Fundam. Appl. Nematol* 20, 393–398.
- Campbell, J.F., Lewis, E.E., Stock, S.P., Nadler, S., Kaya, H.K., 2003. Evolution of Host Search Strategies in Entomopathogenic Nematodes. *Journal of Nematology* 35, 142–145.

- Campos-Herrera, R., Blanco-Pérez, R., Bueno-Pallero, F.Á., Duarte, A., Nolasco, G., Sommer, R.J., Rodríguez Martín, J.A., 2019a. Vegetation drives assemblages of entomopathogenic nematodes and other soil organisms: Evidence from the Algarve, Portugal. *Soil Biology and Biochemistry* 128, 150–163. doi:10.1016/j.soilbio.2018.10.019
- Campos-Herrera, R., 2019b. Temporal patterns of entomopathogenic nematodes in Florida citrus orchards\_ Evidence of natural regulation by microorganisms and nematode competitors. *Soil Biology and Biochemistry* 128, 193-204. doi:10.1016/j.soilbio.2018.10.012
- Campos-Herrera, R. (Ed.), 2015. *Nematode Pathogenesis of Insects and Other Pests: Ecology and Applied Technologies for Sustainable Plant and Crop Protection*. Springer International Publishing, Cham. doi:10.1007/978-3-319-18266-7
- Campos-Herrera, R., Escuer, M., Labrador, S., Robertson, L., Barrios, L., Gutiérrez, C., 2007. Distribution of the entomopathogenic nematodes from La Rioja (Northern Spain). *Journal of Invertebrate Pathology* 95, 125–139. doi:10.1016/j.jip.2007.02.003
- Campos-Herrera, R., Gutiérrez, C., 2009. Screening Spanish isolates of steinernematid nematodes for use as biological control agents through laboratory and greenhouse microcosm studies. *Journal of Invertebrate Pathology* 100, 100–105. doi:10.1016/j.jip.2008.11.009
- Campos-Herrera, R., Gutiérrez, C., 2008. Comparative study of entomopathogenic nematode isolation using *Galleria mellonella* (Pyralidae) and *Spodoptera littoralis* (Noctuidae) as baits. *Biocontrol Science and Technology* 18, 621–626. doi:10.1080/09583150802064864
- Campos-Herrera, R., Jaffuel, G., Chiriboga, X., Blanco-Pérez, R., Fesselet, M., Půža, V., Mascher, F., Turlings, T.C.J., 2015a. Traditional and molecular detection methods reveal intense interguild competition and other multitrophic interactions associated with native entomopathogenic nematodes in Swiss tillage soils. *Plant and Soil* 389, 237–255. doi:10.1007/s11104-014-2358-4
- Campos-Herrera, R., Johnson, E.G., EL-Borai, F.E., Stuart, R.J., Graham, J.H., Duncan, L.W., 2011. Long-term stability of entomopathogenic nematode spatial patterns in soil as measured by sentinel insects and real-time PCR assays. *Annals of Applied Biology* 158, 55–68. doi:10.1111/j.1744-7348.2010.00433.x
- Campos-Herrera, R., Palomares-Ruis, J.E., Blanco-Perez, R., Rodriguez -Martin, J.A., Landa, B.B., Castillo, P., 2022. Irrigation modulates entomopathogenic nematode community and its soil food web in olive groves under different agricultural managements. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 337, 108070, 1–12. doi:https://doi.org/10.1016/j.agee.2022.108070

- Campos-Herrera, R., Půža, V., Jaffuel, G., Blanco-Pérez, R., Čepulytė-Rakauskienė, R., Turlings, T.C.J., 2015b. Unraveling the intraguild competition between *Oscheius* spp. nematodes and entomopathogenic nematodes: Implications for their natural distribution in Swiss agricultural soils. *Journal of Invertebrate Pathology* 132, 216–227. doi:10.1016/j.jip.2015.10.007
- Caroli, L., Glazer, I., Gaugler, R., 1996. Entomopathogenic Nematode Infectivity Assay: Comparison of Penetration Rate into Different Hosts. *Biocontrol Science and Technology* 6, 227–234. doi:10.1080/09583159650039412
- Castro-Huerta, R.A., Falco, L.B., Sandler, R.V., Coviella, C.E., 2015. Differential contribution of soil biota groups to plant litter decomposition as mediated by soil use. *PeerJ* 3, 1–14. doi:https://doi.org/10.7717/peerj.826
- Cavagnaro, T.R., Bender, F., S., Asghari, H., R., vand der Heijden, M., G.A., 2015. The role of arbuscular mycorrhizas in reducing soil nutrient loss. *Trends in Plant Science* 20, 283–290. doi:https://doi.org/10.1016/j.tplants.2015.03.004
- Chamorro-Martínez, Y., Torregroza-Espinosa, A.C., Inés, M., Pallares, M., Osorio, D.P., Paternina, A.C., Echeverría-González, A., 2022. Soil macrofauna, mesofauna and microfauna and their relationship with soil quality in agricultural areas in northern Colombia: ecological implications. *Rev Bras Cienc Solo* 46, 1–15. doi:https://doi.org/10.36783/18069657rbcs20210132
- Chang, D.Z., Serra, L., Lu, D., Mortazavi, A., Dillman, A.R., 2019. A core set of venom proteins is released by entomopathogenic nematodes in the genus *Steinernema*. *PLOS Pathogens* 15, 1–29. doi:https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007626
- Chassain, J., 2023. Thèse : Biodiversité des sols et services écosystémiques associés dans des systèmes de culture alternatifs stables et en transition (Ecologie, Environnement). Université Paris-Saclay, Paris.
- Chauhan, B.S., 2020. Grand Challenges in Weed Management. *Frontiers in Agronomy* 1. doi:10.3389/fagro.2019.00003
- Chauvin, C., Trambolho, M., Hedde, M., Makowski, D., Cérémonie, H., Jimenez, A., Villenave, C., 2020. Soil Nematodes as Indicators of Heavy Metal Pollution: A Meta-Analysis. *Open Journal of Soil Science* 10, 579–601. doi:10.4236/ojss.2020.1012028
- Chen, B., 2021. Droplet digital PCR as an emerging tool in detecting pathogens nucleic acids in infectious diseases. *Clinica Chimica Acta* 517, 156-161. doi: https://doi.org/10.1016/j.cca.2021.02.008



- Chen, J., Liu, Q., Zheng, W.-B., Hong, S.-J., Sugiyama, H., Zhu, X.-Q., Elsheikha, H.M., 2018. *Toxocariasis*: a silent threat with a progressive public health impact. *Infectious Diseases of Poverty* 7, 1–13. doi:<https://doi.org/10.1186/s40249-018-0437-0>
- Chen, S., Li, J., Han, X., Moens, M., 2003. Effect of temperature on the pathogenicity of entomopathogenic nematodes (*Steinernema* and *Heterorhabditis* spp.) to *Delia radicum*. *BioControl* 48, 713–724.
- Chen, Y., Long, H., Feng, T., Pei, Y., Sun, Y., Zhang, X., 2022. Development of a Novel Primer–TaqMan Probe Set for Diagnosis and Quantification of *Meloidogyne enterolobii* in Soil Using qPCR and Droplet Digital PCR Assays. *International Journal of Molecular Sciences* 23, 11185. doi:10.3390/ijms231911185
- Chen, B., Teh, B.-S., Sun, C., Hu, S., Lu, X., Boland, W., Shao, Y., 2016. Biodiversity and Activity of the Gut Microbiota across the Life History of the Insect Herbivore *Spodoptera littoralis*. *Scientific Reports* 6, 1–14.
- Cole, J.R., Chai, B., Farris, R.J., Wang, Q., Kulam-Syed-Mohideen, A.S., McGarrell, D.M., Bandela, A.M., Cardenas, E., Garrity, G.M., Tiedje, J.M., 2006. The ribosomal database project (RDP-II): introducing myRDP space and quality controlled public data. *Nucleic Acids Research* 35. doi:10.1093/nar/gkl889
- Coll, P., Le Cadre, E., Mérot, A., Villenave, C., 2013. La caractérisation du fonctionnement biologique du sol en viticulture biologique peut être réalisée par l’analyse de la nématofaune. *Innovations Agronomiques* 32, 391–400.
- Collier, T., Steenwyk, R.V., 2004. A critical evaluation of augmentative biological control. *Biological Control* 31, 245–256. doi:10.1016/j.biocontrol.2004.05.001
- Corato, U.D., 2023. Governance of soil amendment to enhance suppression to soil-borne plant pathogens from a long-term perspective. *Applied Soil Ecology* 182, 1–5. doi:<https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2022.104721>
- Cortés-Martínez, C.I., Chavarría-Hernández, N., 2020. Production of entomopathogenic nematodes in submerged monoxenic culture: A review. *Biotechnology and Bioengineering* 117, 3968–3985. doi:10.1002/bit.27515
- Creamer, R.E., Barel, J.M., Bongiorno, G., Zwetsloot, M.J., 2022. The life of soils: Integrating the who and how of multifunctionality. *Soil Biology and Biochemistry* 166, 1–15. doi:<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2022.108561>
- Crees, J.J., Turvey, S.T., 2015. What constitutes a ‘native’ species? Insights from the Quaternary faunal record. *Biological Conservation* 186, 143–148. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.biocon.2015.03.007>

- Curran, J., Heng, J., 1992. Comparison of Three Methods for Estimating the Number of Entomopathogenic Nematodes Present in Soil Samples. *Journal of Nematology*, The Society of Nematologists 24, 170–176.
- Daramola, F.Y., 2021. Isolation and molecular characterization of entomopathogenic nematode, *Heterorhabditis* sp. from an arable land in Nigeria. *Journal of Integrative Agriculture* 20, 10, 2706-2715. doi: 10.1016/S2095-3119(21)63609-2
- Date, J., Tanida, N., Hobara, T., 2004. Qat chewing and pesticides: A study of adverse health effects in people of the mountainous areas of Yemen. *International Journal of Environmental Health Research* 14, 405–414. doi:10.1080/09603120400012884
- Davis, F.R., 2019. Pesticides and the perils of synecdoche in the history of science and environmental history. *History of Science* 57, 469–492. doi: <https://doi.org/10.1177/0073275319848964>
- Decaëns, T., 2010. Macroecological patterns in soil communities. *Global Ecology and Biogeography* 19, 287–302. doi:10.1111/j.1466-8238.2009.00517.x
- Deguine, J.-P., Ledouble, H., 2022. Le biocontrôle en France : de quoi parle-t-on ? *Cah. Agric.* 31, 1–8. doi:<https://doi.org/10.1051/cagri/2022018>
- Depuydt, E., Ogier, J.-C., Nusrat, A., Villenave, C., Jimenez, A., Mahieu, P., Vouadec, B., Nguema-Ona, E., Gaudriault, S., 2024. Combining multiple baiting cycles with digital droplet PCR optimizes description of the distribution of entomopathogenic nematodes in French maize fields. *Soil Biology and Biochemistry* 189, 1–9.
- Diakhaté, S., Villenave, C., Diallo, N.H., Ba, A.O., Djigal, D., Masse, D., Sembène, P.M., Chapuis-Lardy, L., 2013. The influence of a shrub-based intercropping system on the soil nematofauna when growing millet in Senegal. *European Journal of Soil Biology* 57, 35–41. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejsobi.2013.04.003>
- Dichusa, C.A., Ramos Jr, R., Aryal, S., Sumaya, N.P.D., Sumaya, N.H., 2021. Survey and identification of entomopathogenic nematodes in the province of Cotabato, Philippines, for biocontrol potential against the tobacco cutworm, *Spodoptera litura* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae). *Egyptian Journal of Biological Pest Control* 31, 1–10. doi:<https://doi.org/10.1186/s41938-021-00390-w>
- Dijk, M., Morley, T., Rau, M.L., Saghai, Y., 2021. A meta-analysis of projected global food demand and population at risk of hunger for the period 2010–2050. *Nature Food* 2, 494–501. doi:<https://doi.org/10.1038/s43016-021-00322-9>

Dillman, A.R., Chaston, J.M., Adams, B.J., Ciche, T.A., Goodrich-Blair, H., Stock, S.P., Sternberg, P.W., 2012. An Entomopathogenic Nematode by Any Other Name. *PLoS Pathogens* 8, e1002527. doi:10.1371/journal.ppat.1002527

Ding, Y., Chen, Y., Lin, Z., Tuo, Y., Li, H., Wang, Y., 2021. Differences in Soil Microbial Community Composition Between Suppressive and Root Rot-Conducive in Tobacco Fields. *Current Microbiology* 78, 624–633.

Dix, I., Burnell, A.M., Griffin, C.T., Joyce, S.A., Nugent, M.J., Downes, M.J., 1992. The identification of biological species in the genus *Heterorhabditis* (Nematoda: Heterorhabditidae) by cross-breeding second-generation amphimictic adults. *Parasitology* 104, 509–518. doi:10.1017/S0031182000063770

Dixon, P., 2003. VEGAN, a package of R functions for community ecology. *Journal of Vegetation Science* 14, 927–930.

Dritsoulas, A., Campos-Herrera, R., Blanco-Pérez, R., Duncan, L.W., 2020. Comparing high throughput sequencing and real time qPCR for characterizing entomopathogenic nematode biogeography. *Soil Biology and Biochemistry* 145, 8. doi:https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2020.107793

Dumont, A.M., Wartenberg, A.C., Baret, P.V., 2021. Bridging the gap between the agroecological ideal and its implementation into practice. A review. *Agron. Sustain. Dev.* 41, 1–17. doi:https://doi.org/10.1007/s13593-021-00666-3

Duncan, L.W., Dunn, D.C., Bague, G., Nguyen, K.G., 2003. Competition Between Entomopathogenic and Free-Living Bactivoracious Nematodes in Larvae of the Weevil *Diaprepes abbreviatus*. *Journal of Nematology* 35, 187–193.

Ekschmitt, K., Bakonyi, G., Bongers, M., Bongers, T., Boström, S., Dogan, H., Harrison, A., Nagy, P., O'Donnell, A.G., Papatheodorou, E.M., Sohlenius, B., Stamou, G.P., Wolters, V., 2001. Nematode community structure as indicator of soil functioning in European grassland soils. *Eur. J. Soil Biol.* 37, 263–268. doi:https://doi.org/10.1016/S1164-5563(01)01095-0

Elbrense, H., Elmasry, A.M.A., Seleiman, M.F., AL-Harbi, M.S., El-Raheem, A.M.A., 2021. Can Symbiotic Bacteria (*Xenorhabdus* and *Photorhabdus*) Be More Efficient than Their Entomopathogenic Nematodes against *Pieris rapae* and *Pentodon algerinus* Larvae? *Biology* 10, 1–21. doi: https://doi.org/10.3390/biology10100999

Elmahalawy, S.T., Halvarsson, P., Skarin, M., Höglund, J., 2018. Droplet digital polymerase chain reaction (ddPCR) as a novel method for absolute quantification of major gastrointestinal nematodes in sheep. *Veterinary Parasitology* 261, 1–8. doi: 10.1016/j.vetpar.2018.07.008

- ElShahed, S.M., Mostafa, Z.K., Radwan, M.H., Hosni, E.M., 2023. Modeling the potential global distribution of the Egyptian cotton leafworm, *Spodoptera littoralis* under climate change. *Scientific Reports* 13, 1–10. doi:<https://doi.org/10.1038/s41598-023-44441-8>
- Emelianoff, V., Le Brun, N., Pagès, S., Stock, S.P., Tailliez, P., Moulia, C., Sicard, M., 2008. Isolation and identification of entomopathogenic nematodes and their symbiotic bacteria from Hérault and Gard (Southern France). *Journal of Invertebrate Pathology* 98, 211–217. doi:10.1016/j.jip.2008.01.006
- Epsky, N.D., Walter, D.E., Capinera, J.L., 1988. Potential Role of Nematophagous Microarthropods as Biotic Mortality Factors of Entomogenous Nematodes (Rhabditida: Steinernematidae, Heterorhabditidae). *Journal of Economic Entomology* 81, 821–825. doi:10.1093/jee/81.3.821
- Escudí, F., Auer, L., Bernard, M., Mariadassou, M., Cauquil, L., Vidal, K., Maman, S., Hernandez-Raquet, G., Combes, S., Pascal, G., 2018. FROGS: Find, Rapidly, OTUs with Galaxy Solution. *Bioinformatics* 34, 1287–1294.
- Evans, E.W., Soares, A.O., Yasuda, H., 2011. Invasions by ladybugs, ladybirds, and other predatory beetles. *BioControl* 56, 597–611. doi:10.1007/s10526-011-9374-6
- Fan, X., Hominick, W.M., 1991. Efficiency of the *Galleria* (wax moth) baiting technique for recovering infective stages of entomopathogenic rhabditids (Steinernematidae and Heterorhabditidae) from sand and soil. *Revue Nématol* 14, 381–387.
- Ferris, H., Bongers, T., de Goede, R.G.M., 2001. A framework for soil food web diagnostics: extension of the nematode faunal analysis concept. *Applied Soil Ecology* 18, 13–29. doi:10.1016/S0929-1393(01)00152-4
- Filgueiras, C.C., Kim, Y., Wickings, K.G., EL-Borai, F., Duncan, L.W., Willett, D.S., 2022. The Smart Soil Organism Detector: An instrument and machine learning pipeline for soil species identification. *Biosensors and Bioelectronics* 221, 1–9. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bios.2022.114417>
- Fischer, R.A., 2015. Definitions and determination of crop yield, yield gaps, and of rates of change. *Field Crops Research* 182, 9–18. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.fcr.2014.12.006>
- Fondon, C.L., Gonzalez, J.B., Fernandez, M.P., Remelli, S., Lozano-Parra, J., Menta, C., 2020. Effects of Livestock Pressure and Vegetation Cover on the Spatial and Temporal Structure of Soil Microarthropod Communities in Iberian Rangelands. *Forests* 11, 1–21. doi:10.3390/f11060628
- Friedman, J., Hastie, T., Tibshirani, R., 2010. Regularization Paths for Generalized Linear Models via Coordinate Descent. *Journal of Statistical Software* 33, 1–22.

- Fuxa, J.R., Richter, A.R., Agudelo-Silva, F., 1988. Effect of Host Age and Nematode Strain on Susceptibility of *Spodoptera frugiperda* to *Steinernema feltiae*. *Journal of Nematology* 20, 91–95.
- Garland, S., Baker, A., Phillott, A.D., Skerratt, L.F., 2010. BSA reduces inhibition in a TaqMan® assay for the detection of *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Diseases of Aquatic Organisms* 92, 113–116.
- Gaugler, R. (Ed.), 2002. *Entomopathogenic nematology*. CABI Pub, New York.
- Geisert, R.W., Huynh, M.P., Pereira, A.E., Ilan, D.I.S., Hibbard, B.E., 2023. An improved bioassay for the testing of entomopathogenic nematode virulence to the western corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera*) (Coleoptera: Chrysomelidae): with focus on neonate insect assessments. *Journal of Economic Entomology* 116, 726–732. doi:<https://doi.org/10.1093/jee/toad052>
- Georgis, R., Gaugler, R., 1991. Predictability in Biological Control Using Entomopathogenic Nematodes. *Journal of Economic Entomology* 84, 713–720. doi:10.1093/jee/84.3.713
- Ghosal, S., Pattnaik, I.P., Mallick, B., Naik, B.P., 2023. Genetically Modified Organisms (GMO), Agriculture and Biosafety, in: *Advances in Agricultural Extension*. Elite Publishing House, New Delhi, pp. 105–112.
- Gongalsky, K.B., 2021. Soil macrofauna: Study problems and perspectives. *Soil Biology and Biochemistry* 159, 1–11. doi:<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2021.108281>
- Goodrich-Blair, H., 2007. They've got a ticket to ride: *Xenorhabdus nematophila*–*Steinernema carpocapsae* symbiosis. *Current Opinion in Microbiology* 10, 225–230. doi:10.1016/j.mib.2007.05.006
- Goodrich-Blair, H., Clarke, D.J., 2007. Mutualism and pathogenesis in *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*: two roads to the same destination. *Molecular Microbiology* 64, 260–268. doi:10.1111/j.1365-2958.2007.05671.x
- Grace, M.A., Achick, T.-F.E., Bonghan, B.E., Bih, M.E., Ngo, N.V., Ajeck, M.J., Prudence, G.T.B., Ntungwen, F.C., 2019. An Overview of the Impact of Climate Change on Pathogens, Pest of Crops on Sustainable Food Biosecurity. *International Journal of Ecotoxicology and Ecobiology* 4, 114–124. doi:10.11648/j.ijee.20190404.15
- Griffin, C.T., 2012. Perspectives on the Behavior of Entomopathogenic Nematodes from Dispersal to Reproduction: Traits Contributing to Nematode Fitness and Biocontrol Efficacy. *Journal of Nematology* 44, 177–184.

- Griffin, C.T., Dix, I., Joyce, S.A., Burnell, A.M., Downes, M.J., 1999. Isolation and characterisation of *Heterorhabditis* spp. (Nematoda: Heterorhabditidae) from Hungary, Estonia and Denmark. *Nematology* 1, 321–332.
- Guide, B.A., Andaló, V., Ferreira, D.G., Alves, V.S., Fernandes, T.A.P., Neves, P.M.O.J., 2022. First report and biological characteristics of *Heterorhabditis amazonensis* in the state of Paraná, Brazil. *Brazilian Journal of Biology* 84, e262374. doi:10.1590/1519-6984.262374
- Gutiérrez-Aguirre, I., Racki, N., Dreo, T., Ravnikar, M., 2015. Droplet Digital PCR for Absolute Quantification of Pathogens, in: *Plant Pathology: Techniques and Protocols, Methods in Molecular Biology*. Springer Science+Business Media, New York.
- Hajek, A.E., Hurley, B.P., Kenis, M., Garnas, J.R., Bush, S.J., Wingfield, M.J., van Lenteren, J.C., Cock, M.J.W., 2016. Exotic biological control agents: A solution or contribution to arthropod invasions? *Biological Invasions* 18, 953–969. doi:10.1007/s10530-016-1075-8
- Hartley, C.J., Lillis, P.E., Owens, R.A., Griffin, C.T., 2019. Infective juveniles of entomopathogenic nematodes (*Steinernema* and *Heterorhabditis*) secrete ascarosides and respond to interspecific dispersal signals. *Journal of Invertebrate Pathology* 168, 107257. doi:10.1016/j.jip.2019.107257
- Hartman, L.J., Coyne, S.R., Norwood, D.A., 2005. Development of a novel internal positive control for Taqman based assays. *Molecular and Cellular Probes* 19, 51–59. doi:10.1016/j.mcp.2004.07.006
- Hartung, F., Schiemann, J., 2014. Precise plant breeding using new genome editing techniques: opportunities, safety and regulation in the EU. *The Plant Journal* 78, 742–752. doi:10.1111/tpj.12413
- Hassaan, M.A., El Nemr, A., 2020. Pesticides pollution: Classifications, human health impact, extraction and treatment techniques. *Egyptian Journal of Aquatic Research* 46, 207–220. doi:https://doi.org/10.1016/j.ejar.2020.08.007
- Hassan, S., A., 1993. The mass rearing and utilization of *Trichogramma* to control lepidopterous pests: Achievements and outlook. *Pestic. Sci.* 37, 387–391.
- Hedde, M., Blight, O., Briones, M.J.I., Bonfanti, J., Brauman, A., Brondani, M., Galderon Sanou, I., Clause, J., Gonti, E., Cortet, J., Decaëns, T., Erktan, A., Gérard, S., Goulpeau, A., Iannelli, M., Joimel-Boulanger, S., Jouquet, P., Le Guillarme, N., Marsden, C., Martinez Almoyna, C., Mulder, C., Perrin, W., Pétilion, J., Pey, B., Potapov, A., M., Si-moussi, S., Thuiller, W., Trap, J., Vergnes, A., Zaitsev, A., Capowiez, Y., 2022. A common framework for developing robust soil fauna classifications. *Geoderma* 426, 1–13. doi:https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2022.116073

- Helmberger, M.S., Thaler, J.S., Shields, E.J., Wickings, K.G., 2018. Entomopathogenic nematode performance against *Popillia japonica* (Coleoptera:Scarabaeidae) in school athletic turf\_ Effects of traffic and soil properties. *Biological Control* 126, 177–184. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.08.010>
- Heppert, J.K., Ransone, E.M., Grossman, A.S., Mauer, T.J., Goodrich-Blair, H., 2022. Nematodes as Models for Symbiosis, in: *Nematodes as Model Organisms*, CAB International. pp. 82–126.
- Hill, D.S., 1997. Pest Definitions, in: *The Economic Importance of Insects*. pp. 52–63.
- Hillebrand, H., 2004. On the Generality of the Latitudinal Diversity Gradient. *The American Naturalist* 163, 192–211.
- Hindson, B.J., Ness, K.D., Masquelier, D.A., Belgrader, P., Heredia, N.J., Makarewicz, A.J., Bright, I.J., Lucero, M.Y., Hiddessen, A.L., Legler, T.C., Kitano, T.K., Hodel, M.R., Petersen, J.F., Wyatt, P.W., Steenblock, E.R., Shah, P.H., Bousse, L.J., Troup, C.B., Mellen, J.C., Wittmann, D.K., Erndt, N.G., Cauley, T.H., Koehler, R.T., So, A.P., Dube, S., Rose, K.A., Montesclaros, L., Wang, S., Stumbo, D.P., Hodges, S.P., Romine, S., Milanovich, F.P., White, H.E., Regan, J.F., Karlin-Neumann, G.A., Hindson, C.M., Saxonov, S., Colston, B.W., 2011. High-Throughput Droplet Digital PCR System for Absolute Quantitation of DNA Copy Number. *Analytical Chemistry* 83, 8604–8610. doi:10.1021/ac202028g
- Hodson, A.K., Siegel, J.P., Lewis, E.E., 2012. Ecological influence of the entomopathogenic nematode, *Steinernema carpocapsae*, on pistachio orchard soil arthropods. *Pedobiologia* 55, 51–58. doi:10.1016/j.pedobi.2011.10.005
- Houghton, S.G., Iii, F.R.C., 2006. Real-time PCR: Overview and applications. *Surgery* 139, 1–5. doi:10.1016/j.surg.2005.02.010
- Isbell, F., Adler, P.R., Eisenhauer, N., Fornara, D., Kimmel, K., Kremen, C., Letourneau, D.K., Liebman, M., Polley, H.W., Quijas, S., Scherer-Lorenzen, M., 2017. Benefits of increasing plant diversity in sustainable agroecosystems. *Journal of Ecology* 105, 871–879. doi:10.1111/1365-2745.12789
- Ivezić, A., Trudić, B., Draškić, G., 2022. The usage of beneficial insects as a biological control measure in large-scale farming - a case study review on *Trichogramma* spp. *Acta Agricultura Slovenica* 118, 1–13. doi:10.14720/aas.2022.118.2.2402
- Izadi, M., Habashi, H., Waez-Mousavi, S.M., 2017. Variation in Soil Macro-Fauna Diversity in Seven Humus Orders of a Parrotio-Carpinetum Forest Association on Chromic Cambisols of Shast-Klatch Area in Iran. *Eurasian Soil Science* 50, 341–349. doi:10.1134/S106422931703005X

- Jaffuel, G., Blanco-Pérez, R., Büchi, L., Mäder, P., Fließbach, A., Charles, R., Degen, T., Turlings, T.C.J., Campos-Herrera, R., 2017. Effects of cover crops on the overwintering success of entomopathogenic nematodes and their antagonists. *Applied Soil Ecology* 114, 62–73. doi:10.1016/j.apsoil.2017.02.006
- Jaffuel, G., Blanco-Pérez, R., Hug, A.-S., Chiriboga, X., Meuli, R.G., Mascher, F., Turlings, T.C.J., Campos-Herrera, R., 2018. The evaluation of entomopathogenic nematode soil food web assemblages across Switzerland reveals major differences among agricultural, grassland and forest ecosystems. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 262, 48–57. doi:https://doi.org/10.1016/j.agee.2018.04.008
- Jaffuel, G., Mäder, P., Blanco-Perez, R., Chiriboga, X., Fliessbach, A., Turlings, T.C.J., Campos-Herrera, R., 2016. Prevalence and activity of entomopathogenic nematodes and their antagonists in soils that are subject to different agricultural practices. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 230, 329–340. doi:10.1016/j.agee.2016.06.009
- Janvier, C., Villeneuve, F., Alabouvette, C., Edel-Hermann, V., Mateille, T., Steinberg, C., 2007. Soil health through soil disease suppression: Which strategy from descriptors to indicators? *Soil Biology & Biochemistry* 39, 1–23. doi:10.1016/j.soilbio.2006.07.001
- Jayaraman, S., Naorem, A.K., Lal, R., Dalal, R.C., Sinha, N.K., Patra, A.K., Chaudhari, S.K., 2021. Disease-Suppressive Soils—Beyond Food Production: a Critical Review. *Journal of Science and Plant Nutrition* 21, 1437–1465. doi:https://doi.org/10.1007/s42729-021-00451-x
- Johansen, A., 1999. Depletion of soil mineral N by roots of *Cucumis sativus* L. colonized or not by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Soil* 209, 119–127.
- Kanga, F.N., Waeyenberge, L., Hauser, S., Moens, M., 2012. Distribution of entomopathogenic nematodes in Southern Cameroon. *Journal of Invertebrate Pathology* 109, 41–51. doi:10.1016/j.jip.2011.09.008
- Kapranas, A., Maher, A.M.D., Griffin, C.T., 2017. The influence of organic matter content and media compaction on the dispersal of entomopathogenic nematodes with different foraging strategies. *Parasitology* 144, 1956–1963. doi:10.1017/S0031182017001317
- Karagoz, M., Gulcu, B., Cakmak, I., Kaya, H.K., Hazir, S., 2007. Predation of entomopathogenic nematodes by *Sancassania* sp. (Acari: Acaridae). *Experimental and Applied Acarology* 43, 85–95. doi:10.1007/s10493-007-9105-y
- Karthikeyan, L., Chawla, I., Mishra, A.K., 2020. A review of remote sensing applications in agriculture for food security\_ Crop growth and yield, irrigation, and crop losses. *Journal of Hydrology* 586, 1–22. doi:https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2020.124905



- Kaya, H.K., Stock, P., 1997. Techniques in insect nematology, in: Manual of Techniques in Insect Pathology. Elsevier, pp. 281–324. doi:10.1016/B978-012432555-5/50016-6
- Kenney, E., Eleftherianos, I., 2016. Entomopathogenic and plant pathogenic nematodes as opposing forces in agriculture. *International Journal for Parasitology* 46, 13–19. doi:10.1016/j.ijpara.2015.09.005
- Kenney, E., Hawdon, J.M., O'Halloran, D.M., Eleftherianos, I., 2021. Secreted virulence factors from *Heterorhabditis bacteriophora* highlight its utility as a model parasite among Clade V nematodes. *International Journal for Parasitology* 51, 321–325. doi:https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2020.10.004
- Khan, Md.A., Ahmad, W. (Eds.), 2019. *Microbes for Sustainable Insect Pest Management: An Eco-friendly Approach - Volume 1, Sustainability in Plant and Crop Protection*. Springer International Publishing, Cham. doi:10.1007/978-3-030-23045-6
- Kim, I.-H., Aryal, S.K., Aghai, D.T., Casanova-Torres, A.M., Hillman, K., Kozuch, M.P., Mans, E.J., Mauer, T.J., Ogier, J.-C., Ensign, J.C., Gaudriault, S., Goodman, W.G., Goodrich-Blair, H., Dillman, A.R., 2017. The insect pathogenic bacterium *Xenorhabdus innexi* has attenuated virulence in multiple insect model hosts yet encodes a potent mosquitocidal toxin. *BMC Genomics* 18, 1–25.
- Kim, S.K., Flores-Lara, Y., Stock, S.P., 2012. Morphology and ultrastructure of the bacterial receptacle in *Steinernema* nematodes (Nematoda: Steinernematidae). *Journal of Invertebrate Pathology* 110, 366–374. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2012.04.011
- Kim, T.G., Jeong, S.-Y., Cho, K.-S., 2014. Comparison of droplet digital PCR and quantitative real-time PCR for examining population dynamics of bacteria in soil. *Applied Microbiology and Biotechnology* 98, 6105–6113. doi:10.1007/s00253-014-5794-4
- Kokkoris, V., Vukicevich, E., Richards, A., Thomsen, C., Hart, M.M., 2021. Challenges Using Droplet Digital PCR for Environmental Samples. *Applied Microbiology* 1, 74–88. doi:10.3390/applmicrobiol1010007
- Kondo, E., Ishibashi, N., 1986. Infectivity and Propagation of Entomogenous Nematodes, *Steinernema* spp., on the Common Cutworm, *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *Appl.Ent. Zool.* 21, 95–108.
- Koppenhöfer, A.M., Fuzy, E.M., 2003. Ecological characterization of *Steinernema scarabaei*, a scarab-adapted entomopathogenic nematode from New Jersey. *Journal of Invertebrate Pathology* 83, 139–148. doi:10.1016/S0022-2011(03)00056-9

- Kruitbos, L.M., Heritage, S., Hapca, S., Wilson, M.J., 2010. The influence of habitat quality on the foraging strategies of the entomopathogenic nematodes *Steinernema carpocapsae* and *Heterorhabditis megidis*. *Parasitology* 137, 303–309. doi:10.1017/S0031182009991326
- Kung, S.-P., Gaugler, R., Kaya, H.K., 1991. Effects of soil temperature, moisture, and relative humidity on entomopathogenic nematode persistence. *Journal of Invertebrate Pathology* 57, 242–249. doi:10.1016/0022-2011(91)90123-8
- Kung, S.-P., Gaugler, R., Kaya, H.K., 1990a. Influence of Soil pH and Oxygen on Persistence of *Steinernema* spp. *Journal of Nematology* 22, 440–445.
- Kung, S.-P., Gaugler, R., Kaya, H.K., 1990b. Soil type and entomopathogenic nematode persistence. *Journal of Invertebrate Pathology* 55, 401–406. doi:10.1016/0022-2011(90)90084-J
- Kurtz, B., Toepfer, S., Ehlers, R.-U., Kuhlmann, U., 2007. Assessment of establishment and persistence of entomopathogenic nematodes for biological control of western corn rootworm. *J. Appl. Entomol.* 131, 420–425. doi:10.1111/j.1439-0418.2007.01202.x
- Labaude, S., Griffin, C., 2018. Transmission Success of Entomopathogenic Nematodes Used in Pest Control. *Insects* 9, 72. doi:10.3390/insects9020072
- Lacey, L.A., Georgis, R., 2012. Entomopathogenic Nematodes for Control of Insect Pests Above and Below Ground with Comments on Commercial Production. *Journal of Nematology* 44, 218–225.
- Lacey, L.A., Grzywacz, D., Shapiro-Ilan, D.I., Frutos, R., Brownbridge, M., Goettel, M.S., 2015. Insect pathogens as biological control agents: Back to the future. *Journal of Invertebrate Pathology* 132, 1–41. doi:10.1016/j.jip.2015.07.009
- Lamichhane, J.R., Bischoff-Schaefer, M., Bluemel, S., Dachbrodt-Saaydeh, S., Dreux, L., Jansen, J.-P., Kiss, J., Köhl, J., Kudsk, P., Malausa, T., Messéan, A., Nicot, P.C., Ricci, P., Thibierge, J., Villeneuve, F., 2016. Identifying obstacles and ranking common biological control research priorities for Europe to manage most economically important pests in arable, vegetable and perennial crops. *Pest Manag Sci* 73, 14–21. doi:10.1002/ps.4423
- Lawrence, J.L., Hoy, C.W., Grewal, P.S., 2006. Spatial and temporal distribution of endemic entomopathogenic nematodes in a heterogeneous vegetable production landscape. *Biological Control* 37, 247–255. doi:10.1016/j.biocontrol.2006.02.002
- Lazarova, S., Coyne, D., G. Rodríguez, M.G., Peteira, B., Ciancio, A., 2021. Functional Diversity of Soil Nematodes in Relation to the Impact of Agriculture—A Review. *Diversity* 13, 64–86. doi:10.3390/d13020064

- Lemtiri, A., Colinet, G., Alabi, T., Cluzeau, D., Zirbes, L., Haubruge, É., Francis, F., 2014. Impacts of earthworms on soil components and dynamics. A review. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 18, 121–133.
- Lenteren, J.C., Bolckmans, K., Köhl, J., Ravensberg, W., Urbaneja, A., 2018. Biological control using invertebrates and microorganisms: plenty of new opportunities. *BioControl* 63, 39–59. doi:<https://doi.org/10.1007/s10526-017-9801-4>
- Lephoto, T.E., Gray, V.M., 2019. *Oscheius basothovii* n. sp. (Nematoda: Rhabditidae), a new entomopathogenic nematode isolated from an uncultivated grassland in South Africa. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 52, 125–140. doi:10.1080/03235408.2019.1588193
- Leppanen, C., Frank, D.M., Simberloff, D., 2018. Circumventing regulatory safeguards: *Laricobius* spp. and biocontrol of the hemlock woolly adelgid. *Insect Conservation and Diversity* 12, 89–97. doi:10.1111/icad.12336
- Letourneau, D.K., Armbrrecht, I., Rivera, B.S., Lerma, J.M., Rrez, C.G., Rangel, J.H., Rivera, L., Saavedra, C.A., Torres, A.M., Trujillo, A.R., 2011. Does plant diversity benefit agroecosystems? A synthetic review. *Ecological Applications* 21.
- Lissy, A.-S., 2019. Thèse : Imagerie quantitative non invasive et expérimentation pour l'intégration des phénomènes d'écoulement non uniforme dans les modèles de transfert de masse en milieux poreux hétérogènes: Application aux sols structurés (Sciences agricoles). Université d'Avignon.
- Liu, L., 2021. Nematode communities indicate anthropogenic alterations to soil dynamics across diverse grasslands. *Ecological Indicators* 132, 1–10. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2021.108338>
- Liu, T., Wang, Z., Guan, H., Zhong, B., He, X., Wang, Y., Qi, Y., Yan, W., Lu, X., 2023. Soil Macrofauna Disperse and Reconstruct Soil Nematode Communities: Takeaways from a Microcosm Study. *Forests* 14, 1–11. doi:<https://doi.org/10.3390/f14040748>
- Lu, D., Baiocchi, T., Dillman, A.R., 2016. Genomics of Entomopathogenic Nematodes and Implications for Pest Control. *Trends in Parasitology* 32, 588–598.
- Lu, D., Sepulveda, C., Dillman, A.R., 2017. Infective Juveniles of the Entomopathogenic Nematode *Steinernema scapterisci* Are Preferentially Activated by Cricket Tissue. *PLOS ONE* 12, 1–14. doi:10.1371/journal.pone.0169410
- Lu, Q., Liu, T., Wang, N., Dou, Z., Wang, K., Zuo, Y., 2020. A review of soil nematodes as biological indicators for the assessment of soil health. *Front. Agr. Sci. Eng.* 7, 275–281. doi:<https://doi.org/10.15302/J-FASE-2020327>

Lysenko, O., Weiser, J., 1974. Bacteria associated with nematode *Neoplectana carpocapsae* and the pathogenicity of this complex for *Galleria mellonella* larvae. *Journal of Invertebrate Pathology* 24, 332–336.

Machado, R.A.R., Wüthrich, D., Kuhnert, P., Arce, C.C.M., Thönen, L., Ruiz, C., Zhang, X., Robert, C.A.M., Karimi, J., Kamali, S., Ma, J., 2018. Whole-genome-based revisit of *Photorhabdus* phylogeny: proposal for the elevation of most *Photorhabdus* subspecies to the species level and description of one novel species *Photorhabdus bodei* sp. nov., and one novel subspecies *Photorhabdus laumondii* subsp. clarkei subsp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 68, 2664–2681.

Mahé, F., Rognes, T., Quince, C., de Vargas, C., Dunthorn, M., 2014. Swarm: robust and fast clustering method for amplicon-based studies. *PeerJ* 2, 1–13. doi:10.7717/peerj.593

Maher, A.M.D., Asaiyah, M., Quinn, S., Burke, R., Wolff, H., Bode, H., B., Griffin, C.T., 2021. Competition and Co-existence of Two *Photorhabdus* Symbionts with a Nematode Host. *Microbial Ecology* 81, 223–239. doi:https://doi.org/10.1007/s00248-020-01573-y

Marais, M., Swart, A., Fourie, H., Berry, S.D., Knoetze, R., Malan, A.P., 2017. Techniques and Procedures, in: Fourie, H., Spaull, V.W., Jones, R.K., Daneel, M.S., De Waele, D. (Eds.), *Nematology in South Africa: A View from the 21st Century*. Springer International Publishing, Cham, pp. 73–117. doi:10.1007/978-3-319-44210-5\_4

Martin, T., Wade, J., Singh, P., Sprunger, C.D., 2022. The integration of nematode communities into the soil biological health framework by factor analysis. *Ecological Indicators* 136, 108676. doi:10.1016/j.ecolind.2022.108676

Massol, F., Macke, E., Callens, M., Decaestecker, E., 2019. A methodological framework to analyse determinants of host–microbiota networks, with an application to the relationships between *Daphnia magna*'s gut microbiota and bacterioplankton. *Animal Social Networks* 90, 102–119.

Matuska-Łyżwa, J., Duda, S., Nowak, D., Kaca, W., 2024. Impact of Abiotic and Biotic Environmental Conditions on the Development and Infectivity of Entomopathogenic Nematodes in Agricultural Soils. *Insects* 15, 1–28. doi:https://doi.org/10.3390/insects15060421

McMurdie, P.J., Holmes, S., 2013. phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLOS ONE* 8, 1–11. doi:doi:10.1371/journal.pone.0061217

Miduturi, J.S., Moens, M., Hominick, W.M., Briscoe, B.R., Reid, A.P., 1996. Naturally occurring entomopathogenic nematodes in the province of West-Flanders, Belgium. *Journal of Helminthology* 70, 319–327.

- Miduturi, J.S., Waeyenberge, L., Moens, M., 1997. Natural distribution of entomopathogenic nematodes (Heterorhabditidae and Steinernematidae) in Belgian soils. *Russian Journal of Nematology* 5, 55–65.
- Min, Y.Y., Toyota, K., Sato, E., 2012. A novel nematode diagnostic method using the direct quantification of major plant-parasitic nematodes in soil by real-time PCR. *Nematology* 14, 265–276. doi:10.1163/156854111X601678
- Miranda, V.A., Navarro, P.D., Davidowitz, G., Bronstein, J., Stock, S.P., 2013. Effect of insect host age and diet on the fitness of the entomopathogenic nematode-bacteria mutualism. *Symbiosis* 61, 145–143. doi:10.1007/s13199-013-0266-7
- Molyneux, A.S., 1986. *Heterorhabditis* spp. and *Steinernema* (= *Neoplectana*) spp.: Temperature, and aspects of behavior and infectivity. *Experimental Parasitology* 62, 169–180. doi:10.1016/0014-4894(86)90021-4
- Morton, A., Garcia-del-Pino, F., 2017. Laboratory and field evaluation of entomopathogenic nematodes for control of *Agriotes obscurus* (L.) (Coleoptera: Elateridae). *Journal of Applied Entomology* 141, 241–246. doi:10.1111/jen.12343
- Morton, A., García-del-Pino, F., 2009. Ecological characterization of entomopathogenic nematodes isolated in stone fruit orchard soils of Mediterranean areas. *Journal of Invertebrate Pathology* 102, 203–213. doi:10.1016/j.jip.2009.08.002
- Mráček, Z., Bečvář, S., 2000. Insect aggregations and entomopathogenic nematode occurrence. *Nematology* 2, 297–301.
- Mráček, Z., Bečvář, S., Kindlmann, P., Jersáková, J., 2005. Habitat preference for entomopathogenic nematodes, their insect hosts and new faunistic records for the Czech Republic. *Biological Control* 34, 27–37. doi:10.1016/j.biocontrol.2005.03.023
- Mucci, N.C., Jones, K.A., Cao, M., Wyatt, M.R., Foye, S., Kauffman, S.J., Richards, G.R., Taufer, M., Chikaraishi, Y., Steffan, S.A., Campagna, S.R., Goodrich-Blair, H., 2022. Apex Predator Nematodes and Meso-Predator Bacteria Consume Their Basal Insect Prey through Discrete Stages of Chemical Transformations. *American Society for Microbiology* 7, 1–24.
- Mueller, D.S., Wise, K.A., Sisson, A.J., Allen, T.W., Bergstrom, G.C., Bissonnette, K.M., Bradley, C.A., Byamukama, E., Chilvers, M.I., Collins, A.A., Esker, P.D., Faske, T.R., Friskop, A.J., Hagan, A.K., Heiniger, R.W., Hollier, C.A., Isakeit, T., Jackson-Ziems, T.A., Jardine, D.J., Kelly, H.M., Kleczewski, N.M., Koehler, A.M., Koenning, S.R., Malvick, D.K., Mehl, H.L., Meyer, R.F., Paul, P.A., Peltier, A.J., Price, P.P., Robertson,

- A.E., Roth, G.W., Sikora, E.J., Smith, D.L., Tande, C.A., Telenko, D.E.P., Tenuta, A.U., Thiessen, L.D., Wiebold, W.J., 2020. Corn Yield Loss Estimates Due to Diseases in the United States and Ontario, Canada, from 2016 to 2019. *Plant Health Progress* 21, 238–247.
- Mulder, C., Schouten, A.J., Hund-Rinke, K., Breure, A.M., 2005. The use of nematodes in ecological soil classification and assessment concepts. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 62, 278-289. doi: 10.1016/j.ecoenv.2005.03.028
- Murfin, K.E., Ginete, D.R., Bashey, F., Goodrich-Blair, H., 2019. Symbiont-mediated competition: *Xenorhabdus bovienii* confer an advantage to their nematode host *Steinernema affine* by killing competitor *Steinernema feltiae*. *Environmental Microbiology* 21, 3229–3243. doi:10.1111/1462-2920.14278
- Naranjo, S.E., Ellsworth, P.C., Frisvold, G.B., 2015. Economic Value of Biological Control in Integrated Pest Management of Managed Plant Systems. *Annual Review of Entomology* 60, 621–645. doi:10.1146/annurev-ento-010814-021005
- Neher, D.A., 2001. Role of Nematodes in Soil Health and Their Use as Indicators. *Journal of Nematology* 33, 161–168.
- Nguyen, K.B., Smart, G.C., 1991. Pathogenicity of *Steinernema scapterisci* to Selected Invertebrates. *Journal of Nematology* 23, 7–11.
- Nielsen-LeRoux, C., Gaudriault, S., Ramarao, N., Lereclus, D., Givaudan, A., 2012. How the insect pathogen bacteria *Bacillus thuringiensis* and *Xenorhabdus/Photorhabdus* occupy their hosts. *Current Opinion in Microbiology* 15, 220–231. doi: 10.1016/j.mib.2012.04.006
- Nouh, G.M., 2021. Efficacy of the entomopathogenic nematode isolates against *Spodoptera littoralis* (Boisduval) and *Agrotis ipsilon* (Hufnagel) (Lepidoptera: Noctuidae). *Egyptian Journal of Biological Pest Control* 31, 1–5. doi:https://doi.org/10.1186/s41938-021-00374-w
- Oerke, E.-C., 2006. Crop losses to pests. *Journal of Agricultural Science* 144, 31–43. doi:10.1017/S0021859605005708
- Ogier, J.-C., Akhurst, R., Boemare, N., Gaudriault, S., 2023. The endosymbiont and the second bacterial circle of entomopathogenic nematodes. *Trends in Microbiology* 31, 629–643. doi:https://doi.org/10.1016/j.tim.2023.01.004
- Ogier, J.-C., Pagès, S., Frayssinet, M., Gaudriault, S., 2020. Entomopathogenic nematode-associated microbiota: from monoxenic paradigm to pathobiome. *Microbiome* 8, 25. doi:10.1186/s40168-020-00800-5

- Ogier, J.-C., Pagès, S., Galan, M., Barret, M., Gaudriault, S., 2019. *rpoB*, a promising marker for analyzing the diversity of bacterial communities by amplicon sequencing. *BMC Microbiology* 19, 171. doi:10.1186/s12866-019-1546-z
- Öğretmen, A., Ebubekir, Y., Canhilal, R., 2020. Susceptibility of larvae of wireworms (*Agriotes* spp.) (Coleoptera:Elateridae) to some Turkish isolates of entomopathogenic nematodes under laboratory and field conditions. *Biological Control* 149, 1–6.
- Oota, M., Tsai, A.Y.-L., Aoki, D., Matsushita, Y., Toyoda, S., Fukushima, K., Saeki, K., Toda, K., Perfus-Barbeoch, L., Favery, B., Ishikawa, H., Sawa, S., 2020. Identification of Naturally Occurring Polyamines as Root-Knot Nematode Attractants. *Molecular Plant* 13, 658–665. doi:10.1016/j.molp.2019.12.010
- Özdemir, E., 2020. Compatibility of entomopathogenic nematodes with pesticides registered in vegetable crops under laboratory conditions. *Journal of Plant Diseases and Protection* 127, 4, 529-535. doi:10.1007/s41348-020-00337-7
- Pagès, S., Ginibre, N., 2006. Evaluation de la virulence de bactéries entomopathogènes. *Les Cahiers Techniques de l'INRA* 57, 11–19.
- Parker, S.S., 2010. Buried treasure: soil biodiversity and conservation. *Biodivers Conserv* 19, 3743–3756. doi:10.1007/s10531-010-9924-8
- Pessis, C., 2020. Histoire des « sols vivants ». *Revue d'anthropologie des connaissances* 14, 1–22. doi:10.4000/rac.12437
- Peters, A., 2016. Formulation of Nematodes, in: Glare, T.R., Moran-Diez, M.E. (Eds.), *Microbial-Based Biopesticides, Methods in Molecular Biology*. Springer New York, New York, NY, pp. 121–135. doi:10.1007/978-1-4939-6367-6\_10
- Peters, A., 1996. The Natural Host Range of *Steinernema* and *Heterorhabditis* spp. and Their Impact on Insect Populations. *Biocontrol Science and Technology* 6, 389–402.
- Pilz, C., Toepfer, S., Knuth, P., Strimitzer, T., Heimbach, U., Grabenweger, G., 2014. Persistence of the entomoparasitic nematode *Heterorhabditis bacteriophora* in maize fields. *J. Appl. Entomol* 138, 202-212. doi:10.1111/j.1439-0418.2012.01743.x
- Poitout, S., Bues, R., Rumeur, C.L., 1972. Élevage sur milieu artificiel simple de deux noctuelles parasites du coton *Earias insulana* et *Spodoptera littoralis*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 15, 341–350. doi:10.1111/j.1570-7458.1972.tb00219.x

- Pressecq, T., Nicot, P.C., Bourgeay, J.F., Rousselin, A., Goillon, C., Bardin, M., Tchamitchian, M., 2024. Using microbial biocontrol for disease control in French vegetable production: An analysis of the perspectives of farmers and farm advisors. *Crop Protection* 180, 1–11. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cropro.2024.106648>
- Puissant, J., Villenave, C., Chauvin, C., Plassard, C., Blanchart, E., Trap, J., 2021. Quantification of the global impact of agricultural practices on soil nematodes: A meta-analysis. *Soil Biology and Biochemistry* 161, 108383, 1-13. doi:10.1016/j.soilbio.2021.108383
- Půža, V., Mráček, Z., 2009. 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* 102, 40–43. doi:10.1016/j.jip.2009.06.005
- Pyšek, P., Hulme, P.E., Nentwig, W., 2009. Glossary of the Main Technical Terms Used in the Handbook, *Invading Nature-Springer Series in Invasion Ecology* 3. ed, DAISIE, Handbook of Alien Species in Europe. Springer Netherlands.
- Qiu, J.J., Westerdahl, B.B., Anderson, C., Williamson, V.M., 2006. Sensitive PCR Detection of *Meloidogyne arenaria*, *M. incognita*, and *M. javanica* Extracted from Soil. *Journal of Nematology* 38, 434–441.
- Rahman, S.A.S.A., Mohamed, Z., Othman, R.Y., Swennen, R., Panis, B., De Waele, D., Remy, S., Carpentier, S.C., 2010. In planta PCR-based detection of early infection of plant-parasitic nematodes in the roots : a step towards the understanding of infection and plant defence. *Eur J Plant Pathol* 128, 343–351. doi:10.1007/s10658-010-9656-3
- Raja, R.K., Arun, A., Touray, M., Hazal Gulsen, S., Cimen, H., Gulcu, B., Hazir, C., Aiswarya, D., Ulug, D., Cakmak, I., Kaya, H.K., Hazir, S., 2021. Antagonists and defense mechanisms of entomopathogenic nematodes and their mutualistic bacteria. *Biological Control* 152, 1–11. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104452>
- Rasmann, S., Köllner, T.G., Degenhardt, J., Hiltbold, I., Toepfer, S., Kuhlmann, U., Gershenson, J., Turlings, T.C.J., 2005. Recruitment of entomopathogenic nematodes by insect-damaged maize roots. *Nature* 434, 732–737. doi:10.1038/nature03451
- Ravigné, V., Becker, N., Massol, F., Guichoux, E., Boury, C., Mahé, F., Facon, B., 2022. Fruit fly phylogeny imprints bacterial gut microbiota. *Evolutionary Applications* 15, 1621–1638. doi:10.1111/eva.13352



- Raza, A., Razzaq, A., Mehmood, S.S., Zou, X., Zhang, X., Lv, Y., Xu, J., 2019. Impact of Climate Change on Crops Adaptation and Strategies to Tackle Its Outcome: A Review. *Plants* 8, 1–29. doi:10.3390/plants8020034
- Razinger, J., Vasileiadis, V.P., Giraud, M., van Dijk, W., Modic, Š., Sattin, M., Urek, G., 2015. On-farm evaluation of inundative biological control of *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera:Crambidae) by *Trichogramma brassicae* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) in three European maize-producing regions. *Pest Manag Sci* 72, 246–254. doi:10.1002/ps.4054
- Regnault-Roger, C., 2012. Plant Defence: Biological Control, J.M. Mérillon and K.G. Ramawat. ed, *Progress in Biological Control* 12. Springer Science+Business Media B.V.
- Riutta, T., Slade, E.M., Bebber, D.P., Taylor, M.E., Malhi, Y., Riordan, P., Macdonald, D.W., Morecroft, M.D., 2012. Experimental evidence for the interacting effects of forest edge, moisture and soil macrofauna on leaf litter decomposition. *Soil Biology & Biochemistry* 49, 124–131. doi:10.1016/j.soilbio.2012.02.028
- Rivera-Ferre, M.G., 2018. The resignification process of Agroecology: Competing narratives from governments, civil society and intergovernmental organizations. *Agroecology and Sustainable Food Systems* 42, 666–685. doi:10.1080/21683565.2018.1437498
- Robin, D.C., Marchand, P.A., 2020. Macroorganismes de biocontrôle en France, état des lieux. *Innovations Agronomiques* 79, 425–439.
- Robin, D.C., Marchand, P.A., 2018. Evolution of the biocontrol active substances in the framework of the European Pesticide Regulation (EC) No. 1107/2009. *Pest Manag Sci* 75, 950–958. doi:10.1002/ps.5199
- Rognes, T., Flouri, T., Nichols, B., Quince, C., Mahé, F., 2016. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ* 4, 1–22. doi:10.7717/peerj.2584
- Rolston, A., Meade, C., Boyle, S., Kakouli-Duarte, T., Downes, M., 2009. Intraspecific variation among isolates of the entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae* from Bull Island, Ireland. *Nematology* 11, 439–451. doi:10.1163/156854109X447015
- Römbke, J., Jänsch, S., Didden, W., 2005. The use of earthworms in ecological soil classification and assessment concepts. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 62, 249–265. doi:10.1016/j.ecoenv.2005.03.027

- Rose, D.C., Sutherland, W.J., Parker, C., Lobley, M., Winter, M., Morris, C., Twining, S., Ffoulkes, C., Amano, T., Dicks, L.V., 2016. Decision support tools for agriculture: Towards effective design and delivery. *Agricultural Systems* 149, 165–174. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.agsy.2016.09.009>
- Ruf, A., Beck, L., Dreher, P., Hund-Rinke, K., Römbke, J., Spelda, J., 2003. A biological classification concept for the assessment of soil quality: “biological soil classification scheme” (BBSK). *Agriculture, Ecosystems & Environment* 98, 263–271. doi:[10.1016/S0167-8809\(03\)00086-0](https://doi.org/10.1016/S0167-8809(03)00086-0)
- Ruiu, L., Marche, M.G., Mura, M.E., Tarasco, E., 2022. Involvement of a novel *Pseudomonas protegens* strain associated with entomopathogenic nematode infective juveniles in insect pathogenesis. *Pest Manag Sci* 78, 5437–5443. doi:[10.1002/ps.7166](https://doi.org/10.1002/ps.7166)
- Rupnik, R., Kukar, M., Vracar, P., Kosir, D., Pevec, D., Bosnic, Z., 2019. AgroDSS: A decision support system for agriculture and farming. *Computers and Electronics in Agriculture* 161, 260–271. doi:<https://doi.org/10.1016/j.compag.2018.04.001>
- Sagova-Mareckova, M., Omelka, M., Kopecky, J., 2022. The Golden Goal of Soil Management: Disease-Suppressive Soils. *Phytopathology* 113, 741–752. doi:<https://doi.org/10.1094/PHYTO-09-22-0324-KD>
- Salvadori, J.D.M., Defferrani, M.S., Ligabue-Braun, R., Yamazaki Lau, E., Salvadori, J.R., Carlini, C.R., 2012. Characterization of entomopathogenic nematodes and symbiotic bacteria active against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and contribution of bacterial urease to the insecticidal effect. *Biological Control* 63, 253–263. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2012.08.002>
- San-Blas, E., Gowen, S.R., Pembroke, B., 2008. *Steinernema feltiae*: Ammonia triggers the emergence of their infective juveniles. *Experimental Parasitology* 119, 180–185. doi:[10.1016/j.exppara.2008.01.008](https://doi.org/10.1016/j.exppara.2008.01.008)
- Savary, S., Willocquet, L., Pethybridge, S.J., Esker, P., McRoberts, N., Nelson, A., 2019. The global burden of pathogens and pests on major food crops. *Nature Ecology & Evolution* 3, 430–439. doi:<https://doi.org/10.1038/s41559-018-0793-y>
- Schlatter, D., Kinkel, L., Thomashow, L., Weller, D., Paulitz, T., 2017. Disease Suppressive Soils: New Insights from the Soil Microbiome. *Phytopathology* 107, 1284–1297. doi:[10.1094/PHYTO-03-17-0111-RVW](https://doi.org/10.1094/PHYTO-03-17-0111-RVW)
- Secretariat of the Convention on Biological Diversity (Ed.), 2000. Cartagena protocol on biosafety to the Convention on Biological Diversity: text and annexes. Secretariat of the Convention on Biological Diversity, Montreal.

- Serepa-Dlamini, M.H., Gray, V.M., 2018. A new species of entomopathogenic nematode *Oscheius safricana* n. sp. (Nematoda: Rhabditidae) from South Africa. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 51, 309–321. doi:10.1080/03235408.2018.1475281
- Shan, S., Wang, W., Wang, M., Sun, B., Li, Y., Fu, Y., Gu, X., Ruan, W., Rasmann, S., 2019. The symbiotic bacteria *Alcaligenes faecalis* of the entomopathogenic nematodes *Oscheius* spp. exhibit potential biocontrol of plant and entomopathogenic fungi. *Microbial Biotechnology* 12, 459–471. doi:10.1111/1751-7915.13365
- Shao, H., Zhang, P., Peng, D., Huang, W., Kong, L., Li, C., Liu, E., Peng, H., 2023. Current advances in the identification of plant nematode diseases: From lab assays to in-field diagnostics. *Frontiers in Plant Science* 14, 1106784. doi:10.3389/fpls.2023.1106784
- Shapiro-Ilan, D., Dolinski, C., 2015. Entomopathogenic Nematode Application Technology, in: Campos-Herrera, R. (Ed.), *Nematode Pathogenesis of Insects and Other Pests*. Springer International Publishing, Cham, pp. 231–254. doi:10.1007/978-3-319-18266-7\_9
- Shapiro-Ilan, D.I., Han, R., Qiu, X., 2014. Production of Entomopathogenic Nematodes, in: *Mass Production of Beneficial Organisms*. Elsevier, pp. 321–355. doi:10.1016/B978-0-12-391453-8.00010-8
- Shapiro-Ilan, D.I., Morales-Ramos, J.A., Rojas, M.G., 2016. In Vivo Production of Entomopathogenic Nematodes, in: Glare, T.R., Moran-Diez, M.E. (Eds.), *Microbial-Based Biopesticides, Methods in Molecular Biology*. Springer New York, New York, NY, pp. 137–158. doi:10.1007/978-1-4939-6367-6\_11
- Shields, M.W., Johnson, A.C., Pandey, S., Cullen, R., González-Chang, M., Wratten, S.D., Gurr, G.M., 2019. History, current situation and challenges for conservation biological control. *Biological Control* 131, 25–35. doi:10.1016/j.biocontrol.2018.12.010
- Shurtleff, M., Averre, C., 1997. *Glossary of Plant-Pathological Terms*. MN: Am. Phytopathol. Soc. Press, Saint Paul.
- Sicard, M., Le Brun, N., Pages, S., Godelle, B., Boemare, N., Moulia, C., 2003. Effect of native *Xenorhabdus* on the fitness of their *Steinernema* hosts: contrasting types of interaction. *Parasitology Research* 91, 520–524. doi:10.1007/s00436-003-0998-z
- Sicard, M., Raimond, M., Prats, O., Lafitte, A., Braquart-Varnier, C., 2008. Pathogenic effect of entomopathogenic nematode–bacterium complexes on terrestrial isopods. *Journal of Invertebrate Pathology* 99, 20–27. doi:10.1016/j.jip.2008.02.001

- Siegel-Hertz, K., Edel-Hermann, V., Chapelle, E., Terrat, S., Raaijmakers, J.M., Steinberg, C., 2018. Comparative Microbiome Analysis of a Fusarium Wilt Suppressive Soil and a Fusarium Wilt Conducive Soil From the Châteaurenard Region. *Frontiers in Microbiology* 9, 1–16. doi:10.3389/fmicb.2018.00568
- Sivčev, I., Kljajić, P., Kostić, M., Sivčev, L., Stanković, S., 2012. Management of Western Corn Rootworm. *Pestic. Phytomed.* 27, 189–201. doi:10.2298/PIF1203189S
- Slingo, J.M., Challinor, A.J., Hoskins, B.J., Wheeler, T.R., 2005. Introduction: food crops in a changing climate. *Philosophical Transactions of the Royal Society* 360, 1983–1989. doi:10.1098/rstb.2005.1755
- Snyder, W.E., 2019. Give predators a complement: Conserving natural enemy biodiversity to improve biocontrol. *Biological Control* 135, 73–82. doi:https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.04.017
- Sobhy, H.M., Abdel-Bary, N.A., Harras, F.A., Faragalla, F.H., Hussein, H.I., 2020. Efficacy of entomopathogenic nematodes against *Spodoptera littoralis* (Boisd.) and *Agrotis ipsilon* (H.) (Lepidoptera: Noctuidae). *Egyptian Journal of Biological Pest Control* 30, 1–8. doi:https://doi.org/10.1186/s41938-020-00265-6
- Stenberg, J.A., Becher, P.G., Jonsson, M., Karlsson, M., Sundh, I., Viketoft, M., 2023. Political deafness may impede transition to biological control. *Trends in Plant Science* 28, 498–500.
- Stenberg, J.A., Sundh, I., Becher, P.G., Björkman, C., Dubey, M., Egan, P.A., Friberg, H., Gil, J.F., Jensen, D.F., Jonsson, M., Karlsson, M., Khalil, S., Ninkovic, V., Rehmann, G., Vetukuri, R.R., Viketoft, M., 2021. When is it biological control? A framework of definitions, mechanisms, and classifications. *Journal of Pest Science* 94, 665–676. doi:10.1007/s10340-021-01354-7
- Stewart, A., 2001. Commercial biocontrol—reality or fantasy? *Australasian Plant Pathology* 30, 127–131. doi:10.1071/AP01011
- Stock, S.P., Pryor, B.M., Kaya, H.K., 1999. Distribution of entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) in natural habitats in California, USA. *Biodiversity and Conservation* 8, 534–549.
- Sturhan, D., Mráček, Z., 2000. Comparison of the *Galleria* baiting technique and a direct extraction method for recovering *Steinernema* (Nematoda: Rhabditida) infective-stage juveniles from soil. *Folia Parasitologica* 47, 315–318. doi:10.14411/fp.2000.055
- Susurluk, A., 2006. Effectiveness of the Entomopathogenic Nematodes *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema feltiae* against *Tenebrio molitor* (Yellow Mealworm) Larvae in Different Soil Types at Different Temperatures. *Turk J Biol* 30, 199–205.

- Tabarant, P., Villenave, C., Risede, J.-M., Roger-Estrade, J., Thuries, L., Dorel, M., 2011. Effects of four organic amendments on banana parasitic nematodes and soil nematode communities. *Applied Soil Ecology* 49, 59–67. doi:10.1016/j.apsoil.2011.07.001
- Tandzi Ngoune, L., Mutengwa, S.S., 2020. Factors Affecting Yield of Crops, in: *Agronomy - Climate Change & Food Security*, Agronomy. IntechOpen, p. 108.
- Tarasco, E., Clausi, M., Rappazzo, G., Panzavolta, T., Curto, G., Sorino, R., Oreste, M., Longo, A., Leone, D., Tiberi, R., Vinciguerra, M.T., Triggiani, O., 2015. Biodiversity of entomopathogenic nematodes in Italy. *Journal of Helminthology* 89, 359–366. doi:10.1017/S0022149X14000194
- Taylor, A.R., Pflug, A., Schröter, D., Wolters, V., 2010. Impact of microarthropod biomass on the composition of the soil fauna community and ecosystem processes. *European Journal of Soil Biology* 46, 80–86. doi:10.1016/j.ejsobi.2009.11.003
- Therneau, T.M., Grambsch, P.M., 2000. *Modeling Survival Data: Extending the Cox Model*, K. Dietz, M. Gail, K. Krickeberg, J. Samet, A. Tsiatis. ed, *Statistics for Biology and Health*. Springer.
- Therneau, T.M., Lumley, T., Atkinson, E., Crowson, C., 2024. *survival: Survival Analysis*. CRAN.
- Thévenot, J., 2013. *Synthèse et réflexions sur des définitions relatives aux invasions biologiques*. (Rapport SPN MNHN No. SPN 2013/15). Paris.
- Timper, P., Kaya, H.K., Jaffee, B.A., 1991. Survival of Entomogenous Nematodes in Soil Infested with the Nematode-Parasitic Fungus *Hirsutella rhossiliensis* (Deuteromycotina: Hyphomycetes). *Biological Control* 4, 42–50.
- Toepfer, S., Gueldenzoph, C., Ehlers, R.-U., Kuhlmann, U., 2005. Screening of entomopathogenic nematodes for virulence against the invasive western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera* (Coleoptera: Chrysomelidae) in Europe. *Bulletin of Entomological Research* 95, 473–482. doi:10.1079/BER2005379
- Toepfer, S., Peters, A., Ehlers, R.-U., Kuhlmann, U., 2008. Comparative assessment of the efficacy of entomopathogenic nematode species at reducing western corn rootworm larvae and root damage in maize. *Journal of Applied Entomology* 132, 337–348. doi:10.1111/j.1439-0418.2008.01274.x
- Torr, P., Spiridonov, S.E., Heritage, S., Wilson, M., 2007. Habitat associations of two entomopathogenic nematodes: a quantitative study using real-time quantitative polymerase chain reactions. *Journal of Animal Ecology* 76, 238–245.

Traugott, M., Benefer, C.M., Blackshaw, R.P., van Herk, W.G., Vernon, R.S., 2015. Biology, Ecology, and Control of Elaterid Beetles in Agricultural Land. *Annu. Rev. Entomol.* 60, 313–334. doi:10.1146/annurev-ento-010814-021035

Trejo-Meléndez, V.J., Ibarra-Rendón, J., Gontreras-Garduño, J., 2024. The evolution of entomopathogeny in nematodes. *Ecology and Evolution* 14, 1–17. doi:https://doi.org/10.1002/ece3.10966

Tu, C., Lu, Q., Zhang, Y., Tian, J., Gao, Y., Liu, Y., Yang, H., Chen, L., Zhang, J., Wang, J., Xiao, J., 2022. The soil nematode community indicates the soil ecological restoration of the *Pinus massoniana* plantation gap replanted with *Cinnamomum longipaniculatum*. *Ecological Indicators* 136, 1–9. doi:https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2022.108678

Ulug, D., Hazir, S., Kaya, H.K., Lewis, E., 2014. Natural enemies of natural enemies: the potential top-down impact of predators on entomopathogenic nematode populations: Top-down impact of predators on EPNs. *Ecological Entomology* 39, 462–469. doi:10.1111/een.12121

Van den Hoogen, J., Geisen, S., Routh, D., Ferris, H., Traunspurger, W., Wardle, D.A., de Goede, R.G.M., Adams, B.J., Ahmad, W., Andriuzzi, W.S., Bardgett, R.D., Bonkowski, M., Campos-Herrera, R., Cares, J.E., Caruso, T., de Brito Caixeta, L., Chen, X., Costa, S.R., Creamer, R., Mauro da Cunha Castro, J., Dam, M., Djigal, D., Escuer, M., Griffiths, B.S., Gutiérrez, C., Hohberg, K., Kalinkina, D., Kardol, P., Kergunteuil, A., Korthals, G., Krashevskaya, V., Kudrin, A.A., Li, Q., Liang, W., Magilton, M., Marais, M., Martín, J.A.R., Matveeva, E., Mayad, E.H., Mulder, C., Mullin, P., Neilson, R., Nguyen, T.A.D., Nielsen, U.N., Okada, H., Rius, J.E.P., Pan, K., Peneva, V., Pellissier, L., Carlos Pereira da Silva, J., Pitteloud, C., Powers, T.O., Powers, K., Quist, C.W., Rasmann, S., Moreno, S.S., Scheu, S., Setälä, H., Sushchuk, A., Tiunov, A.V., Trap, J., van der Putten, W., Vestergård, M., Villenave, C., Waeyenberge, L., Wall, D.H., Wilschut, R., Wright, D.G., Yang, J., Crowther, T.W., 2019. Soil nematode abundance and functional group composition at a global scale. *Nature* 572, 194–198. doi:10.1038/s41586-019-1418-6

Veres, A., Petit, S., Conord, C., Lavigne, C., 2013. Does landscape composition affect pest abundance and their control by natural enemies? A review. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 166, 110–117. doi:10.1016/j.agee.2011.05.027

Verhoef, H.A., 1996. The Role of Soil Microcosms in the Study of Ecosystem Processes. *Ecology* 77, 685–690.

Vigneux, F., Zumbihl, R., Jubelin, G., Ribeiro, C., Poncet, J., Baghdiguian, S., Givaudan, A., Brehélin, M., 2007. The *xaxAB* Genes Encoding a New Apoptotic Toxin from the Insect Pathogen *Xenorhabdus*

*nematophila* Are Present in Plant and Human Pathogens. *The Journal of Biological Chemistry* 282, 9571–9580. doi:10.1074/jbc.M604301200

Vrscaj, B., Poggio, L., Ajmone Marsan, F., 2008. A method for soil environmental quality evaluation for management and planning in urban areas. *Landscape and Urban Planning* 88, 81–94. doi:10.1016/j.landurbplan.2008.08.005

Wang, H., Qi, J., Xiao, D., Wang, Z., Tian, K., 2017. A re-evaluation of dilution for eliminating PCR inhibition in soil DNA samples. *Soil Biology & Biochemistry* 106, 109–118. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.12.011

Wang, J., Vanga, S.K., Saxena, R., Orsat, V., Raghavan, V., 2018. Effect of Climate Change on the Yield of Cereal Crops: A Review. *Climate* 6, 1–19. doi:10.3390/cli6020041

Wang, Y.-F., Chen, P., Wang, F.-H., Han, W.-X., Qiao, M., Dong, W.-X., Hu, C.-S., Zhu, D., Chu, H.-Y., Zhu, Y.-G., 2022. The ecological clusters of soil organisms drive the ecosystem multifunctionality under long-term fertilization. *Environment International* 161, 1–10. doi:https://doi.org/10.1016/j.envint.2022.107133

Weber, M.M., Stevens, R.D., Diniz-Filho, J.A.F., Grelle, C.E.V., 2017. Is there a correlation between abundance and environmental suitability derived from ecological niche modelling? A meta-analysis. *Ecography* 40, 817–828. doi:0.1111/ecog.02125

Wei, T., Simko, V., 2024. R package “corrplot”: Visualization of a Correlation Matrix.

Weller, D.M., Raaijmakers, J.M., Gardener, B.B.M., Thomashow, L.S., 2002. Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 40, 309–348. doi:10.1146/annurev.phyto.40.030402.110010

Westphal, A., 2005. Detection and Description of Soils with Specific Nematode Suppressiveness. *Journal of Nematology* 37, 121–130.

Wezel, A., Goette, J., Lagneaux, E., Passuello, G., Reisman, E., Rodier, C., Turpin, G., 2018. Agroecology in Europe: Research, Education, Collective Action Networks, and Alternative Food Systems. *Sustainability* 10, 1–18. doi:10.3390/su10041214

White, G.F., 1927. A method for obtaining infective nematode larvae from cultures. *Science* 66, 302–303. doi:10.1126/science.66.1709.302-a

WHO position statement, 2011. The use of DDT in malaria vector control, Global Malaria Programme. World Health Organization, Genève.

- Yağci, M., Yücel, C., Erdorgus, F.D., Benk, G., Kepenekci, I., 2022. Biological control potential of local entomopathogenic nematodes against the different stage larvae of cotton leafworm. *Egyptian Journal of Biological Pest Control* 32, 1–8. doi:<https://doi.org/10.1186/s41938-022-00558-y>
- Yeates, G.W., 2003. Nematodes as soil indicators: functional and biodiversity aspects. *Biol Fertil Soils* 37, 199–210. doi:[10.1007/s00374-003-0586-5](https://doi.org/10.1007/s00374-003-0586-5)
- Zamberletti, P., Sabir, K., Opitz, T., Bonnefon, O., Gabriel, E., Papaix, J., 2021. More pests but less pesticide applications: Ambivalent effect of landscape complexity on conservation biological control. *PLOS COMPUTATIONAL BIOLOGY* 17, 1–16. doi:<https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1009559>
- Zervos, S., Johnson, S.C., Webster, J.M., 1991. Effect of temperature and inoculum size on reproduction and development of *Heterorhabditis heliothidis* and *Steinernema glaseri* (Nematoda: Rhabditoidea) in *Galleria mellonella*. *Canadian Journal of Zoology* 69, 1261–1264. doi:[10.1139/z91-177](https://doi.org/10.1139/z91-177)
- Zhang, K., Baiocchi, T., Lu, D., Chang, D.Z., Dillman, A.R., 2019. Differentiating between scavengers and entomopathogenic nematodes: Which is *Oscheius chongmingensis*? *Journal of Invertebrate Pathology* 167, 107245. doi:[10.1016/j.jip.2019.107245](https://doi.org/10.1016/j.jip.2019.107245)
- Zhang, Q., Men, X., Hui, C., Ge, F., Ouyang, F., 2022. Wheat yield losses from pests and pathogens in China. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 326, 1–7. doi:<https://doi.org/10.1016/j.agee.2021.107821>
- Zhang, X., Guan, P., Wang, Y., Li, Q., Zhang, S., Zhang, Z., Bezemer, T.M., Liang, W., 2015. Community composition, diversity and metabolic footprints of soil nematodes in differently-aged temperate forests. *Soil Biology & Biochemistry* 80, 118–126. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2014.10.003>
- Zhang, X., Li, L., Kesner, L., Robert, C.A.M., 2021. Chemical host-seeking cues of entomopathogenic nematodes. *Current Opinion in Insect Science* 44, 72–81. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cois.2021.03.011>
- Zhang, X., Machado, R.A., Doan, C.V., Arce, C.C., Hu, L., Robert, C.A., 2019. Entomopathogenic nematodes increase predation success by inducing cadaver volatiles that attract healthy herbivores. *ELife* 8, e46668. doi:[10.7554/eLife.46668](https://doi.org/10.7554/eLife.46668)
- Zhou, J., Chen, D., Huang, R., Huang, G., Yuan, Y., Fan, H., 2019. Effects of bacterial-feeding nematodes on soil microbial activity and the microbial community in oil-contaminated soil. *Journal of Environmental Management* 234, 424–430. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.01.021>



Zhu, X., Wang, R., Shi, W., Yu, Q., Li, X., Chen, X., 2023. Automatic Detection and Classification of Dead Nematode-Infested Pine Wood in Stages Based on YOLO v4 and GoogleNet. *Forests* 14, 1–19. doi:<https://doi.org/10.3390/f14030601>

**Annexe 1 : Procédure des cycles suivis pour les étapes d'amplification selon les espèces de NEPs ciblées.** Les couples d'amorces utilisées en PCR quantitative Scarpo Campos, Sfelt Campos et Hba Campos ciblant *Steinernema carpocapsae*, *Steinernema feltiae* et *Heterorhabditis bacteriophora* respectivement ont été publiés dans Campos-Herrera *et al.*, 2011. Les couples d'amorces Scarp jc, Sfelt jc et Hba2 jc ciblant *Steinernema carpocapsae*, *Steinernema feltiae* et *Heterorhabditis bacteriophora* respectivement utilisées en ddPCR ont été dessinées par Jean Claude Ogier et ne sont pas publiés.

Etapes des cycles	Nombre de cycles	<i>S. carpocapsae</i>	<i>S. feltiae</i>	<i>H. bacteriophora</i>
PCR quantitative				
Activation de l'enzyme	1	95°C, 10 min	95°C, 10 min	95°C, 10 min
Dénaturation	30	95°C, 30s	95°C, 30s	95°C, 30s
Hybridation		60°C, 1 min	60°C, 1 min	59°C, 1 min
Digital droplet PCR				
Activation de l'enzyme	1	95°C, 5 min	95°C, 5 min	95°C, 5 min
Dénaturation	40	95°C, 30 s	95°C, 30 s	95°C, 30 s
Hybridation		60°C, 45 s	59,4°C, 45 s	52°C, 45 s
Extension		72°C, 15 s	72°C, 15 s	72°C, 15 s
Signal de stabilisation	1	4°C, 5 min	4°C, 5 min	4°C, 5 min
	1	90°C, 15 min	90°C, 15 min	90°C, 15 min