

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE 8 MAI 1945 GUELMA  
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET SCIENCES DE LA TERRE ET DE  
L'UNIVERS  
DEPARTEMENT D'ECOLOGIE ET GENIE DE L'ENVIRONNEMENT



## Mémoire de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie  
Filière : Science Agronomique  
Spécialité/Option : Phytopathologie et Phytopharmacie

### Thème

---

Potentiel de quelque biopesticide sur le criquet pèlerin  
*Schistocerca gregaria*(Forskâl, 1775)

---

#### Présenté par :

M<sup>lle</sup> : BOUCHARMA Hala

#### Devant le jury :

- Président : M<sup>me</sup> OUACHTATL N (M.A)
- Examineur : M<sup>me</sup> HEMISSI (M.A)
- Promoteur : M<sup>r</sup> MAHDJOUBI. D (M.A)
- Co-promoteur : M<sup>r</sup> SI MOHAMED. A (M.A)

Juin 2013

## Remerciement

*Nous tenons avant tout à remercier Dieu tout puissant de nous avoir donné la force et la volonté pour achever ce modeste travail.*

*Nous tenons à remercier particulièrement nos parents ; notre succès demeure de loin le fruit de Leurs longues années de sacrifices et d'éducation.*

*Nos remerciements vont également à notre encadreur monsieur Mahdjoubi Djilleli qui nous ont toujours accueilli à bras ouverts et à tout moment, de nous avoir assisté le long de la réalisation du travail, qu'il trouve ici nos sincères gratitudes et nos profondes reconnaissances pour tous les efforts qui ont déployé dans ce sujet, ainsi que de leur compréhension et de leur patience.*

*Nous remercions également tous les enseignants qui siègent à ce Jury, pour la critique qu'ils feront de notre travail, madame Ouachtati N qui nous a fait l'honneur de présider ce jury.*

*Madame Messied R de nous avoir enseigné et honorer le jury.*

*Monsieur Si mohamed A qui nous a fait l'honneur de bien vouloir juger ce travail.*

*Enfin, nous voulons souligner les contributions efficaces de tous nos Proches et Amis qui à des titres divers, nous ont aidés et soutenus, et toute notre promotion phytopathologie.*

## *Dédicace*

*Je dédie ce travail à mes chères parents ;*

*A mon mari ;*

*A Mes frères et ma sœur ;*

*A toute la famille ;*

*A tous mes amis.....*

*HALA*

## Sommaire

Liste des figures.....	i
Liste des tableaux.....	ii
Liste des abréviations.....	iii
Introduction.....	1

### Chapitre I : Etude bibliographique

#### Le criquet pèlerin

1. Données bibliographiques sur le criquet pèlerin <i>Schistocerca gregaria</i> .....	3
1.1 Généralité .....	3
1.2 Position systématique .....	3
1.3 Morphologie .....	4
1.3.1 L'œuf .....	4
1.3.2 Les larves .....	4
1.3.3 Imagos et Adultes .....	5
1.4 Cycle biologique .....	6
1.4.1 Développement embryonnaire .....	6
1.4.2 Développement larvaire .....	7
1.4.3 Développement imaginal .....	8
1.5 Le polymorphisme phasaire du Criquet pèlerin.....	9
1.6 Lutte antiacridienne .....	12
1.6.1 Lutte préventive .....	12
1.6.2 Lutte curative .....	12

1.6.3 Principaux moyens de lutte .....	12
1.6.3.1 Moyens chimiques .....	12
1.6.3.2 Moyens biologiques .....	13
<b>Les biopesticides</b>	
1 Aspects généraux .....	15
2 Le marché des biopesticides .....	15
3 Avantages des biopesticides .....	16
4 Désavantages .....	17
5 Utilisation de Bt et de ses dérivés en tant que biopesticide .....	17
6 La bactérie <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	20
6.1 Classification .....	20
6.2 Cycle de vie de <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	22
6.4 Les spores .....	23
6.4.1 Structure et composition de la spore .....	23
6.4.2 La Sporulation .....	23
6.4.3 Entomotoxicité de la spore .....	25
6.5 La formation des cristaux protéiques .....	26
6.6 Les toxines de <i>Bt</i> .....	26
6.6.1 Les delta-endotoxines du Bt et leur mode d'action .....	27

## **CHAPITRE II : Matériels et méthodes**

1 Objectif de l'étude .....	29
-----------------------------	----

2 Matériel de travail.....	29
2.1. Matériel non biologique.....	29
2.2 Matériel biologique.....	29
2.2.1. Les criquets.....	29
2.2.1.1 Elevage des criquets.....	29
2.2.2. Les souris blanches de laboratoire.....	30
2.2.3 Les biopesticides testés.....	31
2.2.3,1 La bactérie entomopathogène.....	31
2.3 Principe de choix des doses.....	32
2.4 Schéma descriptif des calculs de doses utilisées de <i>Bt</i> .....	32
2.5 Multiplication de la bactérie.....	32
2.5.1 préparation de la solution mère.....	32
2.5.2 Préparation d'inoculum.....	32
2.6 Etude de la mortalité des L5.....	33
2.6.1 Calcul du pourcentage de mortalité.....	34
2.7 Essai de la persistance et la phytotoxicité de <i>Bacillus thuringiensis</i> sur le feuillage de blé.....	35
2.7.1 La culture de blé.....	35
2.7.2. Pulvérisation de feuillage par <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	36
2.7.3. Prélèvement des feuilles et préparation des solutions.....	37
2.8 Etude de la toxicité de <i>Bacillus thuringiensis</i> sur les souris blanches de laboratoire.....	38
2.8.1 Conditions d'élevage.....	38
2.8.2 Répartition des lots.....	38
2.8.3 Prise de poids des individus de souris d'élevage.....	38
2.8.4 Technique de traitement.....	39

2.8.5 Injection intra- péritonéale.....	39
2.8.6 Paramètre �tudi�s.....	40

### **Chapitre III : Résultats et discussion**

1 Evaluation de la mortalité des larves L5 de <i>S.gregaria</i> sous différentes doses de <i>B. thuringiensis</i> .....	41
2 �tude de la phytotoxicité de <i>Bacillus thuringiensis</i> sur feuillage de blé .....	44
3 �tude de la persistance de <i>Bacillus thuringiensis</i> sur feuillage de blé.....	45
4 Etude de la toxicité de <i>Bacillus thuringiensis</i> sur les souris blanches de laboratoire .....	46
4.1 Taux de mortalité .....	46
4.2 L'évolution pondérale .....	47
4.2.1 Analyse de la variance .....	48
4.2.2. Analyse des coupes histologiques .....	50
Conclusion.....	51

#### **Références bibliographiques**

#### **Annexe**

#### **Résumé**

## Liste des figures

N°=de figure	Titre	N°=de page
1	<i>Schistocerca gregaria</i> mâle	5
2	<i>Schistocerca gregaria</i> femelle	6
3	Cycle biologique de <i>Schistocerca gregaria</i>	9
4	Les étapes de la transformation phasaire	11
5	La bactérie <i>Bt</i>	21
6	Image de <i>Bacillus thuringiensis</i> en microscopie en contraste de phase	21
7	Cycle biologique de <i>Bacillus thuringiensis</i>	22
8	Schéma de la sporulation et de la production des CPI de <i>Bt</i>	24
9	La formation des cristaux protéique	26
10	Cages utilisées pour l'élevage des larves des locustes	30
11	<i>Bacillus thuringiensis</i> sous forme de poudre sèche de spores cultivé au laboratoire	31
12	<i>Bt</i> sous forme de poudre sèche	31
13	Suspension huileuse de spores de <i>Bt</i>	31
14	Les différentes étapes de la préparation de la solution mère	33
15	Récupération des larves L1 L2 à partir des pondoirs pour le transfert aux cages d'élevage	34
16	Dispositif pour le traitement des individus de L5 par les différentes doses des deux bio-pesticides	34
17	plateau à alvéole contient les plants de blé.	35
18	pulvérisation des feuilles par <i>Bacillus thuringiensis</i>	36
19	répartition des plateaux en lots	36
20	Libération des spores de la bactérie par agitation	37
21	Cage d'élevage des souris blanches	38
22	Traitement par injection intrapéritonéale	49
23	Les étapes d'extraction de foie.	40

24	Le nombre des différents plants infectés par les différentes doses de <i>Bt</i> .	42
25	plants altérés suite à l'application de <i>Bacillus thuringiensis</i> présentant les symptômes précités	43
26	Présence des spores de <i>Bacillus thuringiensis</i> au 3 <sup>ème</sup> jour	44
27	Présence des spores de <i>Bacillus thuringiensis</i> au 6 <sup>ème</sup> jour	45
28	Présence des spores de <i>Bacillus thuringiensis</i> au 9 <sup>ème</sup> jour	45
29	Différence de poids entre avant traitement et après	48
30	Des coupes histologiques au niveau des foies des souris	50

Produced with Scan

## Liste des tableaux

N <sup>o</sup> de tableau	Titre	N <sup>o</sup> de page
1	Modifications liées à la transformation phasaire chez <i>S.gregaria</i>	11
2	Moyenne des mortalités cumulées journalières en % des larves L5 de schistoserca gragara(Forskal) témoins et traités au <i>Bacillus thuringiensis</i> .	41
3	Nombre de plants infectés par <i>Bacillus thuringiensis</i>	42
4	Présence ou absence des colonies de <i>Bacillus thuringiensis</i> sur le feuillage.	44
5	L'évolution pondérale des souris traitées et témoins avec les différentes doses.	47
6	Analyse de la variance	49

## Liste des abréviations

- ANOVA : analyse de la variance
- BT* : *bacillus thuringiensis*
- Bta* : *bacillus thuringiensis aizawai*
- Bti* : *bacillus thuringiensis Irsaelensis*
- Btk* : *bacillus thuringiensis Kurstaki*
- Btt* : *bacillus thuringiensis Tenebrionis*
- Cm : centimètre
- Cry : protéine cristale
- Cpi : cristaux protéique insecticide
- Cyt : protéine cytolytique
- DAP : pyridine-2 : acide 6 dicarboxylique ou acide dipicolinique
- EPA : environmental protection agency
- H : heure
- ml : millilitre
- mn : minute
- PH : potentiel hydrogène
- Ssp : sous espèce
- T/mn : tour par minute
- UV : ultra-violet
- Var : variété
- µm : micromètre
- % : pourcent
- °C : degré Celsius

# Introduction

Produced with ScantOPDF

Le Criquet pèlerin est l'un des ravageurs les plus redoutables à l'échelle planétaire, un véritable fléau. Des chroniques médiévales certifient que ses ravages ont continué de façon ininterrompue, sous forme de crises successives. Que ce soit en lutte préventive ou en lutte curative, le recours aux moyens de lutttes chimiques (pesticides) a toujours permis le contrôle de ce fléau acridien. Cependant les conséquences sur l'environnement et la faune auxiliaire induits par l'utilisation des pesticides chimiques ne sont plus à démontrer. Ainsi, pour minimiser les répercussions sur l'environnement, de nouvelles orientations ont été considérées et intéressent l'utilisation des entomopathogènes comme moyen de lutte biologique. (In Djeddar, 2007).

L'utilisation des biopesticides à base d'entomopathogènes a révélé des résultats encourageants, comme cela a été démontré pour le *Metarhizium anisopliae* (Metch) lors des essais en laboratoire (Greathed et al., 1994 ; Sieglaff et al., 1998, Halouane, 1997) et en plein champs, cas de la wilaya d'El Oued au Nord-Est de l'Algérie (Kooyman, 2005). D'autres travaux ont été menés sur le plan national et international ; Jenkins et Thomas (1996), Bissaad (1998), Bensaad (1999), Arthur et Thomas (2000 ; 2001), Haddadj (2001), Kaidi (2004), Hemour (2005) et Outtar (2006). Parallèlement, peu d'informations sont fournies concernant l'impact de ces biopesticides sur l'environnement, pour pouvoir les qualifier de pesticides écologiques.

Les inquiétudes croissantes du public à l'égard des effets potentiellement néfastes de l'utilisation massive d'insecticides chimiques pour l'environnement ont amené la communauté scientifique à chercher des solutions de rechange à la lutte chimique. Parmi les solutions qui ont été proposées, l'utilisation de microorganismes entomopathogènes comme le *Bacillus thuringiensis* (Bt) apparaît comme particulièrement prometteuse.

Un des facteurs qui limite l'introduction de nombreux microorganismes entomopathogènes prometteurs sur le terrain est notre relative méconnaissance de l'écologie, du devenir et des effets de ces organismes dans l'environnement. Avant d'envisager un lâcher dans l'environnement, il est essentiel de choisir un mode d'application approprié et de bien connaître la persistance du microorganisme sélectionné dans l'environnement, son potentiel reproductif (multiplication), la rapidité avec laquelle ses gènes peuvent être transférés aux organismes indigènes, son potentiel de dispersion hors des sites d'application (dissémination) et ses effets sur l'équilibre et le fonctionnement des écosystèmes exposés (sécurité, avantages et dommages) (Trevors et al., 1987). (In Hemour, 2005).

Trois cent quatre-vingt-treize Spécimens de *B. thuringiensis* prélevés au sol ou sur des Criquets et quatre-vingt-treize Autres Bactéries sporulantes ont été testées sur *Locusta migratoria* et/ou *Schistocerca gregaria*, sans obtenir aucune réaction pathogène. (In Hemour, 2005).

A l'heure actuelle beaucoup de résultats scientifiques ont fait l'objet d'une analyse du pouvoir entomopathogène des différentes souches de *B. thuringiensis* abondantes dans le sol et, en particulier, présentes dans les régions arides et semi-arides. Toutefois, jusqu'à présent, aucune souche affectant les criquets se trouve, même si beaucoup de ces nouveaux isolats a montré une activité supérieure contre d'autres insectes ravageurs, les préparations commerciales de *B. thuringiensis* restent peu disponibles sur le marché des bio-pesticides.

Dans le cadre d'une nouvelle stratégie de bio-contrôle qui met en œuvre la valorisation et l'extension des programmes lutte biologique des études d'origine naturelle sont engagées pour déceler le potentiel des agents entomopathogènes microbiens du criquet pèlerin et leur développement à une biopréparation. Au cours des deux dernières années, des organismes internationaux ont mis l'accent sur les thèmes suivants:

1. Rechercher de nouvelles souches d'entomopathogènes connues ou nouvelles maladies
2. Recherche sur *B. thuringiensis* avec un accent particulier sur les souches pathogènes pour le criquet pèlerin
3. La recherche sur les champignons entomopathogènes pour la lutte antiacridienne, principalement sur *Metarhizium anisopliae* et *Sorospora* spp.

Notre approche de lutte biologique a mis l'accent sur deux questions importantes

- Evaluation des agents entomopathogènes à savoir *Bacillus thuringiensis*, pathogènes pour le criquet pèlerin.

- Analyse des incidences environnementales de l'insecticide microbien *Bacillus thuringiensis*, en mettant en cause son impact sur quelques espèces de la Biocénose anthropisée cas des régions céréalières du sud algérien.

# chapitre I

## Etude Bibliographique

Produced by ScanTopDF

## 1. Données bibliographiques sur le criquet pèlerin *Schistocerca gregaria* (Forskål, 1775) :

### 1.1 Généralité :

Le Criquet Pèlerin appartient à la catégorie des acridiens, de type locuste présentant un phénomène de polymorphisme phasaire. C'est à dire la possibilité de développer des aspects variés et réversibles selon la densité des populations. Schématiquement, on parle de phase solitaire pour les populations de faible densité et, de phase grégaire pour les populations de forte densité. Il existe des formes intermédiaires dites transiens: des transiens congregans dans le cas de passage de la phase solitaire vers la phase grégaire, un passage qui demande en général plusieurs générations (4 générations successives au minimum); et de transiens degrégans dans le cas d'un passage de la phase grégaire vers la phase solitaire. Ce passage est plus rapide et s'effectue souvent en l'espace d'une ou deux générations (Duranton et Teroq, 1990).

### 1.2 Position systématique :

D'après Grasse (1970), la position systématique du Criquet pèlerin est comme suit:

<b>Embranchement :</b>	Arthropodes
<b>Sous Embranchement :</b>	Mandibulates
<b>Classe :</b>	Insectes
<b>Sous classe :</b>	Ptérygotes
<b>Super ordre :</b>	Orthoptéroïdes
<b>Ordre :</b>	Orthoptères
<b>Sous ordre :</b>	Caelifères
<b>Super famille :</b>	Acridoidea
<b>Famille :</b>	Acrididae
<b>Sous famille :</b>	Cyrtacanthacridinae
<b>Genre :</b>	Schistocerca
<b>Espèce :</b>	<i>S.gregaria</i> (Forskål, 1775).

*S. gregaria* présente deux sous espèces: l'une est la plus connue, et plus répartie à travers le monde, est *S. gregaria gregaria* (Forskål, 1775), son nom commun est le Criquet pèlerin ou Criquet du désert; et l'autre est *S. gregaria flaviventris* (Burmeister, 1838), modestement répartie en Afrique du Sud-ouest (In, kemassi 2007).

### 1.3 Morphologie :

Morphologiquement *Schistocerca gregaria* (Forsk., 1775), présente des caractères différenciant les individus solitaires des grégaires :

#### 1.3.1 L'oeuf :

L'oeuf est de couleur jaune claire à brunâtre et se présente sous une forme allongée légèrement incurvée dont la longueur est comprise entre 7 et 8 mm (Duranton et Lecoq, 1990), le nombre est de 60 à 80 chez les grégaires ; 110 à 140 chez les solitaires (Launois-Luong et Popov, 1992).

Les œufs sont pondus groupés dans le sol sous forme d'oothèque surmontée par un bouchon de matière spumeuse (Popov et al, 1991).

Chez les solitaires, la forme et la taille des oothèques ressemble à celle des grégaires mais leurs œufs sont en plus petit et en plus grand nombre (Launois-Luong et Popov, 1992).

Une oothèque de solitaire peut contenir 110 à 140 œufs contre seulement 40 à 85 œufs chez les grégaires. Les oothèques des transiens ont un aspect et un nombre d'œufs intermédiaires, (Popov et al, 1990).

#### 1.3.2 Les larves :

Les larves de la phase solitaire et de la phase grégaire se distinguent par leurs couleurs très diversifiées. La plupart des larves en phase solitaire ont une pigmentation uniforme, verte au cours des premiers stades, pouvant devenir brune en fin de développement (Duranton et Lecoq, 1990).

##### -Larves solitaires :

Teinte assez uniformément verte au cours des premiers stades, pouvant devenir brune en fin de développement (deux derniers stades), sans macules pigmentaires noirs. (Duranton et Lecoq 1990).

##### -Larves grégaires:

Livrée sombre, à base de taches noires (maclature) sur fond jaune ou orangé. Les deux premiers stades sont essentiellement noirs. Le troisième présente un mélange de rouge ou d'orange et de noir.

Les quatrième et cinquième stades comportent un mélange de jaune et de noir. Les stades 3 à 5 possèdent une tache occipitale rouge. (Duranton et Lecoq, 1990).

**-Larves transiens :**

Les larves de phase transiens possèdent une teinte générale identique à celle des grégaires mais le développement de la maculature est plus ou moins accentué. (Duranton et Lecoq, 1990).

**1.3.3 Imagos et Adultes :**

Le Criquet pèlerin est un acridien de grande taille. En phase grégaire les femelles mesurent de 5 à 6 cm de long, les mâles de 4,5 à 5 cm. Les individus solitaires sont plus grands que les individus grégaires ; les femelles mesurent de 6 à 9 cm de long, les mâles de 4,5 à 6 cm (Launois-Luong et Popov, 1992).

Cet acridien présente des antennes filiformes, un pronotum concave latéralement chez les grégaires et convexe chez les solitaires avec une longueur des ailes et des élytres dépassant nettement l'extrémité abdominale. La coloration du Criquet pèlerin est très variable ; elle dépend de l'état phasaire et de la maturation sexuelle. Chez les solitaires, la teinte générale est à dominance jaune sable, brune ou grise. Chez les grégaires immatures, la couleur est rose plus ou moins foncée et les imagos matures sont de couleur jaune ( In kemassi 2007 ),

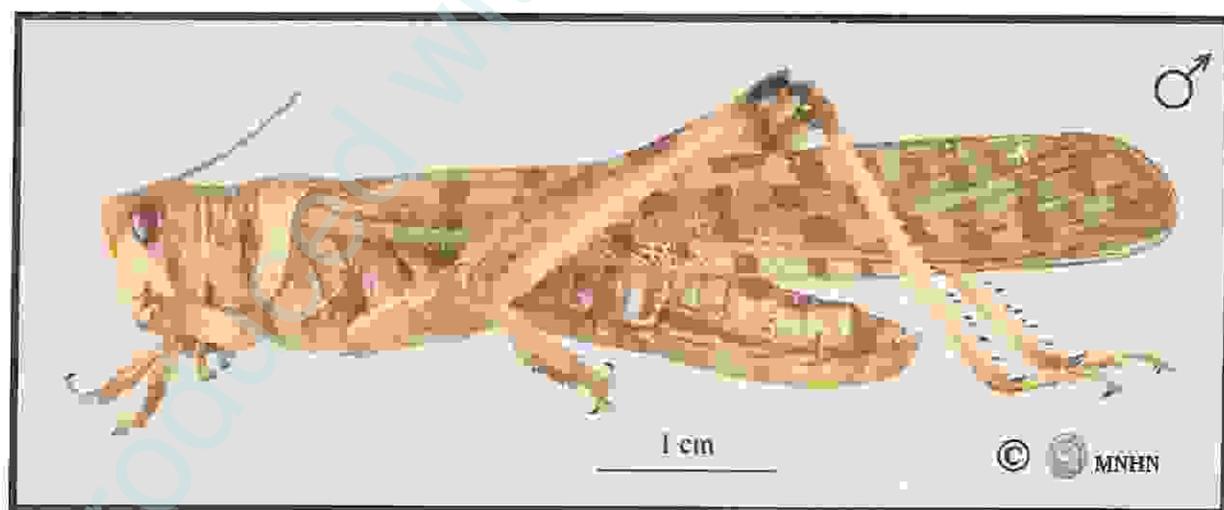


Figure01 : *Schistocerca gregaria* mâle [1].

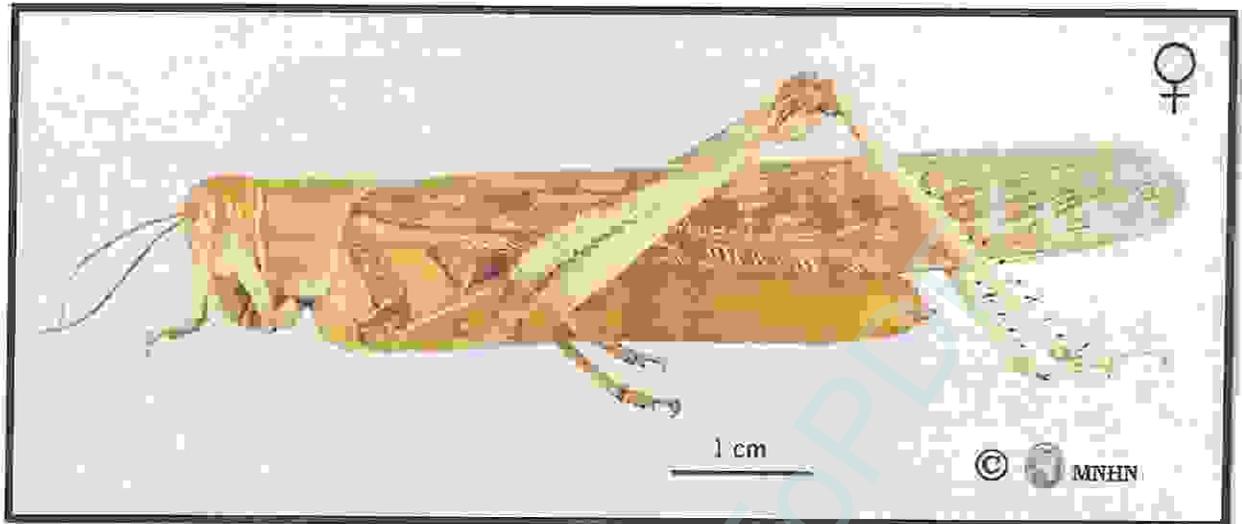


Figure02 : *Schistocerca gregaria* femelle [1].

#### 1.4 Cycle biologique :

Le cycle biologique de *S. gregaria* comprend comme chez les autres espèces de locustes trois états successifs: l'oeuf, la larve et l'imago. Chaque étape se subdivise en différentes phases de développement. (Duranton et Lecoq, 1990). Au cours de l'année, le Criquet pèlerin peut développer 2 à 3 générations (hemour,2009)

Le cycle biologique des individus grégaires est identique à celui des solitaires; les différences résident dans la diminution du nombre d'oeufs par oothèque, du raccourcissement de la durée des stades larvaires, la vie des adultes et le déplacement par effet de masse chez les grégaires (Launois- Luong et Lecoq, 1989).

##### 1.4.1 Développement embryonnaire :

Après l'accouplement, Les femelles déposent leurs pontes dans les sols à texture sableuse ou sablo-limoneuse (Launois- Luong et Lecoq, 1989).

Elles pondent généralement leurs oeufs dans un sol dépourvu de végétation. La ponte peut durer 7 à 30 heures. (Symmons et Cressman, 2001).

Lorsque la femelle détecte une humidité édaphique convenable, elle enfonce son oviscapte dans le sol en faisant un trou, en allongeant son abdomen de 2 à 3 fois sa taille normale. Elle pond en une fois un grand nombre d'oeufs qui s'agglomèrent dans une substance spumeuse. Les oeufs sont réunis en une masse appelée, grappe ovigère (In. Kemassi ,2007).

Chez les femelles du Criquet pèlerin, on note plus de 3 à 4 pontes chez les solitaires et de 2 à 3 pontes seulement chez les grégaires. (Duranton et Lecoq, 1990).

Les oeufs du criquet pèlerin sont déposés dans le sol sous la forme d'une oothèque de 9 à 10,5 cm de longueur avec une largeur de 7 à 9 mm. L'oothèque renferme l'ensemble des oeufs, constituant la grappe ovigère d'une longueur de 4,5 à 6 cm. Elle est surmontée d'un bouchon spumeux, atteignant presque la surface du sol et qui empêche le dessèchement des oeufs (Duranton et Lecoq, 1990); Popov *et al.*, 1990)

Peu après la ponte, l'oeuf s'hydrate et augmente de volume. Les œufs doivent absorber environ leur propre poids d'eau dans les cinq premiers jours après la ponte pour l'éclosion (Duranton et Lecoq, 1990).

Une fois la quantité d'eau nécessaire au développement embryonnaire est absorbée, l'embryon commence son évolution. (Duranton et Lecoq, 1990), mentionnent huit stades de différenciations Embryonnaires

La durée de développement embryonnaire dépend essentiellement de la température du sol. Elle décroît à mesure que la température augmente. Les grégaires se développent légèrement plus vite que les solitaires (Duranton et Lecoq, 1990).

L'embryogenèse est en fonction des conditions d'incubation ; chez les solitaires elle est de 12 jours dans de bonnes conditions et de 65 jours en mauvaises conditions. Chez les grégaires, elle dure 10 jours en bonnes conditions et 80 jours en mauvaises conditions (Popov *et al.*, 1991).

### 1.4.2 Développement larvaire :

Les larves de Criquet pèlerin passent, de l'éclosion à l'état imaginal, par plusieurs stades. Leur nombre est variable en fonction de la phase : 5 stades chez les grégaires et 6 le plus fréquemment chez les solitaires. Le stade supplémentaire se situe entre le troisième et le quatrième stade. Le stade le plus bref est le premier, le dernier est le plus long (Duranton et Lecoq, 1990). Jusqu'au 3ème stade, les larves solitaires sont vertes ; par la suite, elles peuvent éventuellement devenir brunes. Par contre, toutes les larves grégaires sont noires durant les deux premiers stades puis jaunes avec une maculature noire .

La durée de vie larvaire est minimale (36 jours) quand les conditions de développement sont optimales. La durée d'incubation des oeufs dans les mêmes conditions

est de 12 jours; soit une durée de 48 jours entre la ponte et l'apparition d'un nouvel ailé. (Rachadi, 1991).

#### 1.4.3 Développement imaginal :

Suite à la mue imaginale, les larves du cinquième stade (L5) donneront des imagos à cuticule mou qui durcit progressivement après 5 à 10 jours selon les conditions de températures ambiantes. Après cette étape, l'imago est capable de marcher, puis de sauter et voler localement grâce au développement des muscles. Une fois le durcissement de la cuticule achevé, le jeune imago se consacre surtout à la recherche d'un biotope favorable à l'alimentation. Il va connaître une augmentation progressive du poids par accumulation de corps gras, lui permettant d'entreprendre éventuellement des vols sur de grandes distances. Durant cette phase, les ovaires restent en pré-vitellogénèse. Les individus peuvent rester sexuellement immatures des mois (au maximum 6 mois) jusqu'à la rencontre des conditions écologiques propices (Température et humidité adéquate, disponibilité du couvert végétal) (Duranton et Lecoq, 1990). La maturation sexuelle de *S. gregaria* est conditionnée par les conditions écologiques favorables en particulier à la pluie. Dès que cet acridien rencontre des conditions favorables à la reproduction, les populations deviennent sexuellement matures (Duranton et Lecoq, 1990).

Si la végétation est abondante, les températures journalières maximales égales ou supérieures à 35°C et que les précipitations permettent la croissance de la végétation, les ailés peuvent probablement pondre leurs oeufs, trois semaines après la mue imaginale (Symmons et Cressman, 2001).

L'accélération de ce processus est sous la dépendance d'une phéromone sexuelle dite accélétratrice. Les mâles commencent leur maturation les premiers. Ils dégagent des substances chimiques (phéromones sexuelles) qui déclenchent la maturation des femelles et des autres mâles immatures; à partir de ce moment, les ovaires commencent à se développer.

L'attraction entre les individus du Criquet pèlerin se passe de différentes manières. Elle pourrait être visuelle, auditive, et surtout olfactive par le biais des phéromones sexuelles qui attirent les mâles vers les femelles (Duranton et Lecoq, 1990).

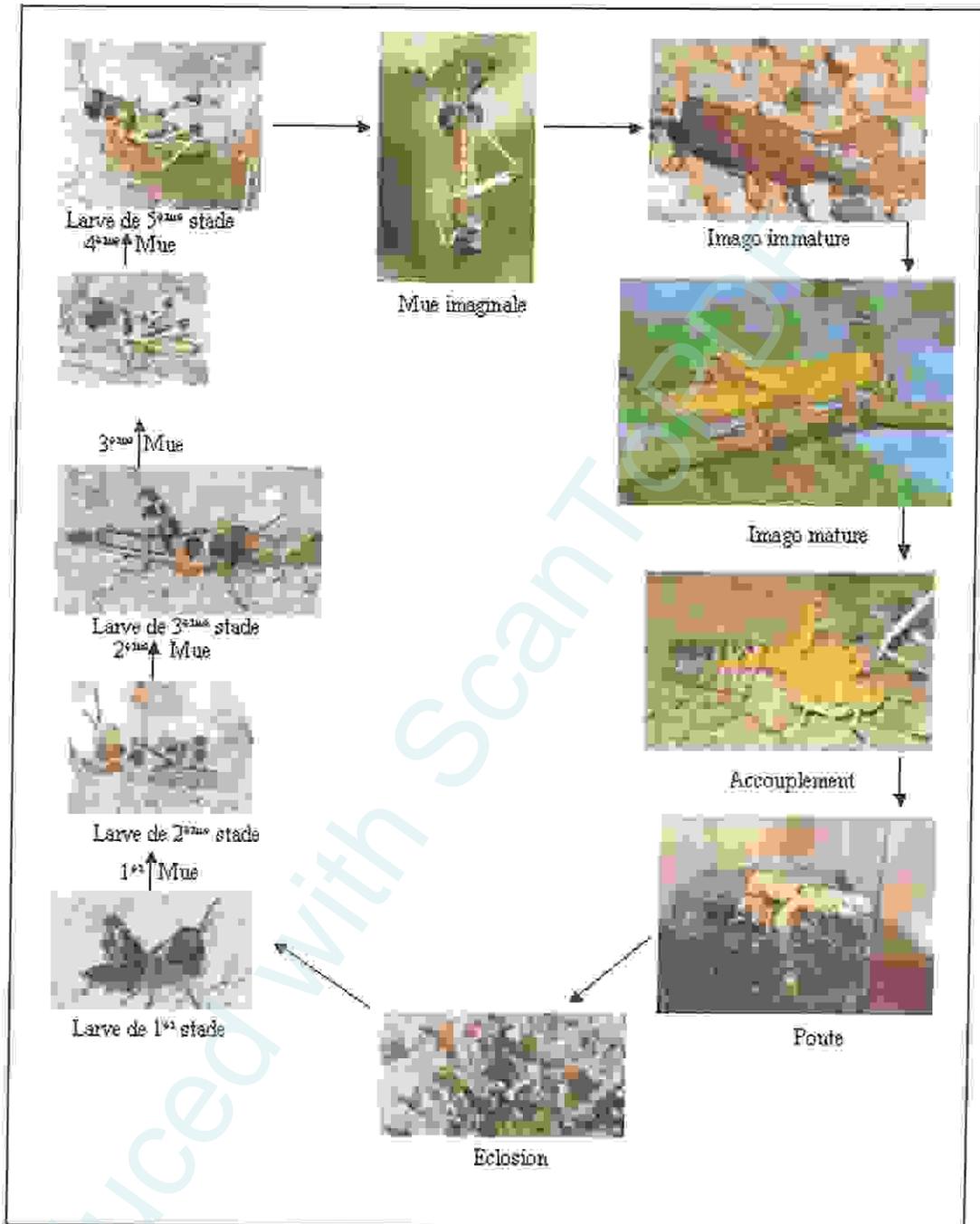


Figure 03 : Cycle biologique de *Schistocerca gregaria* (Forskål, 1775) (in Djeddar, 2007).

### 1.5 Le polymorphisme phasaire du Criquet pèlerin :

Le Criquet pèlerin *Schistocerca gregaria* (Forskål, 1775) est une locuste. Il présente donc un polymorphisme phasaire, c'est-à-dire la possibilité de développer des aspects variés et réversibles, selon la densité des populations. Ces différents aspects sont désignés sous le terme de phases. On distingue une phase solitaire pour les populations isolées et une phase grégaire pour les populations groupées.

La transformation phasaire désigne le passage d'une phase à l'autre. Il existe des formes intermédiaires dites *transiens* : *transiens congregans* dans le cas d'une évolution de la phase solitaire vers la phase grégaire et *transiens degregans* dans le sens inverse. Le passage de la phase solitaire à la phase grégaire demande en général plusieurs générations successives (4 au minimum), au cours desquelles les conditions favorisant la transformation phasaire doivent se maintenir. Le passage de la phase grégaire à la phase solitaire est beaucoup plus rapide et s'effectue souvent en l'espace d'une ou deux générations (Lecoq, 1991).

Le Criquet pèlerin en phase solitaire est beaucoup plus sensible et dépendant des conditions environnementales du micro-milieu. Les individus grégaires sont eux beaucoup plus résistants aux conditions environnementales difficiles, leur aire de dispersion est donc beaucoup plus vaste (Keita, 2009).

Trois facteurs interviennent dans le déclenchement de la grégarisation de *S. gregaria* selon (Duranton et Lecoq, 1990).

➤ **La multiplication :**

Accroissement des effectifs, si les conditions écologiques optimales se maintiennent.

➤ **La concentration :**

Regroupement d'imagos solitaires sous l'effet du système des vents convergents sur des superficies réduites offrant des conditions favorables d'une part ou de la réduction de surface habitable d'autre part.

➤ **La grégarisation :**

Le maintien des conditions écologiques favorables pendant au moins quatre générations successives aboutissent à la grégarisation de *Schistocerca gregaria*. (InKara\_Toumi, 2009)

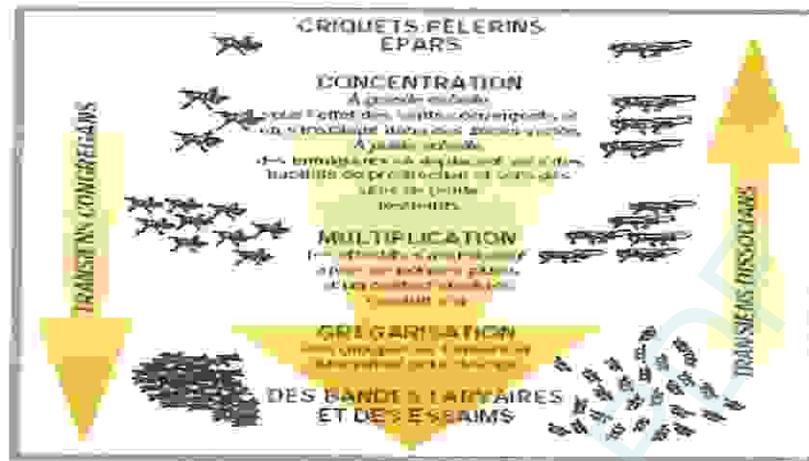


Figure04 : Les étapes de la transformation phasaire (Symmons et Cressman, 2001)

Dans la pratique trois mesures seulement peuvent suffire à caractériser l'état phasaire, au niveau morphologique, d'une population de criquet pèlerin. Il s'agit des mesures de E, F et C :

- E : longueur de l'élytre,
- F : longueur du fémur postérieur,
- C : largeur maximale de la tête. (BENSALAH, 2009)

Tableau 1: Modifications liées à la transformation phasaire chez *S.gregaria* (In.Djezzar, 2007)

Transformations morphologiques	Transformations biologique et anatomiques	Transformations physiologiques
-Les grégaires sont de plus petite taille. -Les ailes des grégaires sont plus petites. Pigmentation des élytres est peu contrastée chez les solitaires et très contrastée chez les grégaires. -Le pronotum est concave chez les grégaires et convexe chez les solitaires -Les larves solitaires sont vertes ou brunes tandis que les grégaires sont jaunes avec de très fortes maculatures noires -Les ailes solitaires sont de couleur brune, grise ou beige, jamais verts alors que les grégaires sont d'abord roses puis jaunes à maturité	-Les larves grégaires se développent en 5 stades et 6 le plus fréquemment chez les solitaires. -Les grégaires se développent légèrement plus vite, par une tendance à la diapause imaginale que les solitaires. -Les grégaires consomment d'avantage de nourriture chaque jour, produisent des œufs plus gros et en nombre plus restreint que les solitaires. -Les grégaires occupent une aire géographique plus étendue que celle des solitaires. Ces derniers sont plus exigeants vis-à-vis de leur environnement -Le nombre d'ovarioles par ovaire chez les femelles et du nombre des tubes séminifères par testicule chez les mâles sont souvent inférieurs chez les grégaires.	-Les grégaires ont un métabolisme respiratoire plus intense que les solitaires. Il existe une tendance à la synthèse d'hydrocarbures très condensés chez les solitaires par rapport aux grégaires. -Les grégaires possèdent plus de mélanine que les solitaires.

### **1.6 Lutte antiacridienne :**

Elle a pour objectif d'enrayer les départs d'invasions, de réduire l'ampleur des pullulations et d'empêcher leurs apparitions (Duranton et *al.*, 1987).

#### **1.6.1 Lutte préventive :**

Elle vise à empêcher la formation d'un départ d'invasion par la surveillance des aires grégariennes et des conditions météorologiques (Launois-Luong et Lecoq, 1993).

Les traitements des foyers de grégariation visent à empêcher l'enclenchement d'un processus de grégariation (Rachadi, 1990). Ces traitements peuvent être physiques, écologiques, chimiques ou biologiques. Ils sont faits dans le but de provoquer une dispersion des populations grégariantes (Chopard, 1943 ; Calvet, 1980 ; Duranton et *al.*, 1987 ; Launois-Luong et *al.*, 1988 ; Halidou, 1996 ; Anonyme, 1971 in Halouane, 1997 ; Dobson, 2001).

#### **1.6.2 Lutte curative :**

Elle ne se pratique qu'en période d'invasion et repose sur une utilisation exclusive de produits acridicides. L'application des pesticides implique au préalable la délimitation de l'espace où évoluent ces populations acridiennes par l'utilisation de la prospection antiacridienne (Moumèn, 1995 ; Moumèn, 2002).

#### **1.6.3 Principaux moyens de lutte :**

Deux principaux moyens sont actuellement utilisés dans la lutte antiacridienne : chimiques et biologiques.

##### **1.6.3.1 Moyens chimiques :**

La lutte chimique est actuellement la seule arme disponible pour juguler les fléaux acridiens de grandes ampleurs qui sont d'ordre locale, nationale ou internationale. Néanmoins elle doit être employée à bon escient et les traitements doivent être réalisés dans le respect des règles de bon usage (Launois-Luong et *al.*, 1988 ; Rachadi., 2005).

Selon Simone et Joern (1994), la lutte consiste à atteindre les acridiens ravageurs, directement ou indirectement (par la végétation) aux moyens de substance actives, naturelles ou de synthèse.

Les produits chimiques utilisés en lutte antiacridienne sont généralement destinés à tuer les criquets soit immédiatement soit après un délai plus ou moins long ; ils sont généralement neurotoxiques (Dobson, 2001).

En prenant les considérations citées, la lutte chimique s'avère néfaste pour l'environnement, l'entomofaune auxiliaire et le développement de résistance chez les criquets en vers les acridicides, sans oublier la pollution du sol et des eaux due aux résidus toxiques des produits chimiques (Duranton et al., 1987).

Des écosystèmes fragiles des régions désertiques ou semi désertiques ont souvent été largement touchés par des pulvérisations massives de produits toxiques. A partir de là, certains pesticides très efficaces tel que la dieldrine ont été délaissés pour leurs risques de toxicité envers l'environnement et la santé humaine ; d'autres matières de remplacement ont été proposées.

Actuellement la recherche de méthodes de lutte moins préjudiciables à l'environnement comme la lutte biologique par l'utilisation des myco pesticides est encouragée (Luong-Skormand et al., 1999).

#### 1.6.3.2 Moyens biologiques :

La lutte biologique est l'utilisation d'ennemis naturels, appartenant soit au règne végétal, soit au règne animal, pour détruire les insectes nuisibles (Calvet, 1980).

Selon Greathed et al., (1994), les acridiens sont la proie d'un grand nombre d'ennemis naturels vertébrés et invertébrés : prédateur, parasitoïdes, agents pathogènes (champignon, bactérie, protozoaire et virus).

##### ➤ Prédateurs et parasitoïdes ;

Divers prédateurs et parasitoïdes s'attaquent aux acridiens. Selon Greathed et al. (1994), les oothèques d'acridiens constituent une source de nourriture pour de nombreux insectes dont les larves prédatrices se développent dans le sol. Chopard (1943), a relevé que les oothèques du Criquet pèlerin sont parasités par de nombreux insectes, notamment les diptères. Quelques autres ennemis naturels s'attaquent également aux adultes.

Seuls les diptères, peuvent jouer un certain rôle durant les années d'invasion (Chopard, 1943 ; Keith et Kevan, 1992).

➤ **Les Champignons entomopathogènes :**

Parmi les microorganismes qui infectent les populations acridiennes, les champignons entomopathogènes sont les plus importants. Ceux du genre *Metarhizium* et *Beauveria* peuvent pénétrer directement la cuticule du criquet, contrairement aux virus et aux protozoaires qui doivent attendre d'être ingérés par l'insecte pour agir par la suite (Prior, 1933).

Ces champignons sont cultivés sur milieux artificiels, sans qu'il soit nécessaire de recourir à des hôtes biologiques (Greathed et al., 1994). (In Djeddar 2007)

➤ **Les Bactéries entomopathogènes :**

Des bactéries impliquées dans des maladies épizootiques sont observées chez les populations de criquets sauvages et élevées au laboratoire. Deux espèces (*Serratia marcescens* et *Pseudomonas aeruginosa*) infectent uniformément des sauterelles une fois ingérées avec la nourriture et peuvent s'étendre dans la population de laboratoire. (kaidi 2007).

## 1. Aspects généraux :

La lutte biologique, par opposition à la lutte dite chimique utilisant des xénobiotiques (tout composé ou molécule n'ayant pas une origine biologique), correspond à l'utilisation d'organismes et/ou composés naturels pour détruire ou contrôler d'autres organismes nuisibles sur le plan agronomique ou au niveau d'espaces naturels. Ces agents sont regroupés sous l'appellation de « biopesticides ». On distingue des organismes prédateurs (insectes, nématodes, plantes, mammifères, etc...) mais également des protistes (bactéries, virus, champignons) ou des molécules naturelles (phéromones, roténones, etc. ...). Un biopesticide est donc un agent de la lutte biologique (Silvy et Riba, 1999). Les premières utilisations de biopesticides remontent déjà à plusieurs siècles. Par exemple, avec la découverte des propriétés insecticides d'extraits de certaines plantes comme le pyrèthre (*Tanacetum cinerariifolium*) qui est à l'origine des pyréthrinoïdes de synthèse.

Les biopesticides représentent de nos jours en volume environ 3 à 4 % du marché total des insecticides. Principalement utilisés en agriculture, ils le sont également en milieux naturels tels que forêts et zones humides.

## 2. Le marché des biopesticides :

Le marché des pesticides synthétiques avait diminué au cours des 5 dernières années grâce au développement des biopesticides et des récoltes génétiquement modifiées. Les biopesticides représentent 2.5% (672 millions \$ en 2005) des ventes de produits phytosanitaires (26 milliards \$), alors qu'il était seulement de 0.2% en 2000.

En dépit de sa petite taille comparée aux pesticides synthétiques, le marché des biopesticides se développe donc et on prédit qu'il atteindra plus d'un milliard de dollars en 2010 (Thakore 2006). Actuellement, l'Amérique du nord et l'Europe consomment environ 40% et 20% respectivement de la production mondiale de biopesticides. On s'attend à ce que le marché des biopesticides aux USA monte de 205 millions à 300 millions US\$, et le marché européen d'environ 135 millions jusqu'à 270 millions \$ vers la fin de la décennie. Parmi les biopesticides microbiens, les produits à base de bactéries représentent 74% du marché mondial. Plus de vingt-cinq produits microbiens (13 bactéries et 12 champignons) sont actuellement inscrits à la EPA (Fravel 2005), et parmi eux, 36% ont été enregistrés dans les cinq dernières années. *Bacillus thuringiensis* ou Bt est considérée comme la bactérie la plus importante et la plus largement répandue, elle domine le marché des biopesticides microbiens

(70%) (Thakore 2006). Ces souches produisent un mélange de différentes protéines ( $\delta$ -endotoxines), et tue spécifiquement une ou quelque espèces de larves d'insecte.

### 3. Avantages des biopesticides :

Ces biopesticides ou agents de lutte biologique, peuvent être définis comme des produits phytosanitaires dont le principe actif est un organisme vivant ou l'un de ses dérivés. Ils peuvent donc être constitués d'organismes (plantes, insectes, nématodes) ou de micro-organismes (bactéries, levures, champignons, virus) exerçant une activité protectrice sur les plantes vis-à-vis d'agents phytopathogènes, mais aussi de substances d'origine naturelle telles que des extraits végétaux, phéromones, etc ... (Thakore, 2006).

Tout comme les autres agents de lutte biologique, les biopesticides microbiens sont écologiquement beaucoup plus compatibles que les produits chimiques et ont une spécificité accrue vis-à-vis des pathogènes contre lesquels ils sont dirigés. Ils sont par conséquence moins dommageables pour les organismes non ciblés de la microflore endogène qui exerce une action bénéfique sur les plantes. De plus, les biopesticides sont souvent efficaces en faibles quantités et leurs activités protectrices peuvent relever de mécanismes multiples et déclenchent donc rarement des phénomènes de résistance chez le pathogène à cause d'une faible pression de sélection. En outre, ils peuvent compléter les pesticides conventionnels une fois utilisés dans les programmes intégrés de la gestion des parasites (Fravel 2005; Thakore 2006). Par exemple, l'intégration du contrôle biologique avec des fongicides, les pratiques culturales, et d'autres mesures peuvent contribuer au contrôle de la rouille sur la tomate (Lourenco Junior *et al.* 2006).

Les biopesticides peuvent donc être complémentaires au traitement chimique, mais peuvent aussi être utilisés dans des situations pour lesquelles aucune solution de contrôle utilisant des produits de synthèse n'est actuellement disponible. Ces agents microbiens sont utilisés à travers le monde dans les champs et dans les serres (Ji *et al.* 2006; Lee *et al.* 2006; Minuto *et al.* 2006; Saravanakumar *et al.* 2007), pour combattre un grand nombre de maladies causées par des pathogènes du sol, foliaires ou de post-récoltes. Ces produits ont été développés pour contrôler de multiples maladies sur diverses céréales, légumes, fruits et fleurs (Paulitz et Bélanger 2001; Fravel 2005).

#### 4. Désavantages :

Malgré les avantages de ces agents biologiques, le marché des biopesticides reste toujours limité à cause de certaines contraintes : premièrement, l'effet protecteur est parfois insuffisant par rapport aux produits chimiques (Shishkoff et McGrath 2002) ou n'est parfois pas constant, dépendant notamment des conditions du milieu (la température, sol, humidité, la plante hôte, pH, etc...) (Larkin et Fravel 2002; Mendoza Garcia *et al.* 2003).

Deuxièmement, le coût et le délai sont très élevés pour l'enregistrement en Europe, de même que le coût de la production est élevé pour la plupart des agents de biocontrôle (Fravel *et al.* 1999). Troisièmement, le conditionnement et la formulation sont très difficiles pour des espèces non sporulantes et même parfois pour les espèces sporulantes (Hjeljord *et al.* 2000; Collins et Jacobsen 2003). D'autre part, les pesticides chimiques peuvent offrir rapidement une activité beaucoup plus efficace, tandis que les biopesticides peuvent avoir besoin de temps après leur application pour commencer à agir. Il est important de se rappeler que la plupart des biopesticides sont composés d'organismes vivants qui ont un spectre relativement restreint de ravageurs cible.

#### 5. Utilisation de *Bt* et de ses dérivés en tant que biopesticide :

L'intérêt pour les pesticides biologiques s'est développé dans le milieu des années 1970 du fait de l'augmentation de la résistance des insectes aux pesticides chimiques (pyréthrinoïdes) (Watkinson, 1994). Depuis plus de 20 ans, l'une des applications les plus réussies de *Bt* est le contrôle des Lépidoptères dans les forêts du Canada et des Etats-Unis, par la souche HD-1 capable de produire les toxines Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac et Cry2A, réduisant significativement l'utilisation d'insecticides chimiques (Bauce *et al.*, 2004). En effet, plusieurs millions d'hectares de forêt sont pulvérisés tous les ans par des produits issus de *Btk* (*kurstaki*) pour le traitement contre la spongieuse (*Lymantria dispar*) et la ordeuse des bourgeons de l'épinette (*Choristoneura fumiferana*).

Un avantage significatif des produits dérivés de *Bt* est leur capacité à contrôler cette résistance chimique des insectes. Par exemple, en Australie, aux Etats-Unis et en Extrême Orient, ils ont été utilisés pour le traitement contre les *Heliothis* ssp. et papillons nocturnes résistants aux pyréthrinoïdes. Cependant, des cas de résistance ont été observés chez certains insectes. Aussi, *Bti* (*israelensis*) est utilisé pour 80 % du contrôle des Diptères tels que la similie et le moustique, vecteurs de nombreuses maladies dans les pays africains à cause de leur résistance aux organophosphates (Bravo *et al.*, 2007).

Cette souche native est très active puisque les différentes toxines de ses inclusions de cristaux fonctionnent de façon synergiques (Angsuthanasombat et al., 1992; Chang et al., 1993; Crickmore et al., 1995; Delecluse et al., 1993; Poncet et al., 1995; Wu et al., 1994). Il existe des actions synergiques du même type entre certaines toxines (Ravoahangimalala et al., 1993; Van Frankenhuyzen et al., 1991), entre certaines toxines et bactéries (Dubois and Dean, 1995) et entre certaines toxines et spores (Delecluse et al., 1993; Dubois and Dean, 1995; Johnson and McGaughey, 1996; Miyasono et al., 1994; Moar et al., 1995; Moar et al., 1989; Tang et al., 1996). En effet, les spores peuvent induire une septicémie, augmentant ainsi les risques de mortalité de l'insecte. C'est pourquoi, les produits commerciaux contenant des spores sont supposés être plus efficaces sur le terrain (Watkinson, 1994).

En 1982, une nouvelle souche de Bt a été développée, *Btt (tenebrionis)* par les compagnies Mycogen et Ecogen pour le contrôle du doryphore aux Etats-Unis et en Europe (*Leptinotarsa decemlineata*). En 1992, *Bta (aizawai)* a été développée par les laboratoires Abbott pour le contrôle du papillon nocturne (*Plutella xylostella*), résistant aux pesticides chimiques (Watkinson, 1994).

Les formulations de Bt sont diverses : poudres, granules, briquettes ou suspensions organiques, donnant à l'agriculteur plus de flexibilité quant à l'utilisation du produit, notamment s'il envisage de faire des mélanges (Watkinson, 1994). Les plus connus sont le Dipel, le Thuricide et le Delfin mais leur utilisation reste limitée à cause de leur faible persistance sur le terrain (rapidement dégradées par les rayonnements Ultra-Violets et les microorganismes) et de leur coût élevé (Roush, 1994).

Des laboratoires de biotechnologies ont alors développé différentes souches de bactéries transformées pour exprimer les gènes insecticides *cry*. La première bactérie dans laquelle des gènes de protéines Bt ont été clonés est *Escherichia coli*, bactérie facilement manipulable génétiquement.

Cependant, cette dernière présente de faibles rendements d'expression à cause de divers facteurs de régulation (Broadwell, 1994). Alors, la société Mycogen aux Etats-Unis a développé à des fins agricoles, une souche de *Pseudomonas* dans laquelle un gène de *Btk* a été incorporé de façon stable (Watkinson, 1994). Lorsqu'elle meurt, cette souche conserve sa membrane cellulaire intacte ce qui protège les cristaux des rayonnements solaires. Ainsi, les performances sur le terrain sont accrues (Watkinson, 1994). Une autre approche, développée par Crop Genetics International, consiste à transformer par un gène de Bt une bactérie endophyte, *Clavibacter xyli* ssp. *cynodontis*. L'imprégnation des graines de maïs par cette

bactérie permet la colonisation du système vasculaire de la plante adulte, la protégeant alors contre la pyrale du maïs (*Ostrinia nubilalis*) (Watkinson, 1994). Aussi, des gènes de *Bt* ont été incorporés dans des algues pour le contrôle des moustiques et dans des virus d'insectes tirant parti du haut niveau d'infectivité des virus (Watkinson, 1994).

Cependant, les meilleurs hôtes pour ces gènes restent les *Bacillus*. Donc, en clonant ces gènes dans d'autres espèces de *Bacillus* comme *Bacillus sphaericus*, le spectre d'hôtes peut être augmenté avec des possibles actions synergiques entre les toxines et les spores (Broadwell, 1994). Aussi, de nouvelles approches de formulation sont proposées, notamment l'utilisation de la toxine à l'état adsorbée, plus efficace chez les larves de moustiques se nourrissant par filtration (Lee et al., 2003). *Bt*, utilisé comme alternative ou en complément des pesticides synthétiques chimiques en agriculture, est maintenant l'agent de lutte biologique le plus utilisé dans le monde. Plus de 250 biopesticides sont vendus dans le monde (1 % du marché des pesticides) et *Bt* représentent environ 80 % des biopesticides vendus (Mark E. Whalon, 2003). Même si l'utilisation des agents biologiques reste à la traîne derrière les pesticides chimiques, les bénéfices environnementaux font que les produits à base de *Bt* sont en plein essor.

La stratégie commerciale d'application de *Bt* prend en compte 3 paramètres majeurs (Bryant, 1994) :

- Les caractéristiques physico-chimiques de *Bt* : la toxine ne devient active que dans l'intestin des insectes cibles donc tout processus interférant avec la nutrition des insectes diminue l'efficacité. Aussi, la persistance est fortement altérée par l'action des rayonnements Ultra-Violets (UV) et le lessivage par les pluies (Crecchio and Stotzky, 1998; Koskella and Stotzky, 1997). Pour aider à l'efficacité de *Bt*, des composés ont été développés permettant une meilleure pénétration de la surface foliaire, un meilleur dépôt limitant les lessivages par la pluie et des « UVprotectants » comme de l'amidon ou d'autres polymères (Brar et al., 2006; Cökmüş et al., 2000; McGuire et al., 1990).
- Le mode d'application : il faut soit appliquer une dose létale de *Bt* soit appliquer une exposition chronique plus faible. Par ailleurs, la zone de contact doit être ciblée en fonction de la façon dont se nourrit l'insecte.
- Le comportement des espèces cibles : La dose à appliquer est fonction de la taille de la larve, une grosse larve nécessitant une dose plus forte (McGaughey, 1978).

## 6. La bactérie *Bacillus thuringiensis*:

### 6.1. Classification :

Selon **Berliner, 1915** la classification de *Bacillus thuringiensis* est comme suite:

<b>Règne :</b>	<u>Bacteria</u>
<b>Embranchement :</b>	<u>Firmicutes</u>
<b>Classe :</b>	<u>Bacilli</u>
<b>Ordre :</b>	<u>Bacillales</u>
<b>Famille:</b>	<u>Bacillaceae</u>
<b>Genre :</b>	<u><i>Bacillus</i></u>

### 6.2. Caractéristiques générales de *Bacillus thuringiensis* :

*Bacillus thuringiensis* (*Bt*) est une bactérie aérobie facultative, ubiquiste, Gram positive, caractérisée par l'activité entomopathogène des corps d'inclusions qu'elle produit lors de sa sporulation. Elle fait partie d'un groupe de six bacilles, rassemblés sous le terme « groupe *Bacillus cereus* » : *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycoides*, *Bacillus weihenstephanensis* et *Bacillus thuringiensis*. À l'état végétatif, *Bacillus thuringiensis* a la forme d'un bâtonnet de 5 µm de long sur 1 µm de large, et est pourvu de flagelles (voir figure 5). Elle se distingue des autres bacilles du groupe par sa capacité à synthétiser des cristaux protéiques (voir figure 6). Elle a été isolée au Japon par Ishiwata (Ishiwata, 1901) dans des larves de vers à soie malades (*Bombyx mori*) et décrite par Berliner en 1911 en Thuringe (Allemagne). Depuis, différentes souches ont été isolées dans divers habitats tels que le sol (Carozzi et al., 1991; DeLucca et al., 1979; Hastowo et al., 1992; Martin and Travers, 1989; Smith and Couche, 1991), les insectes (Carozzi et al., 1991), la poussière de papillons (Burgess and Hurst, 1977; DeLucca et al., 1979; Meadows et al., 1992), et des feuilles de conifères (Kaelin et al., 1994; Smith and Couche, 1991).

La plupart des Lépidoptères sont sensibles aux cristaux produits par les souches *kurstaki* et *aizawai* et plus récemment *tenebrionis* (ou *san diego*) (Drummond and Pinnock, 1994). Depuis la découverte de la souche *israelensis*, spécifique des Diptères, le spectre d'hôtes de *Bacillus thuringiensis* s'est vu augmenté de plus de 100 espèces de moustiques et simuliés. Les propriétés entomotoxiques de *Bacillus thuringiensis* en font tout l'intérêt commercial. Les premiers essais de lutte biologique avec *Bt* ont été réalisés en Hongrie dans

les années 1920 et en Yougoslavie dans les années 1930 pour contrôler principalement les Lépidoptères (Beegle and Yamamoto, 1992).

Les résultats prometteurs de ces essais ont conduit à la production du premier produit commercial en France en 1938 par les laboratoires Libec, la Sporéine. Par la suite, un nouveau produit, le Thuricide apparut au début des années 1960 (Lord, 2005). En 1976, la découverte des sérotypes *israelensis* (*Bti*) et *tenebrionis* (*Btt*) a permis l'ouverture de nouveaux marchés, grâce à une action larvicide sur les moustiques, les simulies et les coléoptères. Cependant, l'utilisation de Bt en lutte contre les ravageurs ne représente à ce jour que moins de 2 % du marché mondial des insecticides.



Figure 05 : La bactérie *Bt*

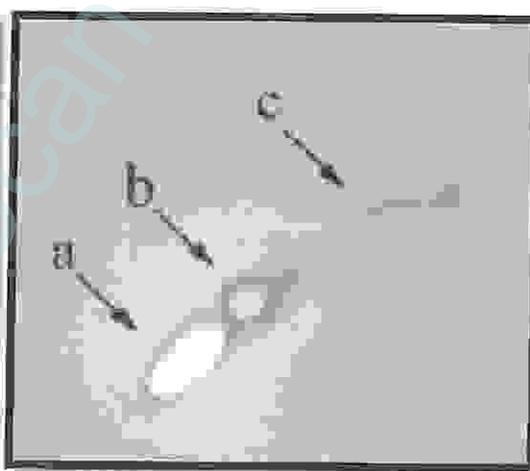


Figure 06 : Image de *Bacillus thuringiensis* en microscopie en contraste de phase ; a : spore ; b : inclusion parasporale contenant les cristaux de protéines ; c : filament (Rampersad et al., 2003).

### 6.3. Cycle de vie de *Bacillus thuringiensis* :

Le cycle vital de la bactérie *B. thuringiensis* comporte deux (2) phases (Young *et al.* 1998) (figure 7) :

- Une phase végétative observée lorsque les conditions du milieu sont favorables. Au cours de cette phase, la bactérie se multiplie de façon exponentielle par scissiparité. Elle synthétise pendant la phase végétative une exotoxine thermosensible appelée protéine insecticide végétative (Vegetative Insecticidal Protein ou VLP.) (Vassal, 2004).

- Une phase stationnaire qui commence dès que les nutriments essentiels du milieu se raréfient. Cette phase se caractérise par une différenciation des cellules bactériennes, aboutissant à la formation des spores. C'est aussi dans cette phase qu'intervient la synthèse des delta-endotoxines, substances protéiques conférant à la bactérie un pouvoir pathogène contre certains insectes. Ces protéines s'accumulent dans la cellule bactérienne pour former un cristal qui est ensuite libéré dans le milieu.

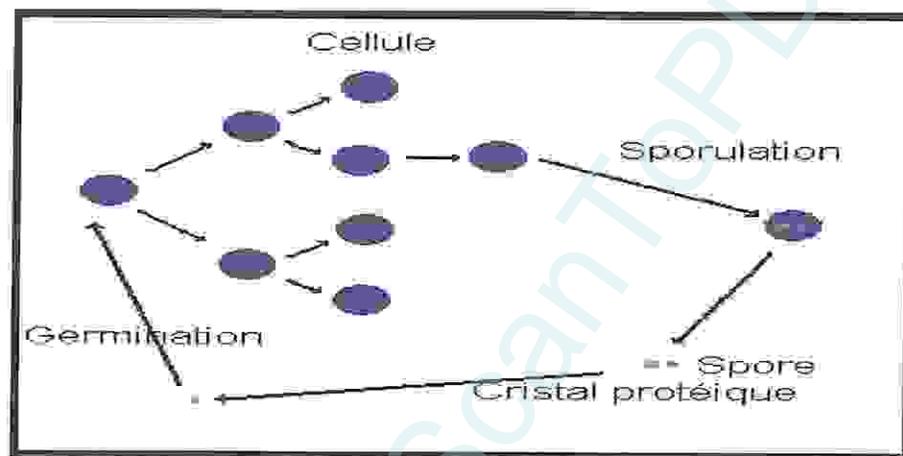


Figure 07: Cycle biologique de *Bacillus thuringiensis*[3].

Contrairement aux pesticides chimiques pour lesquels le mode d'action est rapide au moindre contact avec l'insecte, le mode d'action de *Bt* est lent. Il commence après que les insectes aient ingéré le produit contenant les cristaux de protéines, les spores, et autres composés (enzymes, protéines insecticides végétatives etc.) encore appelés composés de virulence.

Cinq phases résument le mode d'action de *Bt* (Schnepf et al, 1998; Cooper, 1994; Aronson et Shai, 2001) : Les inclusions cristallines (les protoxines), les spores et les composés de sont ingérés par les larves d'insecte (phase 1). Elle est suivie de celle où la protoxine est virulente solubilisée dans l'intestin de la larve en raison du pH alcalin et se fragmente pour donner des toxines actives (phase 2). Au fait, au cours de cette phase 2, les extrémités COOH- et/ou NH<sub>2</sub>- terminales des protéines Cry sont hydrolysées par les protéases de l'insecte afin de libérer les toxines. Ensuite, les toxines entrent réversiblement en contact avec des récepteurs spécifiques des cellules épithéliales de l'intestin (phase 3).

Les toxines forment sur ces récepteurs des pores transmembranaires conduisant à un influx d'électrolytes et d'eau aboutissant à la lyse des cellules épithéliales (phase 4). Cette destruction progressive des structures du tube digestif permet la germination des spores

(ingérées avec le cristal) et la multiplication végétative des cellules bactériennes. Ainsi, les tissus de l'insecte sont peu à peu envahis, si bien que la larve cesse de s'alimenter et finalement meurt (phase 5).

#### 6.4. Les spores :

##### 6.4.1. Structure et composition de la spore :

*Bi* produit des endospores pour survivre aux conditions défavorables de croissance comme l'absence d'éléments nutritifs et les températures élevées. Elles contiennent de l'acide Dipicolinique (pyridine-2 : acide 6 dicarboxylique ou DAP) qui constitue 5-15% de leur masse sèche. Cette composante les distingue des autres formes de spores (exospores, kystes et conidies) produites par divers microorganismes.

Le phosphore et le calcium sont les éléments inorganiques les plus importants contenus dans les structures de la spore. Le phosphore occupe 7% de la masse sèche de la spore et le calcium, 2-3%. Le calcium et le DAP sont importants pour la stabilité de la spore : en combinaison dans la spore, ils sont impliqués dans son développement et sa résistance à la chaleur (Murrell, 1969 ; Pelzcar, 1993). Le manganèse, le cuivre et le zinc participent aussi à la stabilité en formant des complexes avec le DAP (Gould, 1969; Lundgren et Cooney, 1962; Powell et Strange, 1956). Le potassium et le magnésium sont deux autres éléments inorganiques majeurs de la spore et servent de cofacteurs pour des réactions métaboliques durant la sporulation (Lundgren et Cooney, 1962)

Ainsi, beaucoup d'éléments organiques et inorganiques sont exigés pour que la formation des éléments structuraux de la spore soit possible. Le nombre de spores produit est plus élevé lorsque ces éléments se retrouvent en grande quantité dans le milieu. Il est donc important que ces éléments soient accessibles à *Bi* lorsque celle-ci croît dans un milieu aussi complexe que les boues d'épuration.

##### 6.4.2. La Sporulation :

Durant la sporulation bactérienne, le métabolisme de la cellule change considérablement la croissance végétative cesse, les revirements métaboliques augmentent et les réserves s'accroissent. Ces événements physiologiques et biochimiques survenant durant la sporulation sont régulés par induction ou par répression d'enzymes ou autres facteurs liés à l'expression génétique.

Les éléments nutritifs tels que le glucose, l'azote et le phosphore jouent un rôle très important dans la différenciation cellulaire et la sporulation du genre *Bacillus*. L'épuisement de ces éléments nutritifs active un réseau de gènes régulateurs qui activent à leur tour des systèmes effecteurs pour lutter contre les conditions défavorables de l'environnement.

La répression catabolique par le glucose est l'un de ces mécanismes connus pour réguler la sporulation ainsi que la production de métabolites secondaires comme les entomotoxines. La cellule accorde la priorité au métabolisme du glucose en utilisant les éléments azotés et en réduisant l'activité enzymatique des autres voies métaboliques nécessaires à la sporulation (Halvorson, 1957; Hardwick et Foster, 1969; Piggot et Coote, 1976). Bref la sporulation est entamée lorsque le glucose est entièrement consommé dans le milieu de croissance.

La formation de spores s'effectue en sept étapes. La Figure 4 résume les étapes de la sporulation et de la production des CPI chez *Bt*. Plus de 80 gènes sont impliqués dans le processus de sporulation. La composition en éléments nutritifs du milieu influence l'induction et la répression de tous ces gènes.

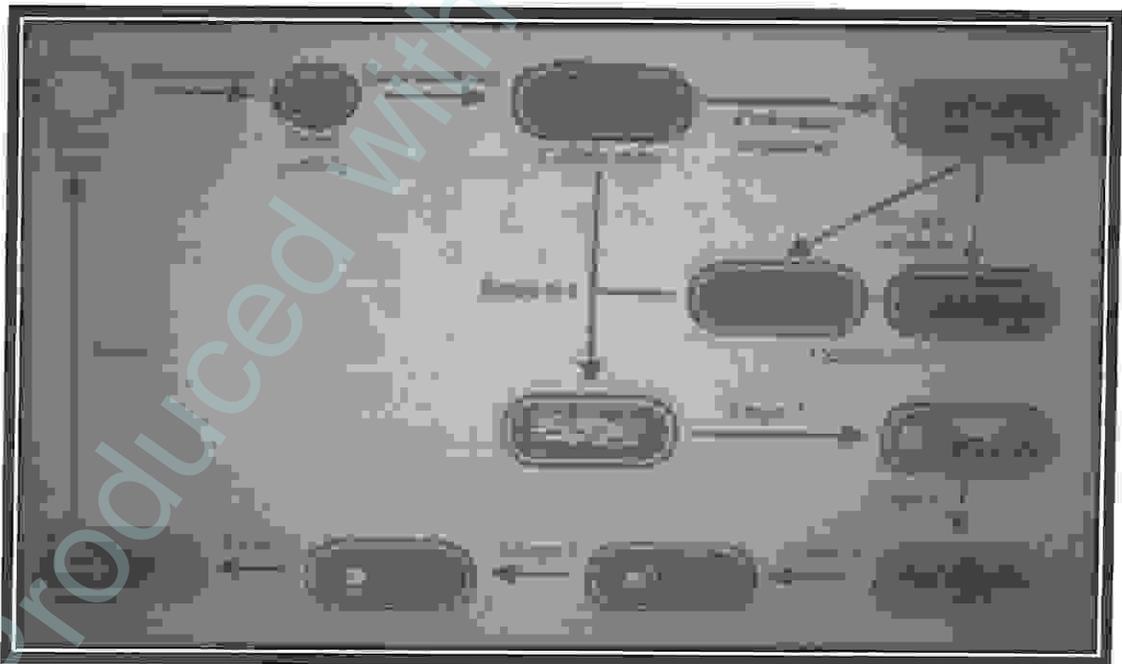


Figure 08 : Schéma de la sporulation et de la production des CPI de *Bt* (Murrell, 1961 ; Gould, 1969 ; Piggot et Coote, 1976 -; Bulla et al., 1980 ; Sneath, 1984 ; Slepecky et Hemphill, 1992 ; Piggot et al., 1994).

**Etape 1:** synthèse de l'ADN et formation d'un filament axial de chromatine par la condensation de deux nucléotides supportés par les mésosomes.

**Etape 2:** formation d'un septum par l'invagination de la membrane à l'une des extrémités de la cellule et début de la synthèse du/des CPI parasporaux.

**Etape 3 :** formation du protoplaste (spore avec une membrane cytoplasmique libre dans la cellule) et assemblage des sous-unités protéiques du CPI.

**Etape 4:** production de la membrane cellulaire et du cortex autour du protoplaste sporal et augmentation de la taille du cristal.

**Etape 5 :** synthèse des couches protéiques sporales et fin de la synthèse du CPI.

#### 6.4.3. Entomotoxicité de la spore :

Les spores de *Bt* provoquent la septicémie chez les larves d'insectes. Dans le cas des lépidoptères, une fois que les cellules épithéliales de l'intestin des larves sont endommagées par les delta – endotoxines de *Bt*, les spores ingérées peuvent pénétrer dans le sang à partir de ces ouvertures. Les spores germent et les cellules végétatives envahissent le sang pour finalement causer la mort de la larve (Mohd-Salleh et Lewis, 1982; Porcar et Juarez-Pérez, 2003).

L'effet insecticide de la spore peut aussi être attribué à la présence de protéines similaires aux delta -endotoxines dans ses couches protéiques (Somerville et al., 1970; Burges et al., 1976; Aronson et al., 1982 ; Mohd-Salleh et Lewis, 1982; Johnson et al., 1998 ; Du et Nickerson, 1996) ou autres substances létales qui agissent en synergie avec les delta-endotoxines (Valéro et al., 1999).

Johnson et al. (1998) ont étudié l'entomotoxicité de différents mélanges de spores irradiées et de CPI. Ils ont constaté que les spores perdaient 53% de leur efficacité après 2h d'irradiation et conservaient, 28% de leur toxicité après 4 h d'irradiation. Cette toxicité était attribuée à la présence de protéines dans les couches protéiques de la spore similaires aux delta-endotoxines contenues dans les CPI. La maturité de la spore est aussi très importante pour contribuer à l'entomotoxicité. Une spore mature et fonctionnelle serait plus apte à causer la septicémie qu'une spore immature. Elle pourrait aussi contenir plus de  $\delta$ -endotoxines (ou de protéines similaires) dans ses couches protéiques. Un milieu de culture qui offre les meilleures conditions pour la maturation des spores est donc souhaitable pour la production de *Bt*.

### 6.5. La formation des cristaux protéiques :

La synthèse de la protéine parasporale commence aux étapes II et III de la sporulation et les inclusions atteignent leur grandeur maximale à l'étape V (Fast, 1981 ; Aronson et al, 1986). Huber et Lüthy, 1987). Le cristal qui en résulte compte pour 20-30% des protéines totales du sporange (Lecadet et Dedonder, 1971 ; Aronson et al, 1986). La figure 4 illustre en partie la formation de la protéine cristalline lors des étapes de la sporulation (Bulla et al, 1980 ; Fast, 1981 ; Faust et Bulla, 1982).

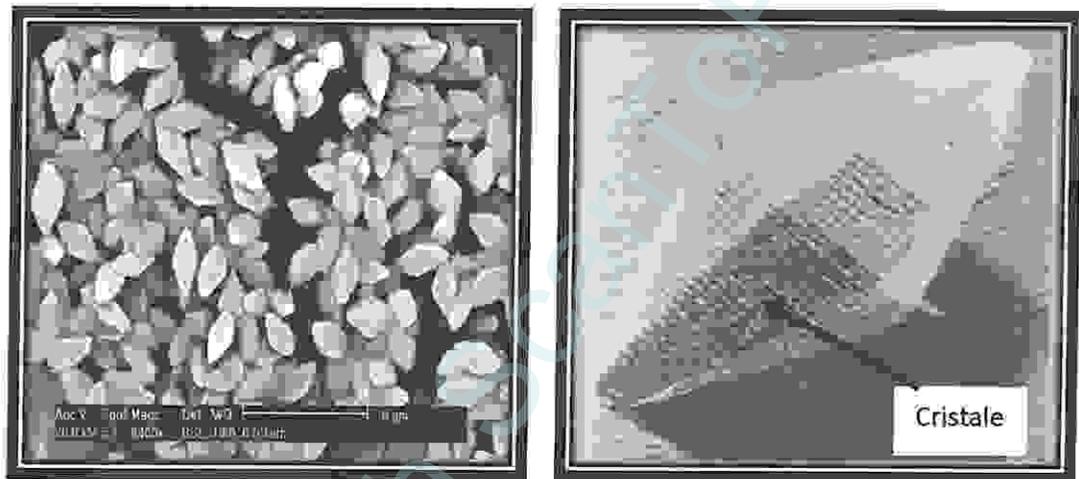


Figure 08 : La formation des cristaux protéique [2].

### 6.6. Les toxines de *Bt* :

Les protéines Cry représentent la grande majorité des toxines synthétisées par *Bt* et font donc l'objet d'une classification exhaustive. Les toxines Cyt ne sont actives que sur Diptères et Coléoptères et agissent en général en synergisant l'effet des toxines Cry (Soberon et coll., 2007). D'autres toxines les Végétatives Insecticidal Proteins (Vip), par exemple les  $\alpha$ -exotoxines, sont sécrétées pendant la phase de croissance végétative et ne présentent qu'un intérêt mineur sur le plan entomopathologique. Au sein des toxines Cry existent plusieurs groupes dont le plus important, celui qui nous intéresse ici, rassemble les toxines structurées en trois domaines. Un autre groupe concerne des toxines à deux composés (binaire) et des toxines dites *Mtx-like* par analogie avec les toxines produites par *B. sphaericus*.

### 6.6.1. Les delta-endotoxines du Bt et leur mode d'action :

Le *Bt* produit un corps d'inclusion parasporal de nature cristalline durant la sporulation. Ce cristal est constitué de protéines. Un grand nombre de protéines cristallisées apparentées ont été identifiées, et un cristal peut renfermer plusieurs types de protéine. Pour dénouer une situation aussi confuse, Höfte et Whiteley (1989) ont proposé un système de classification des protéines cristallisées et des gènes codant leur synthèse. Cette classification repose sur la structure des protéines cristallisées et sur la gamme d'hôtes. Plus de 14 gènes codant la synthèse de protéines cristallisées distinctes ont été décrits, et d'autres protéines présentant des propriétés insecticides ont été identifiées récemment (Lereclus *et al.*, 1993).

Les gènes codent pour la synthèse d'une famille de protéines apparentées présentant des propriétés insecticides (Cry) et sont répartis dans quatre grandes classes, selon que la spécificité des protéines s'exprime à l'endroit des Lépidoptères (I), des Lépidoptères et des Diptères (II), des Coléoptères (III) ou des Diptères (IV). Chaque classe est divisée en un certain nombre de sous-classes possédant des propriétés insecticides et structurales propres. Récemment, un nouveau système de classification fondé uniquement sur l'identité des acides aminés a été proposé (Crickmore *et al.* 1998).

Cette nouvelle classification permet de regrouper les toxines étroitement apparentées et élimine la nécessité de soumettre chaque nouvelle toxine à des essais biologiques contre une série sans cesse croissante d'organismes.

Les protéines cristallisées exercent leurs effets sur l'hôte en lysant les cellules épithéliales de l'intestin moyen et en provoquant la paralysie du tube digestif. L'insecte infecté cesse de se nourrir et finit par mourir s'il ne parvient pas à se rétablir. Une fois ingérés, les cristaux se dissolvent dans l'environnement alcalin de l'intestin moyen de l'hôte. La protéolyse de la protéine cristallisée solubilisée ou protoxine produit le fragment toxique (toxine). Une fois liée à des récepteurs spécifiques présents sur les membranes des cellules épithéliales de l'intestin moyen, la toxine induit la formation de pores dans la membrane des cellules épithéliales et, ce faisant, provoque la mort des cellules et de la larve infectée (Aronson *et al.* 1986; Höfte et Whiteley, 1989; Lereclus *et al.*, 1989; Adang, 1991; Gill *et al.*, 1992; Bauer, 1995).

À partir du mode d'action des protéines cristallisées du *Bt*, on peut supposer qu'au moins quatre paramètres interviennent dans la fonction de la protéine cristallisée :

- 1) l'efficacité de la solubilisation.
- 2) l'efficacité de la conversion protoxine-toxine.
- 3) la liaison des récepteurs spécifiques aux membranes.
- 4) la formation des pores membranaires. Tous ces paramètres déterminent la spécificité d'une protéine de cristal (spectre insecticide).

Produced with ScanTOPDF

# chapitre II

# Partie Pratique

Produced with ScantOPDF

## 1. Objectif de l'étude :

Notre présent travail a pour but d'étudier l'effet de *Bacillus thuringiensis* sur les larves L5 de *S. gregaria*, ainsi que l'impact de ce bio-pesticide sur les différentes espèces non cibles, prenant en considération les paramètres environnementaux suivants :

- ✓ Effet sur la mortalité des larves L5 de *S. gregaria*.
- ✓ Effet sur l'évolution pondérale, et l'activité alimentaire des souris d'élevage.
- ✓ Observation et analyse des coupes histologiques effectuées au niveau des foies des souris d'élevage.
- ✓ Effet sur la végétation par l'observation du degré de phytotoxicité au stade levée et posté levée.

## 2. Matériel de travail :

### 2.1. Matériel non biologique :

Le matériel non biologique utilisé est mentionné dans l'annexe 01.

### 2.2. Matériel biologique :

#### 2.2.1. Les criquets :

Notre travail a porté sur des essais de lutte par des bactéries entomopathogènes sur des larves L5 mâles et femelles de *Schistocerca gregaria* provenant d'un élevage maintenu au niveau du laboratoire de phytopharmacie appliquée, département des sciences agronomiques, Université de Blida.

##### 2.2.1.1. Elevage des criquets :

L'élevage des adultes de criquet pèlerin est réalisé dans une cage parallélépipédique en bois de dimension : 120 x 60 x 55 cm, grillagée sur les deux cotés et de l'avant pour l'aération et avec du plissé glace de la face arrière pour garder la chaleur. Elle est munie d'une porte coulissante en plexiglas et de deux fermetures pour faciliter le nettoyage, le renouvellement de la nourriture et la vérification des pondoirs. Ces derniers se trouvent dans les ouvertures à la base de la cage. Ils sont remplis de sable stérilisé et humidifié pour que les femelles puissent déposer leurs oothèques. L'élevage est soumis à une température de  $30 \pm 3^\circ\text{C}$  et une humidité relative de 50 à 60%. Quant à l'alimentation, elle est à base de gazon, et un complément de son de blé.

Les pondoirs contenant les pontes sont récupérés et remplacés par d'autres pondoirs. Ils sont recouverts d'une toile moustiquaire pour l'aération et troués à la base pour permettre l'infiltration de l'eau en cas de surplus afin d'éviter le risque de la pourriture des œufs. Ces

pondoirs portent les indications nécessaires telles que la date de la ponte. Ils sont mis dans des conditions appropriées pour l'incubation des œufs (In Outtar ; 2009).

Le contrôle de ces pondoirs se fait quotidiennement pour la vérification de l'humidité du sable et les éclosions des œufs, afin d'éviter le dessèchement des œufs et la mort des larves néonates. Ces dernières sont récupérées et mises dans deux cages réservées à l'élevage des larves de 1<sup>er</sup>, 2<sup>ème</sup>, 3<sup>ème</sup> et 4<sup>ème</sup> stades avec les dimensions : 50 x 34 x 35 cm en bois, recouvertes d'un tulle moustiquaire à petites mailles, avec une fermeture. Quant aux larves de 5<sup>ème</sup> stade et les imagos, ils sont élevés dans une cage de la même forme et les mêmes dimensions que celle des adultes. D'après Outtar 2009. Les conditions d'élevage de tous les stades larvaires et les imagos sont les mêmes que pour les adultes.

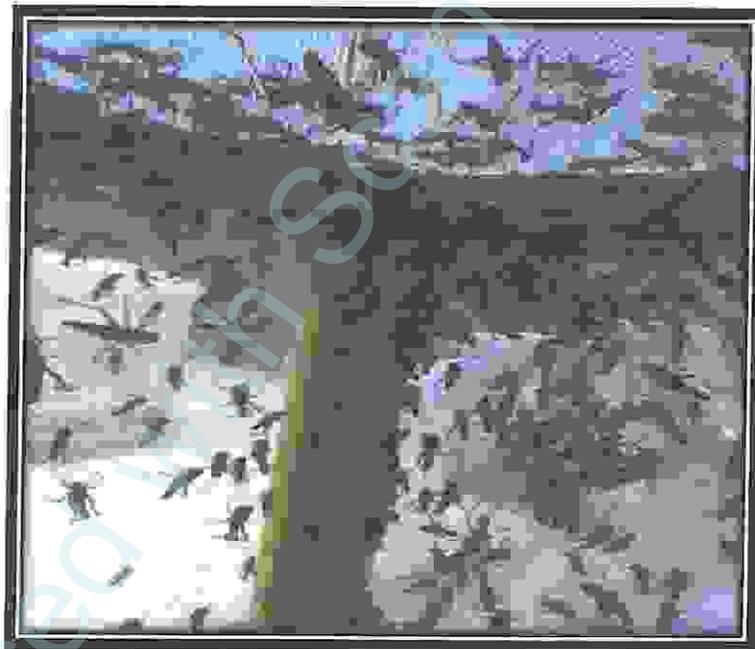


Figure 10 : Cages utilisées pour l'élevage des larves des locustes (In Outtar, 2009).

### 2.2.2. Les souris blanches de laboratoire :

Les souris blanches sont une forme domestiquée de la souris commune appelées *Mus musculus*, elles se caractérisent par une taille comprise entre 14 et 19 cm et un poids varie de 12 à 30g.

Physiologiquement ces animaux deviennent matures à l'âge de deux mois pour les mâles et un mois et demi pour les femelles, ces dernières ont une durée de gestation de 19 à 21 jours, où elles peuvent déposer plus de 10 petits par une portée de poids natal de 0,5 à 1,5g (Leblanc et Samson, 2006).

2.2.3. Les bio-pesticides testés :

2.2.3.1. La bactérie entomopathogène :

La souche de *Bacillus thuringiensis* a été obtenue du Laboratoire de phytopharmacie appliquée département des sciences agronomiques Université de Blida, sous forme d'un biopesticide formulé en poudre sèche des spores conservée dans des sacs en aluminium.

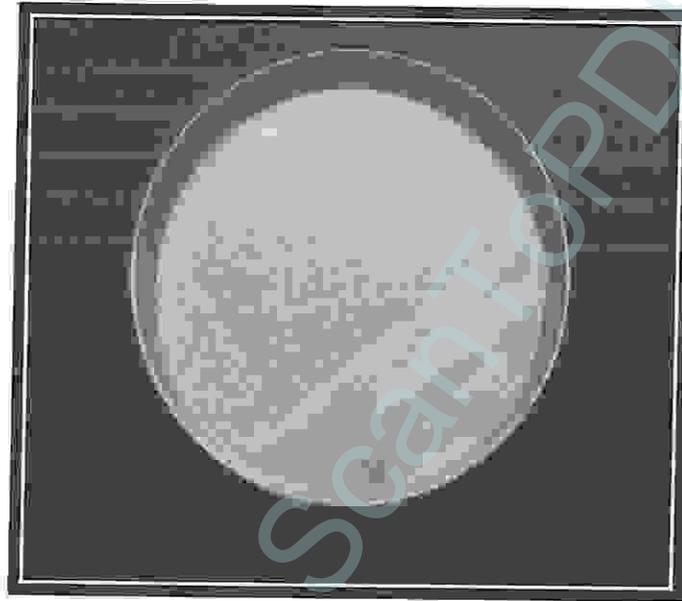


Figure 11: *Bacillus thuringiensis* sous forme de poudre sèche de spore cultivée au laboratoire



Figure 12 : *Bt* sous forme de poudre sèche

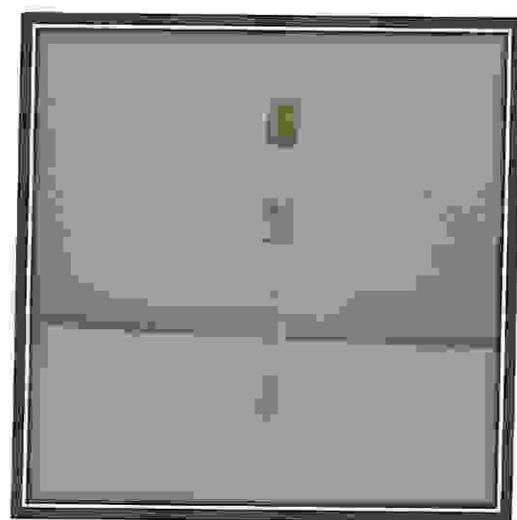


Figure13 : Suspension huileuse de spores de *Bt*

**2.3. Principe de choix des doses :**

La détermination des doses a été précédée par une consultation des rapports de prospection et de lutte antiacridienne du département de lutte antiacridienne de l'institut national de protection des végétaux.

Les doses employées au cours de notre expérimentation représentent celles utilisées en plain champ. Ce choix était subjectif afin de mettre en relation d'une part l'évaluation des doses réelles employées sur terrain et d'autre part les conséquences d'exposition aux biopesticides qui peuvent être trouvés chez les individus de souris de la race Albinos selon les paramètres étudiés.

**2.4. Schéma descriptif des calculs de doses utilisées *Bacillus thuringiensis* :**

Doses employée par hectare = 500g

Volume utilisé pour la dilution de 500 g de poudre de *B. thuringiensis* par hectare = 400L

Donc 500g  $\longrightarrow$  10000 m<sup>2</sup>

Xg  $\longrightarrow$  1 m<sup>2</sup>

$$X = 1 \cdot 500 / 10000$$

$$X = 0.05 \text{ g}$$

**2.5. Multiplication de la bactérie :**

**2.5.1. préparation de la solution mère :**

Pour préparer une solution mère à partir de la poudre sèche des spores de *Bacillus thuringiensis*, on a suivi les étapes suivantes :

Préparer la culture de la bactérie ; en prélevant une quantité de la poudre et en l'introduit dans un volume d'eau physiologique stérile, en suite on agite manuellement pendant 20 min.

A partir de cette suspension, on prélève 1ml et on le dépose dans une boîte de Pétri contenant un milieu gélosé ordinaire «gélose nutritif » et on l'étale, l'incubation se fait à 25°C pendant 15 jours.

**2.5.2. Préparation d'inoculum :**

On prélève des petits fragments de la culture âgée de 15 jours et on les dépose dans un tube à essai contenant 10 ml d'eau physiologique stérile, en fin on agite pendant 10 à 20 mn à l'aide d'un vortex pour assurer une libération maximale des spores.

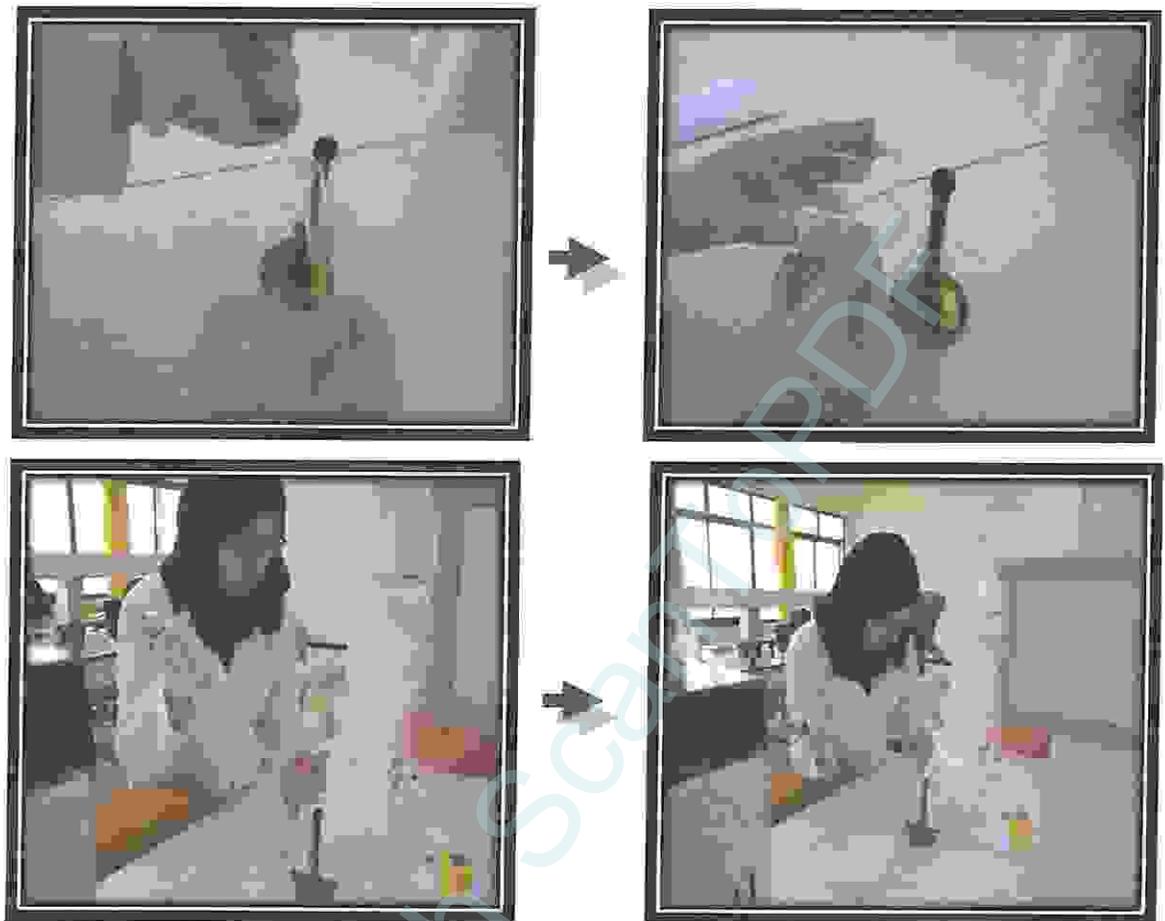


Figure 14 : Les différentes étapes de la préparation de la solution mère.

## 2.6. Etude de la mortalité des L5 :

Pour tester l'effet de *Bacillus thuringiensis* sur la mortalité des larves L5 de *Schistoserca grégaria*, nous avons travaillé sur un total de 120 larves du stade L5.

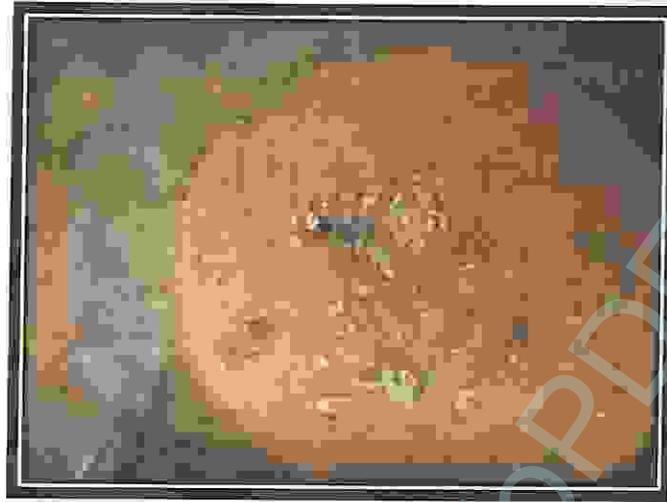
Deux doses de traitement ont été utilisées avec un témoin. Les larves sont réparties en 3 lots chaque lot contient 40 larves.

Les traitements sont réalisés par ingestion à l'exception du lot témoin où l'alimentation est traitée uniquement avec de l'eau distillée.

**Lot 1 :** témoin traité par l'eau distillée.

**Lot 2 :** traité par la dose D 1= 0.25g/200ml d'eau.

**Lot 3 :** traité par la dose D 2= 0.5g/200ml d'eau.



**Figure 15 :** Récupération des larves L1 L2 à partir des pondoirs pour le transfert aux cages d'élevage. (In Outtar ; 2009)



**Figure 16 :** Dispositif pour le traitement des individus de L5 par les différentes doses des deux bio-pesticides. (In Outtar ; 2009)

#### 2.6.1. Calcul du pourcentage de mortalité :

Le pourcentage de mortalité est calculé à l'aide de la formule suivante :

$$\text{Mortalité observée} = \frac{\text{Nombre d'individus morts}}{\text{Nombre total d'individus}} \times 100$$

Le pourcentage de mortalité observée est corrigé par rapport au témoin selon la formule d'ABBOT (1925).

$$\text{MC\%} = \frac{\text{M2} - \text{M1}}{100 - \text{M1}} \times 100$$

M1 : Pourcentage de mortalité chez les témoins.

M2 : Pourcentage de mortalité chez les traitées.

MC% : Pourcentage de mortalité corrigée.

## 2.7. Essai de la persistance et la phytotoxicité de *Bacillus thuringiensis* sur le feuillage de blé :

Dans le but d'étudier la persistance et la phytotoxicité de bacillus thuringiensis sur le couvert végétal (le feuillage) du blé on a suivi les étapes ci-dessous :

### 2.7.1. La culture de blé :

Dans 5 plateaux à 145 alvéole plein de la tourbe, on sème de 2à3 grains de blé (la variété de oued-zneti). Par la suite, les pots sont déposés dans un endroit exposé au soleil et irrigués suffisamment chaque deux jours.

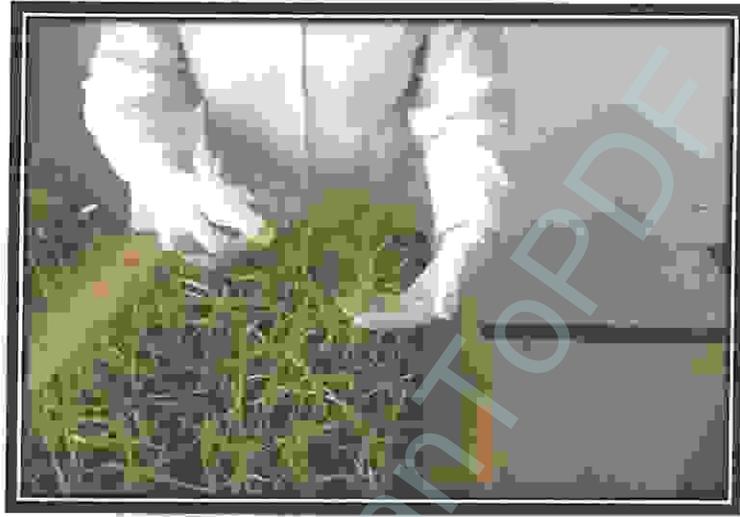
La levée de la plante est marquée après 5 jours, et le stade de 2 feuilles est atteint vers le 20<sup>ème</sup> jour.



Figure 17 : plateau à alvéole contient les plants de blé.

**2.7.2. Pulvérisation de *Bacillus thuringiensis* sur feuillage :**

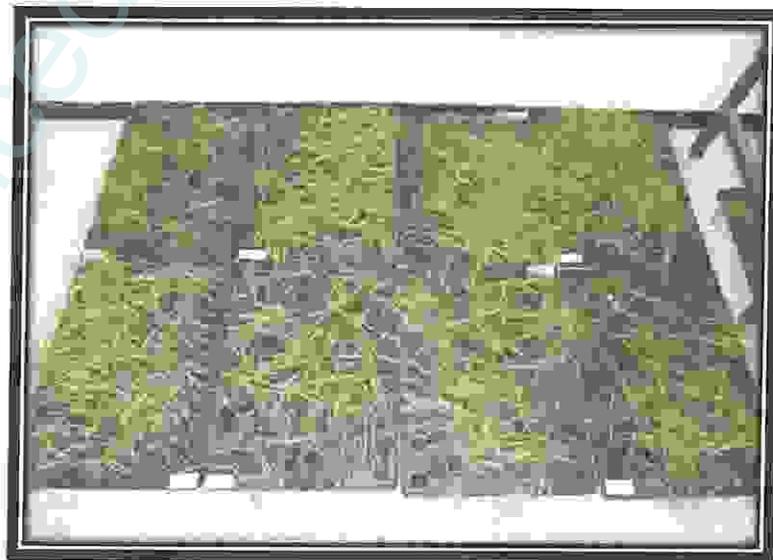
Après 20 jours, les plantes sont au stade levé, où elles sont traitées par les différentes dilutions à l'aide d'un pulvérisateur à main.



**Figure 18:** pulvérisation des feuilles par *Bacillus thuringiensis*

Les 4 plateaux sont répartis en 4 lots :

- **Lot 1 :** lot témoin traité par l'eau de robinet
- **Lot 2 :** traité par la dose 0.25g/200ml d'eau
- **Lot 3 :** traité par la dose 0.5g/200ml d'eau
- **Lot 4 :** traité par la dose 0.75g/200ml d'eau



**Figure19:** répartition des plateaux en lots.

### 2.7.3. Prélèvement des feuilles et préparation des solutions :

Le prélèvement des feuilles (3 feuilles) se fait aléatoirement à partir de chaque lot dans le 3<sup>ème</sup> jour, 6<sup>ème</sup> jour et le 9<sup>ème</sup> jour après traitement.

Après le prélèvement des feuilles on découpe à l'aide d'une lame fine des portions calibrées d'une surface de 0,81 cm<sup>2</sup>.

Par la suite, les portions obtenues sont mises dans des Béchers contenant l'eau distillée stérile puis on agite à 700 t/mn pendant 10mn à fin de libérer le maximum de la bactérie adhérents à la portion.

A l'aide d'une pipette graduée, on prélève 1ml de chaque suspension et on le dépose sous forme des gouttelettes séparées dans les boîtes de Pétri à raison de deux répétitions par suspension, puis on coule le milieu de culture (Gélose nutritive).

Les boîtes préparés pour l'étude de la persistance des bactéries sont incubées à 32°C pendant 24h.



Figure 20 : Libération des spores de la bactérie par agitation

### 2.8. Essai de toxicité de *Bacillus thuringiensis* sur les souris blanches de laboratoire :

#### 2.8.1 Conditions d'élevage :

Dans une température ambiante et un éclairage naturel, les animaux sont abrités dans des cages en plastique avec un couvercle en acier inoxydable à travers le quel on introduit l'eau et la nourriture granulée qui contient des protéines, glucides, cellulose, sels minéraux, acides aminés et des vitamines, les cages contiennent une couche de sciure déposée au fond des cages et renouvelée tout les deux jours.



Figure 21: Cage d'élevage des souris blanches.

#### 2.8.2. Répartition des lots :

Pour réaliser le traitement, les individus sont répartis en 4 blocs, chacun est constitué de 5 individus :

- **Bloc 1:** lot témoin traité par l'eau physiologique.
- **Bloc 2:** traité par la dilution 350  $\mu$ l de *Bacillus thuringiensis* D1
- **Bloc 3:** traité par la dilution 175  $\mu$ l de *Bacillus thuringiensis* D2
- **Bloc 4:** traité par la dilution 78.5  $\mu$ l de *Bacillus thuringiensis* D3

#### 2.8.3. Prise de poids des individus de souris d'élevage :

Chaque jour, les individus de chaque bloc témoins et traités sont pesés individuellement jusqu'au 10<sup>ème</sup> jour afin de calculer l'écart pondérale quotidien ou le gain de poids. Ce dernier est exprimé par la différence entre le poids de l'individu du premier au dernier jour.

Ce calcul permet de traiter les données regroupées en tableaux des différences de poids par le Logiciel SYSTAT en adoptant la méthode ANOVA qui met en évidence l'effet du facteur étudié sur le caractère qui s'exprime au cours de notre expérimentation.

### 2.8.4. Technique de traitement :

Après le calcul de la concentration bactérienne relative à chaque dilution et la répartition des individus ; on procède au traitement biologique.

Avant d'appliquer le traitement, les souris sont mises à jeun pendant 24h puis peser ; après cela on prend l'animal et on le maintient d'une façon à l'immobiliser afin d'arriver à administrer le traitement par injection intra-péritonéale à l'aide d'une seringue après le traitement ils seront pesés chaque jour.

### 2.8.5. Injection intra-péritonéale :

Selon STEPHANIE CARON, Cette méthode consiste à Tenir l'animale tête vers le bas (ainsi les organes descendent par gravité).

- Dans un angle de  $45^\circ$ , insérer une aiguille biseau vers le haut, dans le cadran inférieur droit de l'abdomen.
- Soutirer et vérifier l'absence de sang ou d'urine (si du sang ou de l'urine apparaît, retirer l'aiguille et recommencer).
- Injecter le volume requis.
- Relâcher le piston puis retirer l'aiguille.



Figure 22 : Traitement par injection intrapéritonéale.

- Après 3 jours de traitement, on prélève un individu dans chaque bloc et on fait la dissection pour extraire le foie et on le met dans une solution de formole diluée à 10% afin de réaliser des coupes histologiques.

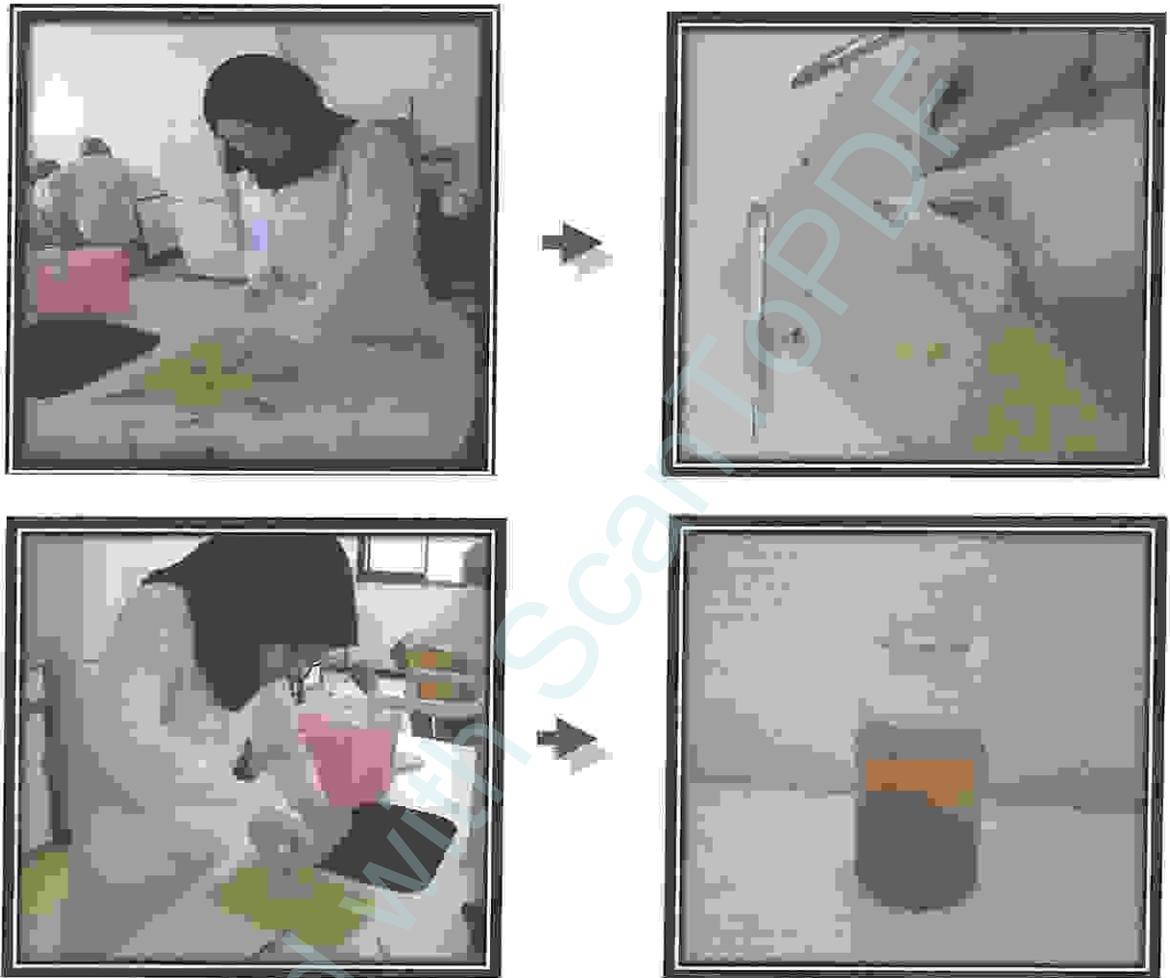


Figure 23: Les étapes d'extraction de foie.

### 2.8.6 Paramètre étudiés :

Après traitement, le suivi des individus dure 10 jours et les paramètres étudiés sont les suivants:

- Le taux de mortalité : c'est le pourcentage des individus morts par rapport au nombre total des individus.
- l'évolution pondérale qui consiste à suivre le poids journalier des individus pendant les 10 jours tout en surveillant la quantité de la nourriture prise.
- Symptômes observés : tout changement éthologique, morphologique et physiologique des souris sont notés durant et après les 10 jours.

# **Chapitre III**

## **Résultats et discussion**

Produced by ScantOPDF

**1. Evaluation de la mortalité des larves L5 de *S.grégaria* sous différentes doses de *B. thuringiensis* :**

D'après (Guendouz 2005) en cas de mortalité observée, les protéines cristallisées exercent leurs effets sur l'hôte en lysant les cellules épithéliales de l'intestin moyen et en provoquant la paralysie du tube digestif. L'insecte infecté cesse de se nourrir et finit par mourir s'il ne parvient pas à se rétablir.

Le tableau suivant montre les différentes valeurs de mortalité enregistrées lors de l'administration du *Bt* avec en différentes doses employées.

Les valeurs enregistrées sont nettement inférieures aux moyennes, cela peut s'expliquer par une mortalité naturelle au cours de l'expérimentation ce qui signifie que les doses employées peuvent nous renseigner sur l'incapacité du bio-pesticide à contrôler une bande larvaire dans des conditions naturelles sous un climat saharien.

**Tableau02 :** Moyennes des mortalités cumulées journalières en %, des larves L5 de *Schistocerca grégaria* (Forsk.) témoins et traités au *Bacillus thuringiensis*.

Temps (J)	T	D1 0.25g	D2 0.5g
	M	M	M
1	0	0	0
2	0	0	0
3	0	0	0
4	0	1,33	2,33
5	0	1,33	2,33
6	0	1,66	2,66
7	0	2,35	3
8	0	2,33	3,22
9	0	3	4,33
10	0	4,33	5,33

J : jour - T : témoin - D : dose - M : moyenne

**2. Etude de la phytotoxicité de *Bacillus thuringiensis* sur feuillage de blé :**

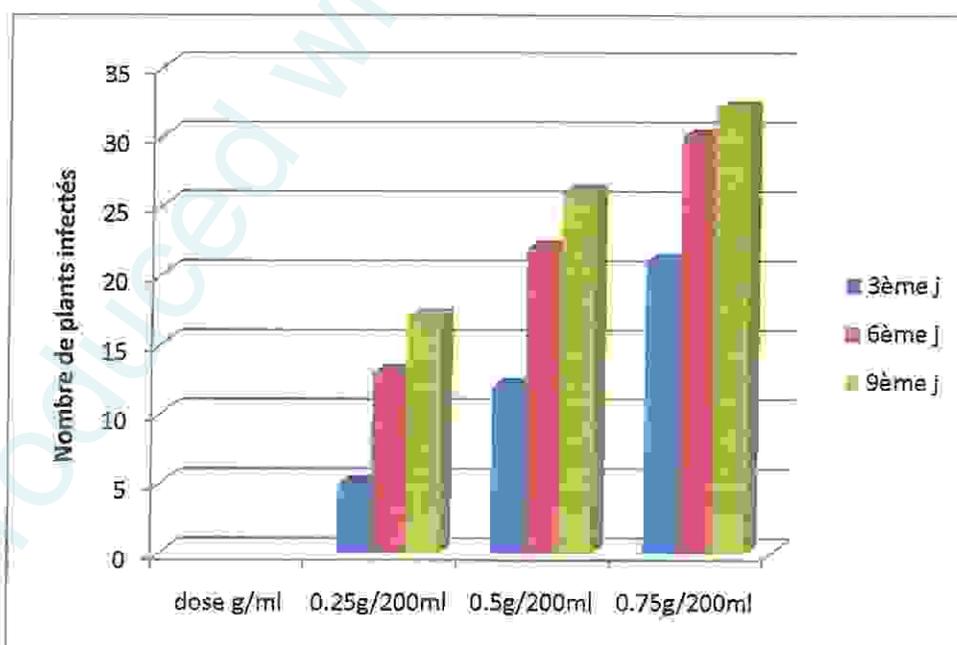
Le tableau suivant montre le nombre des plants présentant des symptômes traités par les différentes doses de *Bacillus thuringiensis* dans le 3<sup>ème</sup>, 6<sup>ème</sup> et 9<sup>ème</sup> jour :

**Tableau03 :** Nombre de plants infectés par *Bacillus thuringiensis*.

jour \ dose g/ml	3 <sup>ème</sup> j	6 <sup>ème</sup> j	9 <sup>ème</sup> j
0.25g/200ml	05	13	17
0.5g/200ml	12	22	26
0.75g/200ml	21	30	32

Le tableau présente le nombre de plants qui ont été observés, ces derniers présentent des symptômes de nature variée à savoir les brulures, le jaunissement, les taches de brunissement, ainsi que des déformations provoquant des retards de croissance.

La figure suivante montre les différences entre les cumules de plants présentant des altérations ces plants sont regroupés par dose. On enregistre la plus grande valeur pour la dose D3 représentée par un nombre de 32 plants altérés. La plus petite valeur a été enregistrée au groupe de la dose D1 au troisième jour avec un nombre de plants de 5.



**Figure 24:** Le nombre des différents plants infectés par les différentes doses de *Bt*.

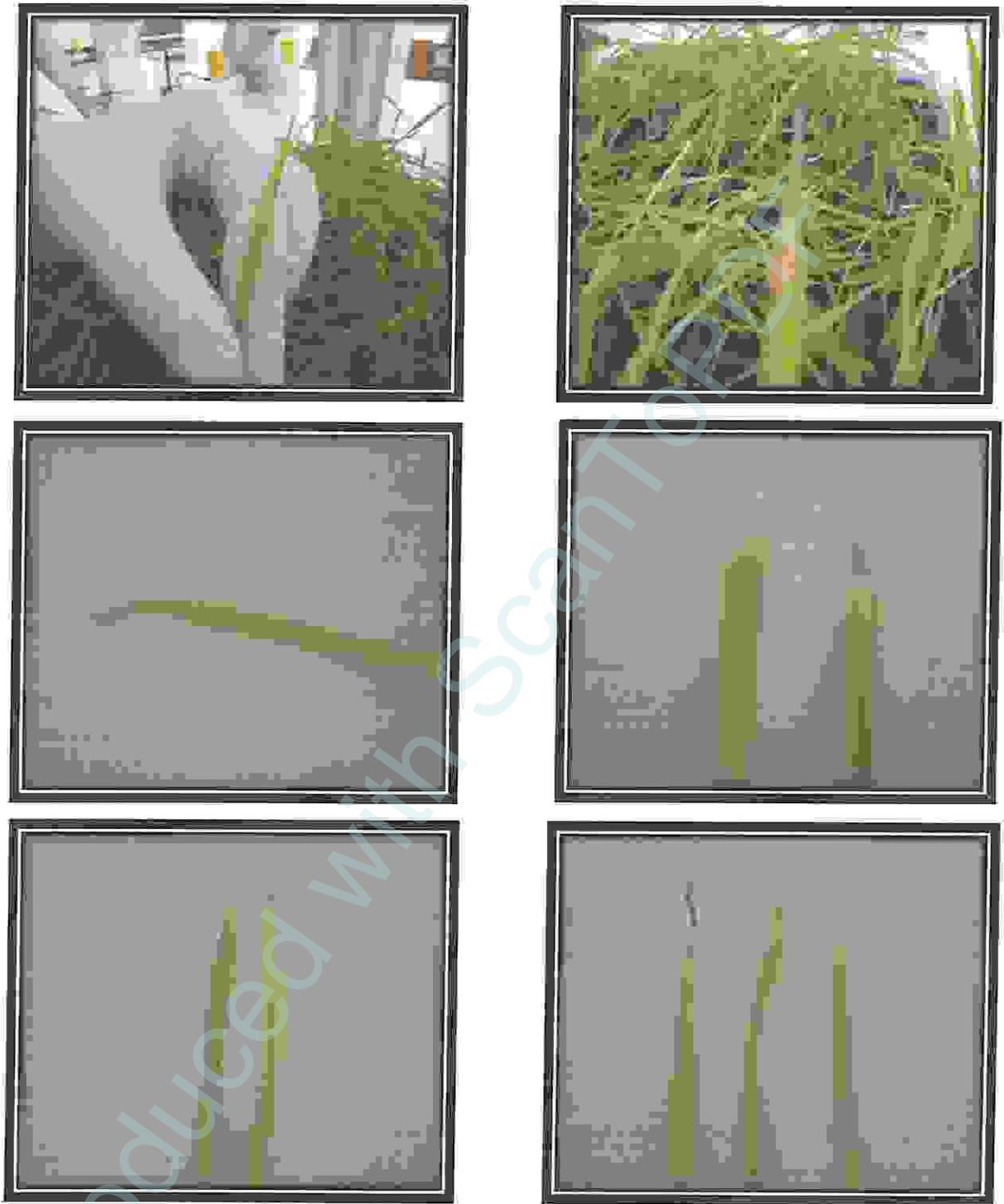


Figure 25 : plants altérés suite à l'application de *Bacillus thuringiensis* présentant les symptômes précités.

Nous avons remarqué une reprise de croissance pour la totalité des plants altérés après la pulvérisation des différentes dilutions de *Bacillus thuringiensis*, cependant les plants qui présentent des symptômes de brûlure et jaunissement ont subi une chute des feuilles touchées.

par le bio-pesticide, cela peut s'expliquer par une réaction du végétal suite à l'application du traitement.

En général, le *Bt* perd 50% de son potentiel insecticide en l'espace de 1 à 3 jours, et une deuxième application est donc souvent nécessaire contre certains insectes comme la spongieuse (*Lymantria dispar* Linnaeus), la tordeuse des bourgeons de l'épinette (*Choristoneura fumiferana* Clemens), la tordeuse occidentale de l'épinette (*Choristoneura occidentalis* Freeman) et la tordeuse du pin gris (*Choristoneura pinus pinus* Freeman) (in Djeddar 2007).

### 3. Etude de la persistance de *Bacillus thuringiensis* sur feuillage de blé :

Les résultats présentant la persistance de *Bacillus thuringiensis* sur le feuillage sont relatifs à la présence ou l'absence des colonies par unité de surface dans chaque lot traité. Ces résultats sont libellés sur le tableau suivant :

Tableau 04 : Présence ou absence des colonies de *Bacillus thuringiensis* sur le feuillage.

Dose g/ml jour	0.25g/200 ml	0.5g/200 ml	0.75g/200 ml
3 <sup>ème</sup> jour	p	p	p
6 <sup>ème</sup> jour	p	p	p
9 <sup>ème</sup> jour	p	p	p

P : présence

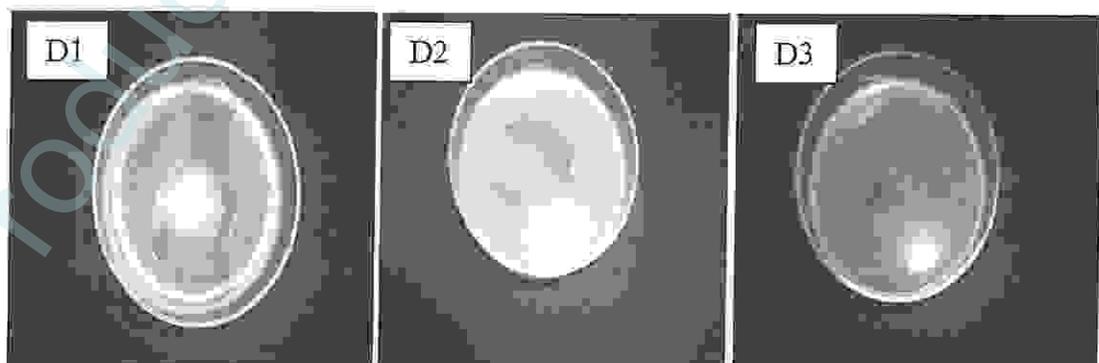


Figure 26 : Présence des spores de *Bacillus thuringiensis* au 3<sup>ème</sup> jour.

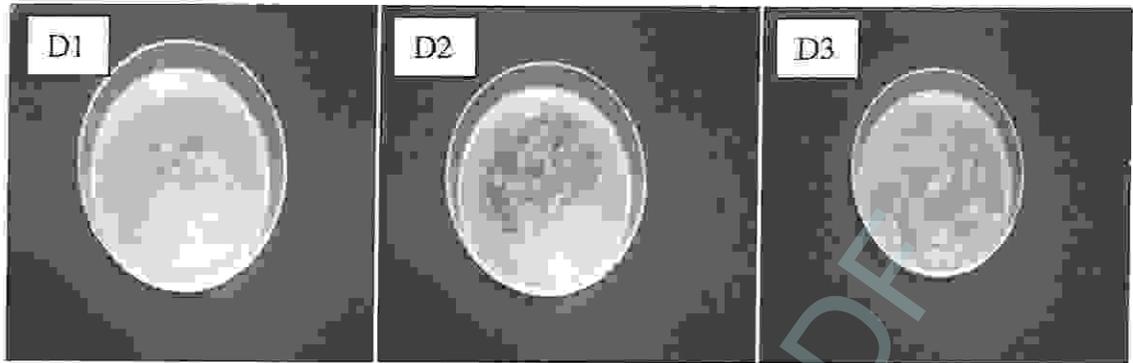


Figure 27 : Présence des spores de *Bacillus thuringiensis* au 6<sup>ème</sup> jour.

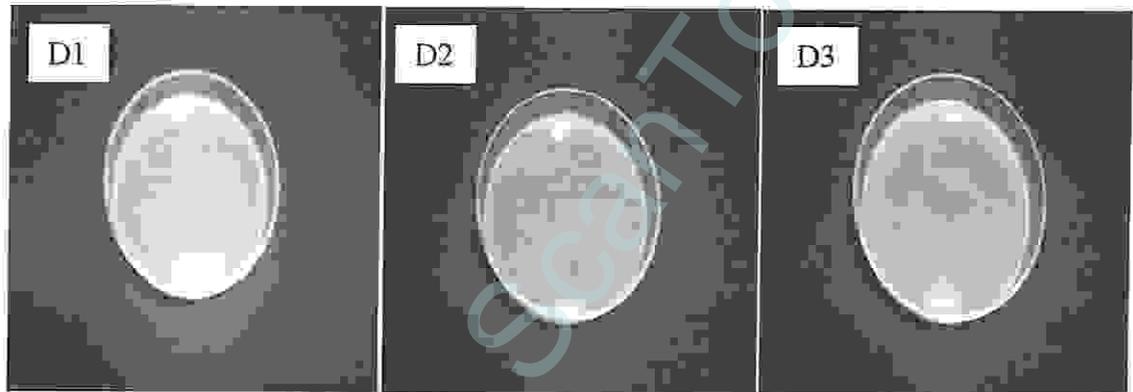


Figure 28 : Présence des spores de *Bacillus thuringiensis* au 9<sup>ème</sup> jour.

Les résultats du tableau et figures révèlent que *Bacillus thuringiensis* est présent tout le long de la période de suivie.

D'après les résultats marqués par Beckwith et Stelzer (1987), *Bacillus thuringiensis* peut persister jusqu'à dix jours sur le feuillage, par contre Joung et Cote (2000) montrent que cette bactérie perd 50% de son potentiel insecticide après le 3<sup>ème</sup> jour de pulvérisation sur feuillage, et une deuxième application est donc souvent nécessaire contre certains insectes.

Contrairement au *Bacillus subtilis* qui persiste sur le feuillage jusqu'au 6<sup>ème</sup> jour après le traitement pour disparaître complètement le 9<sup>ème</sup> jour. (In Djouadi ; 2011)

Cette diminution du nombre des colonies de *B.subtilis* persistant est expliquée par le fait que la bactérie n'a pas pu résister longtemps sur le feuillage car elle n'a pas trouvée les conditions favorables pour son développement. Certains chercheurs ont cependant fait état d'une activité résiduelle plus longue (10 jours) (Beckwith et Stelzer, 1987), et quelques endospores viables de *Btk* ont été isolées sur du feuillage un an après une application au sol de *Btk* effectuée à raison de 1 milliard d'unités internationales (MUI)/arbre (in Djeddar2004)

Le *Bt* est une bactérie du sol indigène qui est répandue dans le monde entier (Martin et Travers, 1989). La forme végétative du *Bt* n'est généralement pas bien adaptée au sol, et sa survie dépend de sa capacité d'atteindre l'habitat spécialisé que constituent les insectes vulnérables.

Les endospores du *Bt* peuvent toutefois survivre dans la majorité des types de sol, quoique leur croissance soit inhibée à des valeurs de pH inférieures à 4,8. Des applications répétées de *Bt* n'entraînent aucune accumulation de la bactérie (in Djezzar ; 2004).

Le devenir du *Bt* dans le sol dépend vraisemblablement de l'intensité de la compétition avec les autres formes microbiennes. En effet, l'abondance du *Bt* diminue rapidement dans les sols non stérilisés, tandis qu'elle peut augmenter dans les sols stérilisés (in Djezzar ; 2004). Inoculé dans le sol à la dose de 10<sup>5</sup> cellules par gramme de sol, le *Bt* s'est maintenu à la densité de 10<sup>3</sup> cellules par gramme pendant 12 à 16 mois. Toutefois, l'abondance relative du *Bt* par rapport à celle des autres bacilles du sol a chuté de 20-40% à environ 10%, ce qui indique que le *Bt* n'est pas bien adapté aux environnements édaphiques. Pruett *et al.* (1980) ont noté qu'après 63 jours, le *Bt* n'avait conservé que 3% de son activité insecticide dans le sol, même si environ 38% des endospores étaient encore viables. Après 135 jours, 23% des endospores étaient encore viables, mais le *Bt* avait complètement perdu son activité insecticide.

#### 4. Etude de la toxicité de *Bacillus thuringiensis* sur les souris blanches de laboratoire :

Le suivi des souris blanches traitées par *Bacillus thuringiensis* à différentes concentrations (350µl, 175µl, 87.5µl) comparativement aux témoins a permis d'évaluer le taux de mortalité et la croissance pondérale durant 10 jours après traitement.

On signale que les trois concentrations utilisées correspondent respectivement aux dilutions 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup> et 10<sup>-3</sup>

##### 4.1. Taux de mortalité :

Aucune mortalité n'est marquée durant toute la période de suivi chez les souris blanches traitées par les différentes concentrations de la suspension bactérienne *Bacillus thuringiensis* (350µl, 175µl, 87.5µl) ainsi que chez les témoins. Cela signifie que la bactérie n'a aucun effet néfaste sur ce petit mammifère.

Selon Meadows, 1993, l'innocuité du *Bt* dans l'environnement est maintenant bien établie, quelques souches sauvages étant appliquées depuis plus de trente ans sans le moindre incident ou dommage sous forme de formulations commerciales en quantités de plus en plus

importantes pour protéger les cultures vivrières, les plantes ornementales, les arbres forestiers et les grains ensilés.

En outre, les nombreux projets de recherche fondamentale et appliquée qui ont accompagné l'exploitation et l'étude du *Bt* nous ont permis d'acquérir des connaissances limitées sur le comportement du microorganisme dans l'environnement (Meadows, 1993).

### 4.2. L'évolution pondérale :

Les résultats de l'évolution pondérale des souris traitées et celles des témoins sont portés sur le tableau suivant :

**Tableau05** :L'évolution pondérale moyenne des souris traitées et témoins avec les différentes doses.

jours \ poids	Témoin	350µl	175µl	87.5µl
1	20.4	28	31.6	31.2
2	19.8	28.6	28.8	29.6
3	19.6	29.8	27.4	28.2
4	23.2	-	27.6	33.6
5	22	-	31	31.2
6	22.8	-	31	29.8
7	24.4	-	31.6	30.2
8	25.2	-	31.8	29.6
9	26	-	33.6	30.6
10	32	-	35.2	33.4

Dans le tableau N°05 on constate que la valeur la plus importante est 35.2g enregistrée le 10<sup>ème</sup> jour correspond à la dose D2= 175µl, suivie de la valeur 33.4g relative à la dose D3= 87.5µl . Le témoin présente une troisième valeur de 32g.

4.2.1. Analyse de la variance :

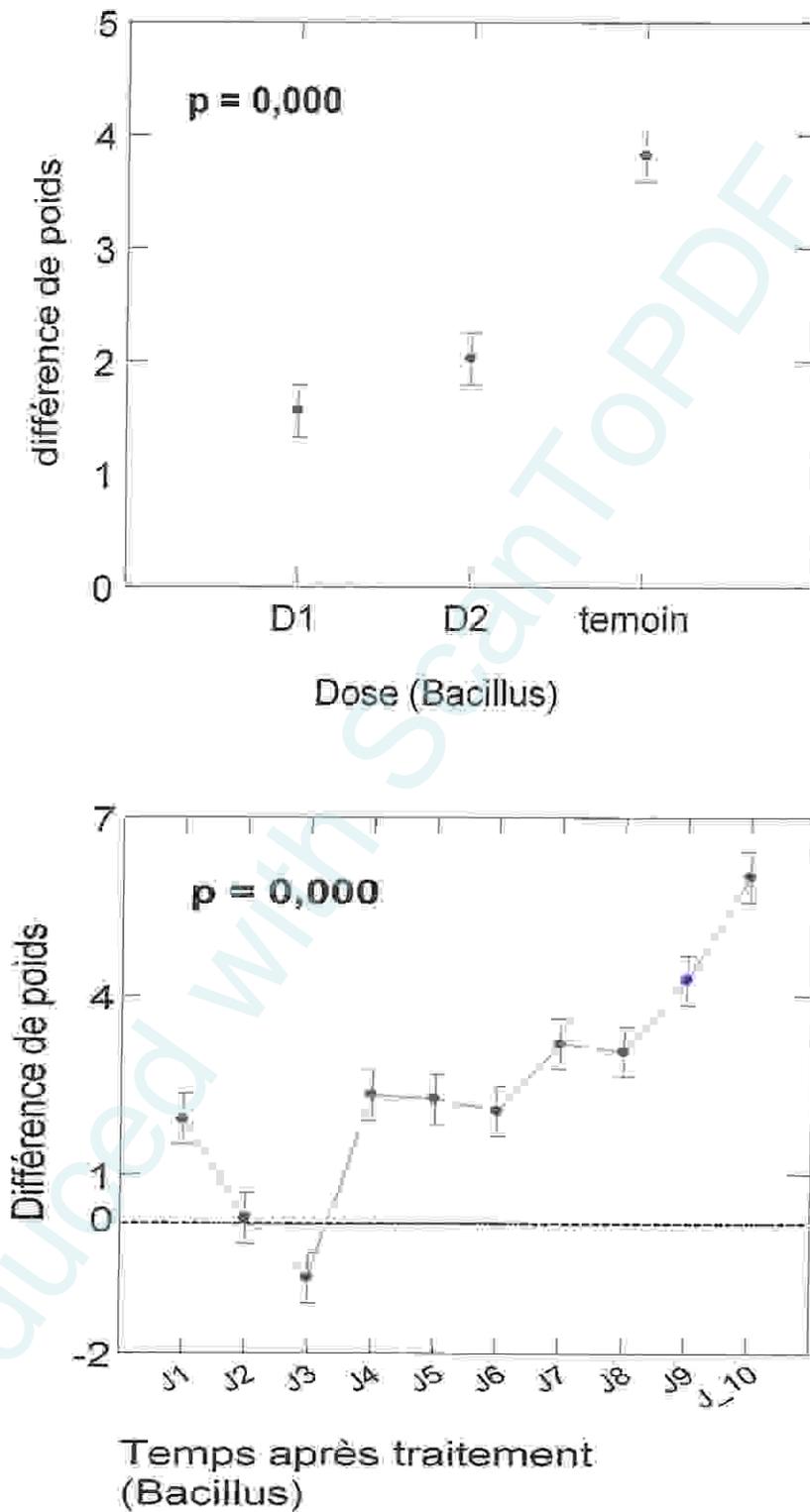


Figure 29 : Différence de poids entre avant traitement et après (la limite est le zéro).

Tableau 06 : Analyse de la variance

Analyse de la variance (ANOVA avec systat vers. 7) (Bacillus)					
Source	somme des carrés des écarts	ddl	Moyenne des écarts	F-Ratio	p
DOSE	142,653	2	71,327	26,95	0,000
TEMPS	483,067	9	53,674	20,28	0,000
DOSE*TEMPS	220,013	18	12,223	4,618	0,000
Varia. Intra.	317,6	120	2,647		

On dit qu'il y'a une :

- Différence significative si  $p < 0,05$ .
- Différence très significative si  $p < 0,01$ .
- Différence hautement significative si  $p < 0,001$ .

D'après le tableau d'analyse de la variance, ce test a révélé une différence hautement significative entre les doses utilisées et le poids, ce dernier varie aussi d'une manière hautement significative dans le temps ( $p = 0,000 < 0,001$ ).

Nous avons pris en considération les différences de poids enregistrées le long de la période de suivi avec une probabilité de ( $p = 0.000$ ).

À partir du mode d'analyse adopté, les valeurs enregistrées signifient que le *Bt* n'influe pas sur la perte du poids des souris au moins dix jours après exposition dans le cas d'une intervention par entomopathogène, et ce en fonction des circonstances d'application du bio-pesticide.

Le *Bt* produit un corps d'inclusion parasporal de nature cristalline durant la sporulation. Ce cristal est constitué de protéines. Un grand nombre de protéines cristallisées apparentées ont été identifiées, et un cristal peut renfermer plusieurs types de protéine. Pour dénouer une situation aussi confuse, Höfte et Whiteley (1989) ont proposé un système de classification des protéines cristallisées et des gènes codant leur synthèse.

Cette classification repose sur la structure des protéines cristallisées et sur la gamme d'hôtes. Plus de 14 gènes codant la synthèse de protéines cristallisées distinctes ont été décrits, et d'autres protéines présentant des propriétés insecticides ont été identifiées récemment (Lereclus *et al.* 1993).

4.2.2. Analyse des coupes histologiques :

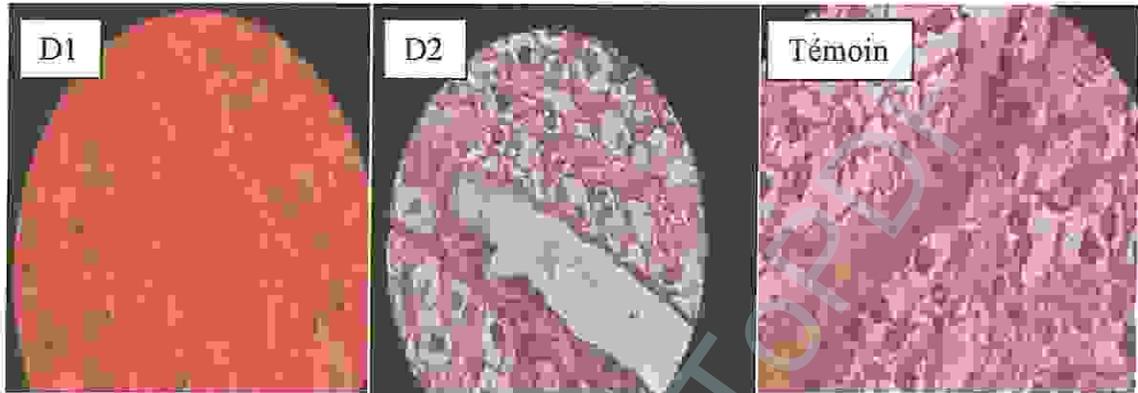


Figure 30 : Des coupes histologiques au niveau des foies des souris.

Dans cette partie nous avons opté pour la réalisation des coupes histologiques au niveau des foies de souris d'élevage, ces individus ont été exposés aux traitements par voie intra-péritonéale.

L'analyse des différentes coupes montre une absence d'anomalies à l'échelle histologique ainsi qu'au cytologique. Une homogénéité est observée chez les différentes images en comparaison avec celles de témoins.

# Conclusion

Produced with ScantOPDF

Cette première initiative qui rentre dans le cadre de notre projet de fin d'étude, l'accent principal a été mise sur l'évaluation d'un *B. thuringiensis* souche pathogène pour les espèces de Lépidoptères ainsi que pour le Criquet pèlerin, et sur le devenir d'une préparation de ce bio-pesticide dans l'environnement.

Bien que plusieurs centaines de *B. thuringiensis* souches ont été testés, aucun isolat n'a pu être trouvée provoquant une mortalité exponentielle chez les criquets. Il est intéressant de chercher d'autres maladies qui peuvent être utilisés dans la lutte biologique par le développement d'un bio-préparation fongique basé sur un principe actif biologique.

Les gènes codent pour la synthèse d'une famille de protéines apparentées présentant des propriétés insecticides (Cry) et sont répartis dans quatre grandes classes, selon que la spécificité des protéines s'exprime à l'endroit des Lépidoptères (I), des Lépidoptères et des Diptères (II), des Coléoptères (III) ou des Diptères (IV). Par conséquent, ces activités sont réduites vis-à-vis le criquet pèlerin.

Chaque classe est divisée en un certain nombre de sous-classes possédant des propriétés insecticides et structurales propres. Récemment, un nouveau système de classification fondé uniquement sur l'identité des acides aminés a été proposé (Crickmore *et al* 1998). Cette nouvelle classification permet de regrouper les toxines étroitement apparentées et élimine la nécessité de soumettre chaque nouvelle toxine à des essais biologiques contre une série sans cesse croissante d'organismes.

Un des principaux avantages du *Bt* comme agent de lutte microbienne réside dans le fait qu'il peut remplacer, du moins en partie, certains des insecticides chimiques les plus dangereux. À l'heure actuelle, les agents de lutte chimique sont utilisés beaucoup plus couramment à l'échelle mondiale que les agents microbiens. Comme il n'est pas certain que tous les pesticides représentent une menace pour l'environnement, leur remplacement par des agents microbiens n'allégerait pas nécessairement les risques pour l'environnement. Néanmoins, pour ce qui est des nombreux pesticides chimiques dont la toxicité s'étend au-delà des ravageurs ciblés, notamment aux animaux et aux humains, l'accès à des agents de lutte biologique plus sûrs, plus sélectifs et biodégradables comporte d'importants avantages au plan écologique. Un des avantages écologiques des agents microbiens provient de leur grande sélectivité, leur action infectieuse ou létale étant limitée à seulement quelques ravageurs ciblés.

À l'avenir, il sera nécessaire d'étudier la stabilité des bio-pesticides employés principalement contre les locustes, de développer de nouvelles formulations sur la base d'huile et émulsions huile / eau et de tester ces différents produits préliminaires dans des conditions tropicales et steppiques. En outre, il est intéressant d'étudier la combinaison de *B. thuringiensis* et d'autres méthodes de lutte par rapport à une action synergique. Dans plusieurs régions du sud algérien, et l'analyse des facteurs environnementaux semble jouer un rôle majeur en tant que facteur de mortalité naturelle de sauterelles. Très peu de résultats ont été publiés sur cette bactérie entomopathogène, d'autres recherches sont nécessaires sur l'écologie et sur les possibilités de son utilisation dans la lutte biologique, son devenir dans l'environnement et son impact sur les différents taxons de la biodiversité des différents types d'écosystèmes.

# Références bibliographiques

Produced with ScanTopDF

- Adang M.J.** 1991. *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: gene structure, action, and utilization. In: Biotechnology for biological control of pests and vectors (Edited by K. Maramorosch). CRC Press, London. pp: 3-23.
- Angsuthanasombat C., Crickmore N. and Ellar D.J.** 1992. Comparison of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* CryIVA and CryIVB cloned toxins reveals synergism *in vivo*. FEMS Microbiology Letters 94: 63-68.
- Annie-monard J.**, 1991- Les stratégies de survie en conditions adverses des acridiens ravageurs d'importance économique en Afrique de l'Ouest. Ed. Dossier de la session de formation, Montpellier, 178 p.
- Aronson, A. J., D.J. Tyrell, P.C-F Itz-jamese T L.A. Bulla** (1982). Relation ship of the syntheses of Spore coat protein and parasporal Crystal protein in *Bacillus thuringiensis*. J. Bacteriol., 151- 399-410
- Bauer, L.S.** 1995. Resistance: a threat to the insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. Florida Entomol. 78(3): 414-442.
- Beegle C.C. and Yamamoto T.** 1992. History of *Bacillus thuringiensis berliner* Research and Development. Canadian Entomologist 124: 587-616.
- Beckwith R.C. and Stelzer M.J.** (1987): Persistence of *Bacillus thuringiensis* in two formulations applied by helicopter against western spruce budworm (Lepidoptera: Tortricidae) in north central Oregon. *Jour. Econ. Entomol.*, 80: 204-207.
- Brar S.K., Verma M., Tyaci R.D. and Valero J.R.** 2006. Recent advances in downstream processing and formulations of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides. Process Biochemistry 41: 323-342.
- Bravo A., Gill S.S. and Soberon M.** 2007. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. Toxicon 49: 423-435.
- Broadwell A.H.** 1994. Molecular biology of *Bacillus thuringiensis*. Agriculture, Ecosystems & Environment 49: 27-29.
- Burges H.D. and Hurst J.A.** 1977. Ecology of *Bacillus thuringiensis* in storage moths. Journal of Invertebrate Pathology 30: 131-139.

- Carozzi N.B., Kramer V.C., Warren G.W., Evola S. and Koziel M.G. 1991.** Prediction of insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains by polymerase chain reaction product profiles. *Applied and Environmental Microbiology* 57: 3057-3061.
- Chang C., Yu Y.M., Dai S.M., Law S.K. and Gill S.S. 1993.** High-level cryIVD and cytA gene expression in *Bacillus thuringiensis* does not require the 20-kilodalton protein, and the coexpressed gene products are synergistic in their toxicity to mosquitoes. *Applied and Environmental Microbiology* 59: 815-821
- CHOPARD L., 1943-Orthoptères de l'Afrique du Nord .Ed.Librairie Larose, Paris, Coll. « Faune de l'empire français », T.1, 450p.**
- Cökmüs C., HakkiSayar A., Saçilik S., Osmanağaoğlu O. and Berber İ. 2000.** Effects of UV-light on *Bacillus sphaericus* and its protection by chemicals. *Journal of Basic Microbiology* 40: 215-221.
- Crecchio C. and Stotzky G. 1998.** Insecticidal activity and biodegradation of the toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* bound to humic acids from soil. *Soil Biology and Biochemistry* 30: 463-470.
- Crickmore, N., Zeigler, D.R., Feitelson, J., Schnepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., and Dean, D.H. 1998.** *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. [Http://www.biols.susx.ac.uk/Home/Neil\\_Crickmore/Bt/index.html](http://www.biols.susx.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/index.html)
- Delecluse A., Poncet S., Klier A. and Rapoport G. 1993.** Expression of cryIVA and cryIVB genes, independently or in combination, in a crystal-negative strain of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Applied and Environmental Microbiology* 59: 3922-3927.
- DeLucca L, A. J., Simonson J. and Larson A. 1979.** Two new serovars of *Bacillus thuringiensis*: serovars *dakota* and *indiana* (Serovars 15 and 16). *Journal of Invertebrate Pathology* 34: 323-324.
- Djezzar M., 2007.-** Effet d'un biopesticide «Green Muscle» sur les différents stades de *Schistocerca gregaria* (Forsk., 1775) (Orthoptera, Acrididae) et impact sur quelques composantes des écosystèmes. Thèse Magister, INA, Alger, 143 p.
- Djouadi W 2011.** Etude de la persistance de trois microorganismes entomopathogènes et contrôle du développement mycélien de *Metarhizium anisopliae* var *acridum*. *mem master en biotechnologie microbienne. dep de biologie.univer de Boumerdess*

- Drummond J. and Pinnock D.E. 1994.** Host spectrum of *Bacillus thuringiensis*. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 49: 15-19.
- Dubois N.R. and Dean D.H. 1995.** Synergism between CryIA insecticidal crystal proteins and spores of *Bacillus thuringiensis*, other bacterial spores, and vegetative cells against *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae) larvae. *Environmental Entomology* 24: 1741-1747.
- Duranton, J.F. & Lecoq, M. 1990.** - *Le Criquet pèlerin au Sahel*. - Coll. : Acridologie opérationnelle, n° 6 - CILSS-DFPV / Ministère des Affaires Étrangères des Pays-Bas / CIRADGERDAT- Prifas : Niamey / La Haye / Montpellier. - 183 p
- Duranton J.-F., Launois M., Launois-Luong M.H. et Lecoq M., 1987-** Guide anti-acridien du sahel. Min. Coop. Dev., Ed. CIRAD-PRIFAS, Montpellier, 344 p.
- Fast, P. G. 1981.** The crystal toxin of *Bacillus thuringiensis*. In : Burges, H. D. (éd.), *Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970-1980*, Academic Press Inc., Londres, RoyaumeUni, pp. 221-248.
- Faust, R. M. et L. A. Bulla 1982.** Bacteria and their toxins as insecticides. In : Kurstak, E. (éd.), *Microbial and Viral Pesticides*, Marcel Dekker, New York, États-Unis, pp.75-207.
- Gill, S.S., Cowles, E.A., and Pietrantonio, P.V. 1992.** The mode of action of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxins. *Ann. Rev. Entomol.* 37: 615-636.
- Gould, G. W. (1969).** The bacterial spore. Academic Press, New York, É.-U., pages-724
- Grasse P. P., 1970.-** Zoologie- Des Invertébrés. Ed. Massons, Paris, 1500 p.
- Guendouz-Benrima A., 2005.-** Ecophysiologie et biogéographie du Criquet pèlerin *Schistocerca gregaria* (Forskål, 1775) (*Orthoptera, Acrididae*) dans le Sud algérien. Thèse de Doctorat d'état, sci. Agro. Inst. Nat. Agro., El Harrach, Alger, 212 p.
- Halvorson, H. G. (1957).** Rapid and simultaneous sporulation. *J. appl. Bact.*, 20 ( 3) : 305-314.
- Hardwick W.A. et J.W. Foster (1969)-** On the nature of sporogenesis in some aerobic bacteria. *J. Gen. Physiol.*, 35 : 907 -927.

- Hastowo S., Lay B.W. and Ohba M. 1992.** Naturally occurring *Bacillus thuringiensis* in Indonesia. *Journal of Applied Bacteriology* 73: 108-113.
- Hemour, S. 2009.** Effet du biopesticide «Green Muscle » (*Metarizium anisopliae* var *acridum*) sur la reproduction du criquet pèlerin *schistocerca gregaria* (Forsk., 1775) (*Acrididae, Cyrtacanthacridinae*) en condition contrôle. Thèse Magister Sci. Agro., Inst. Nat. Agro., El-Harrach, 140p
- Höfte, H., and Whiteley, H.R. 1989.** Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.*, 53: 242-255.
- Huber, H. E. et P. Lüthy. 1987.** *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin : composition and activation. In: Davidson, E. W. (éd.), *Pathogenesis of Invertebrate Microbial Diseases*, Allenheld, Osmun, p. 209-234.
- Ishiwata S. 1901.** On a kind of severe flacherie (sotto disease). *Dainihon Sanshi Kaiho* 114: 1-5.
- Joung K. B. et Cote J. C. (2000)** : Une analyse des incidences environnementales de l'insecticide microbien *Bacillus thuringiensis* .Bulletin technique no. 29. Agriculture et Agroalimentaire, Canada, 14p.
- Kaelin P., Morel P. and Gadani F. 1994.** Isolation of *Bacillus thuringiensis* from stored tobacco and *Lasioderma serricornis* (F.). *Applied and Environmental Microbiology* 60: 19-25.
- Kemassi A., 2004.-** Contribution à l'étude de la bioécoéthologie de *Schistocerca gregaria* (Forsk., 1775) et de *Locusta migratoria* (Linnée, 1758) (Orthoptera- Acrididae) dans les périmètres irrigués sous pivots dans la région de Ouargla. Mém. Ing., Zool. Dép. Agro., Univ. Blida, 101 p.
- Launois-Luong M. H. et Lecoq M., 1989.-** Vade Mecum des criquets du sahel. Collection Acridologie Opérationnelle N°5, C IRAD-PRIFAS, Montpellier, 82 p.
- Launois-Luong M. H., Launois M. et Rachadi T., 1988.-** La lutte chimique contre le criquet du sahel. Collection Acridologie Opérationnelle n°3, CIRAD/PRIFAS, Montpellier, 43 p.

- Launois-Luong M. H. et Popov G. B., 1992.-** *Schistocerca gregaria* (Forskål, 1775) (Acrididea- Cyrtacanthacridinae). Ed. CIRAD- PRIFAS, ISBN. Paris, 45 p.
- Leblanc N., Samson C. (2006) :** Centre D'expertise En Analyse Environnementale Du Québec. *Paramètres d'exposition chez les mammifères – Souris commune*. Fiche descriptive. Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs du Québec, 15 p.
- Lecadet, M.-M. et R. Dedonder. 1971.** Biogenesis of the crystalline inclusion of *Bacillus thuringiensis* during sporulation. *Eur. J. Biochem.*, 23 : 282-294
- Lee, I. H., Je, Y. H., Chang, J. H., Roh, J. Y., Oh, H. W., Lee, S. G., Shin, S. C., and Boo, K. S. (2001).** Isolation and characterization of a *Bacillus thuringiensis* ssp. *kurstaki* strain toxic to *Spodoptera exigua* and *Culex pipiens*. *Curr Microbiol* 43, 284-287.
- Lereclus, D., Bougouin, C., Lecadet, M.M., Klier, A., and Rapoport, G. 1989.** Role, structure, and molecular organization of the genes coding for the parasporal delta-endotoxins of *Bacillus thuringiensis*. In: *Regulation of Prokaryotic Development* (Edited by I. Smith, R.A. Slepecky and P. Setlow). American Society for Microbiology, Washington, D.C. pp: 255-276.
- Lereclus, D., Delécluse, A., and Lecadet, M.-M. 1993.** Diversity of *Bacillus thuringiensis* toxins and genes. In: *Bacillus thuringiensis, an Environmental Biopesticide: theory and practice* (Edited by P.F. Entwistle, J.S. Cory, M.J. Bailey and S. Higgs). Wiley, New York. pp. 37-69.
- Lord J.C. 2005.** From Metchnikoff to Monsanto and beyond: The path of microbial control. *Journal of Invertebrate Pathology* 89: 19-29.
- Ltrndgrerq D. G. et J. J. Cooney (1962)-** Chemical analyses of asporogenic mutants of *Bacillus cereus*. *J. Bact.*, 83 :1287-1293-pages.
- Mahjoub N., 1988.-** Le problème du Criquet pèlerin et les perspectives de sa solution. *Sahel prot. Végé. Info.* (7): 8-11.
- Martin P.A.W. and Travers R.S. 1989.** Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. *Applied and Environmental Microbiology* 55: 2437-2442.

- McGaughey W.H. 1985.** Insect resistance to the biological insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Science* 229: 193-195.
- Meadows M.P., Ellis D.J., Butt J., Jarrett P. and Burges H.D. 1992.** Distribution, frequency, and diversity of *Bacillus thuringiensis* in an animal feed mill. *Applied and Environmental Microbiology* 58: 1344-1350.
- Mohd-Salleh, M.B. et L.C- Lewis (1952).** Toxic effects of spore/crystal ratios of *Bacillus thuringiensis* on European corn borer larvae. *J- Inc. Pathol.*, 39 :290-297.
- Moumen K., 1995.-** Méthodes et techniques des luttres contre les acridiens. Stage de formation en lutte antiacridienne. Ed INPV/OADA, Alger: 137-148.
- Murrell, W-G- (1961).** Spore formation and germination as a microbial reaction to the environment. Dans : *Microbial reaction to environment*, L'ith swposfu\$ñ of the society for society for general microbiologist hetd at the Royal Institution, London 1961, Cambdige University Press, Londres, Royaume-Uni, p. 100-150.
- Pelzcar, M.J., E-C-S. Chan et N.R- Krieg (1993)-** *Microbiologist Concepts and Applications*- McGraw-Hill Inc., New York, É.-U., 896 pages.
- Piggo! P.J.e t J.G. Coote( 1976).** Genetica spects of bacterial endospore formation-B actériol. *Rev.*, 40 (4) :908-962.
- Popov G. B., Duranton J. F. et Gigaul T., 1991.-** Etude des biotopes du Criquet pèlerin *Schistocerca gregaria* (Forskål, 1775) en Afrique du Nord occidentale. *Mini. Coop. Dével.*, CIRAD/ PRIFAS, Montpellier, 753 p
- Popov G. B., Launois-Luong M. H. et Vanderweel F., 1990-** Les oothèques des criquets du sahel. *Collection Acridologie Opérationnelle n°7*, CIRAD/ PRIFAS, Montpellier, 135 p.
- Porcar, M . et V. Juarez-Pérez(2003).** PCR-based identification of *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal genes. *FEMS Microbiol. Rev.*, 26 :419432.
- Powell, J.F. et R.E. Strange (1956)-** Biochemical changes occurring during sporulation n *Bacillus* Species. *BiochemJ.* ,63 (4): 661-668.
- Rachadi T., 1991.-** Précis de lutte antiacridienne: La pulvérisation des pesticides. *Mini. Coop. Dév.*, CIRAD/ PRIFAS, Montpellier, 312 p.

- Roush R.T.** 1994. Managing pests and their resistance to *Bacillus thuringiensis* - Can transgenic crops be better than sprays. *Biocontrol Science and Technology* 4: 501-516.
- Silvy, C., and Riba, G. (1999).** Biopesticides contre maladies, insectes, mauvaises herbes. Les dossiers de l'Environnement, INRA 19, 157-200.
- Sitouh, M.,** 1976 - Relations entre les crues et *Schistocerca gregaria* (Forskål) en phase solitaire dans le Sahara central de 1967 à 1972. - *Ann. Inst. Nat. Agron.* (El Harrach (Algérie), VI(4): 33-83.
- Slepecky, RA. et H.E. Hemphill (1992)-** The genus *Bacillus*-nonmedical- Dans : Balows, H-G., H. G. Triliper, M. Dworkin, W. Harder et k. H. Schleifer (éds), *The Prokaryotes*, 4<sup>e</sup> édition, Springer-Verlag, New York, E.-U., p. 1663 -1696.
- Sneath, P.H.A. (1984).** Endospore-forming Gram-positive rods and cocci. Dans: Bergey, D. H., J. G. Holt et N. R. Krieg (&s), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2, Williams & Wilkins, New York E.-U., chapitre 13.
- Soberon, M., Fernandez, L. E., Perez, C., Gill, S. S., and Bravo, A. (2007).** Mode of action of mosquitocidal *Bacillus thuringiensis* toxins. *Toxicon* 49, 597-600.
- Somerville H.J., Y- Tanada et E.M. Omi (1970).** Lethal effect of purified spore and crystalline endotoxin preparations of *Bacillus thuringiensis* on several lepidopterous insects. *J. Inv. Pathol.*, 16 :241-248.
- Symmons P. M. et Cressman K., 2001.-** Directive sur le Criquet pèlerin I. Biologie et comportement. Ed. FAO/UN, Rome, 43 p.
- Valéro, J.R., S. Mohammadi, N.J. Payne et R.D. Tyagi (1999)-** Microbial control of defoliating insects. *Recent Res. Dev. Microbiol.*, 3 :455-464.
- Vassal J.M., 2004.** *Bacillus thuringiensis*: mode d'action et résistance. Atelier Projet GERICO du 06 au 10 Décembre 2004. (CD-R)
- Watkinson I.** 1994. Global view of present and future markets for Bt products. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 49: 3-7.
- Young J.M., Chilcott C.N., Broadwell A., Wigley P.J. & Lecadet M.M., 1998.** Identification of serovars of *Bacillus thuringiensis* Berliner 1915 in New Zealand. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 26, 63-68.



# Annexe

Produced with ScantOPDF

**Annexe01 : Matériels non biologique :****1. Matériel d'élevage des souris :**

- Cages en plastique 30 x 20 cm.
- Biberons en plastique.
- Sciure.

**2. Matériel de culture de blé :**

- Tourbe
- Plateau à alvéole
- Pulvérisateur

**3. Appareillages :**

- Autoclave
- Agitateur a plaque chauffante
- Balance de précision
- Balance
- Bain marie
- Etuve

**Annexe02****Tableau2 :Evolution pondérale des souris traités par la dose 175 $\mu$ l avant et après traitement**

individus	J0	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7	J8	J9	J10
1	31	30	28	26	27	30	30	31	30	32	33
2	29	33	29	28	28	31	31	32	32	34	36
3	29	32	29	26	26	30	30	31	32	33	34
4	30	31	29	29	29	32	32	32	33	35	37
5	28	32	29	28	28	32	32	32	32	34	36

**Tableau3 :** différence de poids entre avant traitement et après ( la limite est le zéro).

J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7	J8	J9	J10
-1	-3	-5	-4	-1	-1	0	-1	1	2
4	0	-1	-1	2	2	3	3	5	7
3	0	-3	-3	1	1	2	3	4	5
1	-1	-1	-1	2	2	2	3	5	7
4	1	0	0	4	4	4	4	6	8

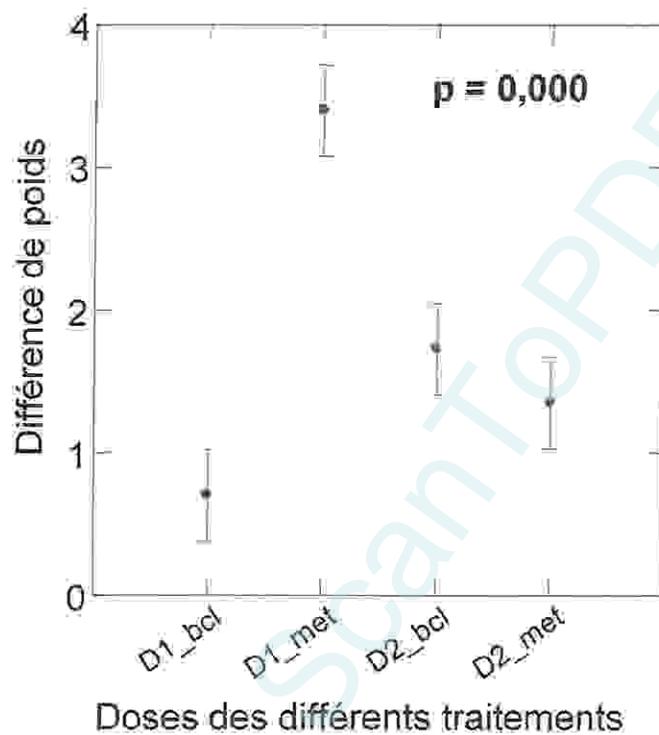
**Tableau4 :** Evolution pondérale des souris traitées par la dose 87.5 $\mu$ l avant et après traitement

individus	J0	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7	J8	J9	J10
1	30	33	30	29	34	34	32	32	30	30	33
2	25	26	25	24	29	26	25	27	26	28	30
3	28	29	29	28	33	30	30	31	31	32	35
4	33	36	34	32	38	34	32	33	30	31	34
5	28	32	30	28	34	32	30	32	31	32	35

**Tableau5 :** différence de poids entre avant traitement et après (la limite est le zéro).

J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7	J8	J9	J10
3	0	-1	4	4	2	2	0	0	3
1	0	-1	4	1	0	2	1	3	5
1	1	0	5	2	2	3	3	4	7
3	1	-1	5	1	-1	0	-3	-2	1
4	2	0	6	4	2	4	3	4	7

**Figure1** : Comparaison de l'effet des deux traitements utilisés (analyse de toxicité sur les souris d'élevage) montrant l'absence de signification.



Produced with ScanTOPDF

# Résumé

Produced With ScantOPDF

La présente étude rentre dans le cadre de l'évaluation biologique des bio-pesticides à base de bactérie entomophage homologuée dans le marché international. Dans notre pays, la recommandation des traitements antiparasitaires possédant un principe actif biologique, inscrits dans le cadre des méga-programmes de lutte biologique contre le Criquet pèlerin impose l'évaluation du devenir des entités biologiques utilisées en bio-contrôle. Pour cela nous avons appliqué par contact 3 doses exprimées en ml sur des larves L5 de *S. gregaria*, avec des témoins traités par l'eau distillée, ces doses ont été évaluées en fonction des facteurs temps. Dans les quatre blocs une présélection des individus a eu lieu pour l'homogénéisation des conditions d'expérimentation et l'élimination des sources d'erreur dans une première étape.

Une deuxième étape consiste à la détermination d'une part du degré de phytotoxicité provoquée sur le végétale lors de l'application des différentes doses de *B. turingiensis*, et d'autre part des effets perturbateurs qui se résument en l'évolution pondérale et l'observation des coupes histologiques au niveau des foies des individus de souris d'élevage dans le but de montrer l'impact de l'utilisation des bio-pesticides sur la faune domestique et les risques attendus pour l'homme lors de la manipulation des produits phytopharmaceutiques d'origine biologique. Dans cette approche, nous avons enregistré une très faible mortalité des larves L5, la probabilité est orientée vers la mortalité naturelle.

Outre le test statique ANOVA adopté pour la détermination des différences en fonction du temps et doses, mettant en cause l'évolution pondérale des souris d'élevage a montré une différence hautement significative pour toutes les doses testées avec des probabilités inférieures à 0.001. Cependant le test de phytotoxicité nous a permis de qualifier les symptômes au type passager suite à une pulvérisation des solutions de *B. turingiensis* avec les différentes doses appliquées, une reprise de croissance a été enregistrée dans tous les cas d'étude.

Le dernier test de toxicité a mis en évidence la réalisation des coupes histologique des organes de foies de souris d'élevage, l'analyse qualitative des images de coupes montre l'absence d'anomalies des échantillons traités comparés aux témoins.

**Mots clés :**

*Schistocerca gregaria*, toxicologie, *Bacillus turingiensis*, ANOVA, Phytotoxicité.

This study falls within the framework of the biological assessment of bio-based pesticides approved entomophage bacteria in the international market. In our country, recommending treatments for parasites with a biological active ingredient, listed in the mega-biological control programs against the locusts requires the assessment of the fate of biological entities used in bio-control. For this we applied by contact 3 doses expressed in ml of L5 larvae of *S. gregaria*, with controls treated with distilled water, these doses were evaluated based on time factors. Within four blocks a screening individuals held for the homogenization of experimental conditions and eliminating sources of error in a first step

A second step is to determine a part of the degree of phytotoxicity caused the plant when applying different doses of *B. turingiensis*, and other disruptive effects which are summarized in the weight change and the observation of histological sections in livers of individuals breeding mice in order to show the impact of the use of bio-pesticides on domestic animals and expected risk to humans when handling plant protection products of biological origin. In this approach, we achieved a very low mortality L5 larvae, the probability is oriented natural mortality

Besides static ANOVA test applied to the determination of differences in function of time and dose, implicating the weight change of the mice breeding showed a highly significant difference for all doses tested below 0001 probabilities. However, the phytotoxicity test allowed us to describe the symptoms to the passenger, following a spray solutions *B. turingiensis* with different doses applied, a resumption of growth was recorded in all the case studies

The last toxicity test showed the achievement of histological sections of organs liver breeding mice, the qualitative analysis of images of sections shows no abnormalities treated samples compared to controls.

**Keywords:**

*Schistocerca gregaria*, toxicology, *Bacillus turingiensis*, ANOVA, Phytotoxicity.

Produced with

لدراسة الحالية تتمثل في إطار التقييم البيولوجي للمبيدات البيولوجية القائمة على استعمال البكتيريا الفتاكة للحشرات الضارة المعتمدة على مستوى السوق العالمي. على مستوى بلدنا النصح بالمبيدات المضادة للأوبئة و التي تعتمد على المكافحة الطبيعية المسجلة في إطار مشاريع ضخمة للمكافحة البيولوجية ضد للجراد الصحراوي تفرض تقييم مدى تطور الفئات البيولوجية المستعملة في المضادات البيولوجية من هذا المنطلق تطرقنا إلى تطبيق ثلاث جرعات على يرقات الجيل الخامس للجراد الصحراوي عن طريق التلامس.

هذه الجرعات قد قيمت بالنسبة لعامل الوقت في الأربع جوانب قمنا باختبار أفراد لتسهيل عملية و ظروف التجربة و إبعاد مصادر الأخطاء في المرحلة الأولى.

المرحلة الثانية تعتمد على تحديد درجة التسمم المسببة في النبات أثناء تطبيق مختلف جرعات هذه البكتيريا ومن جهة أخرى عوامل الاضطراب التي تتلخص في تطور الوزن و ملاحظة المقاطع النسيجية على مستوى الكبد لفئران التجارب. الهدف إبراز تأثير استعمال المبيد الطبيعي على الأنواع الصديقة و الأخطار المنتظرة للإنسان هذه المبيدات الطبيعية في هذا المجال سجلنا نسبة وفيات جد منخفضة ليرقات الجيل الخامس و الأمتثال سوجه إلى وفيات طبيعية. أما بالنسبة للدراسة الإحصائية سجلنا وجود فرق نسبي جد عالي عند دراسة فرق الوزن بالنسبة لتجربة تسمم النبات أبرزت أعراض مؤقتة على مستوى الأوراق.

في الأخير تجربة التسمم تضمنت وجوب دراسة المقاطع النسيجية التي بدورها لم تظهر فروق على المستوى النسيجي أو الخلوي.

الكلمات المفتاحية :

*Schistoserca grégaria*, علم التسمم, *Bacillus thuringiensis*, ANOVA, تسمم النبات.