

UNIVERSITE SAAD DAHLEB- BLIDA 1
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie et Physiologie Cellulaire

THESE DE DOCTORAT 3^{ème} cycle (LMD)

En Biologie

Spécialité : Biologie et santé

Thème

**EVALUATION DE LA TOXICITE DE L'IMIDACLOPRIDE (INSECTICIDE
CHIMIQUE NEONICOTINO DE) ET *METARHIZIUM ANISOPLIAE*
(BIOINSECTICIDE ENTOMOPATHOGENE) SUR TERRAIN ET EN
CONDITIONS CONTRÔLÉES**

Présenté par

Fatima ARKAM

Devant le jury composé de :

| | | |
|--------------------|-----------------------------|---------------|
| A. Benrima | Professeur, U. de Blida1 | Présidente |
| F.Z. Bissaad | Professeur, U. de Boumerdes | Examinatrice |
| F. Hamaidi-Chergui | MCA, U. de Blida1 | Examinatrice |
| F.Z. Kara-Toumi | Professeur, U. de Blida | Promotrice |
| G. Tail-Halil | Professeur, U. de Blida | Co-promotrice |

Blida, juin, 2019

REMERCIEMENT

Tout d'abord, louange à « Allah » le tout généreux qui m'a guidé sur le droit chemin et m'a accordé le courage et la santé tout au long du travail. Sans sa miséricorde, ce travail n'aura pas abouti.

Au terme de ce travail, je tiens à exprimer toute ma reconnaissance et mes remerciements à ma directrice de thèse, **Mme Kara-Toumi Fatma Zohra**, Professeur à l'université de Blida 1 pour avoir dirigé ce travail et pour l'intérêt qu'elle porte pour cette étude, ses encouragements, sa disponibilité et sa patience pour mener à bien ce modeste travail.

Je ne sais combien remercier **Mme SAIDI Fairouz**, Professeur à l'université de Blida1 et la directrice de notre laboratoire de recherche, pour sa disponibilité et de ses précieux aides, conseils et orientations. Qu'elle trouve ici l'expression de toute ma profonde gratitude et mes cordiaux remerciements.

Mes sincères remerciements à ma co-directrice de thèse, **Mme Tail-Halil Ghania**, Professeur à l'université de Blida1 et chef de département de Biologie des populations et des organismes, pour ses orientations et ses conseils.

Je voudrais également exprimer mes vifs remerciements aux membres de jury qui ont bien voulu examiner ce travail à savoir :

Mme **Benrima Atika**, Professeur à l'université de Blida1 et Doyenne de la faculté SNV, pour avoir bien voulu présider le jury.

Mme **Hamaidi-Chergui Fella**. Maitre de conférences à l'université de Blida-1, pour avoir accepté de juger notre travail et d'apporter ses critiques constructives.

Je ne saurais aussi remercier **Mme Bissaad Fatma Zohra**, Maitre de conférences à l'Université de Boumerdes, pour avoir accepté de faire partie du jury et d'avoir bien voulu être également examinateur de ce modeste travail.

Il m'est très agréable de remercier également **Mr. Lazar Mohamed**, Chef de département de lutte antiacridienne de l'Institut National de la Protection des végétaux d'El Harrach- Alger, de m'avoir donné toute les facilitées pour la réalisation de mes expérimentations

Je tien à remercier particulièrement **Dr Saadi Leila**, Maitre de conférence à l'université de Blida1 et Chef de département de Biologie et physiologie cellulaire, qui n'a jamais cessé de me soutenir et de m'encourager. Qu'elle trouve ici l'expression de ma profonde gratitude.

Je saisie cette opportunité pour remercier également tous les membres du Conseil Scientifique de la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie.

يقتصر عملنا على عدة جوانب، من خلال الأول تطرقنا إلى جانب المكافحة بواسطة مبيد الحشرات، إيميداكلوبريد و المبيد الحيوي، رين ماسل اللذان تم تطبيقهما ضد حوريات *Doclostaurus maroccanus* (3 4) في المنطقة "مرحوم". الوظيفة الفتاكة المعتبرة للإيميداكلوبريد تحصلنا عليها 24 من تطبيق 1/8 الجرعة الموصى بها. رش المبيد الحيوي بكمية 50 g/ha 25 g/ha 12,5 g/ha احدث تأثيرا معتبرا على وفيات الحوريات. في اليوم التاسع الذي يلي فعالية المحصل عليها هي 53, 20% 41, 80%

25% على التوالي. تتضح الوظيفة المضادة للحشرات *Metarhizium anisopliae*

نسيجي عا تأثير

أظهرت *M. anisopliae*

م الفطر. وفيات أن المستويا

حوريات الجراد المغربي المعالجة في المخبر بالإيميداكلوبريد و *M. anisopliae* تركيز الجرعة وال . كما تزداد قيم DL50 TL50 المتحصل عليها وفقا للزيادة في تقدم عمر الحوريات. و في جانب آخر، تطرقنا إلى البحث لدى الجرذان الإناث ويستار عن تأثير 10/1 80/1 100/1 200/1 من الجرعة المميته الوسطية للإيميداكلوبريد و رين ماسل التوالي، على الكبد، الكليتين، الرنتين وعلى الأمعاء الدقيقة. و ذلك بال

الشاهدة. التسمم الشبه الحاد بالإيميداكلوبريد تأثيرا معتبرا في الزيادة النسبية لأوزان الفئران و

بعض الضوابط الدموية. كما بينت الدراسة النسيجية المرضية وجود تلف نسيجي متعدد، توسع

في الأوعية الدموية مع تسلل الخلايا و إحتقان الدم. بالنسبة للمبيد الحيوي، أظهرت اختبارات وظائف

الكبد والكليتين اضطرابات إحصائية غير معتبرة. بينما أظهرت

عدد الكريات الدموية البيضاء و الحمراء وفي كمية مكداس الدم والهيموغلوبين. كما

النسيجية وجود بعض التغيرات ثر أهمية مع الزيادة في الجرعة. هذه الاضطرابات

توضح الطابع الإلتهابي والمناعي للمعالجة الشبه مزمنة بالفطر.

الكلمات المفتاحية : إيميداكلوبريد ، رين ماسل، *Doclostaurus maroccanus*

الفئران ويستار، السمية، الالتهاب.

RESUME

Notre travail comporte plusieurs volets ; A travers le premier, nous avons approché l'aspect lutte avec l'insecticide, imidaclopride et le biopesticide, Green muscle qui sont appliqués contre les larves de *Doclostaurus maroccanus* (L3 et L4) dans la région « Marhoum ». L'action létale significative de l'insecticide est atteinte dans les 24h qui suivent le traitement avec 1/8 de la dose recommandée. La pulvérisation de Green muscle à raison de 50 g/ha, 25 g/ha et 12,5 g/ha affecte significativement la mortalité des larves. Au 9e jour après traitement, les taux d'efficacité atteignent respectivement 53,20%, 41,80% et 25%. L'activité entomopathogène de *Metarhizium anisopliae* s'est révélée par des lésions intestinales et cuticulaire et par un effet cytopathologique au niveau de l'hémolymphe. Dans un second volet, nous avons étudié les caractéristiques de *M. anisopliae* qui s'est développé sur différents milieux de culture. Les résultats montrent que les faibles températures et teneurs en activité de l'eau ralentissent la germination. Au laboratoire, les mortalités des larves de criquet marocain traitées avec l'imidaclopride et *M. anisopliae* dépendent du temps et des doses appliquées. Les valeurs des DL50 et TL50 obtenues augmentent en fonction de l'avancement des stades larvaires. Dans un autre volet, nous nous sommes proposé de rechercher, chez les rats Wistar femelles, l'impact de 1/10 et 1/80 DL50 de l'imidaclopride, et 1/10, 1/100 et 1/200 DL50 de Green muscle sur le foie, les reins, les poumons et sur l'intestin grêle, par des comparaisons avec les rats témoins. La toxicité subaiguë de l'imidaclopride change significativement l'augmentation relative des poids corporels et certains paramètres sanguins. L'étude histopathologique a montré de multiples lésions, une vasodilatation avec des infiltrations cellulaires et des congestions sanguines. Quand au biopesticide, les explorations fonctionnelles rénale et hépatique montrent quelques perturbations non significatives. Cependant, la forte dose a montré des augmentations significatives en nombre de leucocytes et d'érythrocytes et en taux de l'hématocrite et de l'hémoglobine. Les coupes histologiques ont révélé quelques altérations qui semblent être plus importantes en fonction de la dose. Ces anomalies révèlent le caractère inflammatoire et immunogène de l'administration subchronique de *M. anisopliae*.

Mots clés : imidaclopride, Green muscle, *Doclostaurus maroccanus*, la région Marhoum, rats Wistar, toxicité, inflammation.

ABSTRACT

Our work has several components, Through the first, we approached the fights aspect with the insecticide, imidacloprid and the biopesticide, green muscle which are applied against the larvae of *Dociostaurus maroccanus* (L3 and L4) in the region "Marhoum". The significant lethal action of imidacloprid is reached in the 24 h which follow the treatment with 1/8 of the recommended amount. The pulverization of green muscle at the amount of 50 g/ha, 25 g/ha and 12, 5% affects significantly the larves's mortalities. At the 9th day after treatments, the average effectiveness are 53,20%, 41,80% and 25% respectively. The entomopathogenic activity of *Metarhizium anisopliae* is revealed by an intestinal and cuticular lesions and a cytopathogenic effect on the hemolymph's level. In a second component we studied the characteristics of *M. anisopliae* which developed on various growth media. The results show that the low temperatures and the low contents of water activity slow down the germination. At the laboratory, the mortalities of the Moroccan locust larvae treated with imidacloprid and *M. anisopliae* depend on time and applied doses. The values of the LD50 and LT50 obtained increase according to the advancement of the larval's stages. In another shutter, we are proposed to search, in the females rats Wistar, the impact of 1/10 and 1/80 LD50 of imidacloprid and of 1/10, 1/100 et 1/200 LD50 of green muscle on the liver, the kidneys, the lungs and on the small intestine, by comparaisons with the control rats. The imidacloprid's subacute toxicity changes significantly the relative augmentation in body weight and certain blood parameters. Histopathological study has showed multiple lesions, a vasodilatation with celullar infiltrations and blood congestion. With the biopesticide, renal's and liver's functions tests have showed some non-significant changes. However, the strong dose has revealed a significant increases in the numbers of leucocytes and erythrocytes and in the concentrations of hematocrit and hemoglobin. Histological sections revealed some alterations that appear to be more important depending on the dose. This anomalies reveal the inflammatory and immunogenic character of the subchronic *M. anisopliae* administration.

Keywords : imidacloprid, green muscle, *Dociostaurus maroccanus*, the region Marhoum, Wistar rats, toxicity, inflammation.

TABLE DES MATIERES

| | |
|---|-----------|
| RESUME | 1 |
| REMERCIEMENTS | 4 |
| TABLE DES MATIERES | 5 |
| LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX | 9 |
| INTRODUCTION | 15 |
| CHAPITRE 1 : DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES | |
| 1.1- Données bibliographiques sur le criquet marocain | 20 |
| 1.2. Stratégies et modalités de lutte antiacridienne | 32 |
| 1.3. Données bibliographiques sur <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i> | 36 |
| 1.4. Données bibliographiques sur le rat Wistar | 46 |
| 1.5. Données bibliographiques sur l'imidaclopride | 47 |
| CHAPITRE 2 : PRESENTATION DE LA REGION D'ETUDE | |
| 2.1. Présentation et situation géographique de la région d'étude | 51 |
| 2.2. Géomorphologie | 52 |
| 2.3. La végétation | 53 |
| 2.4. Le climat | 54 |
| 2.5. La cible des traitements de terrain | 55 |
| 2.6. Faune prédatrice naturelle de la région d'étude | 55 |
| CHAPITRE 3 : MATERIELS ET METHODES | |
| 3.1. Présentation des principaux matériaux utilisés | 57 |
| 3.1.1. Matériels biologiques | 57 |
| 3.1.2. Matériels non biologiques | 58 |
| 3.2. Méthodes des études de terrain avec MIDA® et Green muscle® | 60 |
| 3.2.1. Essai de lutte en milieu naturel avec l'insecticide, imidaclopride | 60 |
| 3.2.2. Essai de lutte en milieu naturel avec le biopesticide, Green muscle | 63 |
| 3.2.3. Traitements des données relatives aux essais de terrain | 67 |
| 3.2.4. Effet de <i>M. anisopliae</i> sur l'histologie de la cuticule et du tube digestif | 68 |
| 3.2.5. Effet de <i>M. anisopliae</i> sur l'hémolymphe des larves <i>D. maroccanus</i> | 69 |
| 3.3. Evaluation de quelques paramètres biologiques de <i>M. anisopliae</i> | 70 |
| 3.3.1. Techniques d'isolement et de multiplication de <i>Metarhizium anisopliae</i> | 70 |
| 3.3.2. Impact de quelques facteurs abiotiques sur quelques paramètres biologiques de <i>M. anisopliae</i> | 72 |
| 3.3.3. Analyse statistique | 74 |

| | |
|--|-----|
| 3.4. Tests de mortalité avec l'imidaclopride et <i>M. anisopliae</i> sur les larves | |
| <i>D. maroccanus</i> dans les conditions contrôlées | 74 |
| 3.4.1. Traitement des larves de <i>D. maroccanus</i> avec l'insecticide MIDA | 74 |
| 3.4.2. Traitement des larves de <i>D. maroccanus</i> avec <i>M. anisopliae</i> | 75 |
| 3.4.3. Évaluation de la mortalité des larves traitées avec <i>M. anisopliae</i> et MIDA | 76 |
| 3.4.4. Calcul des DL50 et des DL90 | 77 |
| 3.4.5. Calcul de TL 50 | 77 |
| 3.4.6. Analyses statistiques des tests de mortalité | 78 |
| 3.5. Etudes de l'aspect toxicologique de MIDA® et Green muscle® | 79 |
| 3.5.1. Etude de la toxicité subaigüe de l'imidaclopride chez les rats Wistar | 79 |
| 3.5.2. Etude de la toxicité subchronique de Green muscle chez les rats Wistar | 79 |
| 3.5.3. Sacrifice des rats et prélèvement des échantillons | 81 |
| 3.5.4. Effet des traitements avec MIDA et GM sur l'évolution du poids corporel des rats et sur le poids des organes étudiés | 81 |
| 3.5.5. Effet des traitements avec MIDA et GM sur quelques paramètres sanguins | 81 |
| 3.5.6. Étude histopathologique chez les rats traités avec MIDA et GM | 86 |
| 3.5.7. analyse statistique | 87 |
| CHAPITRE 4 : RESULTATS ET DISCUSSION | |
| 4.1. Evaluation de l'efficacité de l'imidaclopride sur les larves de <i>D. maroccanus</i> traitées sur terrain | 89 |
| 4.1.1. Effet des traitements par contact avec l'imidaclopride | 89 |
| 4.1.2. Évaluation de l'effet rémanent de l'imidaclopride | 91 |
| 4.1.3. Discussion | 93 |
| 4.2. Evaluation de l'effet de Green muscle sur les larves traité sur terrain | 94 |
| 4.2.1. Effet sur le comportement et la morphologie des larves | 95 |
| 4.2.2. Effet sur la mortalité des larves de <i>D. maroccanus</i> | 96 |
| 4.2.3. Effet de <i>M. anisopliae</i> sur l'histologie du tégument | 99 |
| 4.2.4. Effet de <i>M. anisopliae</i> sur l'histologie du tube digestif | 101 |
| 4.2.5. Effet de <i>M. anisopliae</i> sur l'hémolymphe chez les larves <i>D. maroccanus</i> | 107 |
| 4.2.6. Discussion | 113 |
| 4.3. Etude de quelques aspects bioécologiques de <i>Metarhizium anisopliae</i> | 122 |
| 4.3.1. Effet des milieux de cultures et des températures d'incubation sur la croissance mycélienne et pondérale de <i>M. anisopliae</i> | 122 |
| 4.3.2. Effet de quelques facteurs abiotiques sur la sporulation de <i>M. anisopliae</i> | 128 |
| 4.3.3. Discussion | 134 |
| 4.4. Evaluation de l'efficacité de l'imidaclopride sur les larves <i>D. MAROCCANUS</i> | |

| | |
|---|------------|
| dans les conditions de laboratoire | 138 |
| 4.4.1. Effet sur la mortalité des larves | 138 |
| 4.4.2. Calcul de TL50 | 140 |
| 4.4.3 Calcul de DL50 et DL90 | 143 |
| 4.4.4. Discussion | 144 |
| 4.5. Evaluation de l'efficacité de <i>M. anisopliae</i> sur les larves <i>D. maroccanus</i> | |
| dans les conditions de laboratoire | 146 |
| 4.5.1. Effet de <i>M. anisopliae</i> sur la mortalité des larves | 146 |
| 4.5.2. Calcul de TL50 | 148 |
| 4.5.3. Calcul des DL50 et des DL90 | 151 |
| 4.5.4. Discussion | 152 |
| 4.6. Etude de quelques aspects de la toxicité subaigue | |
| de l'imidaclopride chez les rats Wistar | 154 |
| 4.6.1. Effet des traitements sur le comportement des rats | 154 |
| 4.6.2. Effet des traitements sur l'évolution des poids corporels et sur le poids | |
| des reins et du foie chez les rats Wistar | 154 |
| 4.6.3. Effet des traitements avec MIDA sur quelques paramètres sanguins | 155 |
| 4.6.4. Effet des traitements avec MIDA sur l'histologie de quelques organes | 160 |
| 4.6.5. Discussion | 172 |
| 4.7. Etude de quelques aspects de la toxicite subchronique du biopesticide | |
| Green muscle chez les rats wistar | 175 |
| 4.7.1. Effet des traitements sur le comportement des rats | 175 |
| 4.7.2. Effet des traitements sur l'évolution des poids corporels et sur les poids | |
| absolus et relatifs des organes étudiés chez les rats Wistar | 175 |
| 4.7.3. Effet des traitements avec GM sur quelques paramètres sanguins | 177 |
| 4.7.4. Effet des traitements avec GM sur l'histologie de quelques organes | 182 |
| 4.7.5 Discussion | 193 |
| CONCLUSION ET PERSPECTIVE | 197 |
| APPENDICE | |
| A. Liste des symboles | 204 |
| B. Annexe 1 | 205 |
| C. Annexe 2 | 216 |
| REFERENCES | 244 |

LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX

| | |
|---|-----------|
| Figure 1.1 : Cycle biologique de <i>Dociostaurus maroccanus</i> | 21 |
| Figure 1.2 : Larves <i>D. maroccanus</i> dans la région « Marhoum » | 23 |
| Figure 1.3 : Les phases sous lesquelles peuvent se présenter les locustes | 24 |
| Figure 1.4 : Répartition géographique de <i>D. maroccanus</i> dans le monde | 26 |
| Figure 1.5 : Répartition géographique de <i>D. maroccanus</i> en Algérie | 26 |
| Figure 1.6 : Principales couches du tégument chez les insectes | 29 |
| Figure 1.7 : Anatomie du tube digestif de <i>Schistocerca gregaria</i> | 29 |
| Figure 1.8 : L'hémolymphe de <i>S. gregaria</i> témoin et traitée avec <i>M. anisopliae</i> | 31 |
| Figure 1.9 : Aspect microscopique de <i>Metarhizium anisopliae</i> | 38 |
| Figure 1.10 : Les évènements du processus d'infection par <i>Metarhizium anisopliae</i> | 41 |
| Figure 1.11 : Images d'acridiens infectés par <i>Metarhizium anisopliae</i> | 42 |
| Figure 1.12 : Structure chimique et électrostatique de la nicotine et de l'imidaclopride | 48 |
| Figure 1.13 : Mode d'action de l'imidaclopride au niveau des synapses nerveuses des insectes | 48 |
| Figure 1.14 : Métabolisation de l'imidaclopride par le P450s chez l'homme | 50 |
| Figure 2.1 : Localisation du site expérimentale | |
| Figure 2.2 : Diagramme ombrothermique de la région Marhoum –Wilaya de Sidi-Bel- Abbes au cours des années 2014- 2015- 2016. | 56 |
| Figure 3.1 a et b : Méthode de traitement en couverture totale d'une parcelle | 62 |
| Figure 3.2 : Méthode de préparation des frottis d'hémolymphe | 80 |
| Figure 3.3 : Conidies de <i>M. anisopliae</i> var. <i>acridum</i> , l'isolat IMI 330139 | 71 |
| Figure 3.4 : Cultures de <i>M. anisopliae</i> var. <i>acridum</i> sur le milieu PDA | 72 |
| Figure 3.5 : Diagramme récapitulatif des traitements réalisés avec l'imidaclopride et <i>M. anisopliae</i> sur les larves <i>D. maroccanus</i> dans les conditions de laboratoire | 78 |
| Figure 3.6 : Diagramme synthétique du protocole des expérimentations sur les rats Wistar traités avec l'imidaclopride et le Green muscle | 88 |
| Figure 4.1 : Variations des taux de mortalité chez les larves <i>D. maroccanus</i> traitées sur terrain avec MIDA et DECIS | 90 |
| Figure 4.2 : Variations des taux de mortalité chez les larves de <i>D. maroccanus</i> test rémanence des insecticides DECIS et MIDA | 92 |
| Figure 4.3 : Relevé de l'humidité journalière minimale et maximale pendant la période de suivi des traitements de terrain avec le Green muscle | 95 |
| Figure 4.4 : Relevé des températures sèches et humides pendant la période de suivi des traitements de terrain avec le Green muscle | 95 |
| Figure 4.5 : Symptômes de l'infection avec le Green muscle® chez <i>D. maroccanus</i> | 96 |
| Figure 4.6 : Variations des taux d'efficacité des traitements avec le Green muscle | |

| | |
|--|-----|
| sur les larves de <i>D. maroccanus</i> | 97 |
| Figure 4.7 : Effet de Green muscle sur les mortalités chez les larves <i>D. maroccanus</i> selon les facteurs, temps après traitement et dose appliquée (GLM) | 98 |
| Figure 4.8 : Aspect macroscopique, sous loupe binoculaire, du tube digestif des larves <i>D. maroccanus</i> traitées avec Green muscle | 104 |
| Figure 4.9 – a : Coloration de l'hémolymphe des larves témoins et traitées avec GM à 50g/ha. b et c : Fructification de <i>M. anisopliae</i> après culture de l'hémolymphe des larves traitées | 107 |
| Figure 4.10 : Variations des taux différentiels des hémocytes chez les larves <i>D. maroccanus</i> le 3 ^e et 5 ^e jour après traitements avec le Green muscle | 111 |
| Figure 4.11 : Nombre différentiel des hémocytes au 3 ^e et au 5 ^e jour après traitement avec Green muscle selon les facteurs type de cellule et dose appliquée | 113 |
| Figure 4.12 : Variations de la croissance diamétrale de <i>M. anisopliae</i> sur PDA, MALT et V8 en fonction des périodes d'incubation à différentes températures | 123 |
| Figure 4.13 : Évolution du poids de <i>M. anisopliae</i> sur PDA, V8 et MALT en fonction des périodes d'incubation à différentes température. | 125 |
| Figure 4.14 : Variations de la croissance mycélienne de <i>M. anisopliae</i> selon les facteurs milieu, température et période d'incubation (Modèle G.L.M) | 127 |
| Figure 4.15 : Variations de la croissance pondérale de <i>M. anisopliae</i> selon les facteurs milieu, température et période d'incubation (Modèle G.L.M) | 127 |
| Figure 4.16 : Variations des concentrations en spores de <i>M. anisopliae</i> après 15 jours d'incubation sous différents milieux et différentes températures | 129 |
| Figure 4.17 : Variations de la concentration en spores de <i>M. anisopliae</i> en fonction des facteurs milieu de culture et température (Modèle G.L.M) | 130 |
| Figure 4.18 : Variations de la concentration de spores de <i>M. anisopliae</i> en fonction du milieu de culture et au différentes teneurs en activités de l'eau (a.w) | 132 |
| Figure 4.19 : Variations de la concentration de spores de <i>M. anisopliae</i> en fonction des facteurs milieu de culture et teneurs en activités de l'eau (Modèle GLM) | 133 |
| Figure 4.20 : Variations des taux de mortalité des larves L3, L4 et L5 de <i>D. maroccanus</i> traitées avec l'imidaclopride | 138 |
| Figure 4.21 : Effet de l'imidaclopride sur la mortalité chez <i>D. maroccanus</i> en fonction des facteurs dose, temps et stade larvaire (Modèle G.L.M) | 140 |
| Figure 4.22 : Droites de régression exprimant les probits des taux de mortalité des larves traitées avec l'imidaclopride en fonction des logarithmes des temps | 142 |
| Figure 4.23 : Droites de régression exprimant les probits des taux de mortalité des larves traitées avec l'imidaclopride en fonction des logarithmes des doses | 143 |
| Figure 4.24 : Variations des taux de mortalité des larves de <i>D. maroccanus</i> traitées avec <i>M. anisopliae</i> | 146 |

| | |
|---|------------|
| Figure 4.25 : Effet de <i>M. anisopliae</i> sur la mortalité des larves <i>D. maroccanus</i> en fonction des facteurs, dose, temps et stade (Modèle G.L.M) | 148 |
| Figure 4.26 : Droites de régression exprimant les probits des taux de mortalité en fonction de log (temps) chez les larves traitées avec <i>M. anisopliae</i> | 150 |
| Figure 4.27: Droites de régression exprimant les probits des taux de mortalité chez les larves traitées avec <i>M. anisopliae</i> en fonction des logarithmes des doses | 151 |
| Figure 4.28: Effets de l'imidaclopride sur l'évolution du poids corporel au cours de l'expérimentation, sur l'augmentation relative du poids corporel et sur les poids relatifs des reins et du foie chez les rats Wistar | 156 |
| Figure 4.29: Effets de l'imidaclopride sur les paramètres hématologiques GB, GR, Hb,Ht et Plt chez les rats Wistar | 157 |
| Figure 4.30 : Effets de l'imidaclopride sur le taux plasmatique des paramètres urée, créatinine, ASAT, ALAT, PA et PT chez les rats | 159 |
| Figure 4.31: Effets de Green muscle sur l'évolution du poids corporel au cours de l'expérimentation, sur l'augmentation relative du poids corporel et sur les poids relatifs du foie, des reins et des poumons et chez les rats Wistar | 177 |
| Figure 4.32: Effets de Green muscle sur les paramètres hématologiques GB, GR, Hb, Ht et Plt chez les rats Wistar | 179 |
| Figure 4.33 : Effets de Green muscle sur le taux plasmatique des paramètres biochimiques, urée, créatinine, ASAT, ALAT, PA et PT chez les rats | 181 |
| | |
| Planche 4.1 : Coupes longitudinales au niveau du tégument chez les larves <i>D. maroccanus</i> témoins et traitées avec le Green muscle | 101 |
| Planche 4.2: Coupes transversales au niveau du stomodeum (jabot) chez les larves de <i>D. maroccanus</i> témoins et traitées avec le Green muscle | 104 |
| Planche 4.3: Coupes transversales au niveau du stomodeum (gésier) chez les larves <i>D. maroccanus</i> témoins et traitées avec Green muscle (GM) | 105 |
| Planche 4.4 : Coupes transversales au niveau du mésentéron chez les larves <i>D. maroccanus</i> témoins et traitées avec GM | 105 |
| Planche 4.5: Coupes transversales au niveau des cæca gastriques chez les larves <i>D. maroccanus</i> témoins et traitées avec le GM | 126 |
| Planche 4.6: Coupes transversales au niveau du proctodeum (colon) chez les larves <i>D. maroccanus</i> témoins et traitées avec le GM | 106 |
| Planche 4.7 : Observations microscopiques des frottis sanguins chez les L4 de <i>D. maroccanus</i> témoins et traitées avec le Green muscle | 109 |
| Planche 4.8: Photomicrographies des parenchymes rénaux chez les rats témoins et traités avec le l'imidaclopride à raison de 1/80 et 1/10 DL50 | 162 |
| Planche 4.9: Photomicrographies des parenchymes hépatiques des traités | |

| | |
|---|------------|
| avec l'imidaclopride pendant 14 jours à raison de 1/80 et 1/10 DL50 | 165 |
| Planche 4.10: Photomicrographies des parenchymes pulmonaires chez les rats témoins et traités avec l'imidaclopride à raison de 1/80 et 1/10 DL50 | 168 |
| Planche 4.11: Photomicrographies de l'intestin grêle chez les rats Wistar femelles témoins et traités avec l'imidaclopride à raison de 1/80 et 1/10 DL50 | 171 |
| Planche 4.12: Photomicrographies des parenchymes rénaux chez les rats témoins et traités avec GM pendant 30 jr à raison de 1/200, 1/100 et 1/10 DL50 | 184 |
| Planche 4.13: Photomicrographies des parenchymes hépatiques des rats témoins et traités avec GM pendant 30 jr à raison de 1/200, 1/100 et 1/10 DL50 | 186 |
| Planche 4.14: Photomicrographies des parenchymes pulmonaires chez les rats témoins et traités avec GM à raison de 1/200, 1/100 et 1/10 DL50 | 189 |
| Planche 4.15: Photomicrographies de l'intestin grêle chez les rats témoins et traités avec GM à raison de 1/200, 1/100 et 1/10 DL50 | 192 |
| | |
| Tableau 4.1 : Paramètres de traitement avec l'imidaclopride | 89 |
| Tableau 4.2 : Variations des densités larvaires et des taux de mortalité chez <i>D. maroccanus</i> témoins et traités avec MIDA® et DECIS® | 91 |
| Tableau 4.3 : Fluctuations des densités et des taux de mortalité chez les larves témoins traités avec MIDA® et DECIS®. Test de rémanence | 92 |
| Tableau 4.4 : Paramètres de traitement avec Green muscle® | 94 |
| Tableau 4.5 : Variations des taux de mortalité chez les larves <i>D. maroccanus</i> et des taux d'efficacité des traitements avec le Green muscle | 97 |
| Tableau 4.6 : Modèle G.L.M. appliqué sur les taux de mortalité des larves traitées avec Green muscle selon les facteurs dose et temps | 98 |
| Tableau 4.7: Nombres moyens totaux et différentiels des trois catégories d'hémocytes chez les L4 <i>D. maroccanus</i> traités avec le biopesticide | 111 |
| Tableau 4.8: Modèle G.L.M. appliqué sur le nombre différentiel des hémocytes le 3 ^e et 5 ^e jour après traitement avec le Green muscle selon les facteurs étudiés | 112 |
| Tableau 4.9: Évolution de la croissance radiale de <i>M. anisopliae</i> soumis à différentes températures et aux différents milieux de cultures | 122 |
| Tableau 4.10 : Évolution de la croissance pondérale de <i>M. anisopliae</i> soumis à différentes températures et aux milieux de culture | 124 |
| Tableau 4.11: Modèle G.L.M appliqué sur la croissance mycélienne et la croissance pondérale de <i>M. anisopliae</i> selon les facteurs étudiés | 126 |
| Tableau 4.12 : Dénombrement des spores de <i>M. anisopliae</i> après 15 jours d'incubation sur différents milieux et aux différentes températures | 128 |
| Tableau 4.13 : Modèle G.L.M appliqué sur le logarithme de la concentration en spores de <i>M. anisopliae</i> selon les facteurs, milieu et température | 130 |

| | |
|--|------------|
| Tableau 4.14 : Valeurs optimales de la croissance diamétrale et pondérale de <i>M. anisopliae</i> et de la concentration de spores après 15 jours d'incubation | 131 |
| Tableau 4.15 : Fluctuations des concentrations en spores de <i>M. anisopliae</i> développé sur différents milieux et aux différentes teneurs en activité de l'eau | 132 |
| Tableau 4.16 : Modèle G.L.M appliqué sur le logarithme concentration en spores selon facteurs, teneurs en activité de l'eau et milieu de culture | 133 |
| Tableau 4.17 : Modèle G.L.M appliqué sur les mortalités chez <i>D. maroccanus</i> traités avec <i>M. anisopliae</i> selon les facteurs dose, temps et stade | 139 |
| Tableau 4.18 : Logarithmes décimaux des temps et probits des taux de mortalité cumulée chez les L3, L4 et L5 traitées avec l'imidaclopride | 141 |
| Tableau 4.19 : Les valeurs des TL 50 chez les larves L3, L4 et L5 de criquet marocain traitées avec l'imidaclopride à différentes doses | 143 |
| Tableau 4.20 : Les valeurs des DL50 et DL90 pour les larves L3, L4 et L5 de criquet marocain traitées avec l'imidaclopride | 144 |
| Tableau 4.21 : Modèle G.L.M appliqué sur les mortalités chez <i>D. maroccanus</i> traitées avec <i>M. anisopliae</i> selon les facteurs dose, temps et stade | 147 |
| Tableau 4.22 : Logarithmes décimaux des temps et probits des pourcentages de mortalité corrigée chez les L3, L4 et L5 de <i>D. maroccanus</i> | 149 |
| Tableau 4.23 : Valeurs des TL50 chez les L3, L4 et L5 de <i>D. maroccanus</i> traitées avec <i>M. anisopliae</i> à différentes doses | 150 |
| Tableau 4.24 : Valeurs des DL50 et DL90 chez les L3, L4 et L5 des criquets marocains traitées avec <i>Metarhizium anisopliae</i> | 152 |
| Tableau 4.25 : Effet de l'imidaclopride sur l'évolution des poids corporels des rats et sur les poids absolus et relatifs des reins et du foie | 155 |
| Tableau 4.26 : Effet de l'imidaclopride sur de quelques paramètres hématologiques chez les rats Wistar femelles | 156 |
| Tableau 4.27 : Effet de l'imidaclopride sur de quelques paramètres biochimiques rénaux et hépatiques chez les rats Wistar | 184 |
| Tableau 4.28 : Effet de Green muscle sur l'évolution des poids corporels des rats et sur les poids absolus et relatifs des reins, des poumons et du foie | 176 |
| Tableau 4.29 : Effet de Green muscle sur de quelques paramètres hématologiques chez les rats Wistar femelles | 178 |
| Tableau 4.30 : Effet de Green muscle sur de quelques paramètres biochimiques rénaux et hépatiques chez les rats Wistar | 180 |

INTRODUCTION

L'agriculture contemporaine a un besoin de plus en plus grand de protéger ses cultures et ses récoltes, si elle veut maintenir ses hauts rendements et ses marges déjà faibles dans certaines productions [1]. Les espèces végétales sont soumises régulièrement à des attaques de déprédateurs, parmi eux les acridiens. Ces derniers occupent une place prépondérante notamment dans les territoires abritant de vastes zones arides et semi-arides. L'Algérie, par sa situation géographique, est inscrite parmi les pays où les acridiens peuvent créer de vraies menaces pour les pâturages et les cultures. On y trouve notamment les espèces les plus nuisibles sur le territoire national : le criquet pèlerin (*Schistocerca gregaria*), le criquet migrateur (*Locusta migratoria*), et le criquet marocain (*Dociostaurus maroccanus*) [2].

Du fait de sa polyphagie et de son grégarisme, *Dociostaurus maroccanus* (Thunberg, 1815) (*Acrididae*, *Gomphocerinae*) est considéré comme très redoutable à l'agriculture. Il peut s'attaquer aux céréales, aux cultures maraichères et à l'arboriculture fruitière. Les pertes de récolte seraient dues surtout aux jeunes stades larvaires [3]. Le criquet marocain peut engendrer, par année favorable, des pullulations très importantes pouvant se constituer en essaims et envahir des régions entières [4].

L'Algérie a connu plusieurs situations d'invasion de cet acridien dont la dernière remonte aux années 1963-1964. Des recrudescences mineures sont enregistrées à partir des années 1999. Cette situation résulte largement d'une meilleure connaissance du problème associée à l'apparition de nouveaux moyens de surveillance et de lutte. Ces moyens visent l'intervention au niveau des zones où pullulent le criquet marocain et l'engagement des traitements dès que le seuil des interventions est atteint [5]. Les opérations de lutte chimique mobilisent chaque année des moyens humains, des matériels colossaux et une enveloppe financière conséquente. L'institut national de protection des végétaux (INPV) traite chimiquement contre ce ravageur de grandes superficies, avoisinant les 50.000 ha avec énormes quantités d'insecticides, particulièrement en période printanière dans les régions céréalières de l'ouest du pays [6]. Cela n'est pas resté sans

conséquences néfastes sur les écosystèmes naturels et sur les espèces non cibles. Les insecticides chimiques ont ainsi une mauvaise image dans le public et sont de plus en plus sur la sellette pour des questions de toxicité et de pollution. Il se pose également le problème de l'efficacité des produits phytosanitaires qui, comme les antibiotiques utilisés en médecine humaine, voient des résistances apparaître qui les rendent inefficaces [1].

La lutte biologique est une alternative très prometteuse avec un marché en pleine croissance. Cependant, elle reste insuffisante, limitée et peu développée. À défaut de pouvoir se passer des insecticides de synthèse pendant les périodes des invasions acridiennes, il est devenu impératif de bien cibler l'arsenal chimique utilisé et d'explorer les moyens et les méthodes de traitement, jugés utiles, afin de réduire les doses des insecticides actuellement recommandées et appliquées.

Les néonicotinoïdes, en particulier l'imidaclopride, représentent des insecticides chimiques qui sont rapidement imposés. L'utilisation de l'imidaclopride a considérablement augmenté depuis son introduction [7]. Ces dernières années, il domine le marché avec une part de 25 % du total des ventes mondiales des insecticides [8]. La haute affinité de l'imidaclopride aux récepteurs nicotiques de l'acétylcholine des insectes par rapport à ceux des mammifères lui accorde une forte toxicité sélective pour les insectes et une sécurité apparente chez les humains [9] et [10]. Une fois appliqué, cet insecticide présente une faible persistance dans le sol, une action systémique élevée et une forte efficacité à faible dose comparé à d'autres insecticides [11]. L'imidaclopride ne figure pas dans la liste des produits couramment appliqués en lutte antiacridienne et peu de données sont rapportées sur son utilisation contre les acridiens [12].

Considérant l'importance économique du criquet marocain, et vu les caractéristiques de l'imidaclopride et l'absence de données relatives à son application sur terrain contre *D. maroccanus*, nous nous sommes proposé d'évaluer l'efficacité des doses réduites de l'imidaclopride [MIDA®] à la recherche de la dose efficace la plus faible. Le test est réalisé, en collaboration avec l'INPV, sur les larves de 3^e et 4^e stade de la sauterelle marocaine, au niveau d'un foyer grégarigène, la région "Marhoum" (Sidi-Bel-Abbes). L'imidaclopride est comparée

avec un insecticide de référence, deltaméthrine [DECIS®], un pyréthrianoïdes de synthèse homologué et largement utilisé en lutte antiacridienne [12].

A la recherche de lutte alternative, l'intérêt des scientifiques se tourne vers les micro-organismes entomopathogènes. Ces derniers peuvent assurer une protection phytosanitaire performante par leur ubiquité naturelle dans les écosystèmes, leur grande variété, leur dissémination facile et leur spécificité d'action [13] et [14]. Le *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* dont le nom commercial est le Green muscle® retrouvé sur *Ornithacris cavroisi* (Finot, 1907) (Orthoptera, Cyrtacanthacridinae) au Niger, s'est avéré le champignon entomopathogène le plus virulent [15]. Au cours des dernières années, l'utilisation réelle de Green muscle a augmenté pour atteindre l'échelle commerciale dans plusieurs pays comme le Brésil, la Chine, l'Afrique du Sud et le Mexique [16]. *Metarhizium anisopliae* est largement testé sur le terrain Africain principalement pour le contrôle du criquet pèlerin [17], [18] et [19]; le criquet puant, *Zonocerus variegatus* [20] et [21]; le criquet migrateur [22]; le criquet sénégalais, *Oedaleus senegalensis* [23] et [24] et le criquet du riz, *Hieroglyphus daganensis* [25]. Sur le plan national, les essais sur terrain avec le biopesticide Green muscle ont révélé des résultats satisfaisants, comme le cas du test réalisé à El-Oued (Sud - Est) contre *Schistocerca gregaria* [26], et l'essai réalisé à Sidi-Bel-Abbes (Nord-Ouest) sur les larves de *Dociostaurus maroccanus* [5].

Vu le manque des résultats relatifs à l'étude de l'efficacité de Green muscle sur *D. maroccanus* au niveau national et international, nous avons choisis d'effectuer le deuxième essai sur le terrain Algérien contre les larves de 3^e et 4^e stade de *D. maroccanus*. Ce travail a été réalisé à "Marhoum", région abritant des zones potentielles de reproduction. Notre objectif principal est de contribuer aux efforts menés par l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) afin de promouvoir la lutte biologique par l'utilisation précoce de Green muscle et d'entrevoir les possibilités de son application à grande échelle.

L'utilisation des champignons entomopathogènes est à la fois un moyen pour lutter contre les ravageurs agricoles et un modèle important pour l'étude des interactions hôte - pathogène. La plupart des études de terrain avec le Green muscle ont principalement focalisé sur les taux de mortalité des criquets et

d'efficacité des traitements. Notre étude constitue une première dans la recherche des effets de *M. anisopliae* var. *acidum* sur le fonctionnement hématologique et histo-pathologique des larves de la sauterelle méditerranéenne traitées dans les conditions naturelles. Dans ce concept, nous avons choisis de mettre en lumière les symptômes de l'infection fongique, par les observations de terrain, et les lésions tissulaires au niveau de la cuticule et de l'intestin. Au niveau de l'hémolymphe, nous avons recherché d'éventuelles altérations engendrées dans le temps suite aux traitements à différentes doses avec le biopesticide.

Pour établir les tests de mortalité dans les conditions contrôlées, nous avons appliqué l'imidaclopride et le *M. anisopliae* à faibles doses sur les larves de *D. maroccanus*, originaires de la région Marhoun. Nous avons déterminé les doses létales 50 et 90 (DL50 et DL90) et les temps létaux 50 (TL 50) relatifs à chaque stade larvaire (3^e, 4^e et 5^e).

Plusieurs études récentes de la toxicité expérimentale ont permis de mettre en évidence les effets néfastes de l'imidaclopride chez les mammifères [27], [28], [29] et [30], et chez l'abeille domestique *Apis mellifera* [31], [32], [33]. En plus des rapports d'intoxication humaine [34]. Malgré ces rapports, l'utilisation massive de l'imidaclopride, à forte dose et sans contrôle par les agriculteurs, continue à apporter des conséquences néfastes. Nous nous sommes intéressés, dans ce présent travail, par la recherche de la toxicité de l'imidaclopride à raison de 1/10 et 1/80 DL50 chez les rats Wistar femelles traitées par voie orale pendant 14 jours. L'étude cible certains paramètres hématologiques et biochimiques, l'évolution du poids corporel et la recherche des altérations tissulaires au niveau des reins, du foie, des poumons et de l'intestin grêle.

Un grand nombre de recherches sur les caractéristiques biologiques des variétés de *M. anisopliae* et les effets sur les organismes non cibles ont été conduites par plusieurs auteurs [35], [36], [37], [38], [39] et [40]. Ces recherches sont faites sur des modèles de mammifères et de vertébrés par exposition intra-péritonéale, intraoculaire, par inhalation, ingestion et par injection sous-cutanée. Les données de sécurité rapportées par ces auteurs considèrent *M. anisopliae* comme non toxique et non pathogène avec des risques minimes et acceptables dans l'environnement comme une alternative aux pesticides chimiques.

Metarhizium anisopliae produit une série de métabolites/toxines, principalement les destruxines, qui ont des activités biologiques diverses. Aucun effet toxique dû à ces métabolites n'a été rapporté chez les organismes non cibles [41], [42] et [43], Cependant quelques infections dues aux *M. anisopliae* sont rapportées chez les mammifères et les humains [44], [45], [46], [47], [48] et [49]. Vu le manque des rapports sur la biosécurité, à moyen et long termes, des conidies de *M. anisopliae* var. *acidum* formulées en biopesticide, nous nous sommes proposés de rechercher les indices de l'inflammation subchronique de 1/10, 1/100 et 1/200 DL50 de Green muscle. Nous avons étudié les effets sur l'évolution du poids corporel des rats, sur l'équilibre de quelques paramètres biochimiques et hématologiques et sur l'histopathologie des parenchymes rénal, hépatique, pulmonaire et de l'intestin grêle après 30 jours de traitement par voie orale.

Le présent travail comprend quatre chapitres. Le premier porte sur les données bibliographiques du criquet marocain, de *Metarhizium anisopliae* var. *acidum* et de l'imidaclopride. Le second concerne la présentation de la zone d'étude sur terrain. Le troisième porte sur les matériels et les méthodes du travail adopté. Le quatrième chapitre est consacré aux résultats portant sur :

- L'application de l'insecticide imidaclopride et du biopesticide, Green muscle contre les larves de *D. maroccanus* sur le terrain (la région Marhoum)
- Les caractéristiques bioécologiques de notre souche fongique, et ce en étudiant l'effet de la température, de l'humidité et des milieux de culture sur le comportement de *Metarhizium anisopliae* à savoir la croissance mycélienne, la croissance pondérale et le taux de sporulation.
- L'application de l'imidaclopride et de *M. anisopliae* contre les larves de *D. maroccanus* dans les conditions de laboratoire.
- Recherche des aspects de la toxicité subaiguë de l'imidaclopride et de la toxicité subchronique de Green muscle chez les rats Wistar femelles.

Le quatrième chapitre rapporte également la discussion des résultats obtenus. Ce document se termine par une conclusion et des perspectives.

CHAPITRE 1

DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

1.1. Données bibliographiques sur le criquet marocain, *Dociostaurus maroccanus* (Thunberg, 1815)

1.1.1. Identification morphologique de *Dociostaurus maroccanus*

Dociostaurus maroccanus présente une taille moyenne, la longueur du corps chez le mâle est de 1,65 à 2,85 cm, alors que chez la femelle elle varie de 2,05 à 3,80 cm. La coloration du corps est grise jaunâtre avec des taches plus sombres, grises ou jaune pâle. L'espèce présente une tête subconique, un signe sous forme de croix sur la partie supérieure du pronotum et trois taches sombres sur la face interne du fémur postérieur [5].

1.1.2. Taxonomie

Dociostaurus maroccanus (Thunberg, 1815) présente selon [50] et [51] la nomenclature suivante :

| | |
|---------------------------|--------------------------------|
| Règne | Animalia |
| Sous embranchement | Hexapoda |
| Classe | Insecta |
| Sous classe | Pterygota |
| Infra classe | Neoptera |
| Ordre | Orthoptera |
| Sous ordre | Caelifera |
| Infra-ordre | Acrididea |
| Super-famille | Acridoidea |
| Famille | Acrididae |
| Sous-famille | Gomphocerinae |
| Tribu | Dociostaurini |
| Genre | <i>Dociostaurus</i> |
| Espèce | <i>Dociostaurus maroccanus</i> |

1.1.3. Cycle biologique

Le cycle biologique de tous les acridiens passe par trois états successifs: le développement embryonnaire, le développement larvaire et le développement imaginal [52] (Figure 1.1).

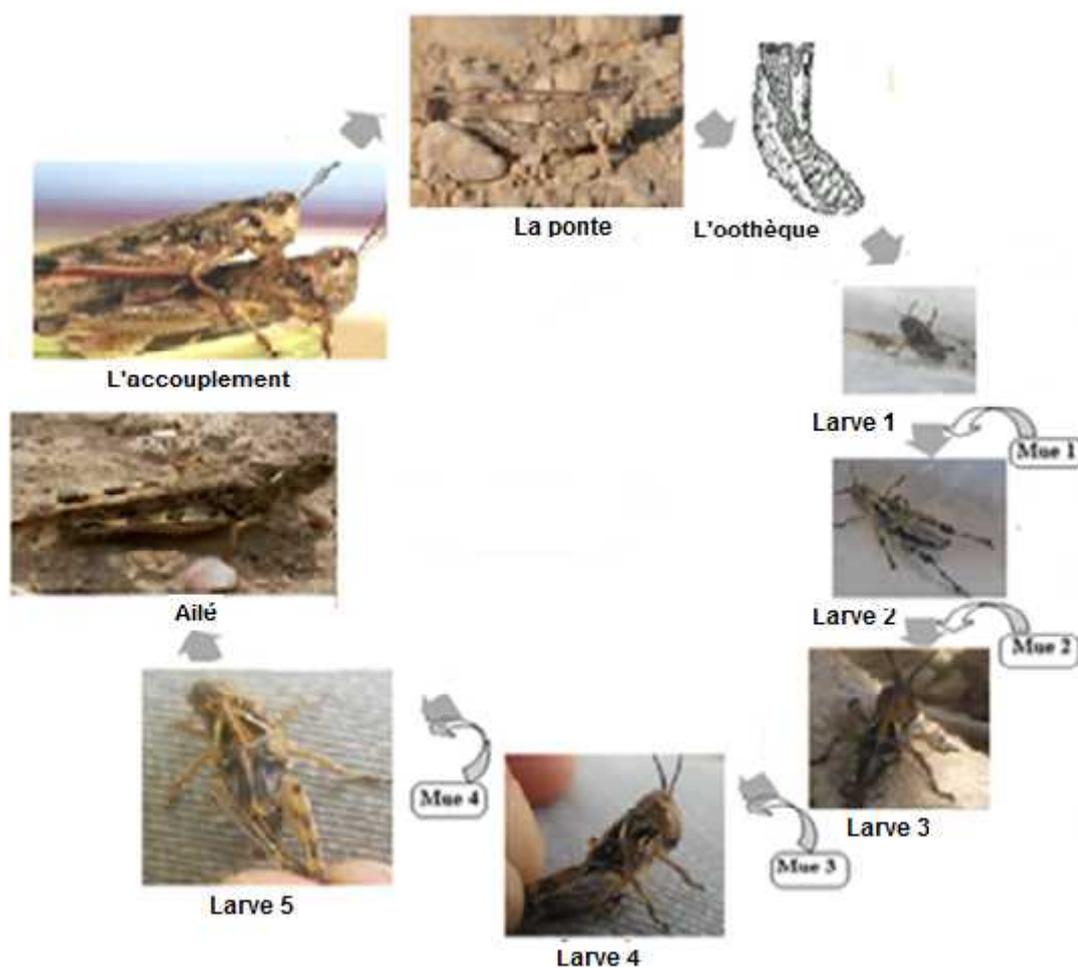


Figure 1.1 : Cycle biologique de *Dociostaurus maroccanus*

(Images originales des larves observées dans la région "Marhoum")

1.1.3.1. La ponte et l'oothèque

Après l'accouplement des adultes de *D. maroccanus* (Figure 1.1), les œufs sont pondus dans une oothèque. Cette dernière se présente comme un tube cylindrique, droit ou faiblement recourbé. L'oothèque mesure entre 32 à 42 mm de long et entre 4 à 6 mm de diamètres et contient 55 à 115 œufs [53]. Ces derniers sont sous forme allongée, un peu incurvée, à chorion blanchâtre, d'une taille qui varie de 5.5 à 7 mm [54].

Au moment de la ponte, la femelle enfonce son oviscapte profondément dans la terre. Les œufs sont déposés sur la couche humide du sol entre 5 à 15 cm de profondeur. La femelle redresse son abdomen puis remplit le trou en y grattant de la terre et tasse bien la surface. La ponte est protégée par une paroi de 0,3 à 1 mm d'épaisseur, constituée de particules de terre ou de petits grains de silice cimentée par les sécrétions des voies génitales femelles. La paroi est dure dans la partie inférieure où se trouve la grappe ovigère. Elle est plus mince et fragile au

niveau du bouchon spumeux. La masse ovigère est surmontée d'un long bouchon de matière spumeuse [55].

1.1.3.2. Développement embryonnaire

La durée du cycle de *D. maroccanus* est de 9 mois environ avec une diapause embryonnaire longue (une seule génération par an). Le développement embryonnaire est régi par un complexe poly factoriel thermo- hydrique et édaphique. Au printemps, l'humidité du sol et la température élevée accélère la croissance de l'embryon. Tandis que les pluies d'automne ont une action défavorable sur les œufs de *D. maroccanus* [56].

1.1.3.3. Développement larvaire

Les larves passent par cinq stades avant de devenir adulte reproducteur. Ces stades sont séparés par des mues durant lesquelles l'insecte se suspend tête en bas accroché par les pattes sauteuses et s'extirpe de son exuvie tête la première.

Les trois premiers stades se ressemblent et se distinguent par l'augmentation de la taille de la larve surtout au niveau de la tête, du thorax et de l'abdomen. Les larves de 4e et 5e stade (Figure 1.2) se distinguent par leur taille et la grandeur de leurs ébauches alaires qui sont dirigées vers le haut et qui restent différentes de celles des 3 premiers stades qui sont dirigées vers le bas [57]. La durée de développement des stades larvaires est en moyenne de 28 à 38 jours selon les facteurs du milieu, notamment la température élevée qui accélère le développement des larves tandis que l'augmentation de l'humidité relative de l'air leur est néfaste [53].



Figure 1.2 : Larves *D. maroccanus* dans la région "Marhoum" (Originale)

1.1.3.4. Développement imaginal et maturité sexuelle

Le développement imaginal de *D. maroccanus* dure un à deux mois dans les conditions naturelles [53]. L'adulte est un imago sexuellement mûr; les accouplements commencent entre 6 à 10 jours après la mue imaginale et se font que pendant le jour, entre 9 h et 20 h [58]. La femelle de *D. maroccanus* s'accouple au moins quatre fois avant de déposer sa première oothèque et pond deux à trois fois [59].

1.1.4. Polymorphisme phasaire

1.1.4.1. Théorie des phases

Une espèce caélifère grégariapte peut se trouver dans la nature sous deux états extrêmes appelés phases [60] (Figure1.3). Chez une population de criquet grégariapte, la grégariation s'accomplit par des transformations progressives; il faut plusieurs générations pour qu'elle s'installe d'une manière durable [61]. Les phases sous lesquelles se présentent les locustes sont décrites par [50] et [61].

a) Phase solitaire

C'est la forme extrême d'une espèce dans une localité donnée où il n'y a pas de migration depuis au moins une génération. Tous les individus vivent isolés.

b) Phase transiens

Les individus qui ont des formes intermédiaires entre les grégaires et les solitaires sont appelés transiens. Ils sont transiens congregans quand ils évoluent vers la phase grégaire et transiens dissocians lorsqu'ils redeviennent solitaires.

c) Phase grégaire

C'est une forme extrême représentée par des acridiens migrants formant des nuages denses ou essaims. Lorsque les conditions écologiques deviennent défavorables, les acridiens se déplacent pour s'alimenter et se reproduire, ce qui se traduit par une concentration des individus déclenchant de ce fait la grégariation [62].

1.1.4.2. Processus de transformation phasaire

Le passage des acridiens de la phase solitaire à la phase grégaire se réalise suivant trois étapes successives: la densation, la multiplication et la grégariation [63] et [64].

a) Densation

Lorsqu'il y a des dessèchements du tapis végétal, les criquets se dirigent vers la végétation qui persiste dans des zones d'accumulation des eaux. Ce qui conduit à

une augmentation de la densité des individus; c'est le principal facteur déclenchant le grégarisme [64].

b) Multiplication

La reproduction des individus est réalisée selon trois étapes : la maturation des adultes, le développement embryonnaire et le développement larvaire. La multiplication est favorisée par le maintien de conditions écologiques favorables à l'espèce durant toutes ses étapes [65].

c) Grégarisation

Le contact entre individus déclenche le grégarisme qui conduit les criquets à des mutations par des transformations phasaires [64].

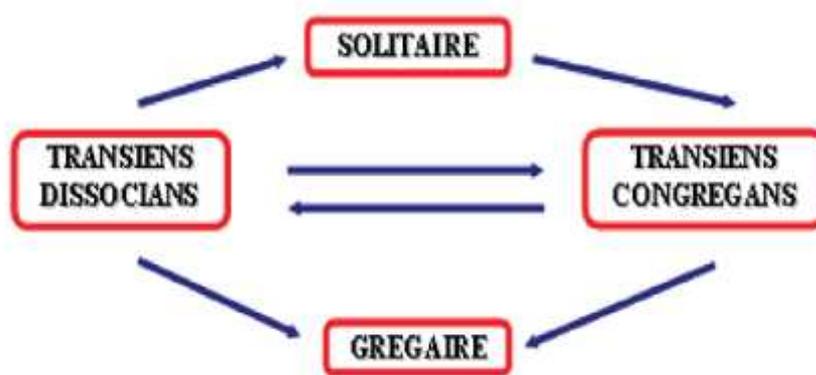


Figure 1.3 : Les phases sous lesquelles peuvent se présenter les locustes [50]

1.1.4.3. Modifications phasaires

Les transformations phasaires s'expriment dans la morphologie et le comportement ainsi que dans les aspects relevant de la biologie et de la physiologie des larves et des ailés. D'après CHARA, [66], les principales modifications sont:

a) Modifications morphologiques

Les grégaires ont généralement une taille moindre et une pigmentation plus claire que les solitaires de *Dociostaurus maroccanus*.

b) Modifications physiologiques

Les grégaires sont plus voraces, ils ont un métabolisme plus élevé et ils produisent des œufs plus gros et en nombre plus restreint que les solitaires.

c) Modifications éthologiques

Les individus grégaires occupent une aire plus étendue que celle des solitaires et forment des essaims d'ailés ou de bandes larvaires. D'après DURANTON et *al.*

[67], les individus grégaires ou solitaires peuvent être obtenus à partir d'une même ponte en élevant les larves néonates en groupes ou isolées.

d) Modifications écologiques

Les exigences écologiques sont plus marquées chez les solitaires. Ils ne se rencontrent en période de rémission que dans des régions limitées dans l'espace. Cependant, en période d'invasion, les grégaires ont une plasticité écologique plus large, et peuvent coloniser des territoires très étendus [67].

1.1.5. Ecologie de *Dociopterus maroccanus*

Dociopterus maroccanus est une espèce sédentaire strictement inféodée aux lits caillouteux, un sol compact, une végétation en mosaïque et un climat semi-aride. Cet acridien persiste en période de rémission dans des foyers grégarigènes favorisés par le surpâturage [68].

1.1.6. Dégâts et importance économique

Le criquet marocain est traditionnellement considéré comme l'un des ravageurs agricoles le plus dangereux de la zone méditerranéenne. Les jeunes larves sont très voraces. Elles se déplacent en bandes et peuvent attaquer une cinquantaine d'espèces végétales, en particuliers les cultures maraichères, céréalières et des arbres fruitiers [5].

La gravité des invasions du criquet marocain tient à la proximité entre les cultures et les foyers de grégarisation. Les superficies infestées varient de quelques dizaines à quelques centaines de milliers d'hectares, leur influence sur la situation économique précaire des régions semi-aride ou aride demeure très grande [6].

1.1.7. Distribution géographique de *Dociopterus maroccanus*

1.1.7.1. Répartition dans le monde

L'aire de répartition du criquet marocain s'étend dans l'ensemble du pourtour semi-aride du littoral méditerranéen : en Europe, au Moyen-Orient, en Afrique du Nord et dans différentes régions Asiatique. L'espèce est observée également au niveau des Iles Canaries jusqu'à l'Asie centrale soviétique en passant par le Maroc, l'Algérie, la France, l'Espagne, la Turquie, la Syrie, l'Irak, l'Iran et l'Afghanistan [56] (Figure 1.4).

1.1.7.2. Répartition en Algérie

L'aire de répartition est très grande en Algérie, il est présent dans les étages bioclimatiques sub-humide et semi aride, notamment les hauts plateaux dont la pluviométrie est comprise entre 250 et 400 mm/an. Tous les foyers

grégarigènes de criquet marocain sont définis par [69], [70], [3] et répertoriés par l'INPV d'El Harrach (Figure 1.5).

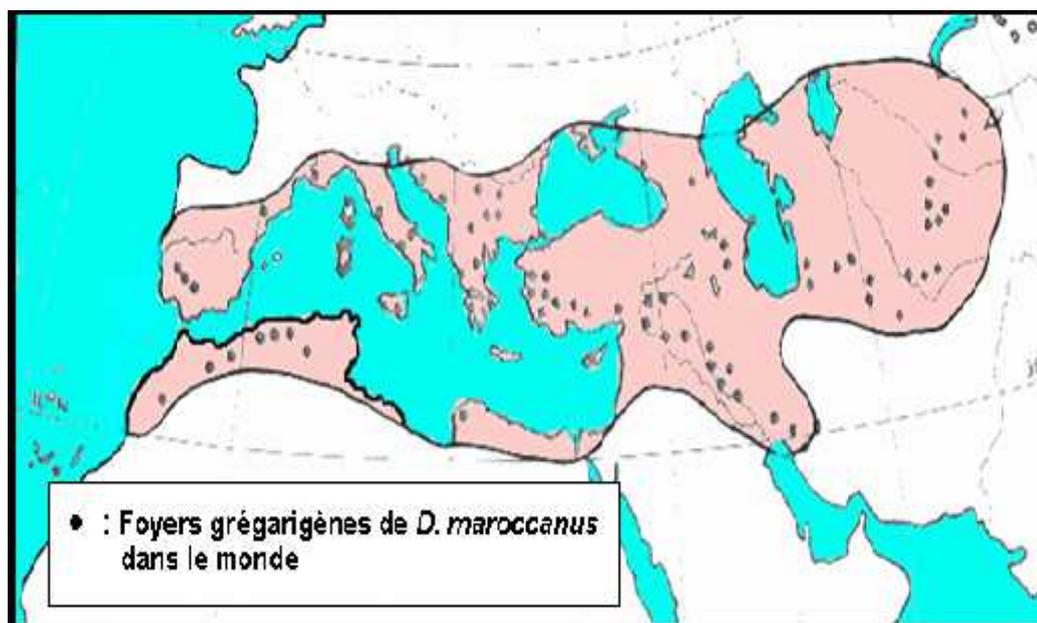


Figure 1.4: Répartition géographique de *D. maroccanus* dans le monde [53].



Figure 1.5: Répartition géographique de *D. maroccanus* en Algérie

Les pullulations des acridiens sont favorisées par plusieurs facteurs biotiques et abiotiques et anthropiques [60], [66].

1.1.8.1. Facteurs biotiques

➤ Facteurs nutritionnels

Les sources trophiques influent sur la fécondité des femelles qui est largement conditionnée d'après Doumandji et Doumandji-Mitiche, [60] par :

) La disponibilité de la nourriture : Une végétation qui persiste verte très longtemps, permet aux femelles d'augmenter leur longévité et par conséquent de se reproduire plusieurs fois au cours de leur vie.

) La qualité de la nourriture : Une nourriture de qualité permet aux femelles une production importante d'œufs par ponte

➤ Facteurs de mortalité

En dehors des composants climatiques, les autres facteurs de mortalité qui tendent à limiter les effectifs de populations d'orthoptères sont soit des agents causant des maladies, soit des prédateurs invertébrés ou vertébrés [60].

1.1.8.2. Facteurs abiotiques

D'après CHARA, [66] les facteurs abiotiques sont d'ordre climatique :

➤ La température

Quand les températures sont très basses, elles ralentissent le développement des acridiens aux différents stades de leur cycle, et peuvent devenir létales.

➤ Le vent

Les densités des criquets peuvent augmenter dans une région à la suite de vents convergents. Les vents forts soulèvent parfois la terre qui entoure les oothèques, lesquelles se dessèchent au point que les œufs meurent.

➤ Les pluies

La quantité de pluie printanière, sont essentiels pour le cycle de *D. maroccanus* et peuvent être favorables ou défavorables à la reproduction et au développement des criquets. Le déficit hydrique durant la période printanière provoque le dessèchement rapide de la végétation verte en îlots favorisant la concentration des criquets marocains locaux en fortes densités [71].

1.1.8.3. Facteurs anthropiques

Les facteurs relatifs à l'activité humaine semblent avoir un effet important sur la dynamique des populations acridiennes marocaines. La déforestation et le surpâturage créent au préalable les conditions nécessaires à la colonisation. Cependant, les terres cultivées sont inadaptées au criquet marocain du fait que les femelles peuvent pondre dans un sol non perturbé [66]. D'après le rapport de l'INPV, [71], les terres laissées en jachères par les céréaliers a permis aux criquets marocains d'élargir leurs zones de pontes limitées habituellement aux lisières de forêts et au niveau des parcours.

1.1.9. Le tégument chez les criquets

1.1.9.1. La membrane basale

La lame basale, 0,5 µm d'épaisseur, forme la surface interne du tégument [72]. Elle sert de barrière et de transport épithélial. Quelques cellules peuvent se spécialiser pour former des organes de sens ou des glandes [72]. C'est l'épiderme qui fournit les composés et les enzymes nécessaires pour la dégradation de l'ancienne cuticule et la formation d'une nouvelle [74].

1.1.9.3. La cuticule

La cuticule recouvre toute la surface externe des insectes et se poursuit à l'intérieur de l'intestin antérieur et postérieur, couvrant aussi le conduit des glandes dermiques et tout le système trachéen. La cuticule est une matière composite de chitine et de protéine, assurant sa légèreté, sa vigueur et sa flexibilité. Elle possède une structure protectrice à plusieurs couches dures et rigides [72] et [75] (Figure 1.6)

➤ L'épicuticule

L'épicuticule est externe mince de 1 à 4 µm d'épaisseur, non chitinisée, riche en lipides et protéines. Elle comprend quatre couches séparées :

Une couche externe, le ciment, suivit par une couche cireuse imperméable à l'eau, mais permet une entrée rapide des insecticides liposolubles, une couche de polyphénols et de protéines au-dessous de laquelle il y a la couche de cuticuline contenant des lipoprotéines polymérisées [72].

➤ La procuticule

La procuticule est interne, plus épaisse (200 µm), Elle contient de longs filaments de chitine incorporés dans une matrice de protéines. La procuticule est arrangée en une couche exocuticulaire externe et une interne de nature similaire et épaisse, mais peu dense, appelée: endocuticule [75].

) L'exocuticule

L'exocuticule, appelée aussi cuticule pré-exuviale, est chimiquement très inerte étant relativement déshydratée et liée par des liaisons croisées.

) L'endocuticule

La couche intérieure ou endocuticule, appelée cuticule post-exuviale est beaucoup plus hydratée et souple.

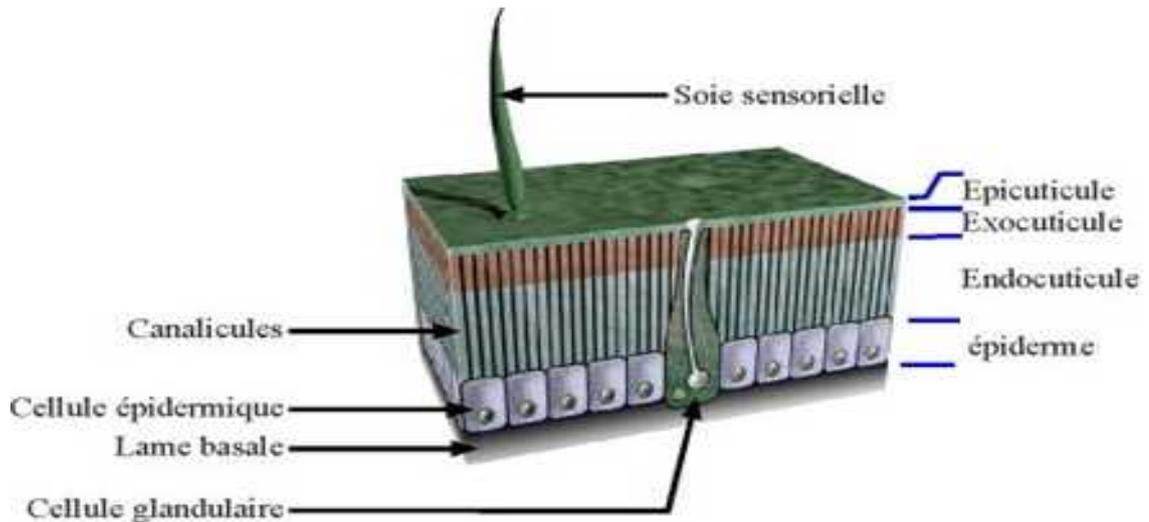


Figure 1.6 : Principales couches du tégument chez les insectes [75, modifié]. (Les proportions ne sont pas respectées).

1.1.10. L'appareil digestif chez les criquets

Le tube digestif est un conduit reliant la bouche à l'anus regroupée de l'avant vers l'arrière en trois parties intestinales, le stomodeum, le mésentéron et le proctodeum (Figure 1.7) [76].

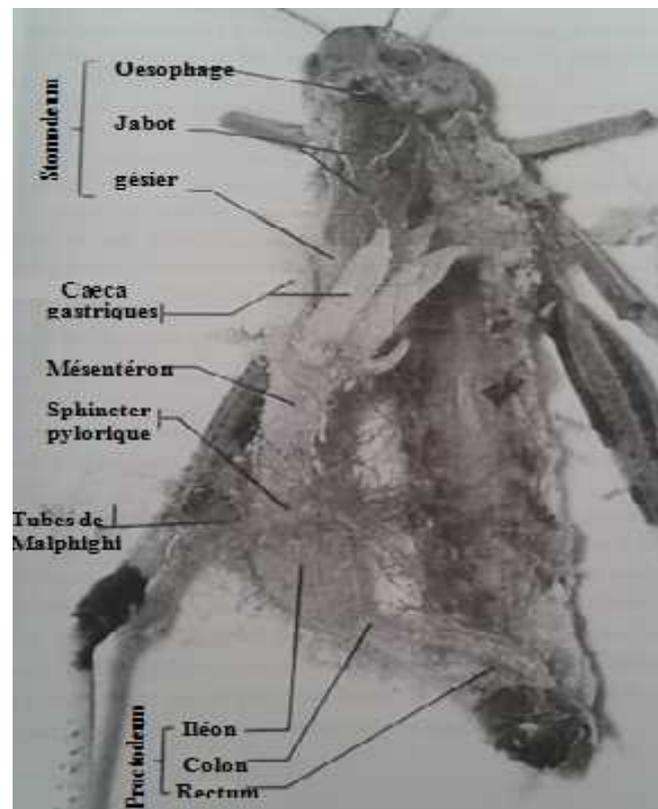


Figure 1.7: Anatomie du tube digestif de *Schistocerca gregaria* [77, modifié].

1.1.10.1. Stomodeum ou intestin antérieur

Le stomodeum s'étend de la bouche au métathorax, il comprend la cavité buccale, le pharynx, l'œsophage et deux poches qui sont le jabot, où sont stockés les aliments, et le gésier qui assure la trituration des aliments et le transit de la nourriture vers l'intestin moyen [66].

1.1.10.2. Méésentéron ou intestin moyen

Cette partie comprend six cæcums gastriques qui augmentent la surface intestinale et va jusqu'au pylore qui le sépare de l'intestin postérieur. Le méésentéron est la région de la digestion et de l'absorption [66].

1.1.10.3. Proctodeum ou intestin postérieur

Cette partie terminale assure la réabsorption d'eau et de certains ions. Elle se différencie à partir du pylore où s'insèrent les tubes de Malpighi qui forment l'appareil excréteur [66]. D'avant en arrière, il se compose des trois régions, un iléon musculéux, un colon étroit et un rectum dilaté en poche. Une valvule rectale marque la limite entre colon et rectum. Le rectum se termine par un sphincter : l'anus [60].

1.1.11. L'hémolymphe chez les criquets

Selon DURANTON et *al.* [67], l'hémolymphe n'est pas entièrement canalisé dans les vaisseaux comme chez les vertébrés. Il remplit la cavité générale du corps (hémocoèle) et la lumière centrale des appendices. Le sang circule sous faible débit grâce aux pressions engendrées par les mouvements du corps et les effets d'un vaisseau dorsal pulsatile [78]. Le volume de l'hémolymphe augmente à la fin de l'intermue et il décroît juste après la mue. Ce liquide peut être pâle ou coloré par des pigments verts ou jaunes, le pH varie de 6 à 7,5 [79].

1.1.11.1. Composition

L'hémolymphe comprend le plasma et plusieurs types de cellules nucléés, les hémocytes auxquels s'ajoutent quelques cellules adipeuses et des débris tissulaires en suspension [79] et [67].

➤ Le plasma

Le plasma est un mélange d'eau, de protéines (amylase, protéase, enzyme protéolytique et oxydoréductases..) et de glucides (sucres réducteurs et tréhalose) et de constituants azotés (acide urique, allantoinique, urée, ammoniacque et surtout l'acidoaminémie). Le plasma contient également des éléments minéraux

(potassium, sodium, magnésium, calcium et plus rarement du cuivre). Sa densité est supérieure à celle de l'eau : 1,02 à 1,03 g/ml. La pression osmotique oscille entre 4 et 13 atmosphères [79].

➤ Les hémocytes

La densité des hémocytes varie de 7000 à 20000 cellules/mm³ de plasma. Les hémocytes ne sont pas distribués au hasard, mais assemblés en général en agrégats en particulier sur le diaphragme dorsal [67]. D'après la littérature, [80], [81] et [82], on connaît au moins quatre types d'hémocytes principaux distingués selon la taille et la forme du noyau. GILLESPIE, [73] identifie trois principaux types d'hémocytes dans l'hémolymphe de *S. gregaria*, les coagulocytes, les granulocytes et les plasmocytes, aussi bien chez les individus témoins et traités avec *M. anisopliae* var. *acridum* (Figure 1.8).

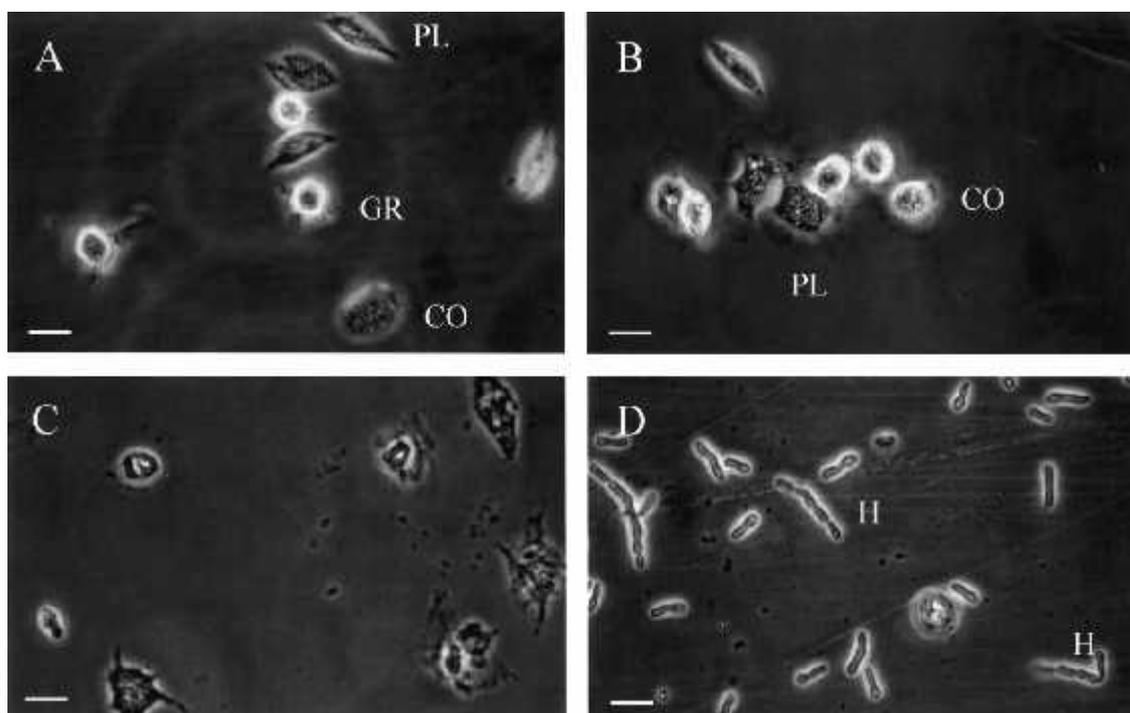


Figure 1.8 : L'hémolymphe de *Schistocerca gregaria* témoin et traitée avec *M. anisopliae* [73]. **A** : témoin, **B** : 1 jour après l'infection. **C** : 2 jours après l'infection.

D : 3 jours après l'infection, **Co** : coagulocytes, **gr** : granulocytes, **PI** : plasmocytes, **H** : hyphes.

1.11.1.2. Rôle de l'hémolymphe

D'après DURRANTON et *al.* [67], les principales fonctions sont d'ordre :

➤ Trophique : transport des nutriments, directement utilisables par les cellules

- Hormonal : transport des hormones des organes producteurs aux organes cibles, destinés à en subir les effets en modifiant leur activité.
- Mécanique : maintien de la turgescence de l'acridien et des organes en place.
- Immunitaire : Certaines cellules ont un rôle dans la coagulation du plasma ou de lutte contre les infections bactériennes ou parasitaires internes.
- Cicatrisante et réparatrice : régénération des tissus en cas de lésions.

1.2. Stratégies et modalités de la lutte antiacridienne

1.2.1. Stratégies de lutte

1.2.1.1. Stratégie préventive

L'intervention précoce peut réduire les frais financiers et les conséquences environnementaux dues à des traitements à grande échelle [85]. Le succès de la lutte repose sur le contrôle de la proportion de la population acridienne avec le but de la maintenir en récession indéfiniment par exemple via l'inoculation d'un agent bioinsecticide dans les concentrations des populations solitaires [86].

1.2.1.2. Stratégie proactive

La proaction est une intervention localisée contre les criquets pour les empêcher d'atteindre le statut de fléau [86].

1.2.1.3. Stratégie réactive

L'intervention a lieu principalement après le déclenchement de l'invasion. La lutte doit se faire avant 9h, lorsque les essaims sont au repos sur le sol [86].

1.2.2. Modalités de la lutte antiacridienne

1.2.2.1. La surveillance

Une détection précoce des changements dans la dynamique des populations acridiennes est indispensable pour une intervention préventive ou proactive. Pour empêcher une quelconque recrudescence des fléaux de criquet marocain durant les campagnes prochaines, les zones de ponte ont été géo-référenciés par l'INPV à fin de planifier des interventions rapides et ciblées [71]. L'utilisation des données météorologiques, des données des satellites et de G.I.S (Système d'information géographique) peuvent améliorer la gestion des données sur les criquets et leur environnement au niveau national et international [86].

1.2.2.2. La lutte

) La lutte physique

➤ Lutte mécanique

La destruction des pontes a été proposée en tout temps par le labour. L'INPV sensibilise les agriculteurs pour labourer leurs terres situées à proximité des zones de pontes classiques de criquet marocain [71]. La destruction des larves et des ailés se fait par le battage avec l'écrasement à l'aube quant les insectes sont peu actifs [86].

➤ Lutte thermique

Se fait par l'utilisation de feu, elle s'effectue à trois niveaux [85]:

- Rabattre les larves vers les cordons d'herbes sèches enflammées.
- Utiliser les lances de flamme sur les terrains pierreux.
- Bruler à l'aube les touffes d'herbes avant la reprise de l'activité des criquets..

) Lutte écologique

La lutte écologique consiste à modifier l'environnement au désavantage de l'acridien et si possible au bénéfice de l'homme. Cela suppose une connaissance approfondie du tempérament écologique des acridiens [65]. Selon ces auteurs les moyens utilisés sont :

- L'inoculation temporaire de certains sites de reproduction
- Les semis de plantes répulsives.
- La suppression des jachères.

) La lutte chimique

L'arsenal chimique utilisé en lutte antiacridienne est très diversifié, les principaux pesticides sont les organophosphorés, les pyréthrinoïdes de synthèse les carbamates et les dérégulateurs de croissance [87].

L'intoxication des acridiens par les insecticides de synthèse provoque de profondes perturbations physiologiques. Celles-ci se traduisent par une perte d'eau intense, un accroissement des échanges respiratoires et une dépression de divers métabolites glucidiques, lipidiques et des métabolites intermédiaires du cycle de Krebs [88].

➤ Les nouvelles molécules insecticides

Les problèmes liés à l'apparition croissante des résistances multiples aux insecticides chimiques chez les insectes ravageurs entraînent la création de nouvelles molécules insecticides [87]. Ces dernières ont un mode d'action

pharmacologique différent des anciens produits. Les nouvelles molécules agissent au stade larvaire, tels que les analogues de l'hormone juvénile (méthoprène) et les inhibiteurs de mues (diflubenzuron) [12]. D'autres molécules ont une action sur les récepteurs nicotiques de l'acétylcholine dont l'imidaclopride est le premier représentant. Ces nouvelles molécules insecticides agissent à de faibles doses et peuvent produire des effets sublétaux plus marqués que ceux de l'ancienne génération

➤ Impact de la lutte chimique antiacridienne

L'arrêt de toute invasion acridienne nécessite, généralement, la pulvérisation d'énormes quantités d'insecticides chimiques sur de grandes surfaces. Cette pratique soulève des problèmes touchant à son coût et à sa nocivité qui ne peut rester sans conséquence très néfastes pour l'homme, les animaux et le milieu [89]. En plus de la destruction de l'entomofaune auxiliaire et la pollution du sol et des eaux souterraines qui est due aux résidus toxiques des produits chimiques.

Selon OULD EL HADJ et *al.* [87], la pollution des écosystèmes naturels par un insecticide peu biodégradable se traduit, à plus ou moins long terme, par une série de phénomènes écotoxicologiques très complexes. Le plus souvent nous ne disposons d'aucune connaissance concernant l'évolution d'un acridicide, son métabolisme, ses possibilités de bioaccumulation ou de biomagnification et les phénomènes de synergie résultant de la présence simultanée d'autres substances ou des conditions du milieu aride. La prévision de l'écotoxicité d'un pesticide est un problème difficile à résoudre du fait de la complexité des mécanismes en cause et de la multiplicité des organismes concernés. Les effets résultant de pollution chronique sont constatés a posteriori lorsqu'ils ne peuvent plus être évités.

d) La lutte biologique

1. Les ennemis naturels

➤ Les prédateurs et les parasites des œufs

Parmi les parasites d'œufs d'acridiens, les *hyménoptères scélionides* qui sont les seuls connus comme de vrais parasites des embryons des locustes et des sautereaux [89].

➤ Les prédateurs des larves et des imagos

DOUMANDJI et *al.* [91], ont cherché les ennemis naturels du criquet marocain étudiés dans 3 des 7 aires grégariques de cet acridien que compte

l'Algérie (région de Ain Boucif, Médéa ; région de Ain Chafia, Sidi Bel Abbes et région de Oued Chaâba, Batna). 23 prédateurs et parasites du Criquet marocain ont été recensés. Il s'agit de 16 espèces d'insectes, 2 espèces d'arachnides, et 5 espèces de vertébrés. Concernant les insectes parasites et prédateurs du criquet marocain, ils sont soit des *Mantidae* (6 espèces), des *Coleoptera*, *Meloidae* (4 espèces), des *Diptera*, *Asilidae* (1 espèce), *Orthoptera*, *Tettigoniidae* (4 espèces) et les *Hymenoptera* (1 espèce). Pour les *Arachnidae* seules deux espèces sont recensées. Les vertébrés sont : le lézard, le hérisson d'Algérie et le chacal et des oiseaux comme les corbeaux (*Corvus corax*) qui se trouvaient en nombre très important, des courvites isabelles (*Cursorius cursor*), de cochevis de Thékla (*Galerida theklae*)

2. Insecticides d'origine végétale

Les deux agents botaniques les plus prometteurs sont extraits à partir de graines d'arbres de la famille des Meliaceae, telle que ; le neem *Azadirachta indica* Juss. et le melia *Melia volkensii* Gürke [92]. L'extrait de neem peut être appliqué en lutte intégrée, soit comme répulsif pour repousser les larves des cultures ou par application locale pour augmenter leur mortalité [93].

3. Les hormones dérégulateurs de croissance des insectes

Les hormones dérégulateurs de croissance des insectes ou « IGR » bloquent la capacité des larves à muer correctement. Ils n'ont pas d'effets toxiques directs sur les vertébrés. Ils restent efficaces après plusieurs semaines et sont souvent utilisés dans les traitements dits en barrières. Le phénylacétonitrile (PAN) est une hormone synthétique agit sur l'instinct de grégarisation des males adultes. Sous l'effet du PAN, les criquets reprennent leur comportement solitaire [17]. Des essais de terrain démontrent que des doses très faibles de PAN pouvaient perturber la grégarisation, diminuer la voracité et le déplacement des criquets et accroître la mortalité par prédation [18]. Il a été prouvé que l'association PAN et *M. anisopliae* a une plus grande efficacité [17] et [18].

4. Les agents entomopathogènes

La lutte biologique par l'utilisation de micro-organismes entomopathogènes est une alternative très prometteuse pour assurer une protection phytosanitaire performante, permettant de protéger les écosystèmes et de préserver la biodiversité, par l'ubiquité naturelle de ces agents microbiologiques. Ils

appartiennent à plusieurs taxons à savoir les virus, les bactéries, les microchampignons, les nématodes et les protozoaires [94].

) Les virus et les rickettsies

Les virus et les rickettsies entomopathogènes sont représentés surtout par : *Melanoplus* et *Rickettsiella* [95].

) Les bactéries

Les espèces entomopathogènes appartiennent aux familles des : *Bacillaceae*, *Pseudomonaceae* et *Enterobacteriaceae*. En lutte biologique, *Bacillus subtilis* est utilisé comme insecticide, bactéricide et biofongicide dans l'agriculture [90].

) Les protozoaires

Les protozoaires entomopathogènes sont représentés par les familles *Amoebidae*, *Nosematidae*, *Neogrageridae* et *Cugregarinidae*. Selon KEITH et KEVAN, [95] *Nosema locustae* peut infecter *L. migratoria* et *S.gregaria*.

) Les champignons

Plus de 500 espèces de microchampignons sont entomopathogènes et jouent un rôle important dans la régulation naturelle des populations des insectes [96]. Ils appartiennent au sous-taxon des *Mastigomycotina*, *Zygomycotina*, *Ascomycotina* et *Deuteuromycotina*. Le plus grand nombre de pathogènes se trouvent dans la classe des Zygomycètes, mais les plus utilisées en lutte biologique proviennent des Deuteromycètes (*Fungi imperfecti*). *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Metarhizium flavoviride*, *B. brogniarti* et *Verticillium lecanii* constituent les espèces des Deutéromycètes qui ont été largement étudiées et produites à grande échelle sous diverses formulations pour servir la lutte biologique [96].

1. 3. Données bibliographiques sur *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* (deuteromycotina : hyphomycetes)

1.3.1. Présentation de la matière active de Green muscle®

Metarhizium est un genre du groupe des champignons anamorphes, autrefois appelés *Fungi imperfecti* ou *deuteromycotina* mitosporiques, qui se reproduisent asexuellement. L'espèce *Metarhizium anisopliae* est cosmopolite, elle est plus commune dans les zones tropicales et subtropicales et vit saprophytiquement dans la plupart des types de sol comme un pathogène facultatif d'insectes [97].

Dans le but de rechercher des méthodes alternatives à la lutte chimique, le projet LUBILOSA (Lutte biologique contre les Locustes et les Sauteriaux) a sélectionné l'isolat IMI 330189 de *M. anisopliae* var. *acridum* Gams & Rozsypal (Deuteromycotina : Hyphomycetes) comme étant la matière active de Green muscle® [98]. En conditions naturelles, cette souche infecte presque exclusivement les orthoptères aux antennes courtes (acridomorpha) (Acridoidea : Acrididae et Pyrgomorphidae) [99].

1.3.2. Position systématique de *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*

La classification de ce genre à été basée sur des caractères morphologiques des cellules et des conidies, et comme ces caractéristiques sont assez limitées elles ont compliqué la taxonomie. *Metarhizium anisopliae* présente selon Bidochka et Small [90] la classification suivante :

- **Règne** : *Fungi*
- **Embranchement** : Dikarya
- **Sous-embranchement** : *Ascomycota*
- **Classe** : *Pezizomycotina*
- **Ordre** : *Hypocreales*
- **Famille** : *Clavicipitaceae*
- **Genre** : *Metarhizium*
- **Espèce** : *Metarhizium anisopliae*

1.3.3. Identification et morphologie de *M. anisopliae* var. *acridum*

La détermination de l'espèce se fait en examinant la forme des spores et des conidiophores, qui sont relativement courts, irrégulièrement ramifiés ou non et arrangés en groupes compacts formant une masse de spores [90]. *Metarhizium anisopliae* peut être aisément identifié par ces conidies vertes particulièrement allongées avec des côtés parallèles (6 µm de longueur et 2 à 3 µm de diamètre) [41] (Figure 1.9)

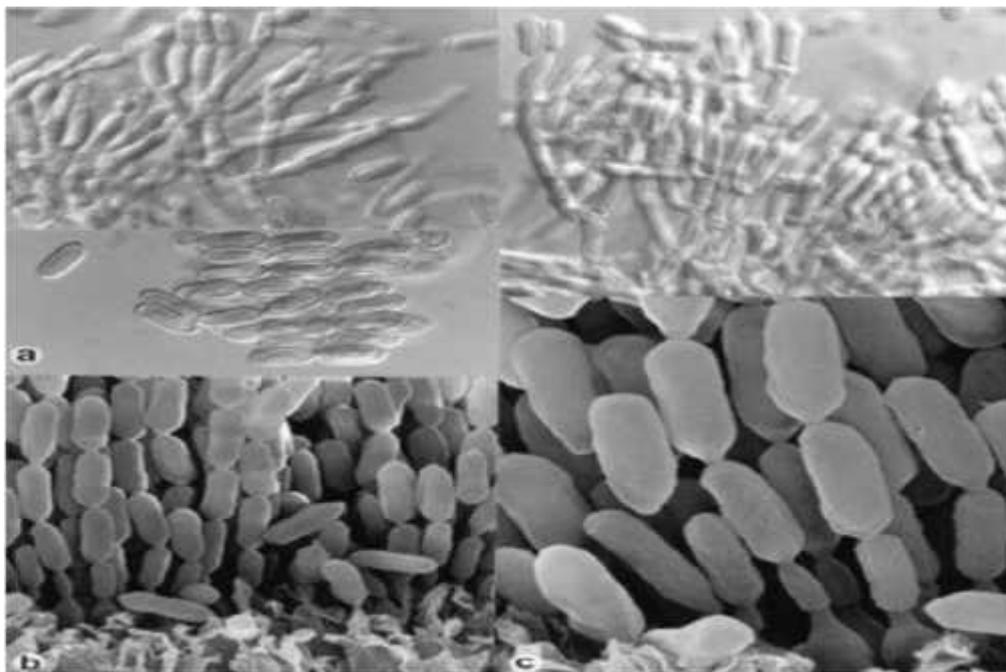


Figure 1.9 : Aspect microscopique de *Metarhizium anisopliae*, a. x1600; b. x2800; c. x7000, [100] et [41]

1.3.4. Isolement, culture et conservation de *M. anisopliae*

1.3.4.1. Isolement

L'isolement du champignon est assez simple si le cadavre d'un criquet est couvert de spores. Cependant, il faut travailler en conditions aussi stériles que possible pour éviter la prolifération des bactéries et des champignons saprophytes. Il faut utiliser des milieux sélectifs aux champignons pathogènes, comme le milieu Veen qui sera incubé à une température de 25 à 30°C.

Si le champignon se trouve à l'intérieur du cadavre, le criquet est stérilisé et est trempé pendant 3 à 4 minutes dans une solution d'hypochlorite de sodium à 5%. L'insecte est rincé trois fois dans de l'eau distillée stérilisée. La dissection se fait sous des conditions stériles. Un peu du contenu du corps est étalé avec une boucle métallique sur un milieu sélectif et incubé entre 25 et 30°C [90].

1.3.4.2. Culture

Les cultures des champignons Hyphomycètes entomopathogènes doivent être examinées tous les jours. Les colonies sont transférées sur un milieu nutritif comme le milieu de Molisch. Cette procédure doit être répétée en cas de contamination, car les colonies saprophytes, les *Penicillium*s et les *Aspergillus*, se développent vite et peuvent envahir une boîte de Pétri en quelques jours [90].

1.3.4.3. Conservation

Les cultures pures de *M. anisopliae* peuvent être maintenues en les transférant de temps en temps sur des milieux fraîchement préparés incubés à 25°C. Cependant, selon les souches, les champignons entomopathogènes peuvent perdre leur pathogénicité. Il est donc conseillé d'isoler à nouveau la souche après deux ou trois transferts si on l'utilise pour des expériences. Si non, on peut prolonger sa survie à 1 an en cultivant la souche sur un milieu peu nutritif (agar avec pomme de terre et carotte ou agar avec pomme de terre et dextrose dilué à un cinquième du normal) dans des bouteilles fermées hermétiquement. Une submersion dans l'huile de paraffine prolonge même la survie à 5 ans. Pour une conservation de plus longue durée, on a recours à la lyophilisation et à l'azote liquide [90].

1.3.5. Formulation et conditionnement du biopesticide Green muscle

1.3.5.1. Formulation

L'application avec succès des produits biologiques comme agents de contrôle microbien dépendra de l'utilisation de l'inoculum approprié, formulé de manière optimale et appliqué au bon moment à un ravageur cible [101]. Généralement, les champignons entomopathogènes sont plus efficaces à l'égard de leurs hôtes dans une suspension huileuse qu'aqueuse. Plusieurs formulations existent à base d'huile végétale ou minérale [102].

Le Green muscle® est conçu pour être utilisé en Ultra Bas Volume (UBV). Les spores de *M. anisopliae* doivent être suspendues dans une formulation huileuse pour être appliquées à l'aide des pulvérisateurs à disque rotatif de divers types: à main, montée sur un véhicule ou sur un avion [93].

1.3.5.2. Conditionnement

Le produit Green muscle® est conditionné sous forme de poudre de spores sèches en technique concentrée (TC) dans des sachets en aluminium ou alors en concentré liquide qui contient 500 g/l dans une formulation huileuse (OF) [103]. Trois facteurs influent sur la dégradation des conidies pendant la conservation et déterminent le choix du matériel de conditionnement : l'humidité, la température et la lumière (les ultra-violet) [103]. Les spores doivent être séchées à 5% de teneur en eau, inférieure à ce taux, elles peuvent se réhydrater en 20 minutes à l'air humide. Il faut prendre soin de protéger les spores contre l'ensoleillement de la mi-journée et les températures extrêmes [98].

1.3.6. Gamme d'hôtes

Il existe plus de 700 espèces d'insectes dans le monde qui peuvent être attaquées par les champignons entomopathogènes. En effet, il y a plusieurs espèces à partir desquelles des isolements de *M. anisopliae* ont été effectués [13] et [103]. L'isolat IMI- 330189 (*M. anisopliae* var. *acridum*), après être choisi comme l'isolat idéal, il a été testé sur beaucoup d'espèces de criquets ce qui a dévoilé que ce dernier infecte quasiment toutes les espèces acridiennes des familles acrididae et pyrgomorphidae, notamment *Schistocerca gregaria*, *locusta migratoria*, *locustana pardalina*, *nomadacris septemfasciata*, *oedaleus senegalensis* et d'autres espèces des criquets sahéliens [99].

1.3.7. Mode d'action de *Metarhizium anisopliae*

L'infection par les champignons entomopathogènes se fait par la pénétration des conidies dans l'hôte par les différentes voies : la cuticule, les stigmates et la voie digestive [97] et [105]. Le mode d'action des champignons entomopathogènes se divise en quatre étapes distinctes qui sont l'adhésion, la germination, la différenciation et la pénétration [94]. (Figure 1.10).

1.3.8. Le développement de l'infection au *Metarhizium* à l'intérieur de l'hôte

Les spores de *M. anisopliae* qui tombent sur la cuticule de l'insecte ou qui sont ramassées de la végétation germent après 24 heures.

- Les hyphes sortant pénètrent dans la cuticule de l'insecte, à l'aide des enzymes (protéases et chitinases), puis se désintègrent en corpuscules hyphales et se répandent à travers le corps [99] (Figure 1.11).
- L'hôte essaie d'enkyster les cellules fongiques (surtout quand leur développement est arrêté par une température élevée). Cependant, la plupart des spores sont capables de se libérer au moment où la température devient favorable à nouveau. Les corpuscules hyphales concurrencent alors l'insecte en nutriments, au fur et à mesure que la biomasse fongique augmente [99].
- D'après GILLESPIE, [83], le développement des hyphes peut être observé dans l'hémolymphe des criquets à partir du 3^e jour d'inoculation. Ce développement commence à s'intensifier à partir du 4^e jour suivant l'infection accompagné d'une réduction considérable du nombre d'hémocytes.
- La colonisation de l'hôte se fait lorsque le champignon parvient à surmonter les mécanismes immunitaires de défense de l'insecte et envahit l'hémolymphe [106].

- L'aptitude de surmonter le système immunitaire des criquets peut être facilitée d'une part par la rapidité de la germination des conidies et de la formation de mycélium et d'autre part via la production de toxines qui paralysent et tuent l'hôte [107].
- La mort de l'insecte survient en général après l'infiltration des différents tissus par les filaments mycéliens causant des dommages par destruction des tissus, entraînant la mort de l'hôte par toxémie [97]. Le criquet meurt également par septicémie, une fois intoxiqués par des toxines produites par les blastospores qui se sont multipliées dans l'hémocœle [75].
- Après la mort de l'insecte, si les conditions de l'environnement sont favorables, du mycélium commence à sortir des articulations. Au bout d'un certain temps, le champignon fructifie et le cadavre devient vert, un phénomène appelé " la muscardine verte" [97] et [99] (figure 1.11).
- Les spores se disséminent peu à peu dans le sol pour infecter d'autres criquets causant ainsi une épidémie.

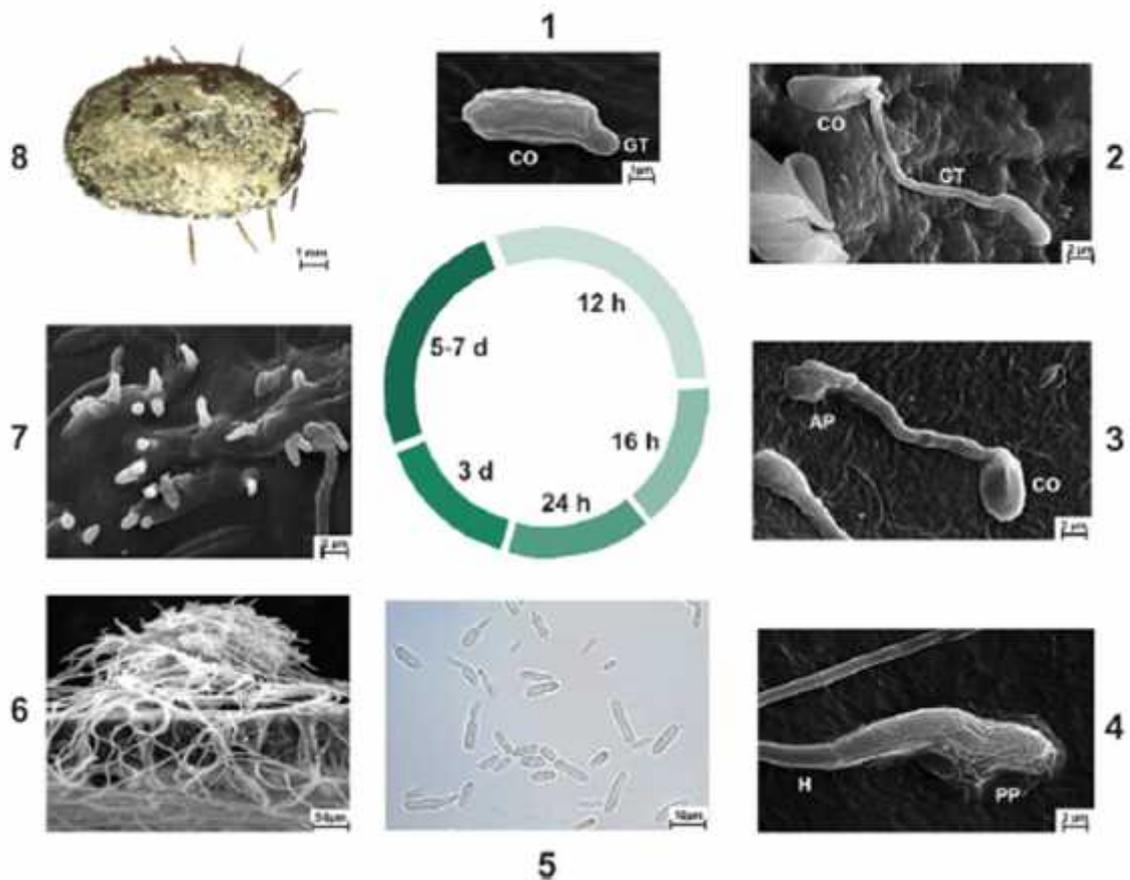


Figure 1.10 : Les évènements du processus de l'infection par *Metarhizium anisopliae* [108].

(1) MEB de l'adhésion des conidies à la cuticule de l'hôte, (2) MEB de la germination des conidies (3) MEB de la germination du tube de différenciation en appressorium (4) MEB de la pénétration de la cuticule, (5) Vue au microscope optique de la différenciation des hyphes dans les blastospores (6) MEB de la colonisation de l'hôte. (7) MEB d'extrusion à la surface d'un cadavre et (8) observation des conidies et des conidiospores produites sur le cadavre. **CO**: conidies ; **d**: jours ; **GT**: tube germinatif ; **AP** : appressorium; **H**: hyphes ; **h**: heures ; **MEB**: microscope électronique à balayage.



Figure 1.11: Images d'acridiens infectés par *Metarhizium anisopliae*
a : Adulte de *Locusta migratoria* [106]. **b**: Larve L4 de *L.migratoria*. Taille réelle : 3,2cm [109]. **c** : Ailé de *Dociostaurus maroccanus* [4].

1.3.9. Facteurs limitant l'efficacité des champignons entomopathogènes

1.3.9.1. Les facteurs de l'environnement

La température et l'humidité relative jouent un rôle limitant sur la virulence de *Metarhizium anisopliae* comme agent de lutte biologique. Ces deux paramètres influencent sur la conservation du pouvoir germinatif des spores et leur dissémination [109]. En zone sahélienne, les conditions environnementales (exposition aux fortes températures et radiations solaires, aridité, les précipitations et le vent) sont des contraintes abiotiques qui limitent l'efficacité des biopesticides [24].

La composition minérale et biochimique du sol, la microflore et la microfaune antagonique sont parmi les facteurs, interagissant dans les écosystèmes, qui peuvent affecter la persistance des entomopathogènes fongiques [91].

La distribution et le type de la végétation, la topographie du terrain et la présence des prédateurs sont tous des facteurs qui influent sur la vitesse et la direction de déplacement des bandes larvaires [111].

1.3.9.2. Les facteurs liés au pathogène

D'après FERRON et *al.* [13], Il existe des différences importantes parmi les souches d'une espèce de champignon entomopathogène à la fois de virulence et de spécificité pour l'espèce hôte. Le potentiel épizootique d'un champignon dépend essentiellement de son ineffectivité, de l'intensité de la sporulation sur les cadavres hôte et de la capacité ultérieure de la souche à envahir les hôtes sains de la population. Dans les conditions défavorables, de nombreux champignons entomopathogènes peuvent rester inactifs sous différentes structures de résistance (chlamydospores, zygosporos ou oospores). Cette résistance peut être importante pour la survie et la régénération de la population du pathogène [94].

1.3.9.3. Facteurs dépendants de l'hôte

Le comportement, l'âge et les conditions physiologiques de l'hôte infectée sont parmi les contraintes biotiques de l'efficacité des entomopathogènes en plus des antagonistes microbiens. L'intensité de l'infection fongique dépend également de la capacité de l'entomopathogène à dépasser les mécanismes de défense employés par l'hôte (quinines et mélanines) pour faire face à cette mycose [110].

1.3.10. Historique sur l'application de Green muscle® sur le terrain Africain

La FAO a placé le biopesticide Green muscle dans la liste des produits recommandés pour le contrôle des locustes. Le produit a fait l'objet de très nombreux tests sur des locustes et des sautereaux en Amérique du Nord et du Sud et en Australie [99].

D'après VAN DER VALK, [17], jusqu'à l'an 2007, 32 études portant sur l'efficacité de Green muscle contre les acridiens en formulation huileuse ont été réalisées en plein champ. Parmi 9 études réalisées avec l'isolat IMI 330189 sur le criquet pèlerin entre 1995 et 2005 en Mauritanie, Niger, Soudan et en Algérie, seuls 6 travaux sont suffisamment détaillés pour pouvoir être examinées :

➤ En 1995, deux études ont été réalisées en Mauritanie avec 5×10^{12} conidies/ha, citées par VAN DER VALK, [17]. La première, réalisée dans la région d'Oued-El Kharob (Nord- Est) a révélée une mortalité de 95% chez les larves traitées au bout de 17 jours et de 100% chez les imagos au bout de 11 jours [112].

La deuxième a Tin- Ouich (sud-est) a aboutit a un taux de 99% de mortalité chez les larves au bout de 18 jours [113].

➤ En 2003, une étude a été réalisée également au centre de la Mauritanie dans la région de Tijirit, citée par VAN DER VALK, [17]. La dose de $1,1 \times 10^{12}$ conidies /ha appliquée en UBV a induit une mortalité de 100% des larves au bout de 11 jours [114].

➤ ASTON, [115], citée par VAN DER VALK, [17], rapporte que l'étude menée a Agagala au Niger en 2003 a révélé que l'application d'une dose de 3×10^{12} conidies/ha en UBV a conduit a une mortalité de 74% des larves de *S. gregaria* au bout de 24 jours.

➤ L'étude menée en Algérie dans la région d'El Oued (Oum Et Thiour) en 2005 conjointement par l'INPV d'El-Harrach - Alger et la FAO sur plus de 1400 hectares infestés de larves de criquet pèlerin. Les résultats ont été très positifs surtout que les conditions climatiques étaient optimales. Le test a permis d'enregistrer un taux qui se situe entre 59% et 94% de mortalité atteint au bout de 10 jours après un traitement appliqué en UBV avec la dose de $2,5 \times 10^{12}$ conidies /ha. [26].

➤ OUAMBAMA et al. [116], cites par VAN DER VALK, [17], mentionnent qu'un taux de 100% de mortalité a été enregistré chez les adultes de criquet pèlerin après le 10^e jour de traitement suite a un essai de lutte dans la région de Agheliough au Niger réalisée en 2005.

❖ Selon DOURO KPINDOU et al. [22], deux expérimentations ont été conduites contre les larves de *Z. variegatus*. La première au sud-est du Bénin, faite avec des formulation huileuse de *M. anisopliae* à des doses de 1×10^{11} , $4,65 \times 10^{11}$, $2,5 \times 10^{12}$ et 1×10^{13} conidies/ha, selon ces auteurs, au-delà de la dose de $5 \cdot 10^{12}$ spores/ha, la réponse effet dose n'est plus significative. La seconde expérimentation conduite dans la région centrale du Ghana. Les traitements étaient appliqués à 5, 10 et 20m entre les passes, correspondant respectivement à des doses de $2,5 \times 10^{12}$, $1,25 \times 10^{12}$ et $0,625 \times 10^{12}$ conidies/ha. Il n'y a eu aucune différence significative au seuil de 5% entre 5 et 10m. Par contre, le traitement avec $1,25 \times 10^{12}$ conidies/ha à une distance de passe de 10 m, a réduit le temps d'application de moitié (17 min au lieu de 34 min). Les auteurs déduisent que les traitements par variation des distances entre les passes ont la même efficacité que le traitement en couverture totale ou irrégulière.

PARAISO et al. [25], indiquent qu'il est possible d'utiliser une formulation aqueuse de *M. anisopliae* avec des doses 10 à 20 fois inférieures à la dose normale dans la lutte contre le criquet du riz. Les applications ont été faites à Malanville au Bénin contre le criquet du riz. Ainsi, 10 g et 5 g de Green muscle sont mélangés à 2 litres d'eau dans lesquels ont été ajoutés 5 g de détergent en poudre. Après 15 jours de traitement avec 5×10^{11} spores/ha et $2,5 \times 10^{11}$ spores/ha, les taux de mortalité enregistrés sont 95% et 73% et les taux d'efficacité atteignent 63% et 50% respectivement.

❖ NIASSY et al. [22], ont évalué la pathogénicité de green muscle (IMI330189) et de trois contraintes locales de *M. anisopliae* var. *acridum* DPV5, DPV10 et DPV15 isolée sur des cadavres de sauterelle dans le Sénégal puis identifiés génétiquement. Les tests sont faits sur *L. migratoria migratorioides* et *Z. variegatus*. La variation de la pathogénicité a été notée sur *L. migratoria*, DPV5 et a causé la mortalité la plus élevée après trois semaines (91.2%). Il y avait une différence significative entre DPV5 et IMI330189. Cependant, il n'y avait aucune différence significative entre IMI330189 et les autres contraintes. L'étude suggère que DPV5 est une souche prometteuse pour la lutte antiacridienne.

❖ ATHEIMINE et al. [19], ont montré l'efficacité de traitement en barrière avec Green muscle à raison de $2,5 \times 10^{13}$ conidies (500 g de conidies /litre), contre des larves de criquet pèlerin. Les larves ont été exposées à la végétation traitée dans des cages placées sur toute la largeur de la barrière. Suite à une exposition des larves pendant 6 h et 24 h, les taux de mortalité ont atteint, successivement, 53 % et 70 % après deux semaines de suivi.

1.4. Données bibliographiques sur la rat Wistar

1.4.1. Classification

| | |
|----------------------------|--------------------------|
| Règne | Animalia |
| Embranchement | Chordata |
| Sous- Embranchement | Vertebrata |
| Classe | Mammalia |
| Sous-classe | Theria |
| Infra-classe | Eutheria |
| Ordre | Rodentia |
| Sous ordre | Myomorpha |
| Famille | Muridae |
| Superfamille | Muroidea |
| Sous-famille | Murinae |
| Genre | Rattus |
| Espèce | <i>Rattus norvegicus</i> |
| Lignée | Rat Wistar, [117]. |

1.4.2. Caractéristiques et physiologie du rat Wistar

Le rat blanc (*Rattus norvegicus* ou rat norvégien) est une espèce génétiquement sélectionné, issue par croissance de la race albinos. C'est un rongeur nocturne, omnivore et coprophage. Le pelage du jeune rat blanc est soyeux, mais devient progressivement rugueux et décoloré avec l'âge. Il possède une large tête, de petites oreilles, des yeux rouges globuleux et une queue. Il se reproduit pendant toute l'année et la gestation dure 21 jours [117].

A la naissance, le raton qui pèse 5g environ est aveugle, mais très actif. Le male adultes pèse 300 à 700 g, alors que la femelle environ 200 à 600 g. Sa durée de vie est de 2 à 3 ans [118]. L'âge moyen à la puberté chez le male est de $27 \text{ j} \pm 1,1 \text{ j}$. chez la femelle est de $34 \text{ j} \pm 2,4 \text{ j}$. Le poids moyen à la puberté chez le male est de $63,3\text{g} \pm 6,8 \text{ g}$ et chez la femelle est de $101\text{g} \pm 12,7 \text{ g}$. L'âge et le poids à l'accouplement chez le male est de 320 - 340 g (10 à11 semaines) et chez la femelle est de 225 - 250 g (11 à 14 semaines) [117].

1. 5. Données bibliographiques sur l'imidaclopride

Le grand succès commercial des insecticides néonicotinoïdes arrive avec la mise sur le marché de l'imidaclopride 1[(6-chloro-3-pyridinyl) methyl]-N-nitro-2-imidazolidinimine [119], le premier membre de la famille des chloronicotinyl nitroguanidine [120].

1.5.1. Propriétés de l'imidaclopride

1.5.1.1. Persistance

La demi-vie (DT_{50}) est le temps que prend 50% de la substance à se dégrader et/ou être éliminé. L'imidaclopride a une DT_{50} entre un et deux ans dans le sol. Cela le caractérise comme étant considérablement persistant [121]. Cet insecticide est plus persistant dans le sol nu que dans le sol couvert de plantes. Ce qui le rend le produit phytosanitaire le plus utilisé pour le contrôle de la *Coccinelle doryphore* de la pomme de terre et le pour traitement de graines [122].

1.5.1.2. Systémie

L'imidaclopride est un produit systémique en traversant les racines vers tout le système vasculaire de la plante au moyen de la sève [120]. Cette propriété assure à la plante une protection de longue durée contre les ravageurs racinaires et aériens puisqu'il est efficace de la levée jusqu'au stade de floraison de la plante. L'imidaclopride peut se retrouver facilement dans le nectar et le pollen [32].

1.5.1.3. Neurotoxicité

En raison de la similarité structurale, l'imidaclopride devient neurotoxique par mimétisme avec la nicotine sur les sites de fixation aux récepteurs nicotiques de l'acétylcholine (nAChR) [123]. Cependant, l'activité neurotoxique de l'insecticide est beaucoup plus spécifique que celle de la nicotine [9], [10] (Figure 1.12).

1.5.2. Mode d'action de l'imidaclopride

Comme les autres néonicotinoïdes, l'imidaclopride se lie aux récepteurs nicotiques post synaptique de l'acétylcholine des insectes (nAChR). Cet insecticide cause un blocage irréversible des nAChR, ce qui conduit à l'accumulation de l'acétylcholine dans les fentes synaptiques [125], [126]. Comme l'acétylcholine-estérase n'a aucun effet sur l'insecticide, le nerf est continuellement surstimulé et se dépolarise rapidement [7]. Cela cause la perturbation de la transmission des stimuli nerveux, la paralysie puis à la mort de l'insecte [127].

L'imidaclopride présente une toxicité plus sélective pour les insectes par rapport aux mammifères. Cette sélectivité est due à la différence qui existe entre les récepteurs nicotiniques des insectes et ceux des vertébrés [130] (Figure 1.13)

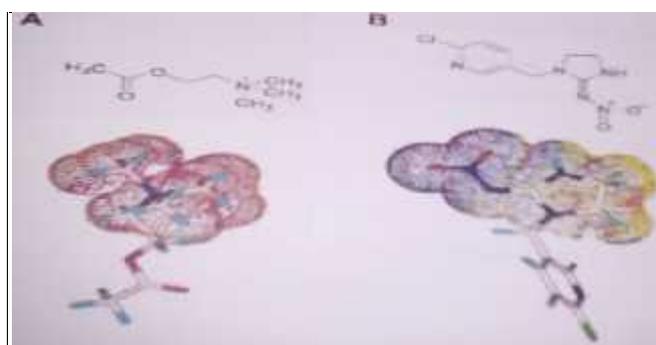


Figure 1.12: Structure chimique et potentielle électrostatique de la nicotine (A) et de l'imidaclopride (B) [124].

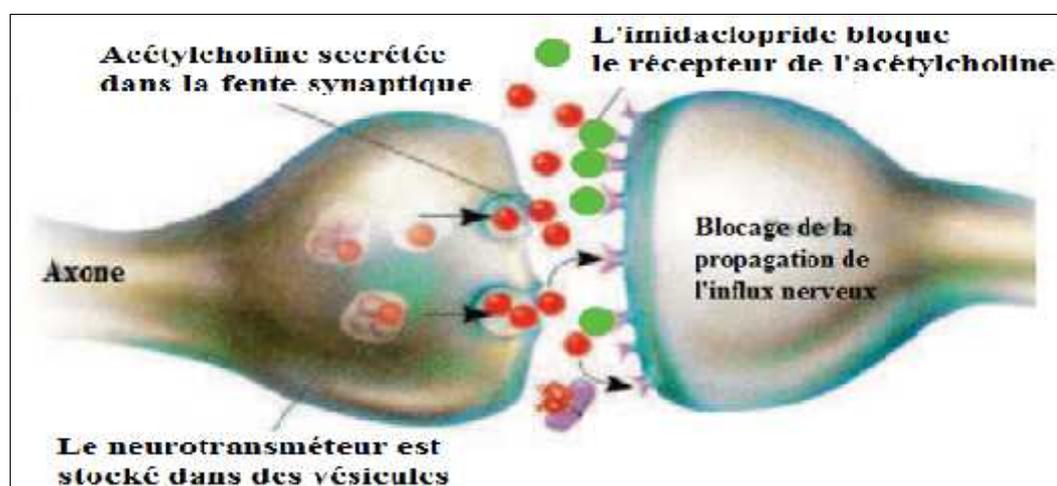


Figure 1.13 : Mode d'action de l'imidaclopride au niveau des synapses nerveuses des insectes [128; modifié].

1.5.3. Toxicité de l'imidaclopride

1.5.3.1. Toxicité environnementale

L'imidaclopride est classé par l'agence de protection de l'environnement à la fois dans les classes de toxicité II et III [129] (Annexe 1), en raison de sa persistance dans l'environnement, son accumulation dans la chaîne alimentaire et dans les produits des animaux tels que le lait, la viande et l'œuf [121].

1.5.3.2. Toxicité sur la santé animale et humaine

La métabolisation de l'imidaclopride par les isoenzymes du cytochrome P450 hépatique peut libérer des métabolites plus toxiques [32]. Ces derniers provoquent l'inhibition du cytochrome C oxydase et par conséquent l'augmentation de la génération des radicaux libres et provoque le stress cellulaire [131]. Ce stress

cellulaire est confirmé par l'augmentation du taux du produit final de la peroxydation des lipides, le malondialdéhyde [120] qui favorise la production des cytokines pro-inflammatoires telles que le facteur de nécrose de tumeur (TNF) et les interleukines IL1B et IL 6 par les leucocytes, ainsi que la production des espèces réactives d'oxygène (ROS) [132].

Ces perturbations engendrent un stress oxydatif en inhibant la capacité antioxydante de la cellule et par conséquent la présence des dommages au niveau des tissus et des organes vitaux tels que le foie, les reins et le cerveau [133] et [134]. Les dommages à l'échelle cellulaire touchent les macromolécules comme les acides nucléiques, les lipides et les protéines ce qui entraîne des altérations fonctionnelles de la cellule cible et accélère sa mort [135]. L'imidaclopride entraîne des dysfonctionnements des systèmes immunitaire et endocrinien [120], [27], des troubles de la reproduction et du développement [136]. Ainsi que des dysfonctionnements neurologiques [137],[138].

Les métabolites de l'imidaclopride peuvent aussi se lier aux acides ribonucléiques et entraînent de ce fait des anomalies génétiques [139]. Ainsi, cet insecticide peut être faiblement mutagénique. Des études sur l'imidaclopride ont montré sa génotoxicité chez les rats [140] et sur les cultures lymphocytaires humaines [141].

1.5.4. Métabolisation

Après absorption par la plante, l'imidaclopride est transformé en nombreux métabolites dont certains sont assez toxiques que la molécule mère pour les ravageurs [125], [142].

Chez l'homme, il a été démontré que CYP3A4 du foie pouvait oxyder et réduire l'imidaclopride. Les différents métabolites de l'imidaclopride sont : le 5-hydroxy-imidclopride (5.OH), le 4,5-dihydroxy-imidaclopride (4,5-OH), l'oléfine, l'acide G-chloronicotinique 6-ACN) et les dérivés guanidine et urée [143], [144]. (Figure 1.14).

Deux métabolites majeurs de l'imidaclopride ont été détectés dans le cytosol du foie chez le lapin : la nitrosoguanidine et l'aminoguanidine [128]. Une différence importante entre les systèmes métaboliques de la plante et de l'animal, les conjugués sont principalement excrétés chez les animaux dans les excréments et les urines, tandis qu'ils sont stockés dans les tissus des plantes [145].

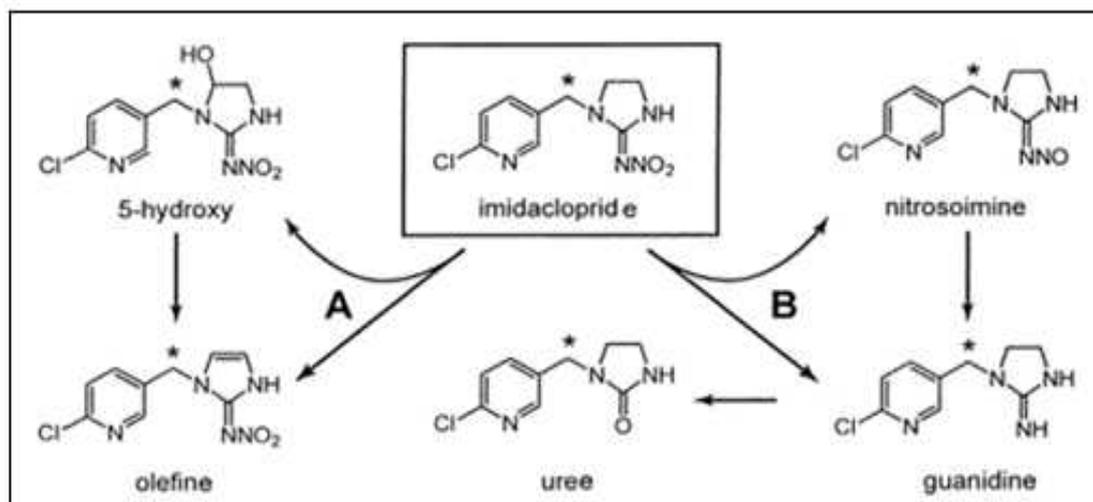


Figure 1.14 : Métabolisation de l'imidaclopride par le P450s chez l'homme [144]. (A) Hydroxylation et dé-saturation de l'imidazolidine. (B) Réduction et clivage du nitrosoimine.

1.5.5. Domaines d'application de l'imidaclopride

L'imidaclopride présente un large spectre d'efficacité en particulier sur les insectes piqueurs-suceurs, et les insectes ravageurs incluant les sauterelles, les coléoptères et les insectes de l'herbe et du sol et les aleurodes qui ravagent les arbres fruitiers, agrumes et cucurbitacées [145], et même pour les plantes d'ornementation [146]. L'utilisation de cet insecticide a permis une production alimentaire suffisante pour une population en grande croissance [147] et la lutte contre les parasites de gazon [148]. L'imidaclopride a contribué à l'amélioration de la santé publique en luttant contre certains insectes et moustiques vecteurs de maladies infectieuses [128]. Son emploi en médecine vétérinaire est récent, Il est introduit dans les médicaments pour les chats et les chiens pour le contrôle des puces et des coquerelles sur les animaux domestiques [149].

CHAPITRE 2

PRESENTATION DE LA REGION D'ETUDE

Afin de réduire les doses d'utilisation des insecticides chimiques appliqués en lutte antiacridienne et de promouvoir la lutte biologique, nous nous sommes proposés, sous la direction d'une équipe de cadres de l'INPV d'El-Harrach-Alger, de réaliser des essais en milieu naturel, sur des populations larvaires de 3^e et 4^e stade de *Dociostaurus maroccanus* (Thunberg, 1815).

Nous avons choisis de conduire nos expérimentations de terrain au Nord-Ouest de l'Algérie, la région Marhoum, (Sidi-Bel-Abes). Les essais sont réalisés en Avril - Mai 2016 et ont porté sur l'étude de l'efficacité de deux produits. Le premier est l'insecticide chimique imidaclopride (MIDA[®]), et le biopesticide Green muscle[®]

2.1. Présentation et situation géographique de la région d'étude

La station d'étude est située dans l'une des zones potentielles de reproduction de *D. maroccanus* citées par, PASQUIER, [69] - [70] et DOUMANDJIMITICHE et *al.* [3], et répertoriées par l'INPV, [71]. C'est l'un des foyers classiques grégarigènes de *D. maroccanus* ayant enregistré de fortes activités à partir de l'année 1999 après plusieurs années de recrudescence. Cette activité résulte des conditions éco-météorologiques particulièrement favorables.

La commune de Marhoum s'étend sur une superficie de 9150 km², située au Sud-Est de la Wilaya de Sidi-Bel-Abbes qui se retrouve à 450 km à l'Ouest d'Alger. Sidi-Bel-Abbes est limité par les wilayas suivantes : Oran au Nord- Est, Ain Témouchent au Nord-Ouest, Tlemcen à l'Ouest, Nâama au Sud- Ouest et El-Bayad au Sud- Est. A l'Est de la Wilaya, on trouve également les Wilayas de Mascara et Saida (Figure 2.1). La station expérimentale se localise au niveau du lieu dit El-Menzeh au Nord de la commune de Marhoum, aux points, latitude 34°26'45.61 Nord et longitude 00°11'42.08 Ouest, d'une superficie d'environ 1.5 ha et d'une altitude de 1195 m. Deux sites ont été retenus pour la réalisation des essais (l'un pour le produit biologique et l'autre pour le produit chimique). La distance entre les deux sites est plus de 1 km.

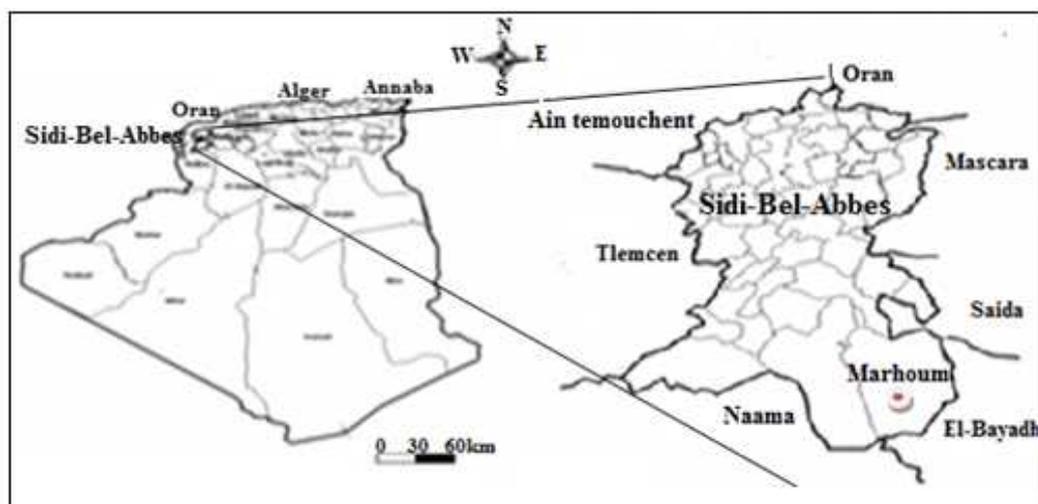


Figure 2.1: Localisation du site expérimentale ([5], modifié)  Site d'étude

2.2. Géomorphologie

2.2.1. Relief

Le relief de la Wilaya de Sidi-Bel-Abbes peut être décomposé en trois grands ensembles naturels distincts [150].

➤ Les zones de montagnes

Elles couvrent 24,59% de la wilaya. Elles occupent au nord, les monts de Tessala, de Beni Chougrane et la partie centrale de la wilaya par les montagnes de Dhaya.

➤ Les zones de plaine

Elles couvrent 35,40% de la wilaya. Elles sont représentées par la plaine de Sidi Bel Abbes dont l'altitude varie entre 400 à 800 m et les hautes plaines de Telagh, 400 à 1000 m d'altitude.

➤ Les zones de steppe

Elles constituent le sud de la wilaya, y compris la région Marhoum, et occupent une superficie totale de l'ordre de 3 660,82 km² soit 40% de l'espace de wilaya dont l'altitude varie de 1 000 à 1 400 m.

Le relief de la région Marhoum est dans l'ensemble très aéré, peu élevé et assez uniforme. Il est constitué dans la grande partie par des collines. Le reste de la circonscription est constitué par des surfaces homogènes où sont cultivés les céréales secondaires, orge et avoine.

2.2.2. Pédologie

La région de Marhoum est une zone jachère caractérisée par un sol caillouteux à texture argilo-limoneuse et une végétation peu dense qui est surpâturée et très basse (la hauteur ne dépasse pas 10cm) (Figure 2.2). Le sol est

constitué de la roche mère calcaire, compacte et caillouteuse. La texture du sol impose une faible teneur en matière active et une faible capacité de rétention en eau ne permettant que le développement d'une végétation xérique adaptée aux conditions du milieu [151].

2.3. La végétation

2.3.1. La végétation naturelle

La composition et la diversité du couvert végétale au niveau de la commune de Marhoum, varient selon le gradient Nord-Sud. Au Nord se développent les formations graminéennes dominées par l'Alfa (*Stipa tenacissima*). D'autres groupements floristiques, associant des espèces spasmophiles, *Stipa parviflora*, *Noaea mucronata*, *Peganum harmala* (ces deux dernières espèces étant indicatrices de dégradation de la steppe et d'ensablement), Au sud se développent quelques espèces halophiles, *Atriplex halimus* et *salsola vermiculata*, Avec quelques formations forestières basses dégradées et hétérogènes à base de pin d'Alep, chêne vert, genévrier et quelques espèces buissonnantes du *Pinetum halpensis* et du *Quercetum* [151].

Les travaux entrepris dans le site expérimentale El-Menzeh- Marhoum par CHAOUCH, [5]. mettent en évidence des groupements à *Stipa tenacissima*, *Artemisia herba alba*, *Lygeum spartum*, *Thymelea microphila*, *Peganum harmala*, *Helinathemum lipii*, *Aristida pungens*, *Stipa lagascae*, *Helinathemum hirtum*, et *Thymelea microphylea*.

2.3.2 Agriculture et espaces de parcours

La surface agricole totale de Sidi-Bel-Abbes couvre 52,504 ha et présente seulement 13,25 % de la superficie totale. Elle occupe le tiers des zones du Nord et un peu moins du dixième des zones du Sud. Cette superficie agricole est répartie entre 1985 exploitations dont 45% relèvent du domaine public (Exploitation Agricole Collective). Elle est dominée par les céréales (1420 ha avec 450 ha de blé dur, 840 ha de blé tendre, 1400 ha d'orge et 111 ha d'avoine) [151].

La céréaliculture a connu son apogée en 1996, mais une baisse brutale s'est produite ensuite. Cette chute résulte, d'une part, de l'augmentation de plus de 200% en moins de cinq ans du prix d'achat des intrants [151] et d'autre part, de rendements souvent très faibles [152].

L'espace de parcours agricole est temporaire et se limite à une exploitation des terres à vocation agricole par les troupeaux. Après la récolte, c'est la

céréaliculture qui domine. Ce type de parcours dont les pailles et les chaumes fournissent environ 100 unités fourragères mais ne retiennent les troupeaux que 3 mois au maximum (entre Juillet et Septembre). Les jachères qui occupent près de 20% de la surface agricole utile constituent des « prairies » mises à la disposition des troupeaux pendant quelques mois. Elles sont en liaison directe avec la céréaliculture dans le cadre de la rotation et de l'assolement [153].

C'est le domaine de la steppe à *Stipa tenacissima* qui est utilisé durant toute l'année [150]. Le parcours est intense durant les mois de Mars à juin pour la strate herbacée colonisant les micro-dépressions entre les touffes d'Alfa et durant toute l'année sur les plantes dominantes que sont *Stipa tenacissima* ou *Artemisia herba alba*. Le parcours forestiers constitue toutes les formations forestières généralement très dégradées et ne représente qu'une très faible superficie inférieure à 2% de la surface totale [150].

2.4. Le climat

Le climat de Sidi Bel Abbès est très chaud en été. En hiver, la neige tombe parfois en abondance, mais ne s'accroche pas et part avec le premier redoux. Des températures au lever du jour peuvent être basses, atteignant facilement l'extrémum de -7 °C. Au printemps, les gelées blanches sont à redouter. Le climat de la région « Marhoum » est considéré comme un climat semi-aride, modérément froid à frais en hiver et chaud en été avec quelques journées de sirocco. Le climat de la steppe a fait l'objet de plusieurs travaux, il est de type méditerranéen semi aride inférieur à aride froid avec des précipitations moyennes annuelles de 271mm, une température moyenne maximale du mois le plus chaud de 34,5°C et une température moyenne minimale du mois le plus froid de -0,5°C avec un coefficient pluviométrique entre 24,5 et 27,7. La période de sécheresse est généralement supérieure à 7 mois, d'Avril à Octobre [153].

2.4.1. Précipitation

La pluviométrie moyenne annuelle de la région de Marhoum de 2000 à 2010 est de 336,1 mm. Depuis ces dernières années. Une baisse très sensible des précipitations est enregistrée dans la wilaya de Sidi-Bel-Abbès engendrant des déficits importants surtout en cultures vivrières [153].

2.4.2. Températures

Les températures se caractérisent par une moyenne assez élevée en été (32°C à 37°C) dans les régions du Nord et 35°C à 38°C dans les zones steppiques dans le

Sud. Les températures moyennes sont de l'ordre de 2°C à 3°C dans le Nord et 0°C à 1°C dans le Sud

D'après le diagramme ombrotermique des années 2014 -2015- 2016 (Figure 2.2) nous remarquons que la période des mois secs est de cinq mois (d'avril à aout) pour l'année 2014 ; de 6 mois pour l'année 2015 (d'avril à septembre) et s'étale de cinq mois (de juin à octobre) en 2016.

2.4.3. Le vent

Les vents dominant sont ceux du Nord-Ouest, Ils soufflent en toute saison pendant 10 à 15 jours par mois. Les vents du Nord également répartis sur toute l'année, soufflent de 4 à 5 jours par mois. Tandis que ceux de l'Ouest, soufflent pendant 7 à 10 jours par mois et sont caractéristiques de l'hiver. Ceux du Nord soufflent sur une période de 7 à 8 jours par mois de l'été. Le Siroco souffle environ 15 jours par an lors des mois de Juillet et Août [153].

2.5. La cibles des traitements réalisés sur terrain

Les deux sites d'étude choisis dans la région Marhoum pour la réalisation des traitements, chimiques et biologiques, renferment plusieurs taches ou bandes larvaires de criquet marocain.

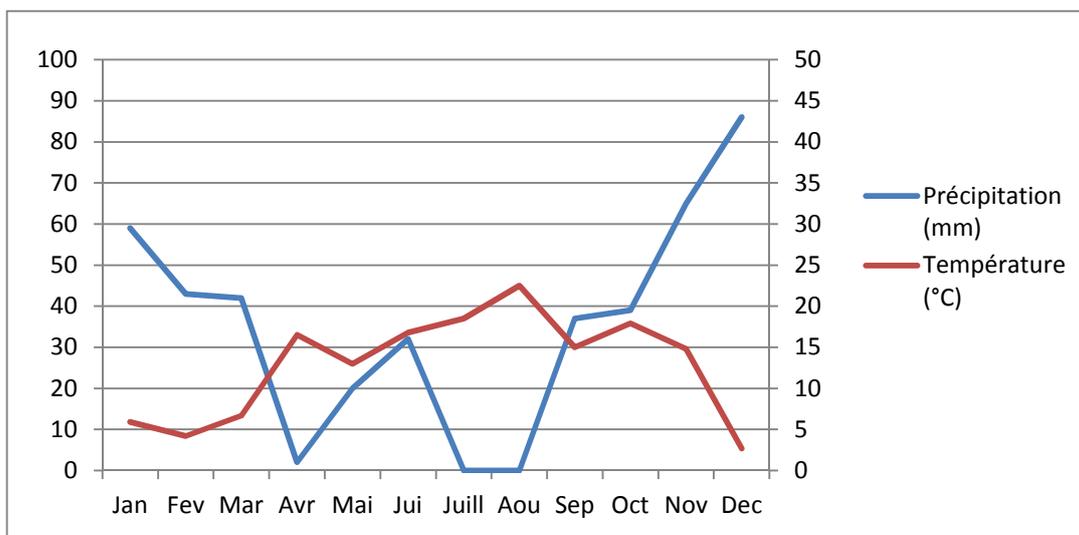
Nous avons choisis de conduire nos essais sur des populations larvaires de *D. maroccanus* de 3^e et de 4^e stade de leur développement. Ce choix est justifié par le fait que les larves de stade 1 et 2 sont vulnérables, tandis que les larves de 5^e stade peuvent effectuer leur mue imaginale (devenir des aillés) avant de succomber au traitement.

Contrairement aux années précédentes, les premières éclosions de criquet marocain ont été observées durant la dernière décade d'avril 2016. Ce retard est dû, probablement, aux conditions météorologiques exceptionnelles.

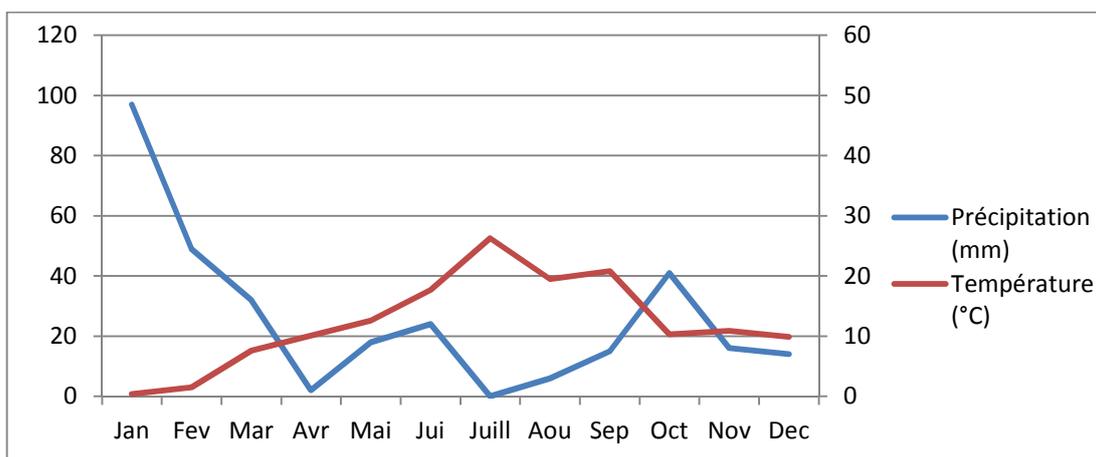
2.6. Faune prédatrice naturelle de la région d'étude

Il y a lieu de signaler que plusieurs ennemis naturels ont été rencontrés sur les sites expérimentaux, essentiellement les oiseaux comme les corbeaux (*Corvus corax*) qui se trouvaient en nombre très important, des courvites isabelles (*Cursorius cursor*), de cochevis de Thékla (*Galerida theklae*), des lézards, des coléoptères, des fourmies et des araignées qui ont consommé les cadavres et les larves affaiblies par les traitements.

Année 2014 :



Année 2015 :



Année 2016 :

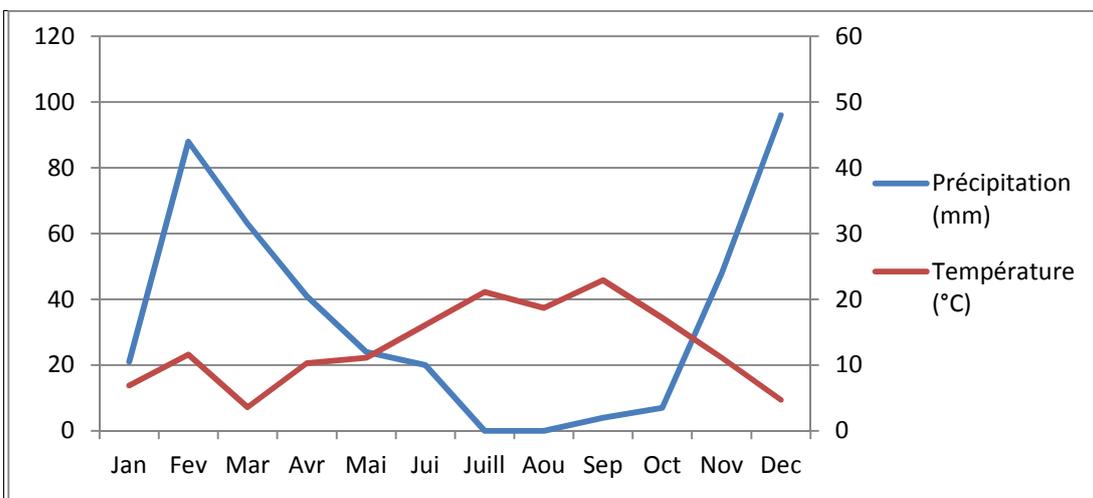


Figure 2.2: Diagramme ombrothermique de la région Marhoum –Wilaya de Sidi-Bel-Abbes au cours des années 2014- 2015- 2016.

CHAPITRE 3

MATERIELS ET METHODES

3.1. Présentation des principaux matériaux utilisés

3.1.1. Matériels biologiques

3.1.1.1. *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*

La souche fongique utilisée lors des différents essais réalisés sur terrain et aux laboratoires est *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* (l'isolat IMI 330139), développé en un biopesticide, le GREEN MUSCLE ®. Ce produit est fabriqué par LUBILOSA (Lutte biologique contre les Locustes et les Sauteriaux) et est spécifique aux espèces de criquet à antennes courtes (*Acridoidea* : *Acrididae* et *Pyrgomorphidae*). Le biopesticide est conditionné dans des sachets de 1kg (au minimum 5×10^{10} conidies /g), sous forme de poudre sèche de spores en couleur verte marine (Annexe 1). Le biopesticide est fourni par l'INPV d'El-Harrach. Le produit est conservé à 4°C. Nous avons utilisé le Green muscle d'une part pour évaluer son effet sur les larves de criquet marocain et d'autre part pour évaluer sa biosécurité vis-à-vis des rats Wistar femelles.

3.1.1.2. Criquet marocain, *Dociostaurus maroccanus* (Thunberg, 1815)

Nos expériences sont conduites sur des populations larvaires de criquet marocain originaires de La région Marhoum, Sidi-Bel-Abbes.

Pour servir aux différents tests de mortalité réalisés au laboratoire, des larves de *D. maroccanus* sont capturées puis transportées dans des cages depuis la région Marhoum jusqu'à l'INPV d'Alger. Les larves sont gardées sous des conditions expérimentales contrôlées. La salle d'élevage est munie d'un système de chauffage permettant de maintenir une température constante de 28 à 30 °C, avec une photopériode de 12 h de lumière par jour.

3.1.1.3. Rats Wistar femelles

Pour l'évaluation de la toxicité subchronique de Green muscle et de la toxicité subaigüe de l'imidaclopride vis-à-vis des mammifères, nous avons utilisé un modèle animale, les rats femelles de souche *Rattus norvigicus* Wistar. Les animaux acquièrent auprès de l'institut pasteur de Kouba- Alger. Les rats sont répartis dans des cages de polypropylène de 30cm /40cm /15cm qui sont tapissées d'une litière constituée de copeaux de bois. Dès leur arrivée à l'animalerie, au niveau de la station expérimentale de la Faculté des Science de la

Nature et de la Vie à l'université de Blida 1, les rattes sont soumises à une période d'acclimatation, pendant 1 semaine, à température ambiante ($24 \pm 1^\circ\text{C}$), et une photo période de 12h /12h. Tous les animaux reçoivent de l'eau par des biberons et un régime alimentaire standard équilibré sous forme de bouchons provenant de la société industrielle de concentré à Bouzerea, Alger.

3.1.2. Matériels non biologiques

Les matériels comportant les équipements, les appareillages, utilisés lors de nos expérimentations, voir l'annexe1. Les principaux matériaux sont les suivants :

3.1.2.1. Milieux de culture

Nous avons utilisé les milieux PDA (Potatos Dexton Agar), MALT, V8 et Baath dont la composition est mentionnée dans l'annexe1. Ces milieux sont stérilisés par autoclavage à 120°C . Les boites remplies de moitiés avec ces milieux, sont étiquetées clairement et sont fermées hermétiquement par du para-film. Les cultures sont maintenues dans des étuves thermoréglables. Toutes les manipulations sont effectuées avec un matériel stérilisé, devant un bec benzène et sous une hotte stérilisée, via les rayons Ultra-Violet (UV), à fin d'éviter toutes contaminations. Ces manipulations sont réalisées au laboratoire du département de lutte antiacridienne à l'INPV.

3.1.2.3. Insecticides et équipement de traitement de terrain

L'imidaclopride (MIDA[®]), un insecticide néonicotinoïde, conditionné dans un flacon contenant 250 ml de solution concentrée à 20% (200 g/ml). Très peu de données sont enregistrées sur l'utilisation des insecticides néonicotinoïde en particulier l'imidaclopride en lutte antiacridienne [12]. Nous avons utilisé le produit d'une part pour déterminer son efficacité à faibles doses vis-à-vis des larves de *Dociostaurus maroccanus* dans les conditions de terrain et de laboratoire et d'autre part pour évaluer la toxicité orale subaigue de l'insecticide vis-à-vis des rats wistar femelles.

➤ Le Deltaméthrine (DECIS[®]) est un pyréthrinoïdes de synthèse, conditionné dans un flacon contenant 1l de solution concentrée à 12,5 g/l. Le produit est homologué en Algérie et est largement appliqué en lutte antiacridienne. DECIS est choisi comme insecticide de référence, connu pour son excellent effet acridicide sur les larves et les adultes des criquets, agit par ingestion et par contact (effet choc au bout de quelques minutes). Deltaméthrine présente des niveaux de rémanence variés et ayant un spectre d'action large [156]. Le Decis est appliqué

sur terrain dans les mêmes conditions de traitement que ceux de l'imidaclopride. Les insecticides ont été fournis par l'INPV d'El-Harrach –Alger.

- Les traitements de terrain avec le Green muscle sont réalisés par un pulvérisateur en Ultra-Bas-Volume (U.B.V.) L'appareil utilisé est le Micronaire AU 8115 (Micron Sprayers Ltd.) monté sur un véhicule léger.
- Les traitements de terrain avec les insecticides chimiques sont réalisés par un pulvérisateur en ultra bas volume motorisé à dos.
- La vitesse et la direction du vent (mesurées à 2 m au-dessus du sol) par un appareil ventilo mètre de type : KESTREL, la température, l'humidité relative, sont mesurés par un appareil Digital Psychromètre de type EP 8706.

3.1.2.4. Matériels utilisés pour l'étude histologique et hématologique

- Chez les rats Wistar

L'ensemble des rats a fait l'objet de pesées hebdomadaires avec une balance électrique. La décapitation et la dissection des animaux ont permis de recueillir le sang dans des tubes à EDTA et à héparine pour le dosage de quelques paramètres sanguins et de prélever quelques organes. Qui sont pesés avec une balance de précision puis destinés à l'étude histopathologiques [157], [158].

-La dissection des animaux sont réalisés au niveau du laboratoire de recherche, Biotechnologies, Environnement et Santé, université de Blida1.

- L'analyse des différents paramètres sanguins est faite dans le laboratoire d'analyses médical privé à Blida.

- L'étude histo-pathologique et l'observation des coupes histologiques, sous microscope optique lié à un dispositif de prise des photos, sont conduites au niveau du laboratoire de cytologie au service d'anatomie pathologique, du Centre Hospitalo- Universitaire Hussein Dey-Alger.

- Chez les criquets marocain

Après l'échantillonnage des larves de criquets marocain avec un filet fauchoir, nous avons prélevé l'hémolymphe avec une micro seringue. Nous avons réalisé des frottis sanguins sur des lames en verres, colorées ensuite par May- Grunwald-Giemsa (MGG) et observées au microscope optique. Sous une loupe binoculaire et avec les outils de la trousse de dissection, les larves sont disséquées pour prélever le tube digestif et quelques fragments de tégument pour l'étude histopathologique.

3.2. Méthodes des études de terrain avec MIDA® et Green muscle® sur les larves de *D. maroccanus*

Les méthodes d'application des traitements chimiques (MIDA® et DECIS) et biologique (Green muscle) en milieu naturel de la région « Marhoum », sont conformes aux normes décrites par l'Organisation Européenne et Méditerranéenne pour la Protection des Plante (OEPP) [157]. L'application des traitements est réalisée par une équipe de cadre de l'INPV d'EL-Harrach- Alger.

3.2.1. Essai de lutte en milieu naturel avec l'insecticide imidaclopride

A travers cet essai, nous avons évalué l'efficacité des doses réduites de l'Imidaclopride (MIDA®). Le produit est testé sur les larves de la sauterelle marocaine de 3^e et 4^e stade à la recherche de la dose efficace la plus faible. Nous avons étudié également l'effet rémanent de la dose recommandée. L'imidaclopride est comparé avec un produit de référence : l'insecticide deltaméthrine (DECIS®). Les différents travaux se sont déroulés du 01Mai au 5 Mai 2016.

3.2.1.1 Préparation des formulations de traitement

D'après les manuels d'utilisateur de l'imidaclopride et de deltamétrine, les deux insecticides sont des produits concentrés émulsifiables (EC) c'est-à-dire que les formulations à base de la matière active sont en solution aqueuse. Le volume d'eau est adapté selon le type de l'appareil de pulvérisation.

- MIDA® est un insecticide de la famille des chloronicotinyles, la matière active, Imidaclopride est concentrée à 200 g/l. MIDA® est recommandé, contre les aleurodes et les pucerons à la dose de 0,5 l/ha.

Dans notre essai, nous avons appliqué les traitements avec cet insecticide au niveau de six parcelles avec la dose recommandée et avec cinq doses décroissantes par des dilutions au demi de la dose recommandée. Les doses testées sont les suivantes.

- La dose recommandée (DR) est 0,5 l/ ha ou 5 ml /100m²
- DR/2 : 2,5 ml de produit MIDA
- DR/4 : 1,25 ml de produit MIDA
- DR/8 : 0,625 ml de produit MIDA
- DR/16 : 0,312 ml de produit MIDA
- DR/32 : 0,156 ml de produit MIDA

Les formulations sont préparées le jour même de traitement, chaque volume prélevé du produit par une micropipette est mélangé dans un bidon en plastique remplie avec 5l d'eau. Après agitation de quelques minutes, les formulations aqueuses ainsi préparées sont pulvérisées chacune dans une parcelle de 100 m².

➤ DECIS® est un insecticide de la famille des pyréthriinoïdes de synthèse, la matière active, la deltaméthrine est concentrée à 12,5 g /l. Nous avons appliqué le produit de référence à sa dose recommandé 1 l /ha c'est-à-dire 10 ml /100 m². Cette dose est diluée dans un bidon contenant 5 l d'eau pour le traitement de parcelle de 100 m².

3.2.1.2. Dispositifs expérimentaux

Nous avons délimité des parcelles de 100 m² avec des balises. Dans chaque parcelle nous avons installé un à deux enclos de terrain de 9 m². Les enclos sont délimités par un film en plastique transparent, entouré sur des piquets en fer de 0,5 m de hauteur, bien enfoncé dans le sol pour empêcher la fuite des larves. La mise en place des enclos de terrain est réalisée un à deux jours avant traitement selon la présence des taches larvaires de *D. maroccanus* de 3^e et de 4^e stade (L3 et L4). Les parcelles sont séparées l'une de l'autre d'au moins 300 m.

Au niveau de chaque bloc, nous avons inséré des étiquettes sur lesquelles nous avons noté la dose et l'heure de traitement, la densité larvaire avant traitement... La végétation présente au niveau des enclos de terrain témoin et traitées est basse et montre une faible densité. Les larves emprisonnées dans les enclos ont consommé la végétation naturellement présente sur le terrain.

3.2.1.3. Modalités et méthode de traitement

La pulvérisation des insecticides est faite en Ultra-Bas-Volume (UBV) par un pulvérisateur monté à dos (porté par un manipulateur) avec un réservoir de 10 l. Le débit de la pulvérisation est estimé à 0,5 l/min. Aucune pulvérisation n'a été appliquée dans la parcelle témoin.

La méthode la plus utilisée, pour obtenir un dépôt moins irrégulier des gouttelettes, est de faire chevaucher les andains en adoptant un espacement entre chaque deux passages successifs. L'andain est défini comme la distance sur laquelle se dépose la plus grande partie du produit depuis le point d'émission. Un pulvérisateur portable s'utilise avec un espacement entre les passages inférieur à la moitié de la largeur de l'andain. Le pulvérisateur se déplace entre les passages face au vent et pulvérise selon la direction du vent à fin d'éviter sa

contamination et pour que les fines gouttelettes soient entraînées latéralement par le vent (Figure 3.1 a et b).

Dans notre cas, pour les traitements chimiques avec un pulvérisateur portable, nous avons effectué des passages délimités par deux mètres entre passes. Nous avons commencé le traitement 2m après la limite de la parcelle Les passes sont tracés au préalable dans des parcelles de 10 m de diamètres. Nous avons commencé le traitement 2m après la limite de la parcelle. A noter que lors du traitement, le pulvérisateur pénètre dans les blocs pour effectuer les passages de pulvérisation. Le réservoir et les conduits de l'appareil de pulvérisation sont bien rincés après chaque traitement.

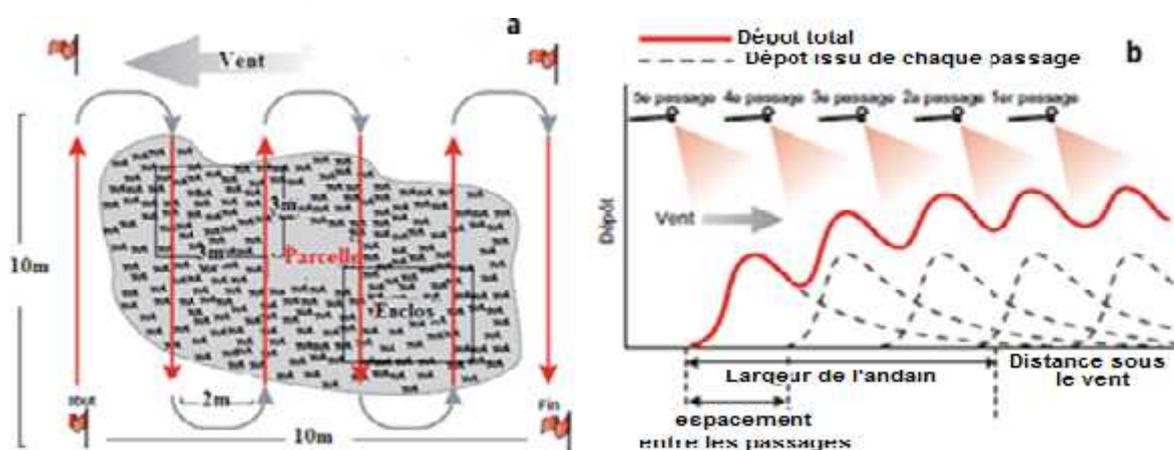


Figure 3.1 a et b: Méthode de traitement en couverture totale d'une parcelle de 100 m² ([158]- modifié).

3.2.1.4. Étude de la rémanence de l'imidaclopride sur la végétation traitée

A fin d'étudier la persistance d'action de l'imidaclopride au niveau de la parcelle traitée avec la dose recommandé (DR= 5 ml/ 100 m²), nous avons utilisés des larves de *D. maroccanus* non traitées, collectées d'une localité distante de 1 km environ des parcelles traitées. Les larves (L3 et L4) sont capturées à l'aide d'un filet de capture puis introduites dans une cage en bois grillagées (50x50x50 cm) pour leurs déplacement

L'effet rémanent de l'imidaclopride est comparé avec celui du produit de référence, le deltaméthrine. Ainsi, 24 heures après l'application des produits chimiques avec les doses recommandés des deux insecticides, nous avons libéré des larves (L4 et L3) dans chacun des deux enclos de terrain à raison de 10 larves /m². Ces enclos ont été installés à vide avant l'application les traitements chimiques.

3.2.1.5. Observations de terrain et suivis des fluctuations des larves

Au cours de l'essai, une attention particulière est accordée à la collecte des informations sur le comportement des larves, les symptomatologies de la toxicité par l'imidaclopride...

Les densités moyennes dans chacun des enclos de terrain sont évalués en faisant le comptage du nombre des individus /m². Ainsi, l'évaluation de la densité des criquets vivants est effectuée dans les carrés fixes de dimensions 1m x 1 m, Le dénombrement des larves, facilité à l'aide de compteur manuel, est fait juste avant traitement et puis suivis dans le temps (chaque 10 minutes) jusqu'à l'épuisement de toute la population traitée.

3.2.2. Essai de lutte en milieu naturel avec biopesticide, Green muscle ®

A travers cet essai, nous avons étudié l'efficacité de trois concentrations de Green muscle. Pour mieux comprendre la physiologie des larves traitées avec *M. anisopliae* var. *acidum* dans les conditions de terrain, des observations plus approfondies sont étudiées sur le plan hématologique et histopathologique.

3.2.2.1. Évaluation du pouvoir germinatif de Green muscle® avant traitement

Selon le manuel d'utilisation de Green Muscle, [103], la dose recommandée du produit est de 50 à 100 g de matière active (conidies de *M. anisopliae* var. *acidum*) par hectare. Avant tous traitements, il est indispensable de calculer le taux de germination du champignon qui nous renseigne sur la viabilité des conidies [159]. Nous considérons une spore comme germée quand un tube germinatif est émise et au moins aussi long que la largeur de cette spore.

- Si le taux de germination est supérieur ou égal à 70%, maintenir la dose recommandée de Green muscle à 50 g/ha.
- Si le taux est compris entre 40 et 70%, appliquer 100 g/ha.
- Le produit avec un taux inférieur à 40% est considéré périmé.

Le test de germination est réalisé au laboratoire quelques jours avant traitement. Le test est décrit et utilisé par ATHEIMINE et al. [19] (Voir annexe1). Nous avons trouvé que 78,33% des conidies sont viables.

3.2.2.2. Le choix des doses et préparation des formulations de traitement

Sur la base du résultat du test de germination, Les traitements en milieu naturel avec le biopesticide, le Green muscle ont porté sur les essais de trois concentrations à base de spores de *Metarhizium anisopliae*,

-) 50 g/ha ce qui équivaut à $2,5 \times 10^{12}$ soit 2500 milliards de conidies,
-) 25 g/ha contenant environ $1,25 \times 10^{12}$ conidies
-) 12,5 g/ha ou $6,25 \times 10^{11}$ conidies.

Le Green muscle est conçu pour être appliqué en UBV avec une formulation huileuse « OF » [159]. L'huile permet une meilleure adhésion des conidies sur la cuticule des insectes, évite l'évaporation rapide et les fines gouttelettes huileuses peuvent être fractionnées jusqu'à 20 μm .

Les inocula sont préparés le jour même de traitement, avec une balance de précision, les poids en g de la poudre sèche de spores, 50 g, 25 g et 12,5 g sont pesés puis mélangés chacun dans une éprouvette contenant 200 ml d'huile végétale de tournesol, choisie comme solvant organique naturel. Après agitation pendant une demi-heure, pour désagréger les spores, le volume d'huile a été complété jusqu'à 2 l dans le réservoir de l'appareil de pulvérisation.

3.2.2.3. Dispositifs expérimentaux pour le traitement avec le Green muscle

Nous avons délimité quatre parcelles de 2500 m² avec des balises. Dans chacune des parcelles, deux enclos de terrain d'environ 9 m² chacun sont installés selon la présence des larves de *D. maroccanus*. L'installation des blocs est réalisée un à deux jours avant traitement, aux heures où la température est basse pour bien localiser les taches larvaire.

Pour les produits biologiques à action lente comme le *Metarhizium*, la parcelle témoin est incluse dans l'essai. Les enclos de terrain témoins sont placés dans le sens opposé au vent afin d'éviter le problème de la dérive des parcelles traitées. Les trois parcelles traitées aux doses mentionnées sont séparées l'une de l'autre d'au moins 300 m et espacées de la parcelle témoin de plus de 800 m. La densité de la végétation est faible et est homogène entre les parcelles.

Les criquets emprisonnés dans les enclos de terrain ont été nourris d'abord avec de la végétation naturellement présente sur le terrain et puis avec de la végétation collectées dans les endroits non traitées. Cette végétation est rajoutée quotidiennement dans tous les enclos pour éviter le phénomène de cannibalisme et la mortalité des criquets par manque de nourriture.

3.2.2.4. Modalités et méthode de traitement

Nous avons appliqué les traitements avec le biopesticide par pulvérisation en U.B.V. La hauteur de l'émission de l'appareil est 2 m.

La technologie de la pulvérisation en UBV permet la genèse de très fines gouttelettes (diamètre médian volumique DMV < 150 µm). Cette technique est très économique et peu polluante pour l'environnement permettant un rendement plus élevé, un traitement plus fiable, et une rapide vitesse d'exécution [158]. L'inoculum est réparti ainsi sur la zone cible (dépôt sur les feuilles et les insectes). Aucune pulvérisation n'a été effectuée dans la parcelle témoin. Une seule application des traitements biologiques aux trois doses mentionnées est faite le 30 Avril 2016. Seulement 0,5 l de chaque inoculum préparé est pulvérisé pour le traitement de parcelle de 2500 m². Le réservoir et les conduits de pulvérisation sont bien rincés avant chaque traitement.

Pour un pulvérisateur monté sur un véhicule, le débit de pulvérisation varie 0,05 à 1,0 l/min et l'espacement entre les passes de pulvérisation oscille entre 10 m et 50 m [158]. L'appareil de pulvérisation est calibré pour un écoulement de produit de 0,7 l/min. L'espacement entre les passes de pulvérisation (E) choisi à 30 m. Le volume totale dans le pulvérisateur (V.T) est 2l. La vitesse d'avancement du véhicule (**V**) est calculée à 7 km/h avec la formule suivante

$$\text{Débit (l/min)} = \frac{\mathbf{V \text{ (km/h)} \times E \text{ (m)} \times VT \text{ (l)}}}{600} \quad [158],[159].$$

3.2.2.5. Estimation de la qualité de pulvérisation

La pulvérisation ne doit pas être faite aux heures les plus chaudes de la journée. Elle doit être effectuée suivant la direction du vent. Pour évaluer la qualité de la pulvérisation et contrôler le dépôt des gouttelettes, des piquets sont implantés dans les parcelles traitées, distancés de 5m et disposés perpendiculairement au passage du véhicule de traitement. Une rangée de papiers oléosensibles est placée sur les piquets à une hauteur de 50 cm du sol. Les papiers sont retirés une heure après traitement. Sous une loupe graduée, le succès de la pulvérisation a été estimé par le dénombrement et la mesure des diamètres des gouttelettes déposées sur les papiers et comparés aux normes [158] et [160].

Après récupération des papiers oléo-sensibles, nous avons constaté que le produit est bien réparti sur les parcelles traitées. Les gouttelettes huileuses récupérées sont fines et régulières ayant 150 µm de diamètres moyen. Le traitement en dérive grâce au vent latéral permet de récupérer 10 à 20 gouttelettes au cm². Ce nombre est suffisant pour toucher la cible d'après [160].

➤ La période de suivie des traitements avec Green muscle

Les invasions acridiennes représentent une menace importante pour l'agriculture. Tous échec dans la maîtrise de celles-ci aux premiers stades larvaires, typiquement en zone aride et semi-aride, peut entraîner des dégâts significatifs aux cultures. Dans les zones voisinages de nos parcelles traitées, les larves sont devenues des L5, d'où le risque du stade aillé après la mue imaginale. C'est pour cette raison que le suivi des tests est achevé au 10^e jour après traitement malgré que la population larvaire traitée ne fût pas totalement épuisée. De ce fait, un traitement avec un insecticide chimique est réalisé ensuite dans notre région d'étude.

3.2.2.6. Suivi de la sporulation de *Metarhizium anisopliae* sur les cadavres

Un test complémentaire est réalisé, à savoir l'évaluation de la sporulation du champignon sur des larves mortes. Cette méthode nous donne une confirmation qualitative de la cause de la mortalité des insectes qui sont probablement infectés par mycose. La méthode est utilisée par plusieurs auteurs, [20], [25], [19], elle consiste à prélever des échantillons de cadavres de *D. maroccanus* à partir des blocs témoins et traités.

Les insectes morts ont été séchés à l'air libre pendant 24h et mis dans des boîtes de pétri en verre au fond desquelles est placé du coton imbibé légèrement d'eau au centre pour le maintien d'une humidité optimale. L'incubation est maintenue à température ambiante et à l'obscurité. Il est important d'aérer les boîtes de pétri une fois par jour. Après quelques jours d'incubation (8 à 10 jours), nous avons observé une couche poudreuse de couleur verte à grise. L'identification du champignon fait appel aux caractères cultureux (Identification macroscopique) et à la morphologie (identification microscopique).

➤ Identification macroscopique

Les caractères morphologiques et cultureux ont été déterminés après ensemencement sur le milieu PDA. Ainsi, quelques spores sont prélevées à l'aide d'une anse de platine stérile et déposées au centre de la boîte de culture.

L'évaluation de l'ampleur du développement a été observée après 7, 14 et 21 jours d'incubation à 28 °C. Ce suivi est réalisable à l'œil nu mais aussi grâce à un binoculaire permettant ainsi de rassembler des indices révélateurs sur l'identité de notre souche (Aspect et couleur du mycélium et sa variation au cours du temps, présence ou absence de gouttelettes sur le mycélium etc...)

➤ Identification microscopique

L'observation *in situ* de la morphologie des chaînes de spores et celle du mycélium s'est faite au microscope optique. Les préparations microscopiques se font à l'état frais en milieu liquide entre lame et lamelle. La manipulation consistait à mettre un petit fragment mycélien sur la lame propre placée, devant un bec Bunsen, recouverte délicatement d'une lamelle. Nous avons recherché par la suite les caractères microscopiques de notre souche fongique.

3.2.2.7. Observations de terrain après traitement avec le Green muscle et suivis des fluctuations des larves

Au cours des essais, l'équipe d'évaluation a programmé des visites permanentes au niveau de chaque parcelle pour le suivi des traitements. Des notations ont été régulièrement prises, et ont porté sur :

-) Les fluctuations de la densité larvaire au niveau de chaque enclos de terrain
-) Anomalie de comportement et de morphologie (nutrition, couleur...)
-) Type d'activité de la tache larvaire (marche, perchée, cachée...)
-) Le développement des stades larvaires (difficulté de mue, malformations...)
-) La mortalité, la présence des cadavres et de prédateurs naturels.
-) Les mesures des paramètres météorologiques.

Les densités moyennes des larves (en nombre d'individus /m²) sont évaluées, dans chacun des enclos de terrain témoin et traités, juste avant traitement et puis chaque jour. Les comptages sont effectués de bon matin car les larves sont rassemblées formant des taches larvaires, elles sont moins mobiles avant de se réchauffer au soleil.

3.2.3. Traitements des données relatives aux essais de terrain

Les résultats des comptages des larves vivantes après traitement avec l'imidaclopride et le Green muscle ont consisté d'abord au calcul des taux de mortalité avec la formule suivante :

$$\text{Mortalité approximative (\%)} = 100 - \frac{(\text{Effectifs vivants après traitement} \times 100 \%) }{\text{Effectifs vivants avant traitement}}$$

L'efficacité des traitements est calculée selon la formule suivante de Henderson et TILTON, [162], décrite et utilisée par d'autres auteurs [20], [25], [19] :

$$\text{Efficacité(\%)} = \left[1 - \left(\frac{Ta}{Tb} \right) \times \left(\frac{Cb}{Ca} \right) \right] \times 100$$

Où **Tb** et **Cb** : Effectif ou densité des larves /m² avant traitement dans respectivement les enclos de terrain traités et témoins.

Ta et **Ca** : densité larvaire après traitement dans respectivement les enclos traités et témoins.

Les résultats sont rapportés sous forme de moyennes \pm écarts types et sont comparées par le test de l'analyse de variance (ANOVA), après vérification de la normalité de la distribution, via le logiciel statistique *SPSS* (Statistic Package for the Social Science) version 23 au seuil de signification 5%. Suivi par le test de comparaisons multiples de Tukey qui permet de vérifier la significativité de la variable d'intérêt entre toutes les combinaisons des modalités qui sont considérées significatives à $p < 0,05$. Et permet de définir les populations homogènes à $\alpha = 0,05$ pour chaque facteur étudié.

Nous avons appliqué le modèle linéaire global (G.L.M.) sur les taux de mortalité, au seuil de signification 5 %, pour étudier l'interaction des facteurs étudiés sur la variable d'intérêt.

3.2.4. Effet de *M. anisopliae* sur l'histologie de la cuticule et du tube digestif

3.2.4.1. Échantillonnage des larves de *D. maroccanus*

Avec un filet de capture, nous avons collecté des larves (L4) à partir des enclos de terrain témoins et traités avec le Green muscle à raison de 50 g/ha, 25g/ha et 12,5 g/ha. L'échantillonnage des criquets est fait à différents temps après traitement (3^e, 5^e et 7^e jour). Les individus vivants prélevés de chaque bloc sont mis dans des sachets de polyéthylène perforés et étiquetés pour leur déplacement.

La collecte des larves, témoins et traitées avec le champignon entomopathogène est faite d'une part pour prélever l'hémolymphe à fin d'étudier ses aspects macroscopique, microscopique et culturale. Et d'autre part, pour la

dissection des larves à fin de prélever l'intestin et le tégument. Ces tissus sont destinés à l'étude histo-pathologique.

3.2.4.2. Préparation des coupes histologiques intestinales et cuticulaires

Les larves retirées à partir des enclos de terrain témoin et traités, sont sacrifiées par décapitation de la tête et disséquées par ouverture de l'abdomen. Les tubes digestifs et des fragments de tégument sont prélevés sous une loupe binoculaire. Ces tissus sont rapidement mis dans des piluliers étiquetés et remplis d'un liquide fixateur, le formol à 10 %

L'étude de la structure des tissus en microscopie optique repose sur la bonne préparation de leurs échantillons selon la technique de MARTOJA et MARTOJA-PIERSON, [163] et GABE, [164] (Voir annexe 1).

Les coupes sont colorées par la coloration de Trichrome de Masson (Voir annexe 1). Les observations microscopiques sont réalisées avec un dispositif de prise de photos aux grossissements $\times 40$, $\times 100$ et $\times 400$ au photomicroscope « Zeis ».

3.2.5. Effet de *M. anisopliae* sur l'hémolymphe des larves *D. maroccanus*

3.2.5.1. Prélèvement de l'hémolymphe

Le prélèvement de l'hémolymphe, des larves de 4^e stade retirées à partir des enclos de terrain témoins et traités. L'individu est immobilisé entre le pouce et l'index, puis nous avons introduit une micro seringue sous le pronotum entre la patte postérieur et le thorax. Des échantillons d'hémolymphe provenant des larves témoins et traitées, sont collectés dans des micro-tubes Eppendorf. Ces prélèvements sont caractérisés par observation macroscopique (aspect de la coloration).

Nous avons recherché la présence des hyphes de *Metarhizium* et son ré-isolement à partir de culture de l'hémolymphe sur le milieu PDA, après ensemencement, la culture est incubée à **30°C** pour la fructification du champignon. Nous avons procédé à l'étude microscopique de l'hémolymphe pour chercher la présence des conidies ou des hyphes de *Metarhizium* et pour identifier d'éventuels lésions au niveau des cellules hémolympatiques chez les individus infectés par le *Metarhizium* (anomalies de structures).

3.2.5.2. Effet de *M. anisopliae* sur l'hémogramme des larves de *D. maroccanus*

Le comptage du nombre totale et différentiel des hémocytes des L4 témoins et traités ou hémogramme est étudié en fonction des doses appliquées (50 g/ha, 25 g/ha et 12,5 g/ha) et en fonction du temps après traitement (le 3^e et le 5^e jour).

L'étude de l'hémogramme nécessite la réalisation des frottis sanguins (Figure 3.2) selon la méthode de GUZO et STOLTZ, [165], come suit:

- L'incision permet de prélever **5 μ l** d'hémolymphe fraîche que nous avons saigné rapidement sur une lame de verre propre.
- Nous avons étalé en couche mince par tirage à la deuxième diapositive à travers le premier à 45°.
- Le séchage de la lame est fait à l'air libre.
- Les lames sont colorées au May-Grünwald Giemsa (MGG) (voir l'annexe 1).

Le comptage des hémocytes est facilité à l'aide des compteurs manuels. Tous les champs de la lame ont été observés et les hémocytes sont comptés en effectuant des passages successifs. Trois lames sont étudiées pour chaque cas et le comptage est refait deux fois pour chaque lame.

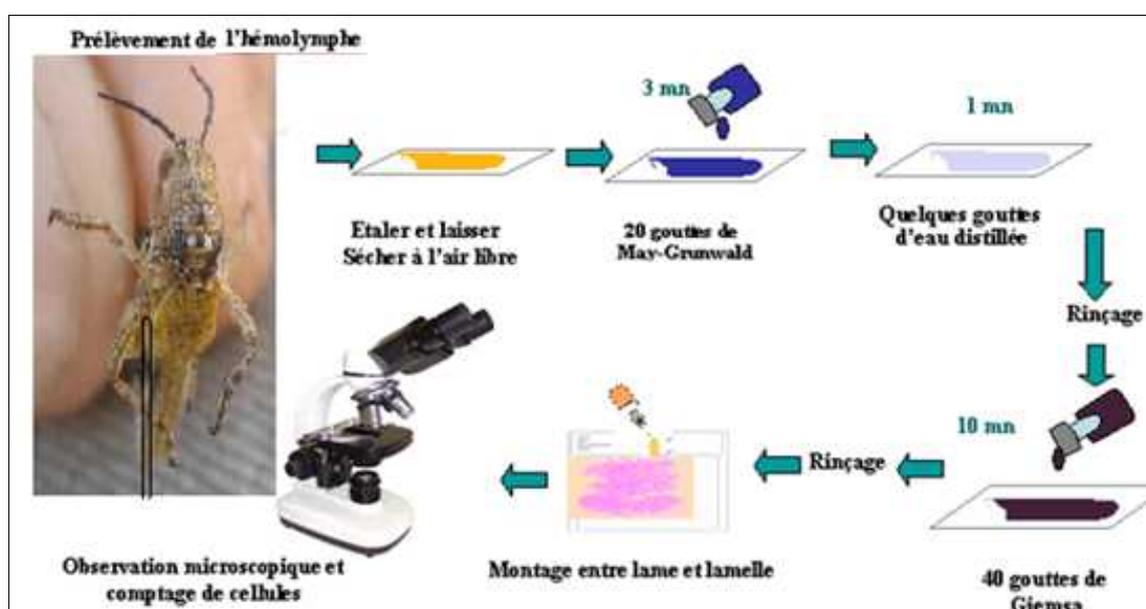


Figure 3.2 : Méthode de préparation des frottis d'hémolymphe ([166], modifié)

3.3. Evaluation de quelques paramètres bioécologiques de *Metarhizium anisopliae*

Pour toutes espèces fongiques, le choix du milieu de culture dépend des exigences nutritionnelles du champignon. Les facteurs abiotiques comme la température et l'humidité influencent la vitesse de développement des champignons entomopathogènes [167]. Notre objectif est d'estimer le développement de *M. anisopliae* sous différentes conditions de mise en culture.

3.3.1. Techniques d'isolement et de multiplication de *Metarhizium anisopliae*

3.3.1.1. Culture et production de *M. anisopliae*

La solution mère de *Metarhizium anisopliae* est extraite du biopesticide, le Green muscle (IMI 330139). Les conidies de *Metarhizium* ne sont miscibles qu'en formulations huileuses. À cet effet, 0,8 g de spores sont mélangées avec 20 ml de gasoil stérile (Figure 3.3). La suspension est homogénéisée à l'aide d'un agitateur (Vortex) pendant 10 min [103]. Nous avonsensemencé trois gouttes de la suspension de spores sur le milieu de culture PDA en conditions aussi stériles que possible. L'incubation des cultures préparées est maintenue dans une étuve à 25 °C. Au bout de quelques jours, la prolifération du champignon est observée sur le milieu de culture.



Figure 3.3 : Conidies de *M. anisopliae* var. *acridum*, l'isolat IMI 330139
a : en suspension huileuse, **b** : observation microscopique Gr : 100 (Originale).



Figure 3.4: Cultures de *M. anisopliae* var. *acridum* sur PDA (Personnel)

3.3.1.2. Multiplication et purification de *M. anisopliae*

La multiplication consiste à l'obtention de souche pure de notre champignon entomopathogène. Le cryptogame est repiqué plusieurs fois sur le milieu PDA pour la fructification du champignon. Les cultures sont maintenues dans l'étuve à

25 °C. Les colonies pures obtenues sont récupérées dans des tubes à essai en verre stériles et conservés à 4 °C. L'identification macroscopique des cultures (la coloration des colonies...) et microscopique par observation sur lame (l'aspect du mycélium, la forme des conidies et des hyphes...) nous ont permis d'identifier la souche *Metarhizium anisopliae* var. *acidum* (Figure 3.4).

3.3.2. Impact de quelques facteurs abiotiques sur quelques paramètres biologiques de *M. anisopliae*

Nous avons réalisé, dans un premier temps, une étude comparée de l'influence de quelques milieux de cultures usuelles et de différentes températures sur la croissance mycélienne et pondérale de *M. anisopliae*. Dans un deuxième temps, nous avons estimé l'influence de quelques facteurs abiotiques sur le développement du champignon (la sporulation). Il s'agit de l'activité de l'eau (humidité) et de la température.

➤ Effet du milieu de culture

À fin de dégager l'influence de substrat cultural sur la multiplication de *M. anisopliae*, notre choix s'est porté sur trois milieux de culture qui sont Potatos, Dexton, Agar (PDA), gélose à l'extrait de levure (milieu V8) et Gélose à l'extrait de Malt (milieu Malt).

➤ Effet des températures

Quatre températures, selon la bibliographie du champignon, ont été sélectionnées à savoir 18 °C, 24 °C, 28 °C et 38 °C. Trois répétitions sont faites pour chaque température et milieu de culture étudié.

➤ Effet de l'humidité

L'activité de l'eau est un facteur critique déterminant la durée de vie des microorganismes. La mise en évidence de l'effet de l'activité de l'eau sur l'entomopathogène est effectuée selon la méthode décrite et utilisés par plusieurs auteurs, [167], [168], [169]. Différentes quantités de glycérol ont été prises à savoir 60,6 g, 55, 36 g, 44,9 g, 35,21 g, 20,29 g et 6,04 g. Achaque quantité nous rajoutons 3,9 g de PDA dans 10 ml d'eau distillée. Les quantités de glycérol ajoutées donnent des activités d'eau suivantes 0,75, 0,80, 0,85, 0,90, 0,95, 0,99 respectivement. Ainsi nous avons six flacons, dans chacun nous avons préparé les solutions suivantes :

- Flacon 1 (0,75) : (3,9 g PDA+100 ml d'H₂O) + 60,60 g de glycérol.
- Flacon 2 (0,80) : (3,9 g PDA+100 ml d'H₂O) + 55,36 g de glycérol.
- Flacon 3 (0,85) : (3,9 g PDA+100 ml d'H₂O) + 46,90 g de glycérol.
- Flacon 4 (0,90) : (3,9 g PDA+100 ml d'H₂O) + 35,21 g de glycérol.
- Flacon 5 (0,95) : (3,9 g PDA+100 ml d'H₂O) + 20,29 g de glycérol.
- Flacon 6 (0,99): (3,9 g PDA+100 ml d'H₂O) + 6,04 g de glycérol.

Les six flacons ainsi préparés sont agités et autoclavés pendant 20 minutes à 120 °C. Après refroidissement des flacons, 1 ml de solution du milieu de culture du champignon âgée de 15 jours estensemencé dans chacune des boites de Pétri contenant les solutions des six flacons ainsi préparés. La concentration en spores de chaque boite est évaluée après 15 jours d'incubation à 28 °C à l'aide de la cellule hématimétrique de Malassez.

3.3.2.1. La croissance mycélienne ou radiale du champignon

Des explantâts mycéliens de notre souche, calibrés à 8 mm de diamètre, sont prélevés à l'aide d'un emporte-pièce à partir d'une culture pure âgée de 15 jours. L'explantât estensemencé au centre des boites de Pétri contenant les milieux retenus. Tous les trois jours pendant 15 jours, le diamètre du mycélium développé est mesuré à l'aide d'un pied à coulisse jusqu'à ce que le mycélium envahisse la totalité de la boite de Pétri (80 mm de diamètre). La mesure du diamètre de la colonie permet d'estimer la croissance radiale ou linéaire du champignon qui est donnée par la formule suivante [170]:

$$L = (D - d) / 2.$$

L : croissance linéaire en mm.

D : diamètre de la colonie en mm

d : diamètre initial de l'explantât.

3.3.2.2. La croissance pondérale

La croissance pondérale est évaluée par pesage, à l'aide d'une balance de précision, des boites de Pétri contenant les milieux de culture solidifiés (sans culture au préalable) avec l'explantât correspondant au *M. anisopliae* inséré au centre. Les boites de Pétri sont pesées chaque trois jours pendant 15 jours. Trois répétitions sont faites pour chaque cas étudié.

3.3.2.3. La sporulation

La sporulation est évaluée pour chaque milieu (PDA, V8 et Malt) et aux différentes températures (18 °C, 24°C, 28°C, 38 °C) après 15 jours d'incubation. Pour quantifier le nombre des spores produites, nous avons gratté le contenu des boîtes de Pétri avec une spatule stérile d'une façon à introduire l'ensemble d'une culture du champignon dans un flacon contenant 50 ml d'eau distillée stérile (volume de la dilution). Après agitation pendant 10 à 15 minutes pour désagréger les spores, nous avons procédé aux comptages à l'aide d'une cellule de Mallassez sous microscope optique (grossissement x40 et x100). Pour le calcul de la concentration en spores nous avons utilisé la formule suivante décrite et utilisée par [168] et [169]:

$$\text{La concentration en spores /}\mu\text{l} = \frac{\text{moyenne des spores comptés par 10 rectangles} \times 100}{(2 \text{ mm} \times 2,5 \text{ mm} \times 0,2 \text{ mm})} = 1\mu\text{l}$$

$$\text{La concentration en spores /ml} = \text{nombre des spores comptés/}\mu\text{l} \times 1000$$

On peut utiliser simplement la formule suivante, décrite et utilisée par [4] et [5]

$$\frac{100 \text{ spores}}{\text{Nombre de spores comptés dans 10 rectangles}} \longrightarrow \frac{10^6 \text{ spores /ml}}{\text{concentration en spores /ml}}$$

3.3.3. Analyse statistique

Nous nous sommes appuyés sur l'analyse de la variance (ANOVA). Ensuite nous procédons au test de Tukey qui nous permet de comparer les moyennes et d'obtenir les groupes homogènes pour chaque facteur étudié. Les moyennes des concentrations en spores sont d'abord sujettes à une transformation logarithmique (\log_{10}) (faute de distribution normale). Nous avons appliqué également le modèle G.L.M pour étudier l'effet simultané des facteurs sur la variable d'intérêt avec le logiciel SPSS version 23. Les différences sont jugées significatives lorsque ($P < 0,05$).

3.4. Tests de mortalité avec l'imidaclopride et *M. anisopliae* sur les larves de *D. maroccanus* dans les conditions contrôlées

Nos expérimentations ont été conduites sur une population larvaire de *D. maroccanus*, originaire de « Marhoum », capturées en mois de Mai 2016. Après une période d'acclimatation, les larves L3, L4 et L5 sont sélectionnées dans de petites cages pour servir aux différents essais de mortalité.

3.4.1. Traitement des larves de *D. maroccanus* avec l'insecticide MIDA

3.4.1.1. Préparation des formulations de traitement

Nous avons choisis trois faibles doses de l'insecticide MIDA®. Nous avons utilisé quatre flacons stériles contenant chacun 100 ml d'eau distillée. Avec une micropipette, nous avons prélevé trois faibles volumes du produit à savoir 50 µl, 100 µl et 200 µl. chaque volume est dilué dans un flacon contenant 100 ml d'eau distillée.

La matière active du produit MIDA est l'imidaclopride concentrée à 200 g/l.

Pour calculer la concentration de la matière active dans chaque inoculum, nous avons : 200 g de matière active, imidaclopride $\xrightarrow{1}$ de produit MIDA

Les trois formulations de traitement sont préparées comme suit:

- 50 µl de l'insecticide MIDA®, contenant 10 mg de l'imidaclopride,
- 100 µl de MIDA®, contenant 20 mg de l'imidaclopride
- 200 µl de MIDA®, contenant 40 mg de l'imidaclopride,

Chaque volume prélevé est dilué dans 100 ml d'eau distillée stérile.

3.4.1.2. Réalisation de l'inoculation avec l'imidaclopride

Les larves de chaque stade (3^e, 4^e, et 5^e stade) sont réparties en quatre lots de six individus chacun, un lot témoin et trois lot traités. Des traitements par contact (une seule pulvérisation) sont réalisés avec les formulations aqueuses à bases des micro-doses de l'imidaclopride. Les larves témoins reçoivent de l'eau distillée stérile (Figure 3.5).

3.4.2. Traitement des larves de *D. maroccanus* avec *M. anisopliae*

3.4.2.1. Préparation des formulations de traitement

À partir de cultures âgées de 15 à 20 jours ayant bien sporulées, nous avons prélevé l'ensemble des colonies de ces cultures que nous avons introduite par la suite dans un Erlen Meyer contenant 50 ml d'huile de tournesol.

Après une agitation de 10 min, le nombre de spores dans la solution mère sera évalué à l'aide de la cellule de Malassez sous microscope optique.

Nous procéderons aux dilutions successives de la solution mère titrée à la concentration la plus élevée. Pour déduire les autres concentrations à partir de la solution mère de spores, nous avons appliqué la loi d'équilibre :

$$C1 \times V1 = C2 \times V2$$

C1 : la concentration de la solution mère en spores/ml

V1 : Le volume initial de la solution mère

C2 : la concentration à obtenir (voulue)

V2 : le volume d'huile végétale de tournesol correspond à la concentration C2

V2 = (C1 x V1)/ C2 Le volume d'huile à ajouter sera alors : **V= V2 — V1**

Les trois doses à base de spores du champignon choisies sont

D1= 1,2 × 10³ spores/ml

D2= 1,2 × 10⁵ spores/ml

D3= 1,2 × 10⁷ spores/ml

3.4.2.2. Réalisation de l'inoculation avec *M. anisopliae*

Pour les traitements des larves avec le champignon entomopathogène, nous avons préparé trois formulations huileuses aux doses mentionnées. Chaque inoculum est bien agité. Les larves de criquet marocain de chaque stade (3^e, 4^e, et 5^e stade) sont réparties en quatre lots de six individus chacun, un lot témoin et trois lots traités. Des traitements par contact sont réalisés avec les trois doses de *M. anisopliae*. Le lot témoin reçoit une seule pulvérisation avec de l'huile végétale (Figure 3.5).

3.4.3. Évaluation de la mortalité des larves traitées avec le *M. anisopliae* et MIDA

Nos observations quotidiennes des larves témoins et traitées portent sur la présence de mortalité et des anomalies de comportement (nutrition, mouvement) et de morphologiques.

Pour étudier l'effet des deux produits sur la mortalité des individus, L3, L4 et L5, nous avons procédé à un comptage cumulé du nombre d'individus morts dans chaque lot jusqu'à l'épuisement de tous les individus traités. Le comptage est refait chaque 12 h pour l'imidaclopride et chaque 24 h pour le Green muscle.

Le pourcentage de mortalité est calculé selon la formule suivante :

$$\text{Taux de mortalité} = \frac{\text{Nombre d'individus morts}}{\text{Nombre total des individus}} \times 100$$

Le pourcentage de la mortalité observée est d'abord corrigé par rapport au témoin selon la formule d'ABBOT, [171]. Elle est donnée comme suit :

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

Mc : Le pourcentage de mortalité corrigée

M 1 : Le pourcentage de mortalité chez les témoins

M 2 : Le pourcentage de mortalité chez les individus traités

3.4.4. Calcul des DL50 et des DL90

La DL50 est la dose létale au bout de laquelle de 50 % d'une population traitée et la DL90 est la dose létale de 90 % de la population. Pour calculer la DL50 et la DL90, nous avons transformé les doses en logarithmes décimaux et les valeurs de pourcentages de mortalité corrigés en probits. Ces valeurs ont été calculées pour chaque produit (*Metarhizium anisopliae* et Imidaclopride) et pour les trois stades larvaires étudiés (L3, L4, et L5). La table des probits est utilisée à cet effet. Ces calculs nous permet d'obtenir des équations de droites de

régression de type : $Y = a x + b$, soit

Y : probits de mortalité corrigée

x : logarithme décimal du temps

a : la pente de la droite qui se calcule par la formule suivante :

$$a = \frac{\sum (x - x') (y - y')}{\sum (x - x')^2}$$

$$b = y' - a x' \quad , [172].$$

3.4.5. Calcul de TL 50

Le Temps létal 50 (TL50) est calculé à partir de la droite de régression des probits correspondants aux pourcentages des mortalités corrigées en fonction des logarithmes décimaux des temps après traitement [172].

À partir des équations de droite de régression de type : $Y = a x + b$, nous pouvons calculer le TL50 et la DL50 en remplaçant y par le probit de 50 (5). Les TL50 et DL50 peuvent être déterminé graphiquement en recherchant l'abscisse du point correspondant au probit 5 sur le graphe [172].

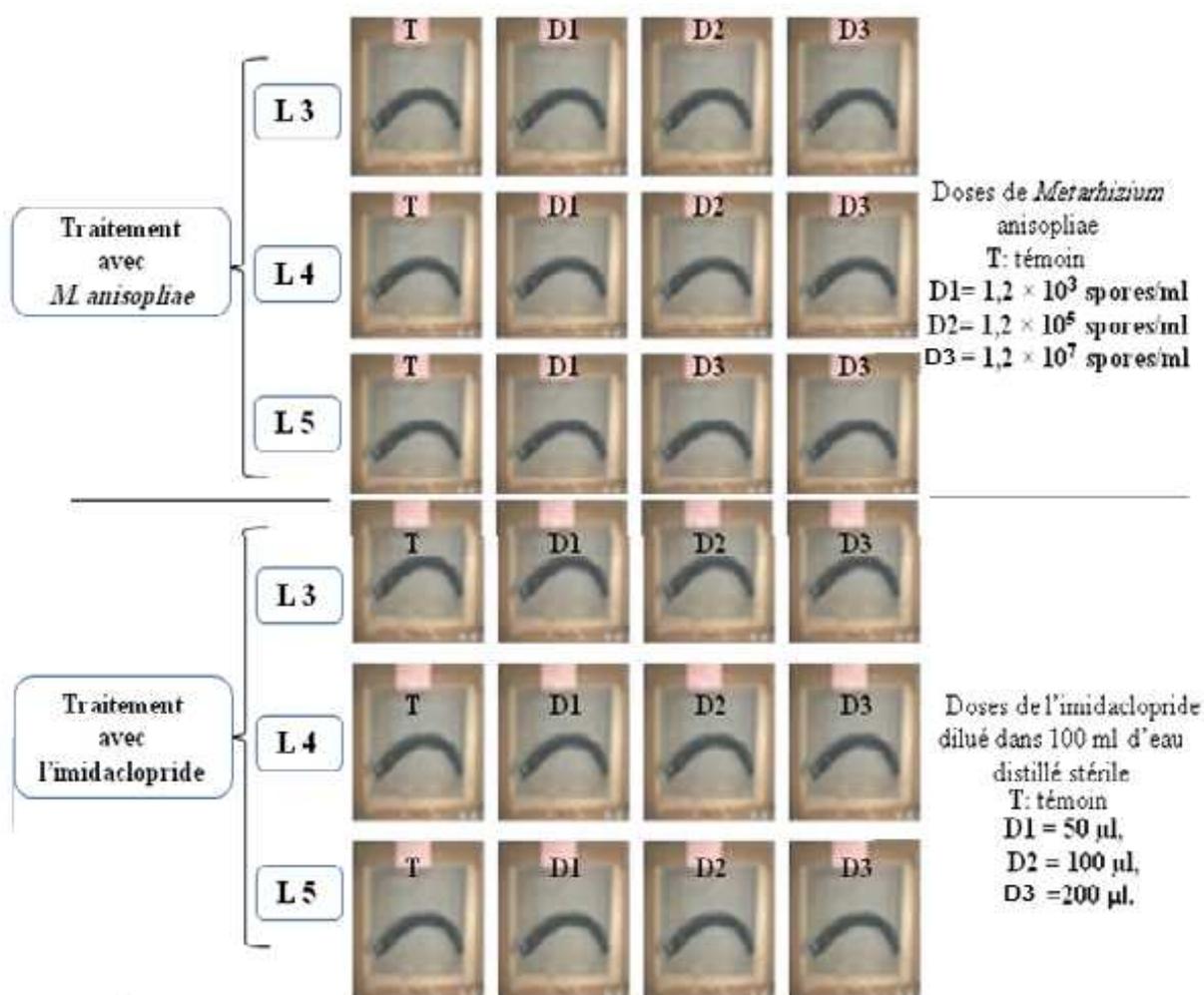


Figure 3.5 : Diagramme récapitulatif des tests de mortalité avec l'imidaclopride et *M. anisopliae* sur les larves de *D. maroccanus* (personnel).

3.4.6. Analyse statistique des tests de mortalité

Les résultats des tests de mortalité sont traités par une analyse de la variance (ANOVA) suivis du test de Tukey au seuil de signification 5 %. Dans les conditions paramétriques du test de l'ANOVA, une transformation logarithmique a été nécessaire afin de normaliser la distribution. Dans les cas où plusieurs facteurs sont en jeu, il peut arriver que toutes les interactions entre facteurs ne soient pas pertinentes à tester. Nous avons alors utilisé le modèle linéaire global (G.L.M.). le traitement des données et le calcul de la DL50, DL90 et TL50 est effectué à l'aide du logiciel XL. STAT version 10 et le logiciel SPSS version 23.

3.5. Etudes de l'aspect toxicologique de MIDA[®] et Green muscle[®]

3.5.1. Etude de la toxicité subaigüe de l'imidaclopride chez les rats Wistar

A travers ce volet, notre travail porte sur la recherche de quelques aspects de la toxicité subaigüe de l'imidaclopride à raison de 1/10 DL50 et 1/80 DL50 chez les rats femelles Wistar pendant 14 jours. Nous avons évalué les effets des traitements sur le comportement des rats, sur le poids corporel, sur le poids de quelques organes, sur le profil de certains paramètres hématologiques et biochimiques et sur histopathologie des parenchymes pulmonaires, hépatiques et rénaux ainsi que sur la structure des villosités intestinales.

Nous avons utilisé 15 rats femelles en croissance. Le poids corporel moyen des rats femelles expérimentées est de 168,26 g ± 10,37. Les animaux sont répartis en trois lots, de cinq individus chacun, un lot témoin et deux lots traités.

3.5.1.1. Préparation des formulations de traitement avec l'imidaclopride

L'imidaclopride, (MIDA[®]), insecticide commercialisé, conditionné dans un flacon contenant 250 ml de solution concentrée à 20 % (200 mg/ml).

Pour l'Imidaclopride la DL50 est de 424 mg/kg/jour chez la femelle des rats Wistar [121]. L'insecticide est utilisé sous forme diluée en solution aqueuse selon les doses choisies 1/10 DL 50 (42,4 mg/kg/jour) et 1/80 DL50 (5,3 mg/kg/jour) et d'après le poids de chaque animal

3.5.1.2. Réalisation de l'inoculation des rats avec l'imidaclopride

Tous les animaux reçoivent de l'eau et de la nourriture *ad-libitum*

- Les rats du lot témoin reçoivent 1 ml d'eau distillée stérile.
- Les rats des deux lots traités reçoivent 1 ml de l'inoculum préparé (le volume calculé de l'insecticide complété à 1 ml avec de l'eau distillé stérile).

L'administration de l'inoculum se fait par voie orale à l'aide d'une seringue munie d'une canule de gavage.

Les rats sont pesées chaque semaine à compter du premier jour de l'expérimentation à fin de recalculer la dose qui correspond à la DL 50 choisie.

3.5.2. Etude de la toxicité subchronique de Green muscle chez les rats Wistar

Nous avons recherché quelques aspects de la toxicité subchronique des conidies de *M. anisopliae* var. *acridum* formulées en biopesticide. Notre objectif est de mettre en lumière d'éventuels indices d'inflammation à travers l'étude de quelques aspects hématologiques, biochimiques et histopathologiques chez les

rats traitées avec le champignon entomopathogène à raison de 200 mg /kg /jr ; 20 mg /kg /jr et 10 mg /kg /jr de Green muscle pendant 30 jours. Nous avons évalué les effets sur le comportement des rats, sur le poids corporel et sur le poids de quelques organes, le foie, les reins et les poumons.

Pour la réalisation de cette expérimentation, nous avons utilisé 20 rats femelles en croissance de poids corporel moyen 144,71 g \pm 9.02. Les animaux sont répartis en quatre lots, de cinq individus chacun, un lot témoin et trois lots traités.

3.5.2.1. Préparation des formulations de traitement avec le Green muscle

Pour évaluer la qualité de Green muscle®, avant le traitement des rats, un test de germination est réalisé (Voir annexe 1).

La viabilité des conidies est obtenue à 90,18 %.

Le biopesticide utilisé présente une formulation huileuse « OF », Pour inoculer les rats, nous avons préparé les formulations, à base de spores de *Metarhizium*, dans de l'huile végétale (de tournesol).

Comme il est difficile de réussir le gavage avec un inoculum huileux concentré, nous avons pulvérisé la formulation de traitement dans l'appâts alimentaire de chaque 5 rats encagés ensemble (Ayant des poids corporels rapprochés).

Chez les rats Wistar, la dose létale 50 (DL50) est supérieure à 2 g de matière active de Green muscle par kg de masse corporelle [98].

1 g de green muscle (GM) contient environ 5×10^{10} conidies.

DL50 chez les rats Wistar $> 10^{11}$ conidies/kg de poids vif.

Les trois doses testées sont :

┆ Lot 1 : 200 mg de GM /Kg /jour contenant environ 10^{10} spores /kg correspond approximativement à 1/10 DL50 de Green muscle.

┆ Lot 2 : 20 mg de GM /kg /jour ou 10^9 spores/kg correspond approximativement à 1/100 DL50 de Green muscle

┆ Lot 3 : 10 mg de GM /kg/jour ou 5×10^8 spores/kg correspond approximativement à 1/200 DL50 de Green muscle.

3.6.1.2. Réalisation de l'inoculation des rats Wistar avec le Green muscle

— Pour le lot témoin : pulvérisation quotidienne de 5 ml d'huile de tournesol sur 250 g de bouchon alimentaire consommé chaque jour par les 5 rats encagés.

— Pour les lots traités, chaque inoculum est préparé juste avant traitement. Le calcul de la DL50 est adapté en fonction du poids vif moyen des cinq rats mis dans une même cage.

Selon la dose choisie, le poids à prélever de Green muscle est multiplié par 5, pesé par une balance de précision, puis dilué dans 5 ml d'huile de tournesol. Après agitation pendant 5 minutes, pour désagréger les spores, l'inoculum est pulvérisé sur 250 g de bouchon alimentaire consommés chaque 24 h.

3.5.3. Sacrifice des rats et prélèvement des échantillons

Après la durée requise pour les traitements réalisés avec les deux produits, Imidaclopride (MIDA) et Green muscle (GM), les rattes Wistar sont sacrifiées. Les sacrifices sont réalisés, après une légère anesthésie avec le chloroforme, par décapitation de la tête et cela la matinée, entre 8 h et 11 h afin d'éviter les variations hormonales pendant la journée.

3.5.4. Effet des traitements avec MIDA et GM sur l'évolution du poids corporel des rats et sur le poids des organes étudiés

À fin de suivre l'évolution de la masse corporelle et de recalculer la concentration à administrer, Les rats femelles traitées avec l'imidaclopride et avec le Green muscle ont fait l'objet de pesées hebdomadaires, juste avant l'opération de traitement journalier. Les dernières pesées sont effectuées le jour du sacrifice.

Les rats témoins sont pesés au début et à la fin de l'expérimentation. La dissection des animaux ont permis de prélever le foie, les reins, les poumons qui ont été soigneusement débarrassés des tissus adipeux adhérents sur un lit de glace et pesés à l'aide d'une balance de précision (poids absolu de l'organe).

L'augmentation relative du poids corporel et le poids relatif d'un organe pour chaque animal ont été calculé comme suit :

$$\text{Augmentation relative du poids corporel (\%)} = \frac{(\text{Poids corporel à la fin de l'expérimentation (mg)} \times 100)}{\text{Poids corporel au début de l'expérimentation (mg)}} - 100$$

$$\text{Poids relatif de l'organe (\%)} = \frac{\text{Poids absolu de l'organe (mg)} \times 100}{\text{Poids corporel du rat le jour de sacrifice (mg)}}$$

3.5.5. Effet des traitements avec MIDA et GM sur quelques paramètres sanguins

Le dosage des paramètres sanguins est fait sur les animaux expérimentés après une période de toxicité subaiguë pour l'imidaclopride et subchronique pour le Green muscle. Après sacrifice des rats, Le sang artérioveineux est directement recueilli dans des tubes à EDTA (l'acide éthylènediamine tétra-acétique) pour la détermination de la formule de numération sanguine (FNS) : quantifier les globules rouges (GR), les globules blancs (Gb), les plaquettes (Plt), le taux de l'hémoglobine (HB) et de l'hématocrite (Ht). Nous avons utilisé également des

tubes à héparine pour le dosage de quelques paramètres biochimiques rénaux (l'urémie, la créatinémie) et hépatiques (le dosage des transaminases, l'aspartateamino-transférase (A.S.A.T.) et de l'alanine aminotransférase (A.L.A.T.), le dosage de la phosphatase alcaline (PA) et du taux total des protéines plasmatiques (PT).

3.6.6.1. Quantification des paramètres hématologiques (la formule de numération sanguine)

➤ Principe

La détermination quantitative des éléments figurés du sang, GB, GR, PLT, HB et HT est réalisée par cytométrie en flux utilisé sur un automate d'hématologie de type sysmex-3000. La fraction du faisceau lumineux qui dévie ses éléments permettent de les quantifier.

➤ Mode opératoire

Mettre l'échantillon sanguin contenu dans un tube à EDTA au-dessous de l'aiguille d'absorption de façon qu'elle y soit plongée. L'opération d'absorption peut prendre quelques secondes.

➤ Lecture

Le résultat est obtenu directement par l'automate précisant la quantification de chaque élément.

3.6.6.2. Dosage de quelques paramètres biochimiques rénaux

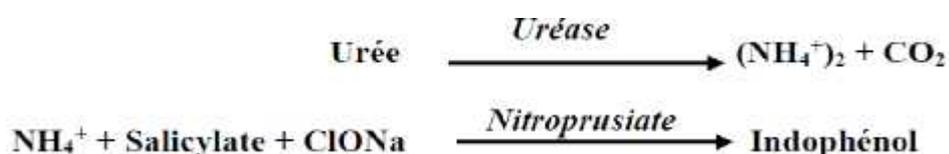
Le plasma, utilisé lors du dosage de quelques paramètres biochimiques, est obtenu après une centrifugation à 3000 tours/min pendant 20 minutes.

Dosage de l'urée sanguine

➤ Principe

La méthode utilisée est une méthode enzymatique et colorimétrique basée sur l'action spécifique de l'uréase qui hydrolyse l'urée en ions ammonium et carbonate. Les ions ammonium réagis avec le salicylate et l'hypochlorite, en présence du catalyseur nitroprusiate pour former un indophénol vert [173].

L'intensité de la couleur formée est proportionnelle à la concentration de l'urée dans l'échantillon.



➤ Mode opératoire

Nous préparons les réactifs de travail R1 et R2 (Tableau 4 de l'annexe 1). Les réactifs restent stables pendant 1 mois en l'absence de contamination (2 à 8 °C).

Nous pipetons :

- Le blanc contient 1 ml R1.
- L'étalon contient 1 ml de R1 + 10µl d'étalon.
- Le contrôle négatif est composé de 1 ml de R1 + 10µl de contrôle négatif.
- Le contrôle positif est formé de 1 ml de R1 + 10µl de contrôle positif.
- Le dosage contient 1 ml de R1 et 10µl de sérum.

Après incubation de 5 minutes dans une température ambiante, nous pipetons dans les tubes 1 ml de R2. Les tubes sont agités et incubés pendant 5 minutes à une température ambiante.

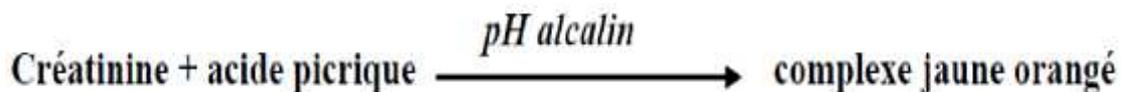
➤ Lecture

La lecture est réalisée après avoir réglé le spectrophotomètre sur une longueur d'onde de 580 nm contre le blanc. La coloration due à la réaction est stable pendant 30 minutes.

Dosage de la créatinine

➤ Principe

C'est une réaction colorimétrique cinétique avec l'acide picrique en milieu alcalin dont la cinétique de développement est mesurée à 490nm (490-510). La créatinine réagit avec l'acide picrique en milieu alcalin (NaOH) pour donner un complexe rouge orangé dont la vitesse de formation de la coloration est proportionnelle à la concentration de la créatinine dans l'échantillon.



➤ Mode opératoire

La solution de travail est obtenue par un mélange à volume égal des réactifs R1 et R2 (Tableau, annexe1). Le mélange reste stable pendant 10 jours à la température de laboratoire (15 et 32 °C).

Nous préparons les réactifs de travail R1 et R2 (Tableau 5 de l'annexe 1).

Nous pipetons dans des tubes à essai :

- Le blanc contenant 1ml de réactif de travail RT (500µl R1 + 500µl R2).
- L'étalon est formé d'un mélange de 100µl de l'étalon et 1ml de RT.

- Le contrôle négatif contient 1 ml de RT et 100µl de contrôle négatif.
- Le contrôle positif contient 1 ml de R1 + 100µl de contrôle positif.
- Le dosage est composé de 100µl de sérum et 1 ml de réactif de travail.

➤ Lecture

La densité optique du complexe formé au cours de la réaction est mesurée par un automate équipé d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 582nm.

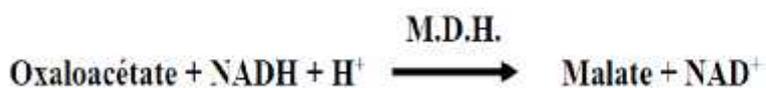
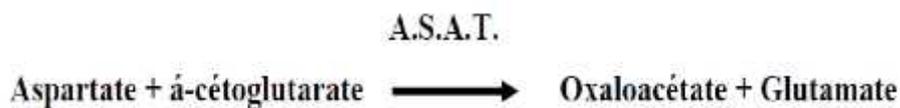
3.6.6.2. Dosage de quelques paramètres biochimiques hépatiques

Dosage des transaminases, l'aspartate aminotransférase et l'alanine aminotransférase

Le test UV est optimisé selon les recommandations de l'IFCC (international federation of clinical chemistry).

➤ Principe de dosage de l'aspartate aminotransférase

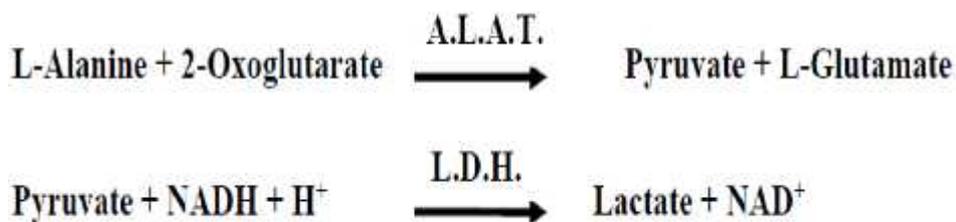
L'aspartate aminotransférase (A.S.A.T.) catalyse la transformation de l'aspartate en oxaloacétate. L'oxaloacétate formé est réduit en malate en présence d'une quantité connue de coenzyme NADH' H⁺ et du malate déshydrogénase (M.D.H.). La cinétique de cette dernière réaction est déterminée par les mesures successives de l'absorbance du coenzyme NADH' H⁺ à 340 nm. De cette cinétique est déduite la concentration de l'A.S.A.T [175].



➤ Principe de dosage de l'alanine aminotransférase

La transamination de l'alanine en pyruvate est réalisée en présence de l'alanine aminotransférase (A.L.A.T.). Le pyruvate obtenu est réduit en lactate en présence du coenzyme NADH' H⁺ et du lactate déshydrogénase (L.D.H.).

La cinétique de cette dernière réaction permet de déterminer la concentration de l'A.L.A.T [175].



➤ Mode opératoire

Les contenants des deux flacons R1 et R2 (Tableau 6 et 7 de l'annexe 1) du kit des transaminases sont mélangés pour obtenir un réactif final stable pendant 21 jours (8 °C). Le réactif est introduit dans un automate avec la solution de contrôle (sérum de contrôle) et 100µl de chaque échantillon de sérum à doser. La calibration de l'automate et le dosage des sérums sont en suite programmés via un microordinateur intégré au système.

➤ Lecture

Les différentes lectures de l'absorbance de NADH' H+ sont réalisées grâce à un spectrophotomètre intégré à l'automate. La lecture est réalisée après 1 minute, et de nouveau après 1,2 puis 3 minutes.

Dosage de la phosphatase alcaline

➤ principe

Le dosage de la phosphatase alcaline (PAL) est effectué avec des substrats dont la déphosphorylation libère un produit coloré. La PAL catalyse l'hydrolyse du p-nitrophenyl phosphate à pH10, en libérant le p-nitrophenol et un groupement phosphate selon la réaction suivante :



➤ Mode opératoire

Un volume de 1,2 ml de réactif est ajouté à 20 µl d'échantillon. Les solutions sont par la suite incubées à 25°C (Tableau 8 de l'annexe 1). La lecture de l'absorbance des solutions après 1, 2 et 3 mn d'incubation est effectuée à une longueur d'onde de 405 nm.

➤ Lecture

Le taux de phosphatase alcaline exprimé en g/l est donné par l'équation suivante:

$$\Delta A / \text{min} \times 3300 = \text{U/L de PAL}$$

Dosage des Protéines plasmatiques totales

➤ Principe

Le dosage des protéines totales plasmatiques (protide totaux) (PT) par la méthode de BRADFORD, [176], permet de déterminer des concentrations très faibles de protéines. C'est une méthode colorimétrique, qui utilise le bleu de Coomassie G 250. Ce dernier s'associe au groupement amine des résidus protéiques modifiant son spectre d'absorption de façon à former une bande intense dont le maximum est à 595nm.

➤ Mode opératoire

Le dosage des protides totaux à été réalisé par la méthode colorimétrique (Selon la fiche technique de Spinreact).

Mixer et incuber les solutions préparées de l'échantillon, le blanc et l'étalon (Tableau 9 de l'annexe1) pendant 5 min à 37 °C ou 10 min à la température ambiante Lire les absorbances des échantillons et de l'étalon contre le blanc réactif préparés à 54 nm. La coloration finale est stable au moins 30 minutes.

➤ Lecture

Les concentrations des protéines sont proportionnelles à l'intensité de l'absorption du réactif et sont calculées par la formule suivante

$$\text{Protéines totales (g/dl)} = \frac{\text{DO échantillon}}{\text{DO étalon}} \times \text{Concentration de l'étalon}$$

3.5.6. Étude histopathologique chez les rats traités avec MIDA et GM

Des études histopathologiques sont faites au niveau des poumons, des reins, des foies et des fragments de l'intestin grêle des rats témoins et traitées avec l'imidaclopride et le Green muscle aux différentes doses. Ces tissus sont rapidement plongés dans le formol à 10 % pour la fixation. Notre objectif est de rechercher d'éventuelles altérations structurales observables en microscopie photonique et de comparer l'importance de ces altérations tissulaires entre les lots des rats traitées avec chacun des deux produits testés.

La technique histologique passe par plusieurs opérations successives présentées selon la technique de GABE, [163], MARTOJA et MARTOJA-PIERSON, [164] (Annexe 1). Les blocs de paraffine sont coupés avec le microtome avec une épaisseur de 5 µm. Les lames sont colorées au Trichrome de Masson (Annexe1).

L'observation au microscopique photonique est réalisée aux différents grossissements : X 40, X 100, X 400 et X 800.

Le protocole expérimental des traitements des rats Wistar femelles avec le Green muscle et l'imidaclopride est illustrée sur le Schéma de la figure 3.6

3.5.7. Analyse statistique

Les résultats des analyses sanguins et des données relatives aux poids corporels et aux poids des organes sont présentés sous forme de Moyenne \pm écart type.

Dans les conditions paramétriques (ANOVA pour ANalysis Of VAriance et le test t de *Student*) la distribution de la variable quantitative doit être normale.

La normalité de la distribution des échantillons est vérifiée par un test de Shapiro-Wilk via le logiciel statistique S.P.S.S. Version 23.

Les comparaisons entre le lot témoin et les lots traités à différentes doses sont effectuées par un test t de *Student* (Test d'égalité des espérances entre deux observations) après l'application d'un test de Fisher (Test d'égalité des variances) au seuil de signification 5 %. La différence est jugée statistiquement comme :

- Non significative lorsque $p > 0,05$
- Significative (*) lorsque $0,05 > p > 0,02$
- Très significative (**) lorsque $0,02 > p > 0,01$
- Hautement significative (***) lorsque $0,01 > p$

Pour définir les lots de rats non significativement différents au seuil de significativité 5 % (les groupes homogènes pour chaque paramètre étudié) nous avons appliqué également le test de Tukey.

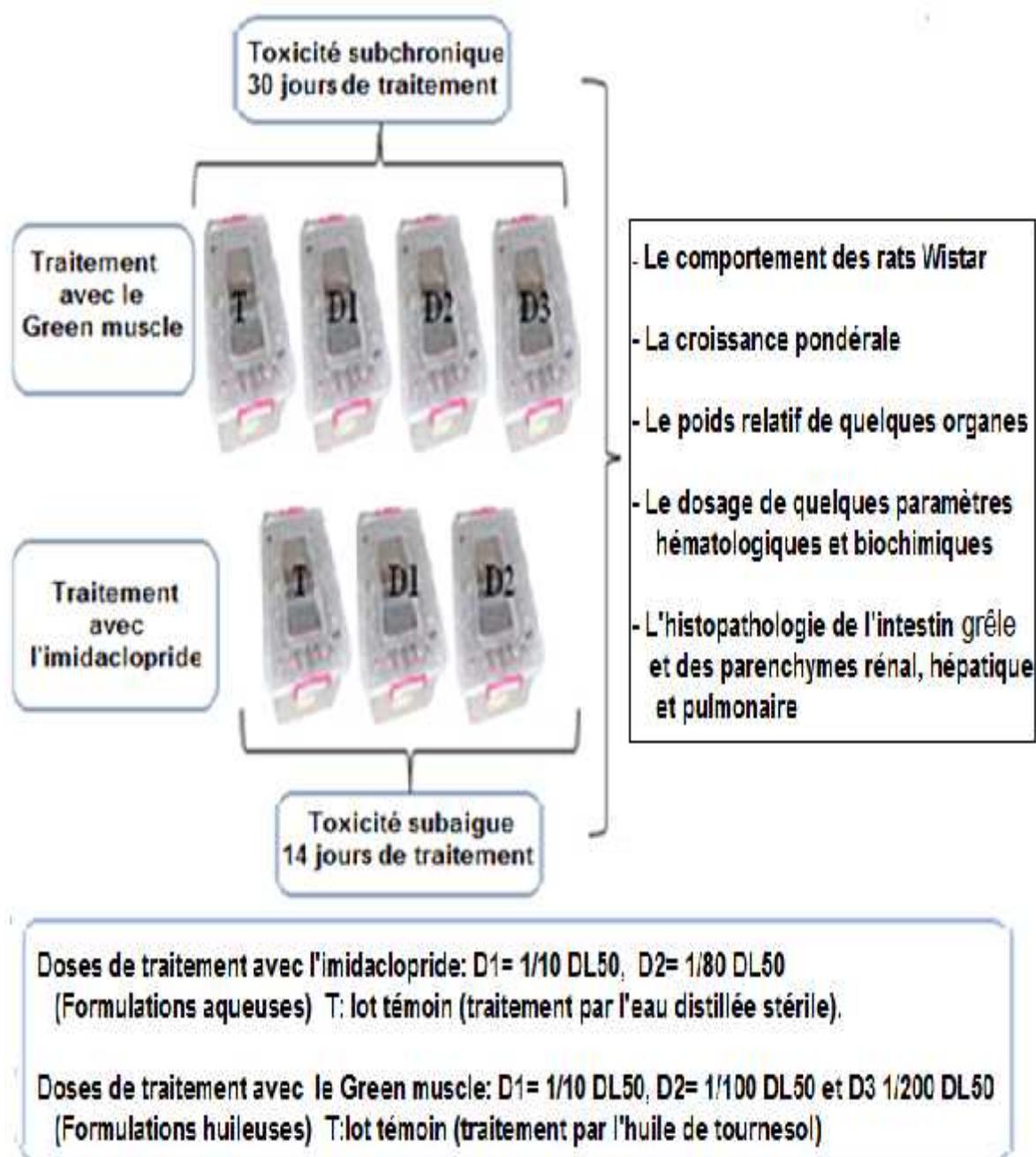


Figure 3.6 : Diagramme synthétique du protocole des expérimentations sur les rats Wistar traitées avec l'imidaclopride et le Green muscle.

CHAPITRE 4

RESULTATS ET DISCUSSIONS

4.1. Evaluation de l'efficacité de l'imidaclopride sur les larves *Dociostaurus maroccanus* traitées sur terrain

Les conditions météorologiques enregistrées lors de l'application des traitements chimiques sont considérées favorables (Tableau 4.1).

Tableau 4.1 : Paramètres de traitement sur terrain avec l'imidaclopride

| | | |
|---------------------------------------|-----------------|------|
| Date de traitement | Le 01/ 05 /2016 | |
| Période | Début | FIN |
| Heure | 7h30 | 10h |
| Température maximale (°C) | 18°C | 20°C |
| Température minimale (°C) | 14 ,8°C | 17°C |
| Température humidifié | 7,5°C | 11°C |
| Vitesse de vent m/s | 4,6 | 5 |
| Direction de vent | Nord- Ouest | |
| Humidité de l'air à 2m de hauteur (%) | 44,4 | 36 |
| Insolation | Peu ensoleillé | |

4.1.1. Effet des traitements par contact avec l'imidaclopride

4.1.1.1. Effet sur le comportement des larves *Dociostaurus maroccanus*

La pulvérisation de l'insecticide imidaclopride à sa dose recommandée sur les criquets provoque des troubles neuromusculaires caractérisés par une série de symptômes cliniques se succédant de façon systématique en quatre phases :

1e Phase : peu de temps après la pulvérisation du produit, l'insecte se déplace activement le long des parois du bloc dans lequel il est enfermé. Peu à peu, ses déplacements sont orientés vers les coins ou sous la végétation à la recherche de l'ombre. Les mouvements de saut sont interrompus par des périodes d'immobilité de plus en plus fréquentes et de plus en plus prolongées.

2e phase : caractérisée par une hyperexcitation de l'insecte qui effectue des tentatives incohérentes de saut, accompagnées d'une incoordination des mouvements de marche avec tremblements intenses de tous les appendices.

3e phase : l'insecte tombe sur le dos et est incapable de se relever. Ses appendices et les segments abdominaux sont animés de mouvements convulsifs. Cette phase correspond au «Knock-Down» .

4e phase : se caractérise par une tétanisation et une paralysie progressives avec déformation des insectes et arrêt de la consommation de nourriture et de la locomotion avant de mourir.

4.1.1.2. Effet sur la mortalité des larves *Dociostaurus maroccanus*

Les résultats portant sur le suivi dans le temps, après traitements chimiques, des variations de la densité larvaire et des taux de mortalité des larves de criquet marocain sont mentionnés sur la figure 4.1 et le tableau 4.2.

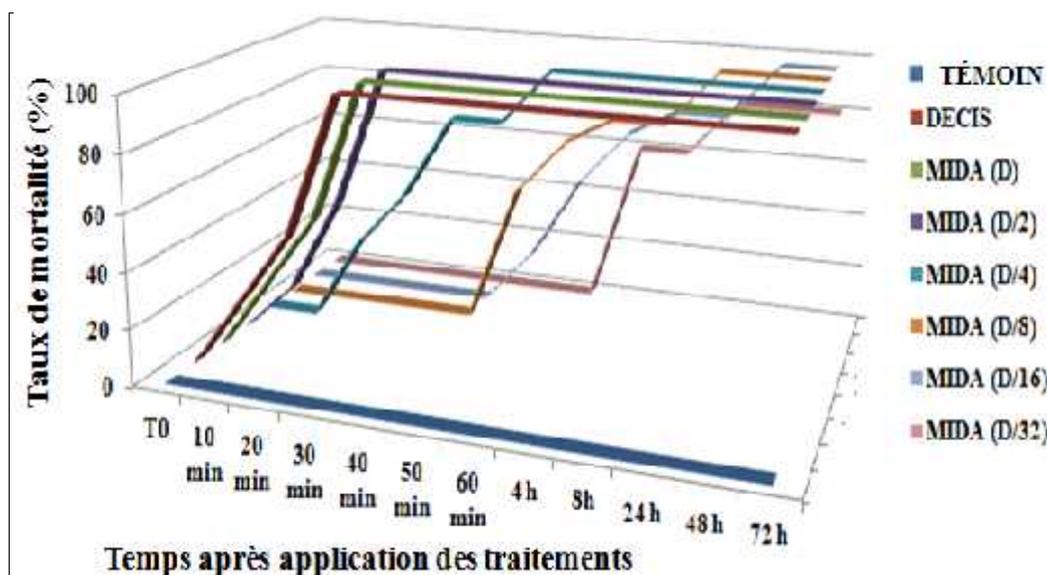


Figure 4.1 : Variations des taux de mortalité chez les larves *D. maroccanus* traitées sur terrain avec MIDA et DECIS. **D** : Dose recommandée.

Les résultats obtenus soulignent l'effet Knock-Down (100% de mortalité au bout d'une heure) de l'imidaclopride après 30 min avec la dose recommandée et avec la demi-dose (DR/2) et après une heure avec DR/4. Nous avons enregistré les mêmes résultats avec le produit chimique de référence, le Decis appliqué à sa dose recommandée.

Dans les 24h qui suivent l'application, l'imidaclopride montre une action létale significative de 100% avec DR/8 soit 0,625 ml/100 m² ou 6,25× 10⁻² l/ ha. Par contre avec les doses plus faibles 100% de mortalité est atteint après 48h avec DR/16 et après 72h avec DR/32. Dans les enclos de terrain témoins, aucune mortalité n'a été enregistrée pendant le suivi des traitements.

Tableau 4.2: Variations des densités larvaires et des taux de mortalité chez *D. maroccanus* témoins et traitées avec MIDA® et DECIS®.

| Enclos de terrain | | Temps après application des traitements chimiques | | | | | | | | | | | |
|-------------------|---|---|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-----|-----|-----|-----|-----|
| | | T0 | 10 min | 20 min | 30 min | 40 Min | 50 min | 60 min | 4h | 8h | 24h | 48h | 72h |
| T | D | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| | M | 00 | 00 | 00 | 00 | 00 | 00 | 00 | 00 | 00 | 00 | 00 | 00 |
| DECIS (DR) | D | 20 | 15 | 10 | 00 | 00 | 00 | 00 | 00 | 00 | 00 | 00 | 00 |
| | M | / | 25 | 50 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| MIDA (DR) | D | 40 | 30 | 20 | 00 | 00 | 00 | 00 | 00 | 00 | 00 | 00 | 00 |
| | M | 00 | 25 | 50 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| MIDA (DR /2) | D | 30 | 25 | 15 | 00 | 00 | 00 | 00 | 00 | 00 | 00 | 00 | 00 |
| | M | 0 | 16,67 | 50 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| MIDA (DR /4) | D | 10 | 10 | 07 | 05 | 02 | 00 | 00 | 00 | 00 | 00 | 00 | 00 |
| | M | 00 | 00 | 30 | 50 | 80 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| MIDA (DR /8) | D | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 05 | 03 | 02 | 00 | 00 | 00 | 00 |
| | M | 00 | 00 | 00 | 00 | 00 | 50 | 70 | 80 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| MIDA (DR/16) | D | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 08 | 05 | 03 | 02 | 02 | 00 | 00 |
| | M | 00 | 00 | 00 | 00 | 00 | 20 | 50 | 70 | 80 | 80 | 100 | 100 |
| MIDA (DR/32) | D | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 04 | 02 | 02 | 02 | 00 |
| | M | 00 | 00 | 00 | 00 | 00 | 00 | 00 | 60 | 80 | 80 | 80 | 100 |

T0 : Le moment de l'application des traitements chimiques. **min** : minute, **h** : heure. **D** : densité en nombre d'individus /m² dans un enclos de terrain, **M** : taux de mortalité (%). **DR** : Dose recommandée. DR (Decis) = 1 l/ha = 10ml/100 m², DR (MIDA)= 0,5 l /ha = 5ml /100m² ; DR/2= 2,5ml ; DR/4= 1,25ml ; DR/8= 0,625 ml ; DR/ 16=0,31 ml ; DR/32= 015 ml.

4.1.2. Évaluation de l'effet rémanent de l'imidaclopride

Nous avons étudié la persistance d'action de l'imidaclopride après 24h de traitement avec la dose recommandée. Des larves L3 et L4 non infestées consomment de la végétation traitée.

4.1.2.1. Effet sur le comportement des larves de criquets marocains

L'odeur de l'insecticide pulvérisé sur la végétation engendre un effet anti-appétant très remarquable. Les larves restent immobiles et se cachent à l'ombre) mais en cas de toucher elles bougent leur appendices. Ces effets peuvent être

transitoires ou permanents, ainsi soit les insectes reprennent leurs mouvements, ou restent immobiles et s'alimentent rarement jusqu'à leurs mort.

4.1.2.2. Effet sur la mortalité des larves de *D. maroccanus*

Les résultats du test de rémanence portant sur les variations des densités et des taux de mortalité larvaires sont mentionnés sur le tableau 4.3 et la figure 4.3

Tableau 4.3 : Fluctuations des densités et des taux de mortalité chez les larves témoins et traitées avec MIDA® et DECIS®. Test de rémanence.

| Enclos de terrain | | Temps après libération des larves dans les enclos de terrain | | | | | | | | |
|----------------------|-------------------------|--|--------|----|----|----|-----|-----|-----|-----|
| | | T ₀ | 30 min | 1h | 4h | 8h | 24h | 48h | 72h | 96h |
| Témoin | D (Ind/m ²) | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| | M (%) | 00 | 00 | 00 | 00 | 00 | 00 | 00 | 00 | 00 |
| MIDA DR= 0,5 l/ha | D (Ind/m ²) | 10 | 10 | 10 | 10 | 8 | 7 | 6 | 6 | 6 |
| | M (%) | 00 | 00 | 00 | 00 | 20 | 30 | 40 | 40 | 40 |
| DECIS DR= 1 l/ ha | D (Ind/m ²) | 10 | 10 | 10 | 9 | 9 | 6 | 6 | 5 | 5 |
| | M (%) | 00 | 00 | 00 | 00 | 10 | 40 | 40 | 50 | 50 |

T₀ : Le moment de la libération des larves. **D** : densité en nombre de larves /m² dans un enclos de terrain; **M** : taux de mortalité (%). **DR** : Dose recommandée.

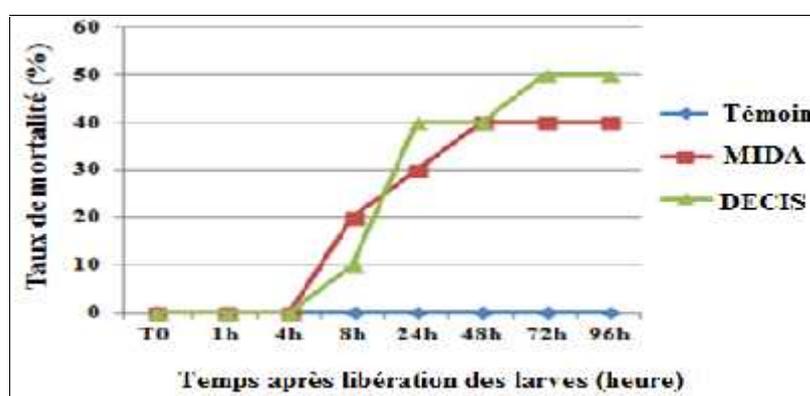


Figure 4.2: Variations des taux de mortalité chez les larves de *D. maroccanus*. Test de rémanence de DECIS et MIDA. **T₀** : le moment de libération des larves

Huit heure après la libération des larves dans les enclos de terrain, la diminution de la densité est notée pour MIDA® à 8 larves/m² et à 9 larves/ m² pour DECIS®. L'imidaclopride révèle une faible persistance d'action. Les taux de mortalité enregistrés 96h après l'application des insecticides (ou 72h après libération des larves) sont 40% et 50% pour respectivement MIDA et DECIS.

4.1.3. Discussion

Les larves traitées avec l'imidaclopride présentent les symptômes de neurotoxicité. L'intoxication des insectes par les insecticides de synthèse provoque des perturbations du système nerveux central et périphérique. L'imidaclopride est un néonicotinoïde agissant par le biais des récepteurs post-synaptiques. Il cible les récepteurs nicotiques de l'acétylcholine (n ACHR) provoquant une accumulation de ce neuromédiateur [177]. Ceci conduit à des tremblements musculaires, à une incoordination motrice, à la paralysie puis à la mort de l'insecte à brève échéance [178]. D'après Suchail et *al.* [31], la toxicité aiguë et chronique par voie orale de l'imidaclopride et de ses principaux métabolites (5-hydroxyimidaclopride, 4,5 dihydroxyimidaclopride, le desnitroimidaclopride, l'acide 6 chloronicotinique, l'oléfine et le dérivé de l'urée) ont été étudiés chez *Apis mellifera*. L'intoxication aiguë par l'imidaclopride ou ses métabolites ont entraîné l'apparition rapide de symptômes de neurotoxicité, tels que l'hyperréactivité, activité, et tremblant et conduit à l'hyporéactivité et à l'hypoactivité. Des perturbations physiologiques traduites par le dérèglement des processus de régulation de la teneur en eau sont souvent constatées chez les insectes soumis à un insecticide. D'après MORETEAU, [179], l'intoxication de *Locusta migratoria* par quatre insecticides différents : lindane, fenthion, baygon et deltaméthrine, provoque une diminution significative de leur poids corporel. Cette diminution est bien liée à une perte d'eau intense résultant d'une défécation et d'une transpiration excessive.

L'imidaclopride s'est révélé être beaucoup plus efficace que ce que l'on croyait. Les concentrations réduites jusqu'à 1/4 de la dose recommandée (DR) provoquent 100 % de «Knock-Down» en une heure. L'action létale significative est atteinte dans les 24h qui suivent l'application avec les doses réduites jusqu'à 1/8 DR. De ce fait l'imidaclopride est considéré comme un excellent acridicide (voir annexe1). Les insecticides couramment utilisés en lutte antiacridienne font partie de cette catégorie. Plusieurs études de terrain prouvent l'efficacité des doses réduites d'insecticide qui sont appliqués seule ou en mélange aux bio-insecticides. Selon BAL et SIDATI, [180], trois insecticides (lambda-cyhalothrin, malathion et chlorpyrifos-éthyle) ont été examinés sur des L3 de criquet pèlerin. Chacun des insecticides est appliqué à la dose recommandée et à la moitié de cette dose avec

l'addition ou pas du phénylacétonitrile. Les taux de mortalité étaient les mêmes avec les doses recommandées et avec la moitié de la dose avec l'addition de petites quantités de phénylacétonitrile. Dans nos conditions de traitement, l'imidaclopride présente une faible persistance d'action. L'effet rémanent des insecticides dans la plupart des zones d'intervention dépasse rarement quelques jours à cause du caractère volatil des formulations aqueuses. Ils ont tous une action de contact et peuvent intoxiquer en plus par ingestion. Plus le produit reste biologiquement actif, il est plus efficace, du fait qu'il peut tuer des larves plus tard pendant qu'elles émergent des œufs ou arrivent dans la parcelle traitée [181]. La plupart des pesticides recommandés par la FAO ont une persistance très faible afin d'éviter leur accumulation dans l'environnement. De tels produits sont efficaces pendant quelques jours et ils doivent être réappliqués en cas où l'infestation réapparaît. Cependant, les conséquences ont des coûts plus élevés et des effets doubles néfastes sur les espèces non cibles [158]. A cet effet, le traitement avec des produits chimiques à faible persistance et efficaces avec des doses plus réduites est préférable.

4.2. Evaluation de l'effet de Green muscle sur les larves de *D. maroccanus* traitées sur terrain

Les essais de terrain avec *Metarhizium anisopliae* var. *acidum* (Green muscle) sont appliqués sous de bonnes conditions météorologiques (Tableau 4.4)

Tableau 4.4: Paramètres de traitement avec Green muscle®

| Période | Début | FIN |
|---------------------------------------|----------------|--------|
| Heure | 8h | 10h30 |
| Température maximale (°C) | 16.2°C | 17°C |
| Température minimale (°C) | 11 °C | 12,5°C |
| Température humidifié | 15°C | 18°C |
| Vitesse de vent m/s | 5,3 | 5 |
| Direction de vent | Nord- Ouest | |
| Humidité de l'air à 2m de hauteur (%) | 51,8 | 44,4 |
| Insolation | Peu ensoleillé | |

Pendant la période de suivi des traitements, allant de 30 Avril à 10 Mai 2016, les mesures de l'humidité relative minimale et maximale ont varié entre 7,0% et 39,8% et entre 22,9% et 60% respectivement. Les températures journalières

minimales et maximales ont varié entre 5°C et 14°C et entre 10°C et 27°C respectivement. Il est à noter que ces conditions météorologiques enregistrées n'étaient pas très favorables pour le bon développement de *Metarhizium anisopliae* et à la propagation de l'infection fongique (Figure 4.3 et 4.4).

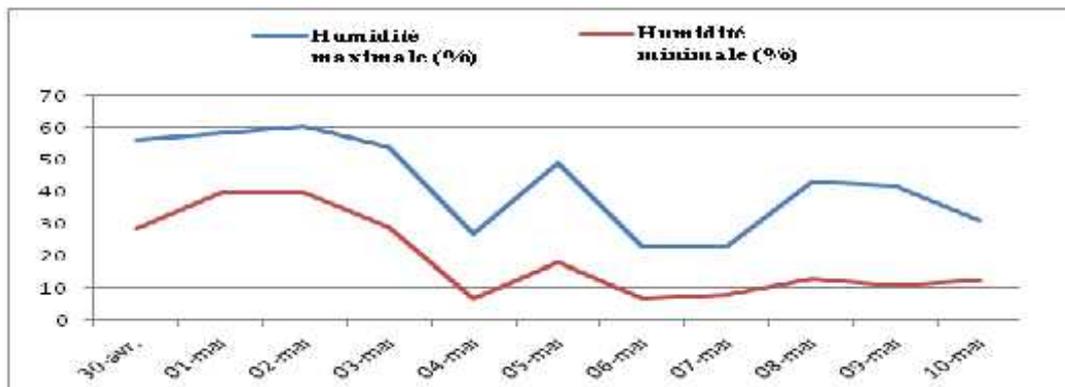


Figure 4.3 : Relevé de l'humidité journalière minimale et maximale pendant la période de suivi des traitements de terrain avec le Green muscle

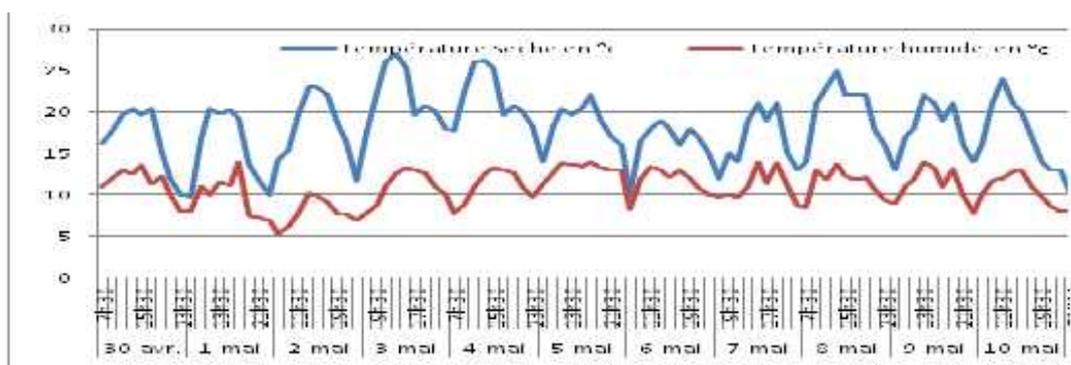


Figure 4.4 : Relevé des températures sèches et humides pendant la période de suivi des traitements de terrain avec le Green muscle

4.2.1. Effet sur le comportement et la morphologie des larves

Quatre à cinq jours après traitement avec le Green muscle, les larves sont inspectées pour des signes d'infection avec *M. anisopliae* var. *acidum*. Les larves sont devenues de moins en moins actives, moins voraces et prostrées dans les endroits ensoleillés ce qui augmente la susceptibilité de la population traitées à la prédation. Des changements morphologiques ont affectés les individus morts qui prennent une coloration rougeâtre et se momifient (Figure 4.5 a).

Nous avons remarqué le 10e jour de l'infection que les L4 était dominant et des L5 sont retrouvées dans les blocs traités avec le biopesticide à raison de 12,5 g/ha. Cela suggère que le traitement avec cette dose n'a pas totalement bloqué la

mue larvaire. Tandis que dans les blocs traités à 50 g/ha, quelques larves sont observées mortes par difficulté de mue larvaire ou vivantes avec des déformations au niveau des élytres (mues larvaires mal réussies) révélant un aspect onduleux et desséché (Figure 4.5 b). Pour les larves témoins, aucun changement morphologique n'a été observé. Quelques jours après l'incubation des cadavres retirés des enclos traités, une couche poudreuse verdâtre de spores de *M. anisopliae* est observée, recouvrant progressivement tout le corps. Ce phénomène est appelé "la muscardine verte" (figure 4.5 c). Dans les conditions sèches de terrain, la sporulation s'est passée à l'intérieur du corps, au niveau du tégument interne. Cela est constaté, après dissection des individus, par observation à l'œil nu et sous une loupe binoculaire (figure 4.5 d). Aucun des cadavres retirés des enclos témoins n'a montré ces symptômes (figure 4.5 e).



Figure 4.5 (a, b, c et d) : Symptômes de l'infection avec le Green muscle® chez *D. maroccanus*. **a** : coloration rougeâtre des cadavres, **b** : mue larvaire bloquée, **c** : sporulation de *M. anisopliae* sur le tégument externe, **d** : sporulation sur le tégument interne. **e** : larve témoin (absence de sporulation).

4.2.2. Effet sur la mortalité des larves de *D. maroccanus*

Au niveau des parcelles traitées et témoins, les densités larvaires, en nombre d'individus /m², dans chaque enclos de terrain ont été estimées quotidiennement aux mêmes heures. Nous avons calculé par la suite les taux de

mortalité des larves et les taux d'efficacité des traitements. Les résultats sont présentés dans les tableaux 4.5 et 1 (annexe 2) et exprimés sur la figure 4.6.

Tableau 4.5: Variations des taux de mortalité chez les larves *D. maroccanus* et des taux d'efficacité des traitements avec le Green muscle.

| Enclos de terrain | | Temps en jours après application des traitements avec le Green muscle | | | | | | | | | |
|---|-------|---|----------|----------|----------|--------------|---------------|---------------|---------------|--------------|---------------|
| | | J (a') | J+1 (a') | J+2 (a') | J+3 (a') | J+4 (a') | J+5 (b') | J+6 (b')(c') | J+7 (c')(d') | J+8 (d')(e') | J+9 (é) |
| Témoin (a) | M(%) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3,33 ± 4,71 | 6,67 ± 9,432 | 8,67 ± 6,60 | 8,67 ± 6,60 |
| | E (%) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 15,76 | 17 | 19 | 21 | 25 |
| 12,5 g/ha 6,25 x 10 ¹¹ C /ha (b) | M(%) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 15,76 ± 3,422 | 20,31 ± 9,857 | 23,64 ± 5,147 | 26,97 ± 0,43 | 30,31 ± 4,285 |
| | E (%) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 15,76 | 17 | 19 | 21 | 25 |
| 25 g/ha 1,25 x 10 ¹² (c) | M(%) | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 ± 5,66 | 13,7 ± 8,90 | 26,96 ± 1,463 | 32,67 ± 0,95 | 38,36 ± 3,34 | 46,22 ± 2,51 |
| | E (%) | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 13,46 | 25 | 29,20 | 33,5 | 41,80 |
| 50 g/ha 2,5 x 10 ¹² C /ha (d) | M(%) | 0 | 0 | 0 | 0 | 11,25 ± 1,77 | 25 ± 00 | 32,5 ± 10,60 | 43,75 ± 8,84 | 52,5 ± 3,53 | 57,5 ± 3,53 |
| | E (%) | 0 | 0 | 0 | 0 | 11,25 | 25 | 28 | 39 | 47,8 | 53,20 |

J: le jour de l'application des traitements. Taux de mortalité en moyenne ± écart type, (**M ± E.t**), **R:** répétitions, (%). **E:** Taux d'efficacité(%). (a),(b),(c),(d) et (a'),(b'),(c'), (d'), (e') : groupes non significativement différents.

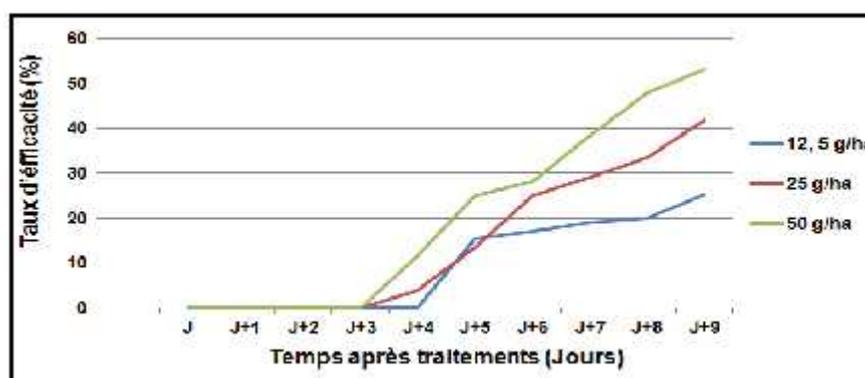


Figure 4.6: Variations des taux d'efficacité des traitements avec le Green muscle sur les larves de *D. maroccanus*

Les densités larvaires moyennes ne variaient qu'au 5e jour après traitement avec la dose 12,5 g/ ha et au 4e jour pour les doses 25 g /ha et 50 g /ha. Chez les témoins, le nombre d'individus /m² a montré une petite réduction à partir du 6e jour. Au 9e jour après application de green muscle, (10 jours d'infection). La

durée de survie du *D. maroccanus* en plein champs dépend de la dose appliquée du biopesticide. En terme d'efficacité, la dose de $2,5 \cdot 10^{12}$ spores/ha est la plus performante avec un taux d'efficacité de 53,20% enregistré au 9e jour après traitement contre 41,8 % et 25 % pour 25 g/ha et 12,5 g/ha respectivement.

Tableau 4.6: Modèle G.L.M. appliqué sur les taux de mortalité des larves traitées avec Green muscle selon les facteurs dose et temps.

| Source | Somme des carrées | ddl | Moyenne des carrées | F | Sig. |
|----------------|------------------------|-----|---------------------|---------|------|
| Modèle corrigé | 13626,760 ² | 23 | 592,468 | 20,229 | ,000 |
| Intercept | 23299,009 | 1 | 23299,009 | 795,542 | ,000 |
| Temps | 5633,721 | 5 | 1126,744 | 38,471 | ,000 |
| Dose | 6754,575 | 3 | 2251,525 | 76,875 | ,000 |
| Temps * Dose | 1238,464 | 15 | 82,564 | 2,819 | ,011 |
| Erreur | 702,912 | 24 | 29,200 | | |
| Total | 37629,481 | 48 | | | |
| Total corrigé | 14320,672 | 47 | | | |

L'analyse de la variance des taux de mortalité à deux critères de classification représentés par les facteurs dose appliquée, et temps après infection, nous a révélé qu'il existe un effet hautement significatif ($P < 0,01$) pour les deux facteurs étudiés (Tableau 2, annexe2). Ces résultats sont confirmés par les groupes homogènes définis par les tests Tukey (Tableau 3, 4, 5-l'annexe 2).

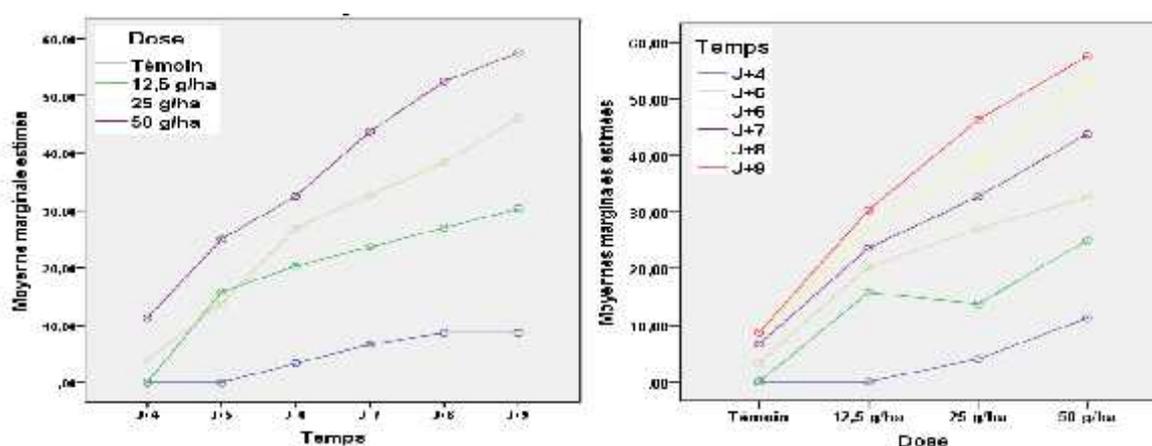


Figure 4.7: Effet de Green muscle sur les mortalités des larves *D. maroccanus* selon les facteurs, temps après traitement et dose appliquée (Modèle G.L.M)

L'analyse du modèle linéaire global montre (G.L.M) (Tableau 4.6 et Figure 4.7) montre que l'interaction des facteurs dose et temps après traitement révèle un effet significatif sur la mortalité des larves ($P < 0,05$).

4.2.3. Effet de *M. anisopliae* sur l'histologie du tégument

Chez les larves de *D. maroccanus* non traitées avec le Green muscle, la structure au microscope optique de la cuticule montre sa composition en trois couches stratifiées: l'épicuticule, l'exocuticule et l'endocuticule.

L'épicuticule est la couche la plus externe et est très mince, colorée en jaune. L'exocuticule est la couche intermédiaire, colorée en rose. La troisième couche est l'endocuticule, c'est la couche la plus épaisse, elle présente une structure lamellaire et est colorée en bleu. L'épiderme, sous la cuticule, présente une coloration violacée (Planche 1- figures A, B et C).

Les observations microscopiques montrent que la cuticule des larves traitées au *Metarhizium anisopliae* est visiblement plus mince par rapport à celle des larves témoins. Nous observons une disparition complète de l'épicuticule et une nette régression dans l'épaisseur de l'exocuticule et de l'endocuticule.

Nous avons remarqué que le champignon a affecté la structure de la partie la plus interne ou post exuviale, l'endocuticule, qui a l'aspect amorphe plutôt que lamellaire. Ces perturbations histopathologiques sont apparentes dès le 3e jour après traitement à 50 g/ha (Planche 1- figures D, E et F) et le 5e jour après traitement à 25 g/ha (Planche1- figures G, H et I).

Les spores tombées sur la cuticule de l'insecte ou ramassées de la végétation germent au cours des trois premiers jours de l'infection, les hyphes sortants pénètrent dans la cuticule à l'aide des enzymes et se désintègrent ensuite en corpuscules hyphales qui se répendent à travers le corps de l'insecte, du mycélium pousse ensuite dans les tissus (Planche1- Figure G).

L'unité infectieuse de notre souche fongique, la spore, a été repérée dans les parties de la cuticule digérée (Planche1- figure H).

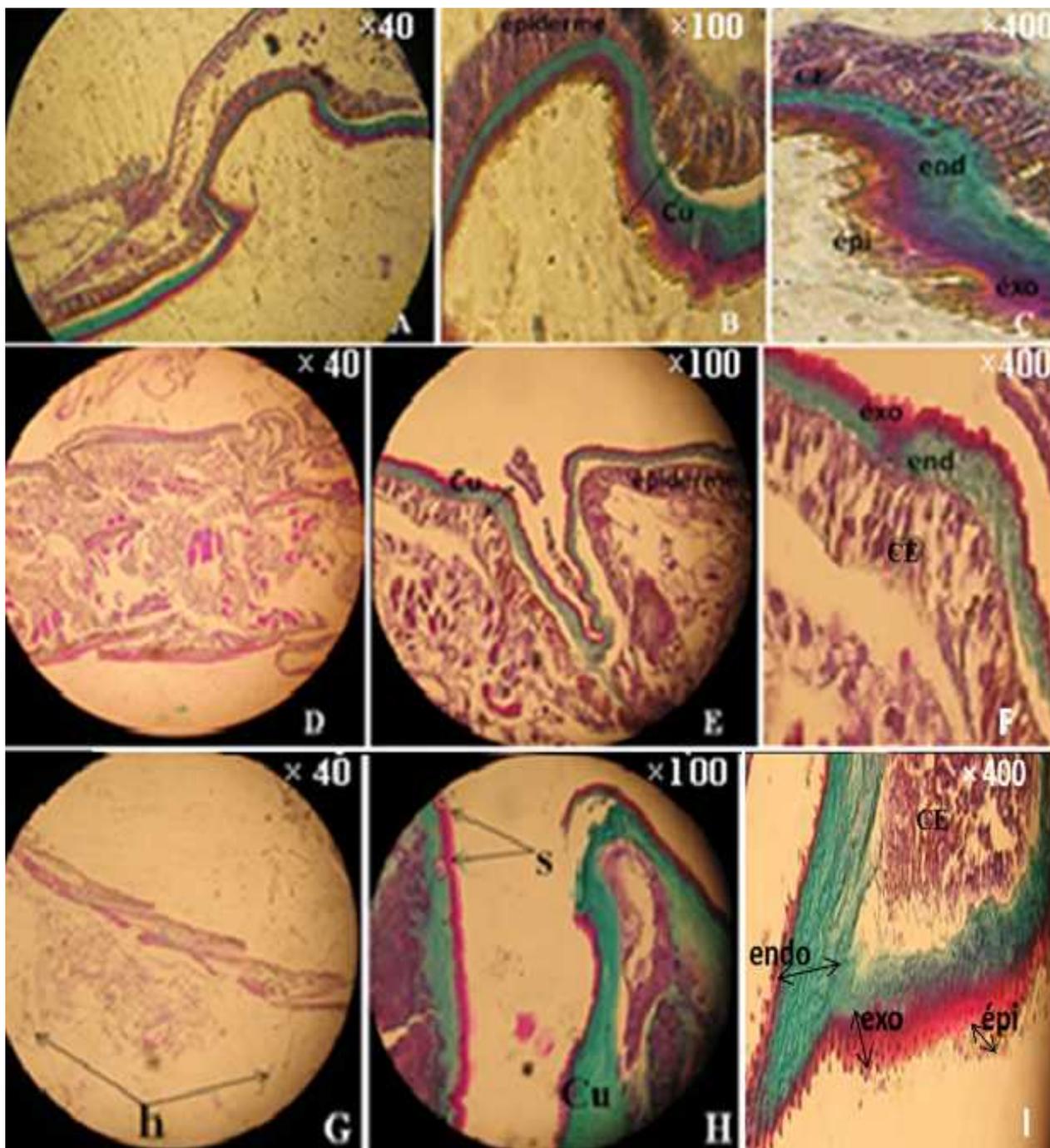


Planche 4.1 : Coupes longitudinales au niveau du tégument chez les larves de *Dociostaurus maroccanus* témoins (Figures **A**, **B** et **C**) et traitées avec le Green muscle (Figures **D**, **E** et **F** : le 3e jour après traitement à 50 g/ha ; Figures **G**, **H** et **I** : le 5e jour après traitement à 25 g/ha).

Epi :Epicuticule, **Exo**:exocuticule, **End**: endocuticule; **CE**: cellules épithéliales, **Cu**: cuticule, **s**: spores, **h**: hyphes.

4.2.4. Effet de *M. anisopliae* sur l'histologie du tube digestif

Les traitements de terrain apportés par *Metarhizium* var. *acridum*, appliqués à différentes doses sur les larves de *D. maroccanus*, ne montrent aucune déformation morphologique ni de lésions macroscopiques au niveau des trois parties intestinales, stomodeum, mésentéron et proctodeum, comparativement aux témoins. (Figure 4.8). L'étude au microscope photonique des lames préparées a révélé les observations suivantes :

➤ Chez les larves témoins

) La région du stomodeum est constituée d'un jabot tapissé par une couche intima cuticulaire, et formée d'un épithélium simple cubique. Nous observons de nombreuses petites villosités, sur lesquelles se dressent les épines. La musculature est constituée d'une couche de muscle circulaire externe qui entoure l'organe et de plusieurs couches de muscles longitudinaux internes bien développés (Planche 4.2-figures A et B).

) Le gésier fait partie également du stomodeum, il est tapissé d'une intima cuticulaire et présente de nombreuses petites villosités uniformes formés d'un épithélium unistratifié cubique. La musculature est constituée de muscles longitudinaux internes et de nombreuses couches de muscles circulaires externes mal délimitées les unes des autres (Planche 4.3- figures A et B).

) Le mésentéron ou intestin moyen présente un épithélium pseudostratifié palissadique à bordure en brosse et à cellules basales de régénération. La cuticule est absente à ce niveau. Les muscles sont très réduits et forment une fine couche circulaire interne et quelques fibres longitudinales externes. Une membrane péritrophique, sous la forme d'une mince couche, enveloppe le bol alimentaire et empêche les aliments imparfaitement broyés de venir en contact avec la paroi intestinale (Planche 4.4- figure A et B).

) La région du mésentéron est pourvue de six cæca gastriques disposés radialement autour de la lumière centrale du tube digestif. Le cæcum gastrique présente des villosités qui s'alternent avec les autres plus petites représentant les cryptes de régénération. Les villosités présentent un épithélium simple prismatique à noyaux rond et avec des bordures en brosse. La cuticule est absente à ce niveau, la musculature est très réduite et composée d'une seule couche de muscles circulaires très fine (Planche 4.5- figure A et B).

) Entre le mésentéron et le proctodeum débouchent les tubes de malpighie qui forment l'organe excréteur.

) Le proctodeum présente des replis épithéliaux développés et fructueux. Le revêtement chitineux est moins épais dans l'intestin antérieur. La musculature est composée de couches longitudinales et circulaires (Planche 4.6- figure A et B).

➤ Chez les larves traitées

Chez les individus traités au *M. anisopliae*, l'histologie du tube digestif a montré quelques différences de structure. Les altérations tissulaires ont commencé dès le troisième jour après traitement avec 50 g/ha. Quelques altérations apparaissent au cinquième jour par la séparation de l'épithélium intestinal des couches musculaires. Après le septième jour, les tissus épithéliaux sont partiellement détruits et la cohésion entre les cellules n'est plus observée. Pour les traitements à faibles doses avec le Green muscle (25 g/ha et 12,5g/ha), les altérations tissulaires étaient les mêmes mais plus tardives, cela peut expliquer les faibles taux de mortalités en comparaison avec ceux induit avec le traitement à 50 g/ha.

Nous avons choisie de monter les altérations tissulaires observés chez les larves traitées à 50g/ha le 5e jour après traitement comme suit :

) Au niveau du jabot, nous remarquons une légère destruction de la cuticule intima des épines. L'épaisseur des couches musculaires a été réduite sensiblement par le détachement et la lyse des couches musculaires externes (Planche 4.2- figure C et D).

) Le gésier a subit le relâchement des assises musculaires où la cohésion entre les fibres n'est plus observée, l'altération de la structure des petites villosités intestinales est notée avec la désorganisation des cellules épithéliales. La cuticule intima est totalement détruite et détachée de l'épithélium (Planche 4.3- figure C et D).

) Au niveau du mésentéron, chez les individus traités comme chez les témoins, les coupes histologiques présentent un bol alimentaire riche. L'effet du champignon s'est traduit par le détachement de l'épithélium intestinal des couches musculaires externes. L'assise épithéliale n'est pas en ligne et présente un diamètre supérieur à celui des témoins résultant, probablement, d'une réduction de la lumière intestinale. Nous avons noté une dégradation progressive jusqu'à l'absence totale des bordures en brosse. Les cellules épithéliales sont

désagrégées, vacuolisées et parfois nécrosées libérant leurs noyaux. Les cellules basales présentent des noyaux évidents à chromatine condensée. La membrane péritrophique est altérée et discontinue. Ces lésions cyto-architecturales sont typiques des dégénérescences cellulaires et d'ulcération (Planche 4.4- figure C et D).

J) Au niveau des cæca gastriques, la déformation des villosités est bien observée, les cryptes régénératrices étaient évidentes mais semblées être en cours de désintégration. L'épithélium a montré un aspect hypertrophié et désorganisé. Les bordures en brosse étaient moins abondantes et irrégulières due probablement à la vacuolisation des cellules épithéliales. Les noyaux deviennent volumineux à chromatine condensée en granules évidentes dans le nucléoplasme. Ces symptômes sont des signes typiques de nécrose cellulaire et de dégénération tissulaires (Planche 4.5- figure C et D).

J) Au niveau du proctodeum, les altérations sur cette partie terminale n'ont pas été très remarquables pour toutes les coupes étudiées. Les cellules épithéliales sont parfois désorganisées et vacuolisées. L'assise musculaire circulaire montre une atrophie et une distension de celle-ci. La cuticule est restée intacte comparativement aux individus témoins. (Planche 4.6- figure C et D).

La légende : **CG** : cæca gastriques, **CR** : cryptes de régénération, **d.CR** : destruction des cryptes de régénération. **Cu.** cuticule intima, **a.Cu.** altération de la cuticule, **DA** : débris alimentaires, **CEV** : cellules épithéliales vacuolisées, **BB** : bordure en brosse, **a.BB** : altération des bordures en brosse, **E** : épines, **MC** : Muscle circulatoire, **MCE** : muscle circulatoire externe, **MCI** : muscle circulatoire interne, **MCE** : muscle circulatoire externe, **MLE** : muscle longitudinal externe, **d. ML** : détachement des muscles longitudinal, **MLI** : muscle longitudinal interne, **VI** : villosités intestinales, **RE** : replis épithéliaux, **MP** : Membrane péritrophique, **AE** : assise épithéliale. **TM** : tube de Malpighie, **U** : ulcération, **L** : lumière intestinale, **N.CE** : nécrose des cellules épithéliales. **CBR** : Cellules basales de régénération, **Np** : noyaux pycnotiques.

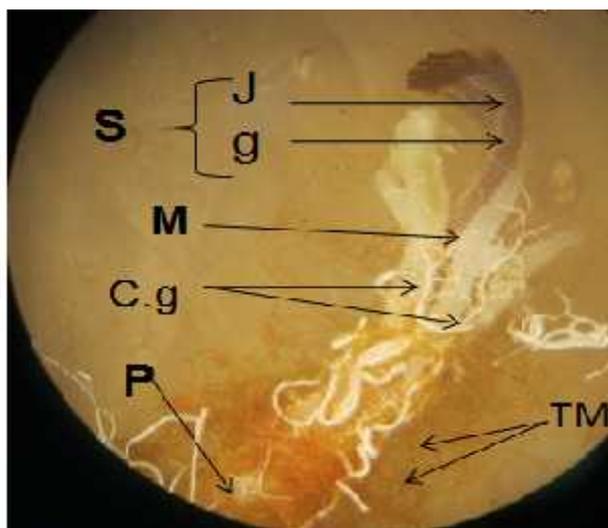


Figure 4.8: Aspect macroscopique, sous loupe binoculaire, du tube digestif des larves *D. maroccanus* traitées avec Green muscle (GM).

J : jabot, **g** : gésier, **C.g** : cæca gastrique, **T.M** : Tube de Malpighi, **S** : stomodeum, **M** : mésentéron, **P** : proctodeum

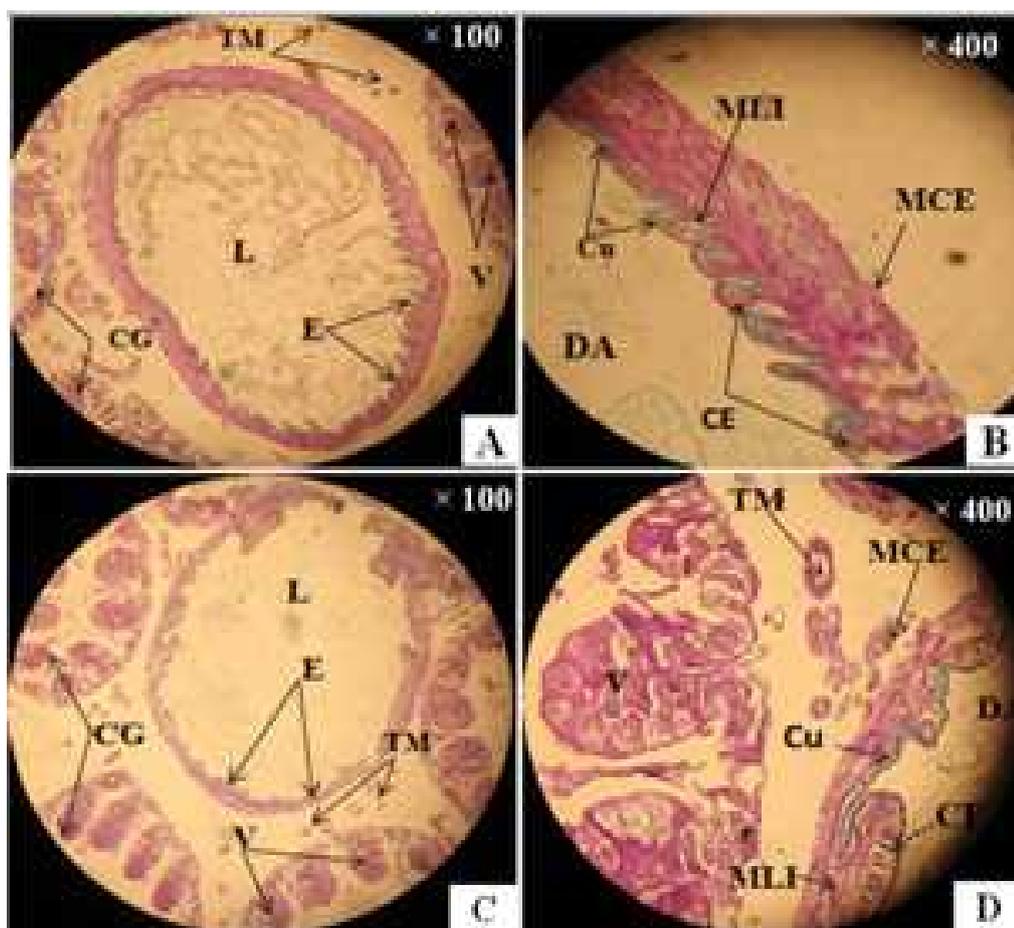


Planche 4.2 : Coupes transversales au niveau du stomodeum (Jabot) chez les larves *D. maroccanus* témoins (**Figure A et B**) et traitées avec GM (**Figure C et D**)

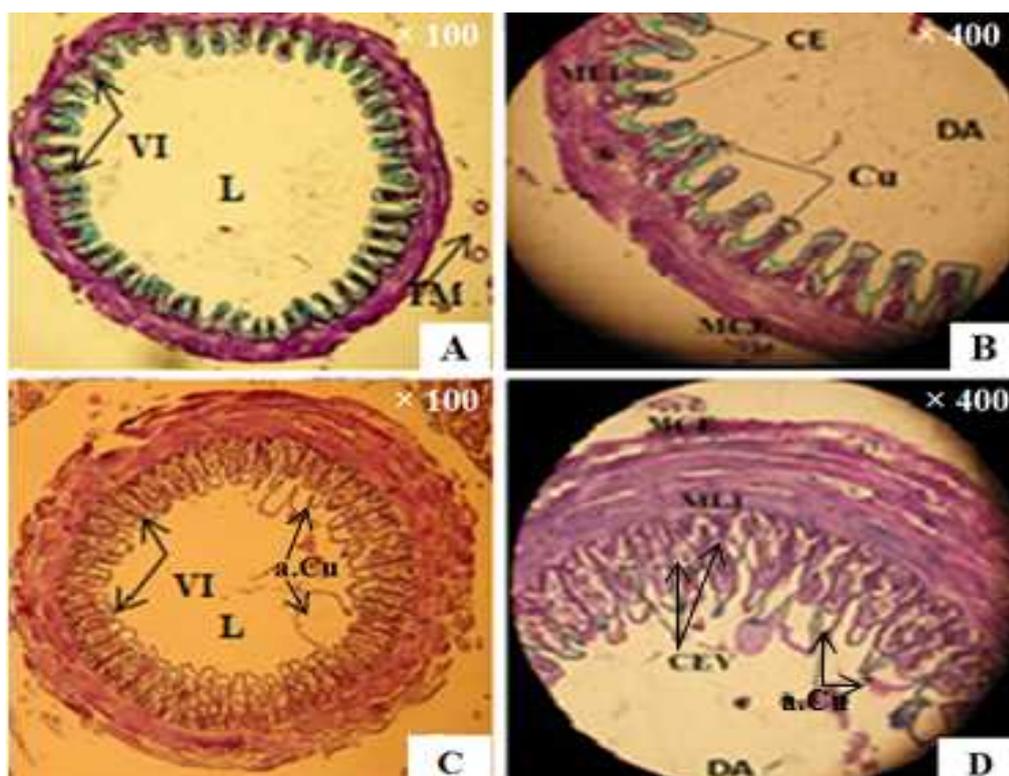


Planche 4.3 : Coupes transversales au niveau du stomodeum (gésier) chez les larves *D. maroccanus* témoins (Figure A et B) et traitées avec GM (Figure C et D)

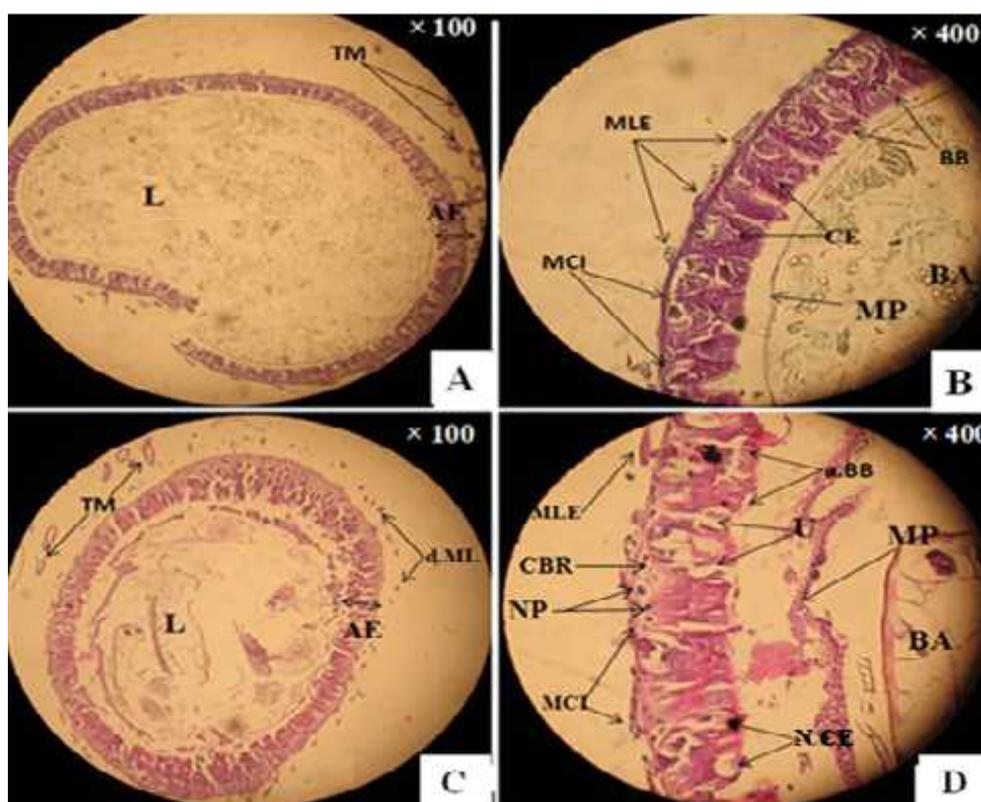


Planche 4.4: Coupes transversales au niveau du mésentéron chez les larves *D. maroccanus* témoins (Figure A et B) et traitées avec GM (Figure C et D)

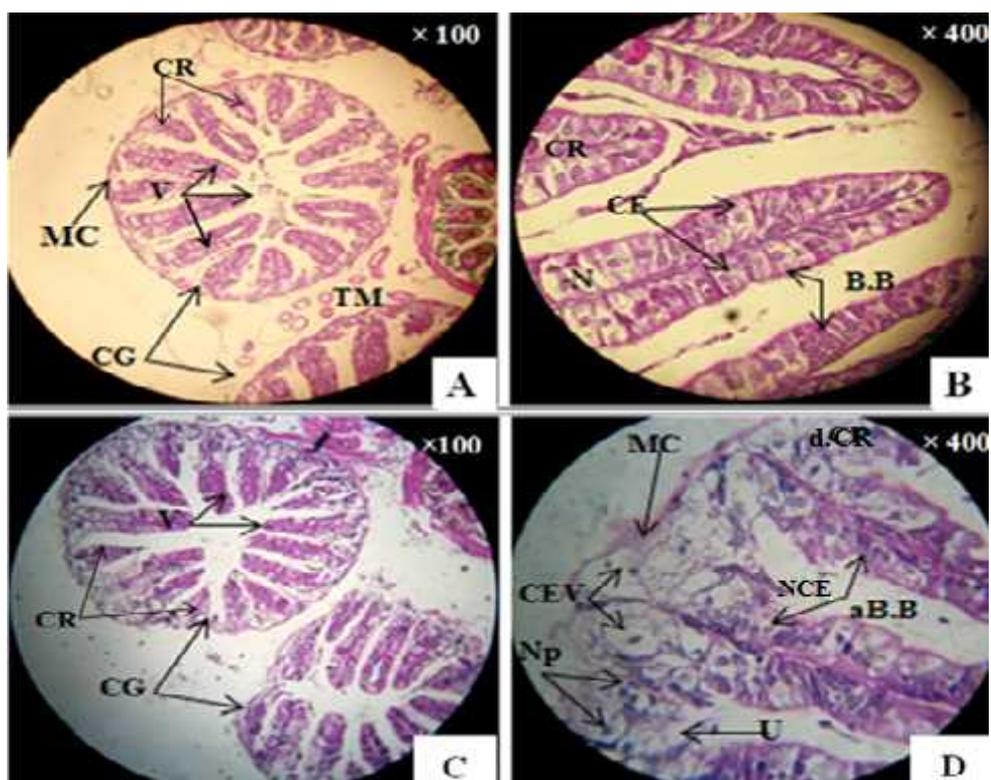
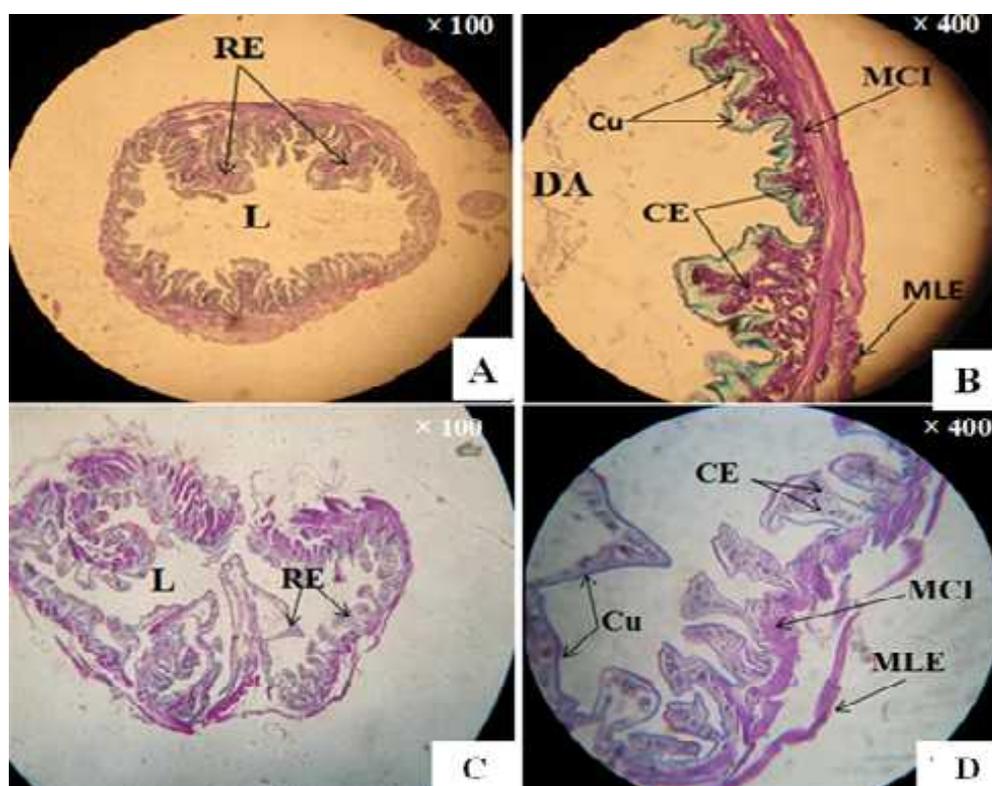


Planche 4.5: Coupes transversales au niveau des cæca gastriques chez les larves *D. maroccanus* témoins (Figure A et B) et traitées avec GM (Figure C et D)



Planches 4.6: Coupes transversales au niveau du proctodeum (colon) chez les larves *D. maroccanus* témoins (Figure A et B) et traitées avec GM (Figure C et D)

4.2.5. Effet de *M. anisopliae* sur l'hémolymphe chez les larves *D. maroccanus*

4.2.5.1. Aspect macroscopique et cultural de l'hémolymphe

Les échantillons d'hémolymphe prélevés des larves témoins, collectés dans un micro-tube Eppendorf, ont montré une coloration jaune claire. Cependant, un changement de couleur a affecté l'hémolymphe des larves traitées par Green muscle. Le changement s'est traduit, 96 heures après traitement à 50 g /ha, par une coloration verte foncée (Figure 4.9-a).

Chez les témoins, nous avons remarqué l'absence totale de sporulation du champignon sur les cultures de l'hémolymphe. L'hémolymphe prélevée à partir des larves traitées mis en culture révèle, après 5 à 6 jours d'incubation à 30°C, la fructification du champignon. Ainsi, de petites colonies verdâtres entourées d'un feutrage blanc sont bien visibles (Figure 4.9 -b). Après 20 jours d'incubation, le mycélium a proliféré encore et a envahit la totalité du milieu de culture (Figure 4.9-c). L'identification macroscopique des cultures (le type de fructification et la coloration des colonies...) et microscopique par observation sur lame (l'aspect du mycélium, la forme des conidies et des hyphes...) nous ont permis d'identifier la souche *Metarhizium anisopliae* var. *acidum*.

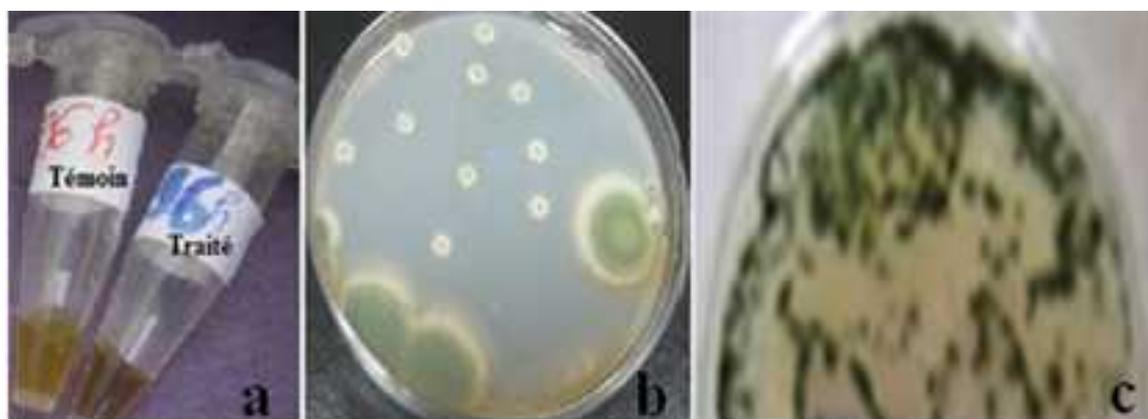


Figure 4.9 - a : Coloration de l'hémolymphe des larves témoins et traitées avec le Green muscle à 50 g/ha. **b et c** : Fructification de *M. anisopliae* sur le milieu PDA après culture de l'hémolymphe des larves traitées. Culture âgée de 5 jours (b), culture âgée de 20 jours (c).

La culture suggère le passage des spores dans la circulation interne des larves traitées dès le 3^e jour suivant l'infection pour tous les échantillons

d'hémolymphe prélevés. Le repiquage de l'hémolymphe des larves traitées sur le milieu PDA a permis le ré-isolément des spores du champignon entomopathogène

4.2.5.2. Étude microscopique des frottis sanguins

Au microscope photonique, nous avons observé différentes catégories de cellule hémolympatique après examen des frottis colorés. La variabilité de la taille et de la forme de ces cellules, nous a permis de déterminer uniquement trois d'entre elles, selon la littérature [80] et [81] aussi bien chez les larves témoins que chez les traitées.

- Les plasmacytes (leucocytes), cellules hautement polymorphes, arrondies, ovales ou souvent fusiformes. Ces leucocytes sont caractérisées par un noyau rond, ovoïde, ou allongé et étiré, d'assez grande taille et situé en position médiane. Le cytoplasme n'est relativement abondant que dans les deux zones apicales de la cellule renferment des vacuoles et des globules denses généralement arrondis.
- Les prohémyocytes, De forme petite, arrondie ou légèrement ovoïde. Les noyaux sont volumineux, arrondis et occupent une position centrale ou excentrique, le cytoplasme est pauvre en éléments cytoplasmiques, d'aspect homogène et occupe une zone étroite autour du noyau.
- Les granulocytes, cellules relativement volumineuses, rondes ou ovales avec de grands noyaux, occupant généralement une position centrale. Le cytoplasme est dense caractérisé par une richesse en organites cellulaires et rempli de nombreuses granules basophiles.

En comparaison avec les images des frottis sanguins des larves témoins (Planche 7- figure A, B et C), les photomicrographies observées chez les larves traitées avec le Green muscle révèlent la présence des spores et des hyphes de *M. anisopliae* dans l'hémolymphe des L4 de *D. maroccanus*. Les conidies sont observées à partir du 3^e jour après traitement à différentes doses et sont soit libres ou en chaînes (Planche 7- figure E, F, H et I).

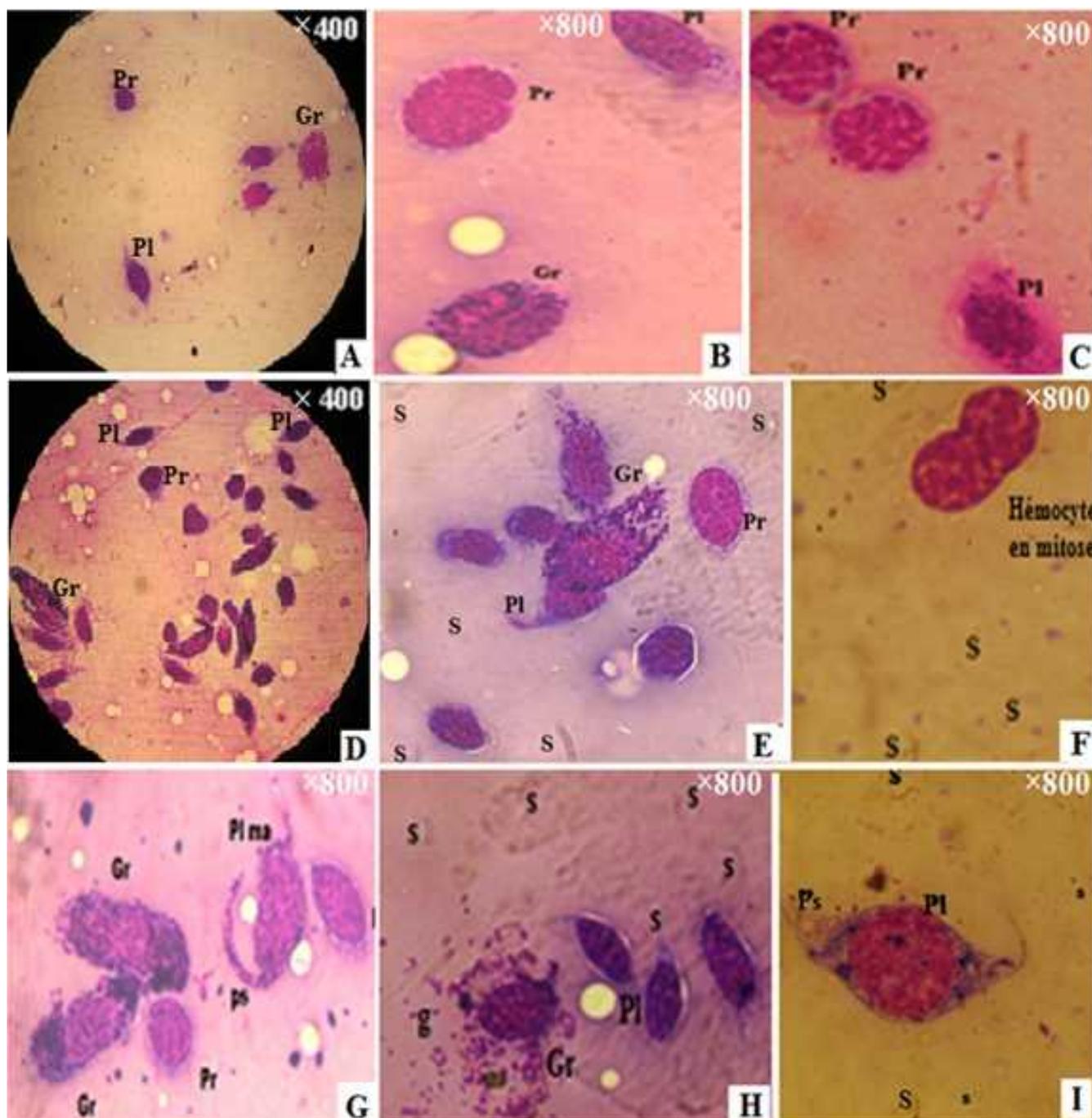


Planche 4.7 : Observations microscopiques des frottis sanguins des L4 de *D. maroccanus*. **Figures A, B et C** : chez les larves témoins. **Figures D, E et F** : chez les traitées avec le Green muscle à 50 g/ha le 3e jour après traitement. **Figures G, H et I** : chez les larves traitées à 25 g/ha le 5e jour après traitement. Coloration MGG. **Pl** : plasmocyte ; **Pr** : prohémocyte ; **Gr** : Granulocyte ; **g** : granules de sécrétion ; **ps** : pseudopode ; **S** : spores de *M. anisopliae*. **Pl ma** : Plasmocytes macrophage.

Nous avons observé des images de mitose cellulaire (cytokinèse) le 3^e jour de l'infection ce qui suggère une activité hématopoïétique (Planche 4.7- figure F). Des hémocytes en mitose sont également observés chez les larves témoins (Planche 4.7- figure C). Les frottis sanguins des larves traitées révèlent d'importantes altérations structurales au niveau des hémocytes totalement absentes chez les individus témoins. Les cellules atteintes présentent un aspect rétracté, dense et diffus et ont tendance à se regrouper pour former des amas (Planche 4.7- figure D, E, G et H).

L'observation microscopique montre des plasmocytes regroupés autour des spores de *M. anisopliae*. Ces cellules peuvent émettre des extensions filamenteuses ou la membrane cytoplasmique émet des invaginations d'endocytose appelées pseudopodes (Planche 4.7- figure E, G et I).

Nous avons observé la libération des granules de sécrétion par les granulocytes (Planche 4.7- figure E et H). Nos résultats reflètent également l'influence de la dose et du temps post-infection sur l'importance des altérations observées.

4.2.5.3. Effet des traitements avec le Green muscle sur l'hémogramme des larves de *D. maroccanus*

Nous avons compté le nombre total des trois types d'hémocytes identifiées ainsi que le nombre et le taux relatif à chaque catégorie de cellule dans les 5 μ l d'hémolymphe. Ces échantillons sont prélevés le 3^e, et le 5^e jour après traitements avec le Green muscle à différentes doses. Les résultats obtenus avec leurs significations statistiques sont présentés dans les figures 4.10 et énumérés sur les tableaux 4.7 et 6 (annexe 2).

Les nombres totaux et différentiels des trois catégories d'hémocytes montrent des diminutions par rapport au témoin et en fonction de la dose appliquée. Quant à la différence entre les deux intervalles de temps, nous avons remarqué que les chutes enregistrées le 5^e jour sont plus importantes que celles enregistrées le 3^e jour. Chez les individus témoins et traités avec *M. anisopliae* à différentes doses, le pourcentage le plus élevé est observé pour les plasmocytes, suivi par celui des prohémocytes et après les granulocytes.

Tableau 4.7: Nombres moyens totaux et différentiels des trois catégories d'hémocytes chez les L4 *D. maroccanus* traitées avec le biopesticide

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

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

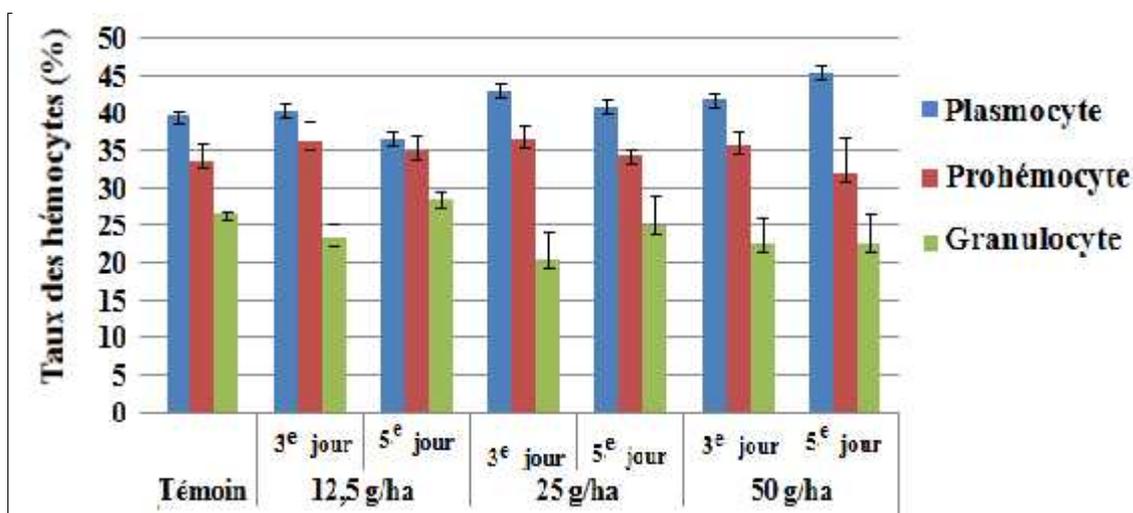


Figure 4.10 : Variations des taux différentiels des hémocytes chez les larves de *D. maroccanus* le 3^e et le 5^e jour après traitement avec Green muscle

L'analyse de la variance réalisée à titre de comparaison entre les deux périodes d'étude le 3^e (j+3) et le 5^e jour (j+5) (Tableaux 7 de l'annexe 2), nous

montre qu'il existe un effet non significatif ($P > 0,05$) du nombre total des hémocytes pour le facteur temps après traitement.

Pour étudier l'effet du facteur dose appliquée sur les variables nombre total et différentiel et les taux des hémocytes avec plus de précision, nous avons fixé la période d'échantillonnage de l'hémolymphe à J+3 et à J+5 jour après application des traitements avec le Green muscle (Tableaux 8 et 9 de l'annexe 2). Un effet hautement significatif des doses appliquées de Green muscle est noté sur les nombres moyens totaux et différentiels des hémocytes ($P < 0,01$). Cependant, les taux moyens des prohéocytes, des plasmocytes et des granulocytes pour les trois traitements appliqués montrent des variations non significatives par rapport au témoin ($P > 0,05$) le 3^e et le 5^e jour après traitement. Les groupes homogènes relatifs à chaque facteur sont mentionnés sur le tableau 4.7. Les résultats sont détaillés sur les tableaux 10, 11, 12 et 13 de l'annexe 2.

Tableau 4.8: Modèle G.L.M. appliqué sur le nombre différentiel des hémocytes le 3^e et 5^e jour après traitement avec le Green muscle selon les facteurs étudiés

| 3 ^e jour Source | Somme des carrées | d. d. l | Moyenne des carrées | F | Sig. |
|-------------------------------|------------------------|---------|------------------------|----------|------|
| Model corrigé | 47870,125 ^a | 11 | 4351,830 | 110,992 | ,000 |
| Intercept | 161868,375 | 1 | 161868,375 | 4128,418 | ,000 |
| Cellules | 6672,250 | 2 | 3336,125 | 85,087 | ,000 |
| Doses | 40617,458 | 3 | 13539,153 | 345,313 | ,000 |
| cellules * Doses | 580,417 | 6 | 96,736 | 2,467 | ,086 |
| Erreur | 470,500 | 12 | 39,208 | | |
| Total | 210209,000 | 24 | | | |
| Total corrigé | 48340,625 | 23 | | | |
| 5 ^e jour Source | Somme des carrées | d. d. l | Moyenne des carrées | F | Sig. |
| Model corrigé | 70227,000 ^a | 11 | 6384,273 | 323,254 | ,000 |
| intercept | 95250,000 | 1 | 95250,000 | 4823,089 | ,000 |
| Cellules | 2462,250 | 2 | 1231,125 | 62,335 | ,000 |
| Doses | 66214,333 | 3 | 22071,444 | 1117,541 | ,000 |
| cellules * Doses | 1550,417 | 6 | 258,403 | 13,084 | ,000 |
| Error | 237,000 | 12 | 19,750 | | |
| Total | 165720,000 | 24 | | | |
| Corrected Total | 70464,000 | 23 | | | |

Dans cette étude, plusieurs facteurs sont en jeu. Nous avons alors appliqué le modèle linéaire global (G.L.M.) sur le nombre total des hémocytes comptés à différents temps après traitement (3^e et 5^e jour).

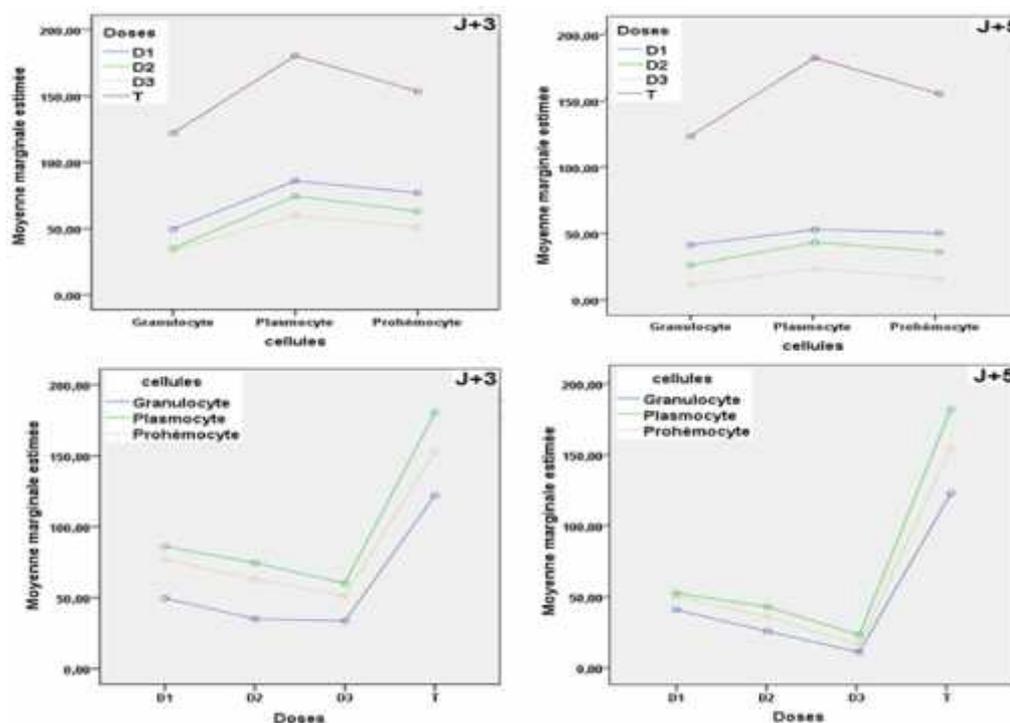


Figure 4.11: Nombre différentiel des hémocytes au 3^e (J+3) et au 5^e (J+5) jour après traitement avec Green muscle selon les facteurs type de cellule et dose appliquée (Modèle G.L.M). D1= 12,5 g/ha, D2= 25 g/ha, D3= 50 g/ha. T= témoin

L'analyse du modèle G.L.M. (Tableau 4.8 et figure 4.11) montre que l'interaction des facteurs dose appliquée et catégorie d'hémocyte sur le nombre différentiel des cellules révèle un effet non significatif le 3^e jour ($p > 0,05$) et hautement significatif le 5^e jour après traitement de terrain avec le Green muscle ($p < 0,05$).

4.2.6. Discussion

➤ Effet de *M. anisopliae* sur les larves *D. maroccanus* traitées sur terrain

Les acridiens traités avec le Green muscle ont été nettement affaiblis et ont commencé à se déplacer lentement après quatre jours, avant d'être attaqués par les oiseaux, les lézards et les fourmis. Les symptômes de la mycose au *M. anisopliae* décrits chez les larves traitées concordent avec ceux observés par plusieurs auteurs. D'après ATHEIMINE et al. [19], les larves traitées sur terrain avec le Green muscle deviennent complètement rouges après leurs morts par l'antibiotique oosporéine, produit par le champignon, contre les bactéries saprophytes intestinales. Pour augmenter la température corporelle, les larves sont

restées prostré au soleil (fièvre comportementale), considéré comme un moyen pour ralentir l'infection [17].

Les réductions moyennes des populations sont plus importantes après le 7^e jour de l'infection (J+6). La mortalité des larves est bien incriminée à l'action de *M. anisopliae* qui a sporulé sur les cadavres. La faible mortalité observée chez les témoins n'est pas due à une contamination par le champignon entomopathogène mais probablement à d'autres facteurs comme le stress. Cela est confirmé par l'absence de sporulation sur les cadavres retirés des enclos de terrain témoins. Nos résultats reflètent également l'influence de la concentration en spores pulvérisées (dose de traitement) sur les taux de mortalité enregistrés. En effet, *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* agit principalement par contact direct. L'insecte peut également être infecté par contact secondaire (lorsqu'il rentre en contact avec la végétation traitée) ou par ingestion. Le principe est que les insectes restent suffisamment de temps en contact avec la végétation contaminée sur laquelle ils se nourrissent pour ramasser une dose létale de conidies. De ce fait, la durée de vie des conidies sur la végétation traitée est un facteur important de mortalité. Ce facteur dépend étroitement de la quantité en spores viables ingérée et accumulée chez l'hôte.

Nos résultats corroborent avec ceux obtenus par plusieurs auteurs lors des traitements de terrain avec le Green muscle [19], [21], [22], [23], [24], [26]; Et les auteurs [20] et [25] qui ont déduit que le taux de sporulation de *Metarhizium* augmente avec le taux de mortalité des individus. La plupart des traitements appliqués en UBV avec la dose 100g /ha de Green muscle soit 5×10^{12} conidies /ha ont entraîné une réduction de la population acridienne de plus de 90% dans un délai de 6 à 14 jours. Avec des doses d'application moindres, le contrôle était moins tangible [18].

Le problème majeur de l'utilisation des champignons entomopathogènes est leur durée de développement dans l'hôte infectée et leur faible persistance sur le feuillage [19], en plus des difficultés d'adaptation des souches fongiques non locales. Dans les conditions de terrain, Il existe de nombreuses contraintes abiotiques quant aux capacités des champignons entomopathogènes à infecter leurs hôtes. Parmi celles-ci se trouvent les UV, la température et l'humidité [182]. Dans les conditions naturelles, les facteurs hydriques ont un rôle déterminant dans la percolation des propagules qui peu à peu s'enfoncent dans le sol. C'est ainsi

que les pluies et les irrigations successives entraînent considérablement les spores qui perdent alors tout contact avec l'insecte hôte. Dans nos conditions expérimentales, les résultats statistiques révèlent que les trois doses appliquées de Green muscle, 50g/ha, 25g/ha, et 12,5 g/ha, ont un effet hautement significatif contre les larves de *D. maroccanus* comparativement avec le témoin.

D'après KANE, [183], une mortalité de 85% et 95% a été signalée chez les L4 de *S. gregaria* traitées respectivement par la souche *M. anisopliae* var. *acridum* IMI 330189 de la Mauritanie et celle de l'Allemagne avec des températures ambiantes qui variaient entre 22 et 26,5 °C. Chez les L4 exposées à des températures ambiantes qui variaient entre 11 et 31,5 °C, la mortalité était inférieure à 25% exceptée pour la forte dose d'IMI 330189 qui a tué 73,33 % des larves traitées. L'exposition des larves traitées avec la forte dose d'IMI 330189 à des températures comprise entre 32 et 46,5°C, pendant 8 heures par jour, a fortement inhibé la virulence du biopesticide avec une mortalité atteignant 7%. Le même auteur suggère que pour le test en conditions semi-naturelles, seul la souche IMI 330189 a été utilisée à la dose 5×10^{12} conidies /ha (100 g/ha). Pour ce test, il y avait deux traitements : larves et végétation traitée et larves non traitées placées sur la végétation traitée pour évaluer l'effet du prélèvement secondaire. Dans le premier cas, une mortalité de 66% a été observée contre 41,25 % pour le second cas.

ATHEIMINE et al. [19], ont montré l'efficacité de traitement en barrière avec le Green muscle® contre des larves du criquet pèlerin exposées à la végétation traitée dans des cages. Les résultats de cette étude confirment que, même sans être directement exposés aux gouttelettes du produit, les criquets passant au travers d'une végétation contaminée par les conidies se contaminent eux-mêmes. Les travaux de BATEMAN et al. [184], ont montré que la mortalité attribuée à l'effet résiduel de *M. acridum*, pourrait être similaire à celle infligée par son effet direct. La persistance des conidies de ce champignon sur la végétation traitée est un facteur de réussite essentiel de son utilisation. En effet, l'importance de cet effet résiduel dépend étroitement de la durée d'exposition des larves à la végétation contaminée [18]. *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*, adapté au climat chaud (35°C) peut survivre jusqu'à 45 jours après application sans effet nocifs sur la faune non cible, et peut causer par la suite une épidémie parmi les insectes, les criquets peuvent être infectés jusqu'à trois semaines après traitement par le

biopesticide [98]. DELGADO et al. [185], lors d'un essai sur terrain du champignon entomopathogène *Bauveria bassiana* contre *Locusta migratoria*, ont enregistré un taux de mortalité de 56 % au 10e jour de traitement.

Des essais au Niger ont prouvé qu'après un premier taux de mortalité élevé dans les enclos de terrain traités avec l'insecticide Fénitrothion, la densité de la sauterelle sénégalaise est devenue plus élevée que celle enregistré dans les enclos traités avec le champignon entomopathogène, *Metarhizium anisopliae*, après seulement neuf jours. L'avantage du Fénitrothion est compensé par le biopesticide dans sa capacité de tuer pendant plus longtemps et de préserver la nature [15].

Nos résultats révèlent que le biopesticide utilisé, même à doses plus faibles que la dose recommandée, peut réduire les densités des ravageurs ciblés. Sous des conditions expérimentales semblables, le traitement avec des doses supérieures à 50 g/ha, peut accélérer la mortalité des larves de *D. maroccanus*. La pulvérisation doit avoir lieu en début d'infestation contre les premiers stades larvaires avant d'atteindre les zones agricole. Cette étude suggère la possibilité de l'utilisation de Green muscle contre les larves de *D. maroccanus* comme une alternative aux insecticides chimiques dans un programme de lutte intégrée.

➤ Effet de *M. anisopliae* sur l'histologie du tégument

Chez les champignons entomopathogènes, quatre étapes sont à distinguer une fois en contact du tégument des insectes: l'adhésion, la germination, la différenciation et la pénétration d'après BISSAAD et al. [106].

L'adhésion est caractérisée par un mécanisme de reconnaissance et de compatibilité des conidies avec des cellules tégumentaires de l'insecte. Cette phase se scinde en deux étapes, la première passive où l'attachement à la cuticule est réalisé grâce à des forces hydrophobes et électrostatiques et la seconde active caractérisée par la production d'un mucilage qui va engendrer une modification épicuticulaire aboutissant à la germination.

La germination va être dépendante des conditions environnantes et aussi de la physiologie de l'hôte (composition biochimique de la cuticule).

La différenciation est caractérisée par la production d'appressorium, structures terminales qui vont servir de point d'encrage, de ramollissement de la cuticule et favoriser la pénétration. La production des appressorium est très dépendante de la

valeur nutritive de la cuticule de l'hôte. Une cuticule nutritive va stimuler la croissance du mycélium plutôt que la pénétration.

La dernière phase est la pénétration dans l'hôte qui se fait par la combinaison de pression mécanique et enzymatique telles que les lipases, les protéases et les chitinases.

L'importance des altérations tissulaires observées au niveau de la cuticule des larves traitées avec le Green muscle dépendent d'une part de la concentration en spores accumulés chez les criquets et d'autre part du temps après infection. Les conditions éco-météorologiques influencent également la vitesse de développement de l'entomopathogène sur l'hôte infectée.

Des perturbations histologiques similaires sont notées par plusieurs auteurs au niveau du tégument de *S. gregaria*, BISSAAD et *al.* [106] dans l'étude de l'activité biologique de Green muscle et HALOUANE et *al.* [186] dans l'étude de l'effet du champignon entomopathogène *Beauveria bassiana*. Ces auteurs ont noté également une diminution du poids sec de la cuticule sternale abdominale, et une réduction de sa teneur en protéines et en chitine. En effet, la déstructuration des couches cuticulaires est due à leur dégradation par les enzymes protéolytiques et chitinolytiques de l'unité infectieuse de notre souche fongique telles que les protéases et les chitinases; ces dernières peuvent inhiber la formation de la cuticule en induisant une exuviation anormale et mortelle de l'acridien. Cependant, c'est le manque de chitine dû à l'inhibition de sa biosynthèse qui est la cause de la forme amorphe observée dans l'endocuticule des larves traitées. Les microfibrilles rencontrées communément dans cette région se composent de protéines et de chitine. L'absence de lamelles dans cette couche est due à la composition chimique de celle-ci [94].

La présence de spores dans les parties de la cuticule digérée est également observée par HALOUANE et *al.* [186].

➤ Effet de *M. anisopliae* sur l'histologie du tube digestif

L'étude au microscope optique des coupes histologiques intestinales chez les criquets témoins concorde avec la littérature [187], [79] et [188].

L'effet de *Metarhizium anisopliae*, même à des concentrations inférieures à la dose recommandée, s'est manifesté par une cytotoxicité intestinale progressive. Cette cytotoxicité dépend de la concentration en spores accumulées dans l'hôte.

Les altérations tissulaires observées sont assez comparables avec ceux des autres travaux réalisés sur l'histologie du tube digestif chez des espèces acridiennes après différents traitements biologiques :

Plusieurs auteurs ont constaté des modifications importantes au niveau des trois parties de l'appareil digestif des individus de *S. gregaria* après traitement avec les bactéries entomopathogènes *Bacillus thuringiensis*, *Cytisustriflorus* et *Pseudomonas fluorescens* [188] et [189]. Des effets comparables induits par l'ingestion de l'extrait brut saponique de *Cestrumpair-quii* sur le système digestif de *S. gregaria* [190] et par l'ingestion orale de l'acide gibbérélique (GA3), un régulateur de croissance de plantes, sur des larves de *Locusta migratoria* [191]. Ces auteurs ont noté une dilatation des cæca gastriques montrant une lumière tout à fait visible accompagnée d'une chute de la taille des plis épithéliaux. AMMAR et N'CIR, [192] ont également observé les coupes intestinales des L5 de *S. gregaria* alimentés avec des feuilles de *Cestrumparqui* (Solanaceae), la structure est modifiée au niveau de la cuticule intima. Cette dernière n'est plus observée comme dans le cas des témoins.

Les activités de l'épithélium mésentérique répondent aux fonctions digestives suivantes: la sécrétion, l'absorption et l'excrétion [187] et [188]. Il nous semble que *Metarhizium* affecte surtout l'intestin moyen qui présente une sensibilité élevée aux entomopathogènes administrés par ingestion par rapport aux deux autres parties de l'intestin. L'absence de l'assimilation et de l'absorption intestinale est presque certaine avec un épithélium intestinal désorganisé et nécrosé. Des altérations semblables sont observées au niveau du mésentéron de l'Acrididae *D. maroccanus* traité avec *Bacillus thuringiensis* [193]. De même, les effets toxiques de *Peganum harmala* (Zygophyllaceae) engendrent des signes d'ulcération et de nécrose cellulaire au niveau de l'intestin moyen du criquet pèlerin [194] et [195]. Ces auteurs ont observé aussi l'atrophie de la muqueuse intestinale présentant un épithélium strié réduit, avec un aspect granuleux et absence de plissements caractéristiques.

De même MESSGO-MOUMENE et al. [196] ont étudié l'effet biocide des extraits aqueux et éthanoliques des plantes des zones arides du Sahara Algérien *Calotropisprocera*, *Schouwia purpurea* sur les larves L5 de *S. gregaria*. Des changements morphologiques et une inhibition de la mue ont été décelés suite à

ces traitements en plus de modifications structurales du mésentéron, les cellules épithéliales semblent être désagrégées, leurs inclusions étaient dispersées dans la matrice intercellulaire, l'épithélium des individus traités a montré une épaisseur plus réduite que celui des témoins. Les travaux de OULEBSIR-MOHANDKACI et DOUMANDJI-MITICHE, [188] sur l'effet de *P. fluorescens* sur les larves de *L. migratoria* et de *S. gregaria*, révèlent en plus de l'altération de la membrane péritrophique et de l'épithélium mésentérique, un élargissement de la lumière intestinale. Peu d'altérations sont observées au niveau de l'intestin postérieur.

Des observations ultrastructurales ont révélé que l'intestin moyen des adultes de *L. migratoria* traités par *B. thuringiensis* était hypertrophié et ont montré une désorganisation considérable en comparaison à l'intestin moyen des adultes non traités [197]. NASIRUDDIN et MORDUE, [198] ont remarqué les mêmes effets, au niveau du mésentéron, après ingestion des extraits de *Melia azadirachtine* par le criquet pèlerin et le criquet migrateur. Plusieurs auteurs suggèrent que les ulcérations observés chez les individus traités, consistant en une rupture des épithéliums, sont dues à des nécroses causées par la substance de traitement sur les cellules épithéliales, ou à l'effet des micro-organismes bactériens, les grégarines dont le nombre est fortement réduit chez les insectes traités [194], [199].

L'altération tissulaire de l'intestin des individus infectés avec le champignon entomopathogène peut expliquer le déclin dans l'ingestion de la nourriture remarqué chez les larves traitées comparées aux témoins d'où carence protéique et lipidique. Ce manque en apports nutritifs provoque, probablement comme signes externes, une réduction de la locomotion et des difficultés de mue larvaire et par conséquent la mort des larves traitées avec le biopesticide.

➤ Effet de *M. anisopliae* au niveau de l'hémolymphe

Chez les larves de *D. maroccanus* traitées en milieu naturel par le Green muscle à différentes concentrations, 12,5 g/ha, 25 g /ha et 50 g /ha, l'infection de l'hémolymphe s'est traduite par des perturbations cytologiques que nous avons étudié sur le plan qualitatif et quantitatif. Au 3^e jour après traitement à 50 g /ha, le changement de couleur de l'hémolymphe des criquets traités par rapport aux individus non traités suggère le passage important des spores de *M. anisopliae* dans la circulation interne. La culture de l'hémolymphe et l'observation

microscopique des frottis confirment la présence des hyphes et des amas de spores du champignon dans l'hémolymphe des larves traitées. Des observations similaires sont rapportées par BIDOCHKA et *al.* [200], des hémocytes regroupés autour des spores de champignon 24h après traitement de locustes.

Il s'avère que l'activité fongique de Green muscle® a confirmé ses potentialités acridicides sur le plan systémique; *M. anisopliae* exerce un effet cytopathologique affectant l'hémolymphe des larves de *Dociostaurus maroccanus* traitées en milieu naturel. Cet effet se traduit par l'apparition des altérations structurales au niveau des hémocytes. La présence du champignon est apparue pour stimuler l'agrégation des cellules au cours des premiers jours de la mycose.

Plusieurs chercheurs ont noté des remarques semblables, nous citons les cas de *Locusta migratoria* traités avec deux champignons entomopathogènes, *Beauveria bassiana* et *Metarhizium flavoviride* [201] et [202] et lors des traitements de criquet pèlerin au *M. anisopliae* et au *B. bassiana* [166]. VEY et *al.* [203]. signalent que des hémocytes présentent de fortes altérations structurales conséquentes à l'infection des insectes *Lymantria dispar* et *Bombyx mori* par *M. anisopliae*. LATCHININSKY et LAUNOIS-LUONG, [53] ont montré que des criquets marocains sont morts intoxiqués par des toxines produites par les blastospores de *B. bassiana* qui se sont multipliée dans l'hémocœle.

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

Chez les insectes, le système immunitaire implique à la fois les facteurs cellulaires et humoraux qui forment une défense efficace contre les organismes envahisseurs [83], [204]. Les réactions cellulaires impliquent les hémocytes qui participent à la phagocytose, la nodulation et l'encapsulation [204].

Nos résultats concordent avec ceux d'AMOURIQ, [97] et KOOYMAN, [99] qui ont montré que le développement des hyphes de *M. anisopliae* peut être observé dans l'hémolymphe des criquets à partir du 3^e jour d'inoculation. Ce développement commence à s'intensifier à partir du 4^e jour accompagné d'une

réduction considérable du nombre des hémocytes. Nos résultats vont dans le même sens que ceux de plusieurs auteurs après traitements des criquets avec des micro-organismes entomopathogènes [166], [205],[206]. La diminution de l'hémogramme est également observée en réponse aux traitements par des entomopathogènes chez d'autres ordres d'insectes. Nous citons les exemples de *Anacridiuma egyptium* traité par *B. bassiana* et par *M. flavoviride* [207] et *Thaumetopea pityocampa* suite au traitement par *Bacillus thuringiensis* [208] et chez *Agrotis segtum* traité par *Bacillus melolonthae* [97].

GILLESPIE et al. [73], annoncent que *M. anisopliae* colonise l'hémolymphe de *S. gregaria* deux jours après traitement et suggère que l'infection s'est produite en deux étapes : pendant la première phase (les deux premiers jours), une augmentation du nombre total des hémocytes est notée. Ceci suggère l'activation de l'hématopoïèse. La seconde étape s'est produite quand les spores du champignon sont entrées en masses dans l'hémocœle et ont replié intensivement (3 à 4 jours après inoculation), cette étape est caractérisée par des baisses en nombres de toutes les catégories des hémocytes. En effet, le champignon évite les défenses immunitaires de l'hôte en détruisant préférentiellement les prohémoocyte et les plasmatocytes [209]. Les spores adhèrent à la surface des plasmocytes qui émettent des pseudopodes pour phagocyter les particules fongiques. La diminution du nombre des hémocytes peut être expliquée par leur intervention dans le processus de défense immunitaire humorale et cellulaire ainsi qu'à l'épuisement des phagocytes (plasmatocytes et granulocytes) suite à la phagocytose contre les spores et les toxines de l'entomopathogène.

Il est évident que lorsque le système immunitaire est très stimulé par le champignon, l'impact de la défense cellulaire de l'hôte vis-à-vis du *Metarhizium* est minimal puisque les hémocytes demeurent peu attachés aux particules fongiques d'où la réduction de la fonction phagocytaire après le 3^e jour de l'infection. La virulence du *M. anisopliae* dépend de la concentration en spores qui envahit l'hémolymphe et s'est montré efficace du moment que ce champignon entomopathogène a échappé à la barrière phagocytaire du système immunitaire. Cela diminue, probablement, les défenses antimicrobiennes des criquets infectés par le champignon entomopathogène.

4.3. Etude de quelques aspects bio-écologiques de *Metarhizium anisopliae* var. *acidum*

Bien qu'elle soit relativement peu exigeante, notre souche fongique *M. anisopliae* var. *acidum* (l'isolat IMI 330139) nécessite, probablement, un certains nombres de facteurs abiotiques et nutritifs pour son développement.

4.3.1. Effets des milieux de cultures et des températures d'incubation sur la croissance mycélienne et pondérale de *M. anisopliae*

4.3.1.1. Effet sur la croissance mycélienne ou radiale de *M. anisopliae*

Les résultats relatifs aux mesures de la croissance radiale de *Metarhizium acidum* cultivé sur les milieux PDA, MALT et V8 à différentes périodes d'incubation sous différentes températures 18°C, 24°C, 28°C et 38°C sont mentionnés sur la figure 4.12 et les tableaux 4.9 et 14 (annexe 2)

Tableau 4.9: Évolution de la croissance radiale (en mm) de *M. anisopliae* soumis à différentes températures et aux différents milieux de cultures.

| T °C | Milieu de culture | C mm | Période d'incubation | | | | | | |
|------------------|-------------------|---------|----------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------------|---------------------------|
| | | | 1 ^{er} jr | 3 ^e jour (a') | 5 ^e jour (b') | 8 ^e jour (c') | 10 ^e jour (d') | 12 ^e jour (d'), (e') | 15 ^e jour (e') |
| 18°C (a'') | PDA (b) | M ± E.t | 0 | 6,25±2,02 | 13,52±2,00 | 21,68±3,01 | 25,53±5,13 | 28,09±2,65 | 29,61±2,74 |
| | Malt (a) | M ± E.t | 0 | 4,43±1,22 | 13,33±2,76 | 16,38±2,11 | 19,87 ± 2,60 | 22,2± 1,098 | 22,65±0,62 |
| | V8 (b) | M ± E.t | 0 | 5,67±1,02 | 7,88± 1,38 | 13,99±5,64 | 23,85±3,49 | 28,99±2,54 | 34,20±0,62 |
| 24°C (a'') (b'') | PDA (b) | M ± E.t | 0 | 7,5±1,02 | 18,19±2,73 | 31,34±1,98 | 33,82±1,34 | 33,92± 1,09 | 36± 00 |
| | Malt (a) | M ± E.t | 0 | 3,14±1,06 | 9,24±1,02 | 18,49±1,54 | 21,12± 2,70 | 22,72±4,67 | 23,08±4,95 |
| | V8 (b) | M ± E.t | 0 | 7,27±1,14 | 14,89±1,16 | 25,31± 4,0 | 30,09± 1,13 | 31,51±0,89 | 35,61±0,43 |
| 28°C (a'') (b'') | PDA (b) | M ± E.t | 0 | 6,68±0,96 | 20,92±1,30 | 32,38±2,41 | 34,92± 2,95 | 36± 00 | 36± 00 |
| | Malt (a) | M ± E.t | 0 | 4,92±0,73 | 16,14±0,34 | 23,87±1,41 | 26,523±0,97 | 26,49±0,24 | 28,50±2,01 |
| | V8 (b) | M ± E.t | 0 | 5,28±0,27 | 18,58±2,77 | 28,53±4,00 | 33,65± 2,30 | 36± 00 | 36± 00 |
| 38 °C (b'') | PDA (b) | M ± E.t | 0 | 5,94±2,03 | 18,58±1,89 | 26,99±1,24 | 29,33± 1,59 | 31,81±0,61 | 32,4± 0,67 |
| | Malt (a) | M ± E.t | 0 | 2,15±0,74 | 10,56±0,67 | 19,57±0,67 | 25,62±1,49 | 26,84±1,09 | 27,40±0,88 |
| | V8 (b) | M ± E.t | 0 | 5,14±1,06 | 17,01±2,18 | 25,04±1,492 | 26,35±1,55 | 27,40±1,17 | 28,24±1,54 |

Valeurs en moyenne \pm écart type (M \pm E.t). Les groupes (a), (b), (c), (d), (e) / (a'),(b') et (a''),(b'') représentent les ensembles non significativement différents pour les facteurs étudiés, milieu de culture, température et période d'incubation.

La croissance linéaire la plus importante enregistrée le 3e jour est notée sur le milieu PDA incubé à 24°C (7,5 mm \pm 1,021), suivi du milieu V8 et puis le milieu MALT. Pour les différentes températures testées, le milieu PDA semble le milieu qui présente la plus importante croissance mycélienne par rapport aux autres milieux MALT et V8. Le développement maximale (36 mm) s'est achevé au bout de 12 jours sur les milieux PDA et V8 incubés à 28°C et le 15^e jour sur le milieu PDA incubé à 24°C. A la fin de notre étude (15^e jr), la croissance mycélienne la plus faible est enregistrée sur le milieu MALT incubé à 18 °C (22,65 mm \pm 0,616), suivis des milieux PDA et V8 respectivement.

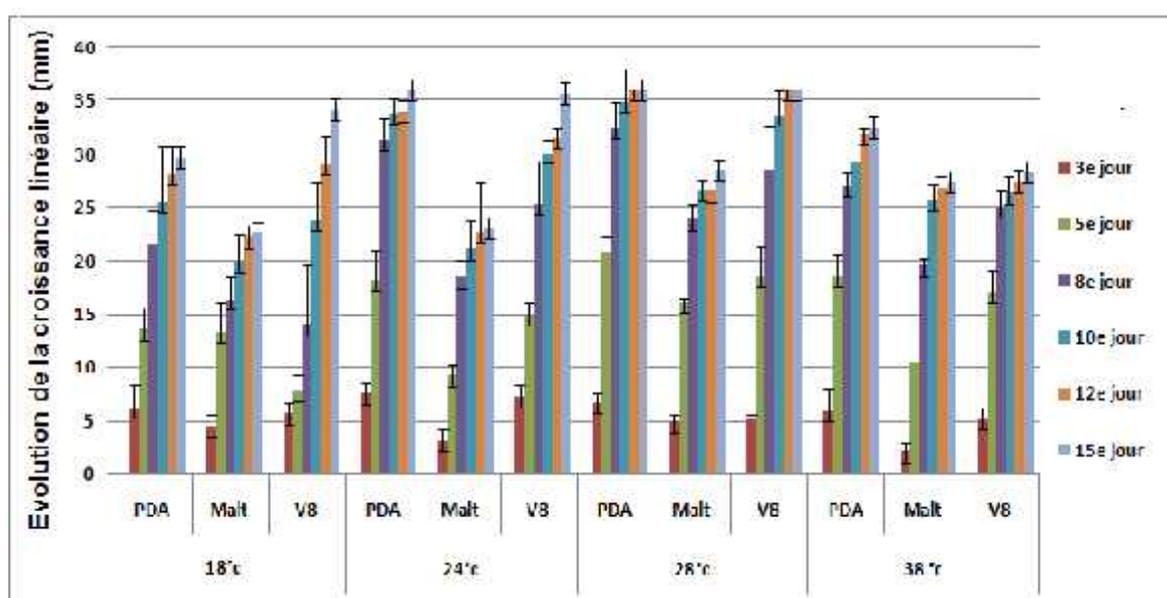


Figure 4.12: Variations de la croissance diamétrale de *M. anisopliae* sur PDA, MALT et V8 en fonction des périodes d'incubation à différentes températures

4.3.1.2. Effet sur la croissance pondérale de *M. anisopliae*

Sur les tableaux 4.10 et 15 (annexe 2) sont mentionnées les valeurs des poids absolus des milieux de culture de *Metarhizium anisopliae*. Ces valeurs sont obtenus par soustraction des poids des boîtes de Pétri entre le jour de l'insertion de l'explantât fongique (J1) et les jours 3^e, 5^e, 8^e, 10^e, 12^e et le 15^e jour après incubation et cela sous différentes températures.

Nous remarquons un gain de poids progressif pour tous les milieux incubés à différentes températures. L'incubation à la température 38°C montre, pour toutes les périodes étudiées, les plus importantes croissances pondérales notées d'abord sur le milieu PDA, suivi du milieu V8 et puis le MALT. A 28°C, le milieu MALT prend la première place suivi des milieux PDA et V8 et ce pour toutes les périodes étudiées sauf pour le 5e jr avec le milieu V8 qui révèle un gain de poids de 0,915 g \pm 0,424. Cependant à 24°C, les meilleurs poids sont enregistrés sur le milieu V8 sauf pour le 8e jour où nous avons enregistré le poids 2,052 g \pm 0,131 sur le milieu MALT.

Tableau 4.10: Évolution de la croissance pondérale (en g) de *M. anisopliae* soumis à différentes températures et différents milieux de culture.

| Température | Milieu de culture | Poids en g | Période d'incubation | | | | | | |
|------------------|-------------------|-------------|----------------------|--------------------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|---------------------------|
| | | | 1 ^{er} jr | 3 ^e jour (a') | 5 ^e jour (a') (b') | 8 ^e jour (b') (c') | 10 ^e jour (c') (d') | 12 ^e jour (c') (d') | 15 ^e jour (d') |
| 18°C (a'') | PDA (a) | M \pm E.t | 0 | 0,62 \pm 0,42 | 0,857 \pm 0,334 | 0,944 \pm 0,383 | 1,123 \pm 0,459 | 1,300 \pm 0,516 | 1,485 \pm 0,6 |
| | Malt (a) | M \pm E.t | 0 | 0,37 \pm 0,10 | 0,554 \pm 0,082 | 0,695 \pm 0,269 | 0,784 \pm 0,271 | 0,88 \pm 0,273 | 1,002 \pm 0,31 |
| | V8 (a) | M \pm E.t | 0 | 0,33 \pm 0,13 | 0,546 \pm 0,209 | 0,759 \pm 0,403 | 1,032 \pm 0,538 | 1,241 \pm 0,627 | 1,576 \pm 0,64 |
| 24°C (a'') (b'') | PDA (a) | M \pm E.t | 0 | 0,42 \pm 0,156 | 0,996 \pm 0,401 | 1,959 \pm 0,747 | 2,174 \pm 0,687 | 2,257 \pm 0,738 | 2,436 \pm 0,831 |
| | Malt (a) | M \pm E.t | 0 | 0,48 \pm 0,03 | 1,09 \pm 0,04 | 2,05 \pm 0,13 | 2,25 \pm 0,21 | 2,33 \pm 0,28 | 2,49 \pm 0,40 |
| | V8 (a) | M \pm E.t | 0 | 0,54 \pm 0,06 | 1,24 \pm 0,10 | 1,81 \pm 0,13 | 2,25 \pm 0,22 | 2,47 \pm 0,45 | 2,64 \pm 0,57 |
| 28°C (b'') | PDA (a) | M \pm E.t | 0 | 0,56 \pm 0,16 | 0,77 \pm 0,3 | 1,07 \pm 0,37 | 1,43 \pm 0,48 | 2,04 \pm 0,69 | 2,28 \pm 0,60 |
| | Malt (a) | M \pm E.t | 0 | 1,11 \pm 0,44 | 1,64 \pm 0,22 | 2,11 \pm 0,24 | 2,76 \pm 0,13 | 3,80 \pm 0,13 | 4,19 \pm 0,41 |
| | V8 (a) | M \pm E.t | 0 | 0,84 \pm 0,12 | 0,91 \pm 0,42 | 1,26 \pm 0,35 | 1,48 \pm 0,35 | 2,14 \pm 0,45 | 2,34 \pm 0,38 |
| 38 °C (c'') | PDA (a) | M \pm E.t | 0 | 1,47 \pm 0,19 | 3,61 \pm 1,21 | 6,13 \pm 1,78 | 7,71 \pm 2,11 | 9,19 \pm 2,07 | 11,21 \pm 1,70 |
| | Malt (a) | M \pm E.t | 0 | 0,99 \pm 0,06 | 2,10 \pm 0,97 | 3,09 \pm 1,33 | 4,10 \pm 2,12 | 4,78 \pm 2,34 | 6,06 \pm 2,70 |
| | V8 (a) | M \pm E.t | 0 | 1,46 \pm 0,14 | 2,85 \pm 0,80 | 4,91 \pm 1,47 | 6,29 \pm 1,91 | 7,76 \pm 2,34 | 9,99 \pm 2,85 |

Valeurs en moyenne \pm écart type ($M \pm E.t$) Les groupes (a) / (a'), (b'),(c') (d') et (a''),(b''),(c'') représentent les ensembles homogènes pour les trois facteurs étudiés (milieu de culture, température et durée d'incubation).

Avec les températures 18°C et 38°C, le milieu PDA semble le milieu qui présente le plus important gain de poids par rapport aux autres milieux sauf avec le milieu V8, le 15e jour d'incubation où nous avons noté une croissance pondérale de l'ordre de $1,576 \text{ g} \pm 0,643$.

Le développement maximal est noté sur PDA le 15e jour à 38°C avec un gain oscillant $11,208 \text{ g} \pm 1,698$. La plus faible croissance pondérale après 15 jours d'incubation est obtenue sur MALT à 18°C ($1,002 \text{ g} \pm 0,313$) (Figure 4.13).

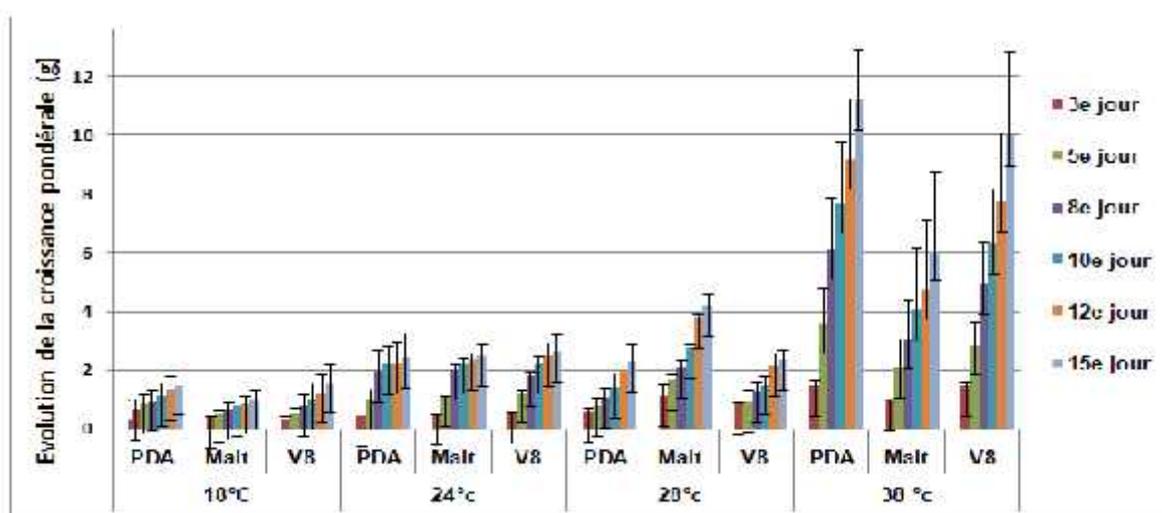


Figure 4.13: Évolution du poids de *M. anisopliae* sur PDA, V8 et MALT en fonction des périodes d'incubation à différentes températures

4.3.1.3. Analyse de la variance relative à la croissance diamétrale et pondérale de *Metarhizium anisopliae*

Pour interpréter les résultats décrits sur les tableaux 4.9, 4.10 et les figures 4.12, 4.13, nous nous sommes basés sur l'analyse de la variance à trois critères

- Facteur 1 : Milieu de culture à 3 niveaux de classification
-) Facteur 2 : Température d'incubation à 4 niveaux
-) Facteur 3 : Durée d'incubation à 6 niveaux de classification.

Les résultats sont portés sur le tableau 16 de l'annexe 2. La différence est statistiquement significative à $p < 0,05$. Nous avons appliqué également le test de Tukey pour la comparaison des moyennes et la définition des groupes non

significativement différents dont les résultats sont illustrés sur les tableaux 4.9 et 4.10 et détaillés sur les tableaux 17, 18 et 19 de l'annexe 2.

L'analyse de la variance de l'évolution de la croissance mycélienne de *M. anisopliae* indique des différences significatives pour les trois facteurs étudiés ($p < 0.05$). L'évolution de poids de notre souche nous révèle que la probabilité est supérieure à 0,05 pour le facteur milieu de culture ce qui suggère qu'il n'existe pas de différence de gain de poids de *Metarhizium* entre les milieux testés. Des différences hautement significatives sont notées pour l'effet de la température et de la période d'incubation sur la croissance pondérale de *M. anisopliae* ($p < 0.01$).

Tableau 4.11: Modèle G.L.M appliqué sur la croissance mycélienne et la croissance pondérale de *M. anisopliae* selon les facteurs étudiés

| Facteurs | Variables dépendantes | Somme des carrés | d.d.l | Carrés moyens | F | Sig. |
|-------------------------------------|-----------------------|------------------------|-------|---------------|-----------|------|
| Model corrigé | CM | 21759,594 ^a | 71 | 306,473 | 72,006 | ,000 |
| | CP | 1154,212 ^b | 71 | 16,257 | 17,927 | ,000 |
| Intercept | CM | 103907,412 | 1 | 103907,412 | 24413,079 | ,000 |
| | CP | 1268,373 | 1 | 1268,373 | 1398,728 | ,000 |
| MILIEUX | CM | 1718,383 | 2 | 859,191 | 201,867 | ,000 |
| | CP | 9,543 | 2 | 4,771 | 5,262 | ,066 |
| Température | CM | 1091,859 | 3 | 363,953 | 85,511 | ,000 |
| | CP | 586,751 | 3 | 195,584 | 215,684 | ,000 |
| Période | CM | 17712,299 | 5 | 3542,460 | 832,302 | ,000 |
| | CP | 257,822 | 5 | 51,564 | 56,864 | ,000 |
| MILIEUX Température | CM | 243,878 | 6 | 40,646 | 9,550 | ,000 |
| | CP | 94,273 | 6 | 15,712 | 17,327 | ,000 |
| MILIEUX * Période | CM | 267,676 | 10 | 26,768 | 6,289 | ,000 |
| | CP | 3,893 | 10 | ,389 | ,429 | ,930 |
| Température * Période | CM | 370,032 | 15 | 24,669 | 5,796 | ,000 |
| | CP | 176,214 | 15 | 11,748 | 12,955 | ,000 |
| MILIEUX Température * Période | CM | 355,467 | 30 | 11,849 | 2,784 | ,000 |
| | CP | 25,716 | 30 | ,857 | ,945 | ,553 |
| Total Corrigé | CM | 22372,489 | 215 | | | |
| | CP | 1284,791 | 215 | | | |

CM : croissance mycélienne, CP : croissance pondérale

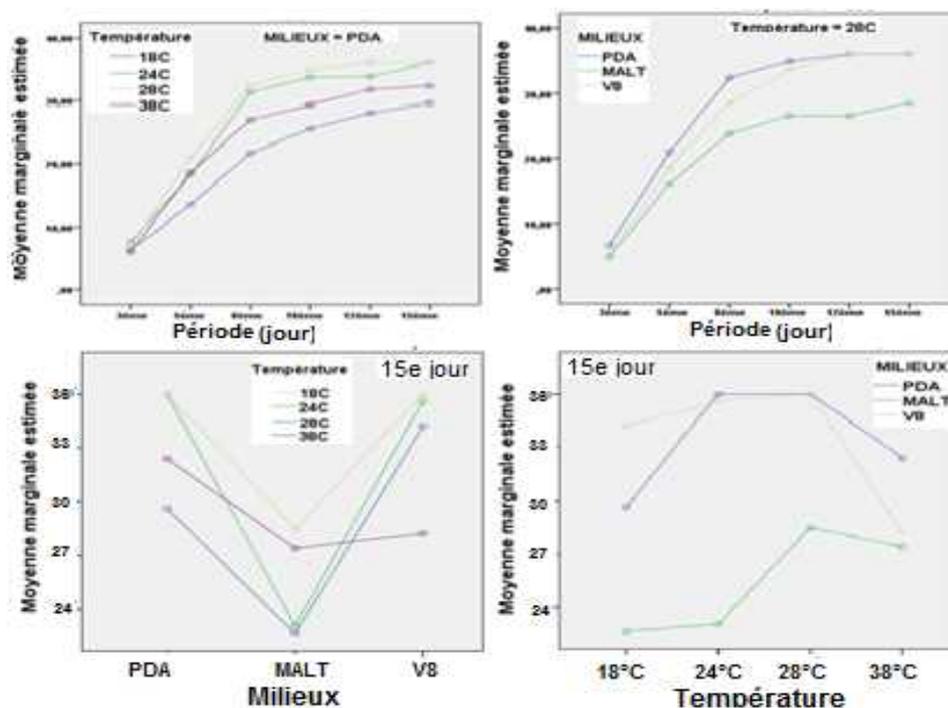


Figure 4.14: Variations de la croissance mycélienne de *M. anisopliae* selon les facteurs milieu, température et période d'incubation (Modèle G.L.M)

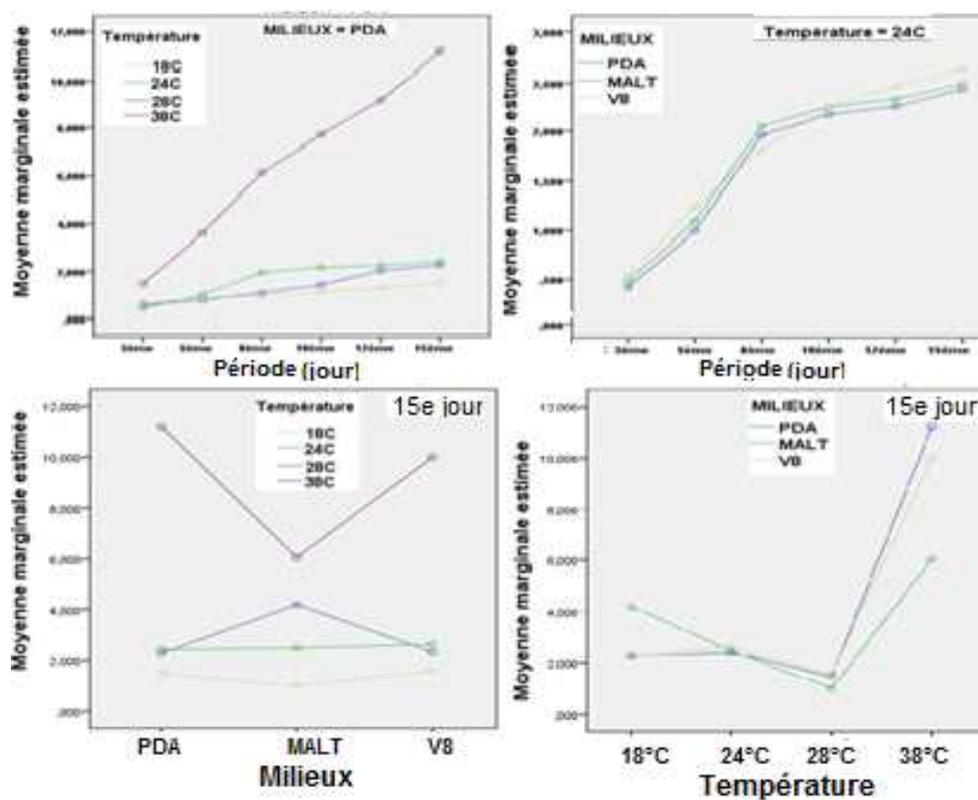


Figure 4.15: Variations de la croissance pondérale de *M. anisopliae* selon les facteurs milieu, température et période d'incubation (Modèle G.L.M)

L'analyse du modèle G.L.M, illustré sur le tableau 4.11 et les figures 4.14, 4.15, montre que la croissance mycélienne de notre souche est significativement influencée par les trois paramètres étudiés deux à deux ou les trois ensembles ($p < 0,05$). Cependant, la croissance pondérale de *M. anisopliae* ne montre pas de différence significative pour l'interaction des trois facteurs étudiés en même temps ($p > 0,05$). Nous avons noté une interaction significative deux facteurs température et période d'incubation sur le développement pondérale ($p < 0,05$).

4.3.2. Effet de quelques facteurs abiotiques sur la sporulation de *M. anisopliae*

En plus des éléments nutritifs, les paramètres physiques de l'environnement (Température, activité de l'eau, pH...) constituent, probablement, des facteurs clés pour la fructification de *Metarhizium anisopliae var. acridum*.

4.3.2.1. Effet de la température et des milieux de culture sur la sporulation

Les résultats concernant l'effet des températures et des milieux de culture sur la concentration de spores de *M. anisopliae* après 15 jours d'incubation, ainsi que leurs transformations logarithmiques (pour l'analyse de la variance), sont portés sur les tableaux 4.12 et 20 (annexe 2) et illustrés sur la figure 4.16.

Tableau 4.12: Dénombrement des spores de *M. anisopliae* après 15 jours d'incubation sur différents milieux et aux différentes températures.

| Température | Milieux de culture | | PDA (a) | MALT (b) | V8 (a) |
|--------------|---------------------------------|--------|--------------|-------------|--------------|
| | [C]X 10 ⁶ Spores/ml | M ± ET | | | |
| 18°C (a') | [C]X 10 ⁶ Spores/ml | M ± ET | 4,133 ± 0,25 | 1,02 ± 0,17 | 4,01 ± 0,46 |
| | L10 | M ± ET | 6,616 ± 0,02 | 6,00 ± 0,07 | 6,601 ± 0,05 |
| 24°C (b') | [C]X 10 ⁶ Spores/ml | M ± ET | 5,176 ± 0,23 | 3,06 ± 0,08 | 6,453 ± 0,76 |
| | L10 | M ± ET | 6,713 ± 0,02 | 6,49 ± 0,01 | 6,807 ± 0,05 |
| 28°C (b') | [C] X 10 ⁶ Spores/ml | M ± ET | 7,163 ± 0,44 | 4,65 ± 0,39 | 5,65 ± 0,15 |
| | L10 | M ± ET | 6,854 ± 0,03 | 6,67 ± 0,04 | 6,752 ± 0,01 |
| 38°C (b') | [C]X 10 ⁶ Spores/ml | M ± ET | 7,063 ± 0,52 | 3,04 ± 0,28 | 6,316 ± 0,68 |
| | L10 | M ± ET | 6,848 ± 0,03 | 6,48 ± 0,04 | 6,798 ± 0,05 |

Valeurs en moyennes ± écart type (M ± ET) ; [C] : nombre de spores ; L10 : logarithme décimale de la concentration de spores /ml. Les groupes (a) et (b) / (a') et (b') représentent les ensembles non significativement différents.

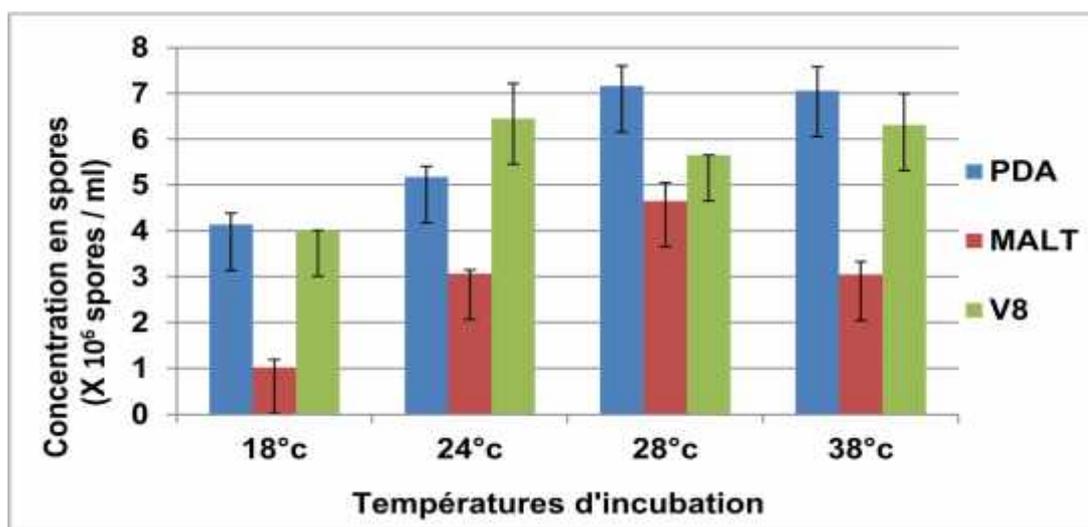


Figure 4.16: Variations des concentrations en spores de *M. anisopliae* après 15 jours d'incubation sous différents milieux et différentes températures

Après 15 jours d'incubation des cultures de *M. anisopliae*, la concentration des spores est fonction des températures et des milieux de culture testés. En effet la meilleure sporulation est obtenue à 28°C sur PDA de l'ordre de $7,163 \times 10^6 \pm 0,441$ spores/ ml, suivis de la concentration $7,063 \times 10^6 \pm 0,518$ spores/ ml, obtenue à 38°C sur le même milieu. A 18 °C, la sporulation la plus importante atteint $6,453 \times 10^6 \pm 0,765$ spore /ml Sur V8. A 24°C, la concentration la plus importante est enregistrée sur PDA et égale à $4,133 \times 10^6 \pm 0,249$ spore /ml. Les plus faibles sporulations sont obtenues à 18°C. Nous constatons d'après ces résultats que les faibles températures ralentissent la germination des spores.

Nous avons appliqué l'analyse de la variance à deux critères de classification, le milieu de culture à trois niveaux et la température à quatre niveaux de classification. D'après les résultats affichés sur le tableau 21 de l'annexe 2. Les deux facteurs influencent significativement sur l'importance de la fructification du champignon (concentration de spores de *M. anisopliae*) ($p < 0,05$) Ces résultats sont appuyés par les tests de Tukey (Tableaux 22 et 23 de l'annexe 2), le regroupement des facteurs étudiés en sous-ensembles homogènes est mentionné sur le tableau 4.12.

Pour étudier l'interaction entre les facteurs milieux de culture et température, nous avons procédé au test G.L.M appliqué sur la variable Logarithme décimale de la concentration en spores de *Metarhizium*. Les résultats sont illustrés sur le tableau 4.13 et la figure 4.17.

Tableau 4.13: Modèle G.L.M appliqué sur le logarithme de la concentration en spores de *M. anisopliae* selon les facteurs milieu et température

| Facteurs | Somme des carrés | d.d.l | Carrés moyens | F | Sig. |
|----------------------|--------------------|-------|---------------|----------|------|
| Model corrigé | 1,848 ^a | 11 | ,168 | 105,057 | ,000 |
| Intercept | 1585,221 | 1 | 1585,221 | 991348,2 | ,000 |
| Milieus de culture | ,922 | 2 | ,461 | 288,450 | ,000 |
| Température | ,664 | 3 | ,221 | 138,347 | ,000 |
| Milieu * Température | ,262 | 6 | ,044 | 27,281 | ,000 |
| Erreur | ,038 | 24 | ,002 | | |
| Total | 1587,107 | 36 | | | |
| Total corrigé | 1,886 | 35 | | | |

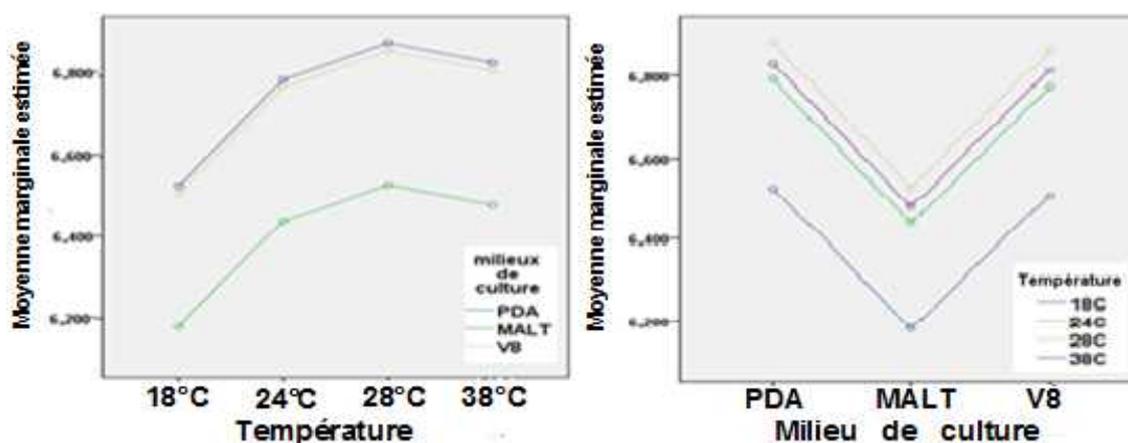


Figure 4.17: Variations de la concentration de spores de *M. anisopliae* en fonction des facteurs milieu de culture et température (Modèle G.L.M).

L'analyse du modèle G.L.M révèle que la composition du milieu de culture et la température d'incubation influencent significativement sur le pouvoir germinatif (la production des spores) de notre souche fongique. Il en est de même pour ces deux facteurs étudiés en interaction.

Nous remarquons que l'entomopathogène fructifie de la même importance sur les milieux V8 et PDA pour une température donnée. Le MALT semble être moins adapté pour la sporulation de notre souche. La même remarque est attribuée à la température 18°C par rapport aux fortes températures 24°C, 28°C et 38°C qui montrent des sporulations semblables sur le même milieu

Tableau 4.14: Valeurs optimales de la croissance diamétrale et pondérale de *M. anisopliae* et de la concentration de spores après 15 jours d'incubation

| Paramètres | | Températures | | | |
|---|---------------|--------------|------------|-------------|-------------|
| | | 18°C | 24°C | 28°C | 38°C |
| Croissance Pondérale optimale (g) | valeur | 1,576 ± 0,64 | 2,642±0,56 | 4,193 ±0,41 | 11,208±1,7 |
| | Milieu | V8 | V8 | MALT | PDA |
| Croissance mycélienne optimale (mm) | valeur | 34,196±0,62 | 36 ± 00 | 36 ± 00 | 32,4 ± 0,67 |
| | Milieu | V8 | PDA | PDA et V8 | PDA |
| Sporulation optimale (X10⁶ spores/ml) | valeur | 4,13 ± 0,25 | 6,453±0,76 | 7,163±0,44 | 7,063±0,52 |
| | Milieu | PDA | V8 | PDA | PDA |

Selon les résultats récapitulés sur le tableau ci-dessus, nous constatons que les températures 24°C et 28°C sont les plus adaptées pour une meilleure croissance mycélienne de *M. anisopliae*. Sur le milieu PDA incubé à 38°C, nous avons enregistré le gain de poids le plus élevé. Cependant à 18°C, nous avons obtenus le plus faible poids (sur V8), ainsi que la plus faible sporulation de notre champignon enregistré sur PDA. Le PDA semble être le milieu de culture le plus approprié pour la fructification et la germination des spores de notre souche fongique d'abord à 28°C et puis à 38°C.

4.3.2.2. Effet de l'activité de l'eau sur la sporulation de *M. anisopliae*

Nous avons évalué l'influence de différentes teneurs en activité de l'eau (aw) sur la production de spores de *M. anisopliae* sur les milieux PDA, MALT, V8 et Baath, incubés à 28°C. Les résultats relatifs à cette étude ainsi que les transformations logarithmiques des concentrations en spores sont consignés sur les tableaux 4.15 et 24 (annexe 2) et illustrés sur la figure 4.18

Selon les résultats relatifs au dénombrement des spores obtenues à partir des cultures de *M. anisopliae* âgées de 15 jours, nous remarquons que la production de spores évolue parallèlement avec l'évolution des teneurs de l'activité de l'eau (a.w).

Tableau 4.15: Fluctuations des concentrations en spores de *M. anisopliae* sur différents milieux et aux différentes teneurs en activité de l'eau.

| Milieux de culture | | Teneurs de l'activité de l'eau (a.w) | | | | | | | | | | | |
|--------------------|------|--------------------------------------|--------|--------------|--------|----------|--------|-------------|--------|----------|--------|----------|--------|
| | | 0,75 (a) | | 0,80 (a) (b) | | 0,85 (b) | | 090 (b) (c) | | 0,95 (c) | | 0,99 (c) | |
| | | C | L10 | C | L10 | C | L10 | C | L10 | C | L10 | C | L10 |
| PDA (a') | M | 2,27 | 5,35 | 2,77 | 5,44 | 3,7 | 5,56 | 4,47 | 5,64 | 7,53 | 5,88 | 10,4 | 6,01 |
| | ± ET | ± 0,25 | ± 0,05 | ± 0,15 | ± 0,02 | ± 0,89 | ± 0,10 | ± 1,20 | ± 0,12 | ± 0,66 | ± 0,04 | ± 1,325 | ± 0,06 |
| MALT (a') | M | 0,85 | 4,93 | 2,253 | 5,35 | 3,28 | 5,51 | 3,72 | 5,57 | 5,006 | 5,70 | 5,513 | 5,22 |
| | ± ET | ± 0,05 | ± 0,03 | ± 0,251 | ± 0,05 | ± 0,33 | ± 0,04 | ± 0,51 | ± 0,06 | ± 0,289 | ± 0,02 | ± 0,63 | ± 0,05 |
| V8 (b') | M | 4,43 | 5,64 | 5,766 | 5,76 | 8,57 | 5,93 | 11,67 | 6,06 | 15,3 | 6,18 | 19,76 | 6,29 |
| | ± ET | ± 0,38 | ± 0,04 | ± 0,472 | ± 0,03 | ± 1,26 | ± 0,06 | ± 1,58 | ± 0,06 | ± 1,907 | ± 0,05 | ± 3,781 | ± 0,08 |
| Baath (a') | M | 1,93 | 5,28 | 2,1 | 5,32 | 2,77 | 5,47 | 4,03 | 5,60 | 6,133 | 5,78 | 7,433 | 5,86 |
| | ± ET | ± 0,40 | ± 0,09 | ± 0,36 | ± 0,07 | ± 0,65 | ± 0,16 | ± 0,91 | ± 0,10 | ± 0,986 | ± 0,07 | ± 1,457 | ± 0,09 |

L10 : Logarithme décimal, Valeurs en moyenne ± écart type (M ± E.t).

C : Concentration en nombre x 10⁵ spores /ml. (a),(b), (c) et (a'),(b') : ensembles homogènes pour les facteurs milieu de culture et teneur en activité de l'eau.

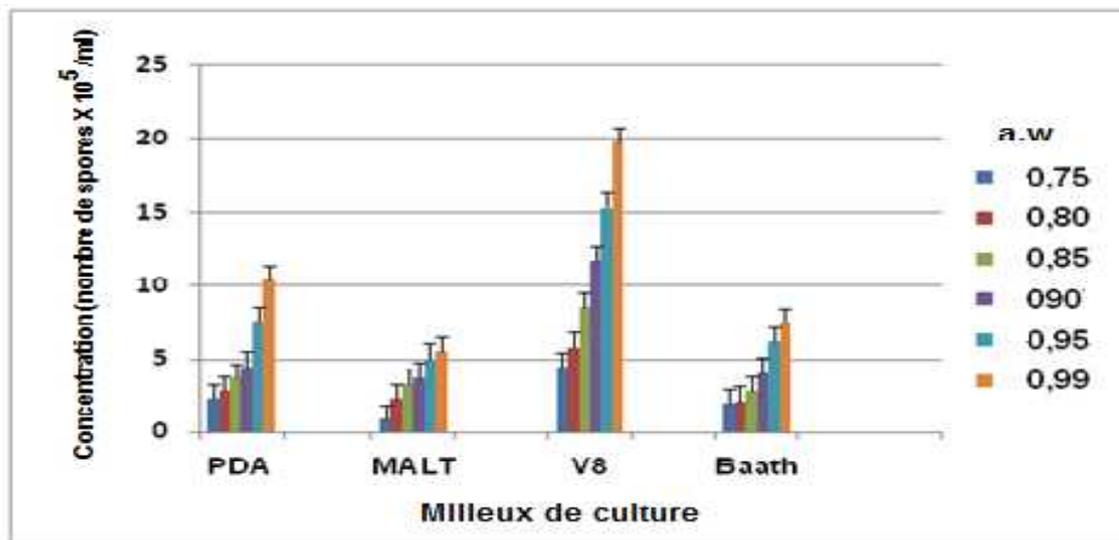


Figure 4.18 : Variations de la concentration de spores de *M. anisopliae* en fonction des milieux de culture et aux différentes teneurs en activité de l'eau (a.w)

Sur le milieu PDA, l'optimum de sporulation est enregistré avec une a.w de 0,99 ($1,04 \times 10^6 \pm 1,32$ spores /ml) et le minimum ($2,27 \times 10^5 \pm 0,25$ spores /ml) est noté pour une a.w. de 0,75. En effet, pour une activité de 0,99, nous avons obtenu la meilleure concentration en spores sur le milieu V8 qui s'évalue à $1,976 \times 10^6 \pm 3,78$ spores /ml. Cette concentration diminue progressivement jusqu'à

l'obtention de la plus faible valeur, avec la plus faible a.w (0,75), enregistrée sur le milieu MALT ($8,5 \times 10^4$ spores /ml).

Nous avons soumis nos résultats à une analyse de la variance à deux critères de classification : le facteur milieu de culture à quatre niveaux et le facteur activité de l'eau à six niveaux de classification. Les résultats de cette analyse, décrits sur le tableau 25 (annexe 2), révèle que les teneurs en activité de l'eau et milieu de culture influencent significativement sur la sporulation ($p < 0,01$). Ceci est confirmé par les tests de Tukey (Tableaux 26 et 27 de l'annexe 2).

Nous avons procédé au test de GLM dont les résultats sont mentionnés sur le tableau 4.16 et la figure 4.20.

Tableau 4.16: Modèle GLM appliqué sur le logarithme concentration en spores selon les facteurs teneurs en activité de l'eau et milieu de culture

| Source | Sommes des carrés | d.d.l | Moyennes des carrés | F | Sig. |
|------------------------|--------------------|-------|---------------------|------------|------|
| Model corrigé | 6,804 ^a | 23 | ,296 | 55,507 | ,000 |
| Intercept | 2307,605 | 1 | 2307,605 | 432982,588 | ,000 |
| Activité d'eau (aw) | 3,858 | 5 | ,772 | 144,775 | ,000 |
| Milieu de culture | 2,716 | 3 | ,905 | 169,859 | ,000 |
| aw * Milieu de culture | ,230 | 15 | ,015 | 2,881 | ,003 |
| Erreur | ,256 | 48 | ,005 | | |
| Total | 2314,665 | 72 | | | |
| Total corrigé | 7,060 | 71 | | | |

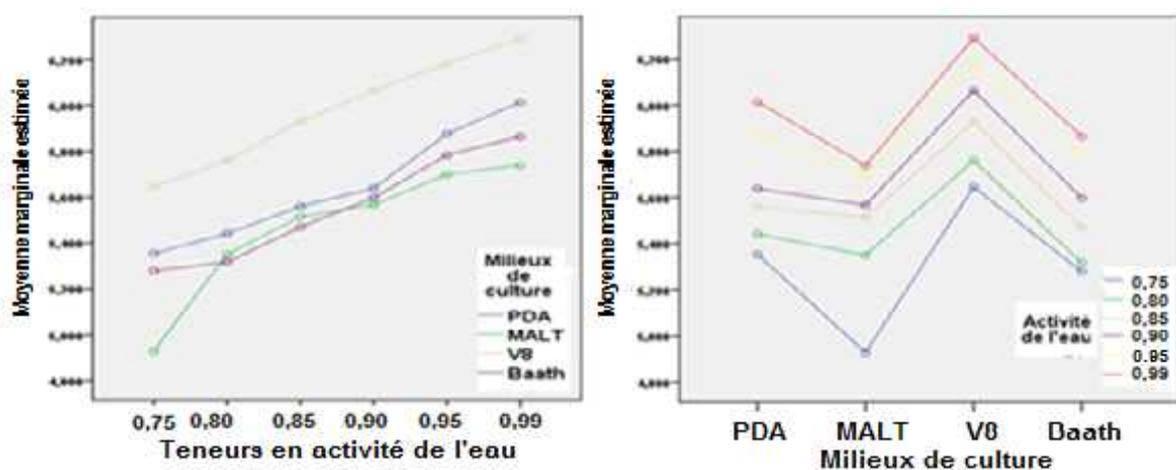


Figure 4.19: Variations de la concentration de spores de *M. anisopliae* en fonction des facteurs milieu de culture et teneurs en activités de l'eau (Modèle GLM).

L'analyse du test des effets entre les facteurs étudiés (GLM) montre que la sporulation de notre souche est significativement influencée par les deux facteurs le milieu de culture et l'activité de l'eau étudiés seul ou en interaction ($p < 0,05$).

Cependant l'importance de la fructification du champignon est sous l'influence de la composition du substrat nutritif comme deuxième facteur en plus de l'humidité. En effet, pour les milieux, PDA, MALT et Baath, le taux de germination des conidies de *M. anisopliae* est pratiquement semblable pour une activité d'eau donnée et suit une progression linéaire avec l'augmentation des teneurs de l'a.w. Nos résultats suggèrent que le milieu V8 semble offrir les meilleures conditions à notre champignon pour la germination des spores à différentes teneurs en a.w comparativement au MALT, Baath et au PDA dont l'action est très proche.

4.3.3. Discussion

Que le milieu soit riche en éléments minéraux (V8 et Baath) ou organiques (PDA, V8 et MALT), *Metarhizium anisopliae* s'est adapté aux différentes substances nutritives et températures testés. Cette adaptation est due essentiellement à la présence d'un complexe enzymatiques important de protéase, amylase, glucose isomérase, hydroxylase, oxydoréductase, transférase et maltase, pour dégrader le substrat cultural [168]. La croissance mycélienne a été meilleure sur le milieu PDA incubé à la température 24°C. La plus faible croissance est notée sur le milieu MALT à 38°C et offre ainsi la plus longue période de latence pour notre souche. L'achèvement de la croissance a été plus rapide à 28°C sur les milieux PDA et V8. Sur ces deux milieux la croissance est maximale après 15 jours d'incubation à 24°C. En effet, quel que soit l'apport en éléments organiques sucre, carbone, azote et acides aminés, nous avons obtenus une bonne croissance. Nous remarquons que cette croissance est retardée d'une durée d'un à trois jours ce qui est confirmé par l'analyse de variance pour les facteurs étudiés et leurs interactions. D'après HADJ RABIA- HADDADJ, [2], la température et le milieu de culture influencent le développement de *B. bassiana* et *M. anisopliae*. Ce dernier évolue aux températures qui se situent entre 25°C et 35°C, avec un optimum à 35°C après seulement 5 jours d'incubation sur le milieu PDA suivis du Sabouraud et enfin le milieu MALT après 8 jours. A 30°C et à 25°C, c'est sur le milieu Sabouraud que *M. anisopliae* achèvera la croissance après 6 jours suivis du MALT après 8 et 9 jours et enfin PDA après 10 et 11 jours

respectivement. A 20°C la meilleure croissance n'est obtenue qu'après 12 jours sur le PDA et après 15 jours sur Sabouraud et MALT. Selon le même auteur, la meilleure croissance mycélienne de *B. bassiana* est obtenue après 7 jours d'incubation à 20°C sur le milieu PDA et après 9 jours sur Sabouraud et MALT. A 25°C et 30°C l'optimum de croissance survient au 9e jour sur le PDA et au 10e jour sur les deux autres milieux avec un retard d'un jour sur le Sabouraud à 30°C. Par contre à 35°C, *B. bassiana* présente une croissance plus lente et atteint son maximum au 14e jour d'incubation sur le PDA et au 15e jour sur Sabouraud et MALT. Ces résultats sont comparables avec ceux de HALOUANE, [167] - [168] qui a conclu que *B. bassiana* s'est très bien développée quel que soit le milieu riche en éléments organiques ou minéraux. BADJI, [209] a enregistré une croissance radiale de *M. anisopliae* var. *acridium* 4 fois plus rapide sous 28°C que sous 35°C au bout de 12 jours d'incubation. D'après KARA-TOUMI, [211], le comportement de *M. anisopliae* et *M. flavoviride* est influencé par la température et le milieu de culture. *Metarhizium anisopliae* manifeste une faible préférence pour le milieu PDA et Sabouraud. Pour *M. flavoviride* une préférence pour le milieu DCLS est notée. D'après le même auteur, l'apparition des premières colonies de *M. anisopliae* sur le milieu PDA commence le premier jour, cependant sur OGA et Sabouraud, elles débutent le 3e jour. L'achèvement de la croissance mycélienne est plus rapide sur OGA que sur PDA et Sabouraud. La croissance diamétrale du mycélium de *M. flavoviride* est maximale et rapide sur milieu DCLS. Les espèces de certain genre de champignons entomopathogènes: *Beauveria sp* et *Metarhizium sp* présentent un large éventail thermique. Elles peuvent germer et croître à des hautes et basses températures (entre 4°C et 45°C) [212], [213]. Pour certains champignons entomopathogènes, les températures élevées accélèrent le développement mycélien [41], [2]. Il existe toutefois des isolats de champignons qui sont adaptés aux conditions environnementales [94]. HALOUANE, [168] a enregistré un maximum de développement de *B. bassiana* entre 15°C et 30°C avec un pic à 25°C. Cette espèce présente un très bon développement sur des milieux de cultures de composition diversifiée grâce à son complexe enzymatique.

Nous avons constaté un accroissement pondéral progressif de notre souche fongique qui s'est acclimatée aux différents milieux et températures mais à des degrés variables durant le temps d'incubation. *Metarhizium anisopliae* cultivé sur le milieu PDA présente le meilleur poids le 15e jour avec la température 38°C,

suivis du milieu V8 et puis le MALT. Cependant à 18°C le plus faible poids est obtenu sur MALT. Les valeurs absolues du poids frais de la masse fongique traduisent la quantité de spores produites et le poids du milieu de culture bouffée et dégradé par le champignon par rapport au poids initial. Ce dernier est noté le premier jour de l'insertion de l'explantât fongique dans les différents milieux de culture. Les poids frais enregistrés pour les trois milieux incubés à différentes températures ont progressivement régressés dans le temps par rapport aux poids initiaux. Cette régression est plus faible avec 18°C, Alors qu'avec 38°C, elle est plus importante, ce qui est probablement due à la diminution du taux d'humidité provoquée par la forte température qui cause l'évaporation et la sécheresse rapide du milieu de culture et la chute de poids frais.

D'après HADJ RABIA-HADDADJ, [2], Chez *M. anisopliae*, les meilleurs poids sont enregistrés à 25 et 30°C sur MALT suivis de 35°C où le poids atteint son maximum sur Sabouraud. Enfin, le poids le plus faible est enregistré à 20°C. Selon le même auteur et chez *B. bassiana*, le meilleur poids frais est enregistré à 25°C d'abord sur le PDA suivi du Sabouraud et enfin le milieu MALT. A 30°C la plus importante croissance pondérale est notée sur le milieu Sabouraud suivi de MALT et PDA et par la suite se classe la température 20°C et puis 35°C. Des résultats similaires sont notés par HADDADJ, [214] qui a obtenue un meilleure poids de *B. bassiana* à 25 °C quelques soit le milieu de culture. La température optimale pour la majorité des hyphomycètes se situe entre 20°C et 25°C, mais l'infection et la maladie des insectes peuvent avoir lieu entre 15 et 30°C [110].

La production des spores à partir de nos cultures âgées de 15 jours a été très importante pour tous les cas étudiés. La sporulation a été maximale à 28°C sur PDA suivis du milieu V8. En dessous de 24°C, nous assistons à une réduction de la germination du mycélium et du nombre de spores. Nos résultats vont dans le même sens avec ceux de KARA-TOUMI, [211], la température affecte la sporulation de *M. anisopliae* et de *M. flavoviride* après 15 jours d'incubation, les meilleures sporulations sont enregistrées à 32°C sur PDA et sur DCLS pour les deux entomopathogènes respectivement. Selon Vidal et al. [215], la composition du milieu de culture influence la production des spores. La richesse du milieu en hydrate de carbone et en azote, permet un bon développement des champignons entomopathogènes. La déficience en ces éléments déclenche une perturbation de la physiologie du champignon. En générale ces éléments peuvent être facilement

assimilés par la plupart des champignons et permettent de limiter la prolifération des envahisseurs indésirables [216]. SCALAN et *al.* [217], ont mentionné que la durée de développement de l'entomopathogène *Metarhizium anisopliae* sur les larves de *Locusta migratoria* était de 6 jours à 35°C et de 21 jours à 20°C. A 35°C presque 100% de spores de *M. anisopliae* ont germé après 24 heures d'incubation suivis des températures 20 et 25°C qui montrent 100% de germination après 48h et après 72h avec 20°C [2].

L'activité de l'eau est un facteur critique déterminant la durée de vie des produits naturels et est indispensable à toute vie microbienne. C'est l'activité de l'eau, et non la teneur en eau, qui détermine la limite minimale d'eau disponible pour la croissance microbienne. L'activité de l'eau ou a.w est approximativement l'inverse de l'humidité relative [168].

Nos résultats suggèrent que l'humidité relative du milieu exprimée en activité d'eau est aussi un facteur limitant qui influence significativement la fructification de *M. anisopliae*. En effet qu'il s'agisse de faible ou de fortes activités d'eau le comportement de champignon diffère. Il manifeste un développement maximal pour la forte activité (0,99 aw) et un développement minimal avec la faible activité d'eau (0,75 aw) et ce quelque soit le milieu de culture testé. Cependant l'optimum est noté pour le milieu V8. La production de spores sur le milieu Baath est plus au moins importante que celle enregistrée sur le milieu MALT. Ce qui est probablement lié à la richesse du milieu Baath en éléments minéraux (présence de CuSO_4) indispensables pour une meilleure sporulation de *M. anisopliae* par rapport au milieu MALT. A cet effet l'interaction entre les deux facteurs (Activité d'eau - milieu de culture, $p < 0,05$) agit significativement sur la sporulation. Des résultats similaires sont notés par plusieurs auteurs [168] et [211]. HALLSWORTH et MAGAN, [218], par leurs études sur trois entomopathogènes *B. bassiana*, *M. anisopliae* et *Paecilomyces fumosoroseus* ont trouvé que la production des spores s'accroît progressivement avec l'accroissement des teneurs en activité de l'eau et que chacune des trois espèces présente une gamme semblable d'activité de l'eau (0,90- 0,99) et un optimum de croissance à 0,99 pour *M. anisopliae* et *P. fumosoroseus* et de 0,998 pour *B. bassiana*.

4.4. Evaluation de l'efficacité de l'imidaclopride sur les larves *D. maroccanus* dans les conditions de laboratoire

A travers cet essai, l'effet de l'imidaclopride (MIDA®) est évalué chez les larves de criquet marocain (L3, L4 et L5) à un seuil de toxicité sublétal. A savoir, les micro-doses choisies, D1 = 50 µl, D2 = 100 µl et D3 = 200 µl de l'insecticide diluée chacune dans 100 ml d'eau distillé, n'ont pas d'effet Knock-Down.

4.4.1. Effet sur la mortalité des larves

Les résultats relatifs aux taux de mortalité chez les larves de 3e ,4e et 5e stade de *Dociostaurus maroccanus* traitées avec l'imidaclopride sont portés sur le tableau 28 de l'annexe 2 et illustrés sur la figure 4.20.

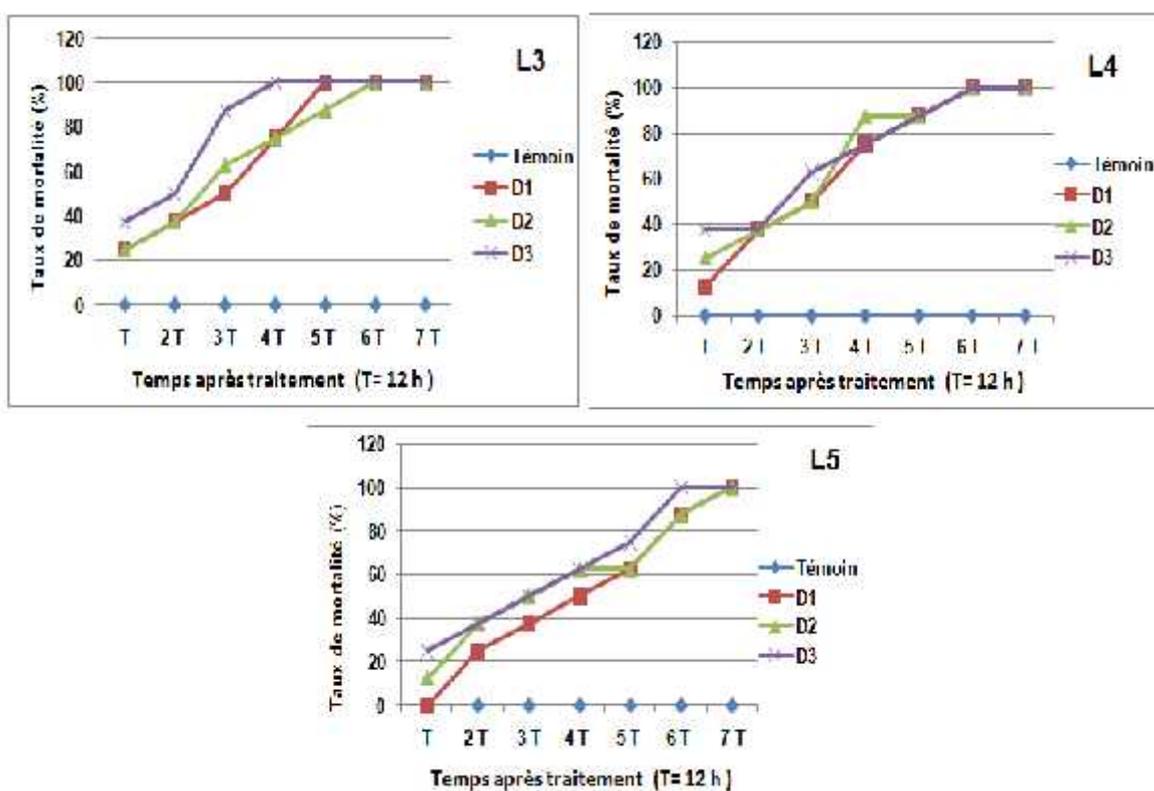


Figure 4.20 : Variations des taux de mortalité des larves L3, L4 et L5 de *D. maroccanus* traitées avec l'imidaclopride. D1 = 50 µl; D2 = 100 µl; D3 = 200 µl.

Les mortalités larvaires ont commencé dès les premières 12h après traitements par l'imidaclopride chez toutes les larves à l'exception des L5 traitées avec D1, dont les premiers individus morts sont observés le lendemain avec un taux de 25%. La mortalité totale des L3 traitées avec D3 est notée le 2e jour après traitement. Cependant, quelques variations individuelles sont observées. 100% de

mortalité est obtenue après 60h et 72h chez les L3 traitées avec D1 et D2 respectivement, Chez les L5 traitées avec D3 et chez les L4, la mortalité totale est obtenue après 72h. Cependant avec D1 et D2 La mortalité totale des L5 est retardée jusqu'à 84h après traitement. Chez les larves témoins, nous avons enregistré un taux de mortalité nul.

L'analyse de la variance (Tableau 29 de l'annexe 2) à 3 critères de classification

-) Facteur 1 : la dose avec 4 niveaux :(3 doses de traitement et le témoin).
-) Facteur 2 : le stade larvaire avec 3 niveaux L3, L4, L5.
-) Facteur 3 : le temps avec 7 niveaux de temps après traitement.

Les résultats révèlent que le stade larvaire a un effet non significatif sur les mortalités ($p > 0,05$). Les facteurs dose et temps après traitement influencent d'une manière hautement significative sur l'efficacité des traitements avec l'imidaclopride ($p < 0,01$). Les groupes non significativement différents des facteurs étudiés sont définis par les tests de Tukey (Tableaux 30 et 31 de l'annexe 2)

Tableau 4.17 : Modèle G.L.M appliqué sur les mortalités chez *D. maroccanus* traitées avec *Metarhizium* selon les facteurs dose, temps et stade.

| Source | Sommes des carrées | ddl | Moyennes des carrées | F | Sig. |
|----------------------|-------------------------|-----|----------------------|---------|------|
| Model corrigé | 257420,945 ^a | 83 | 3101,457 | 62,919 | ,000 |
| Intercept | 436407,180 | 1 | 436407,180 | 8853,30 | ,000 |
| Dose | 148328,683 | 3 | 49442,894 | 1003,03 | ,000 |
| Stade larvaire | 4488,467 | 2 | 2244,234 | 45,528 | ,082 |
| Temps | 72739,955 | 6 | 12123,326 | 245,943 | ,000 |
| Dose * Stade | 1635,045 | 6 | 272,507 | 5,528 | ,000 |
| Dose * Temps | 25675,223 | 18 | 1426,401 | 28,937 | ,000 |
| Stade * Temps | 2165,179 | 12 | 180,432 | 3,660 | ,000 |
| Dose * Stade * Temps | 2388,393 | 36 | 66,344 | 1,346 | ,134 |
| Erreur | 4140,625 | 84 | 49,293 | | |
| Total | 697968,750 | 168 | | | |
| Total corrigé | 261561,570 | 167 | | | |

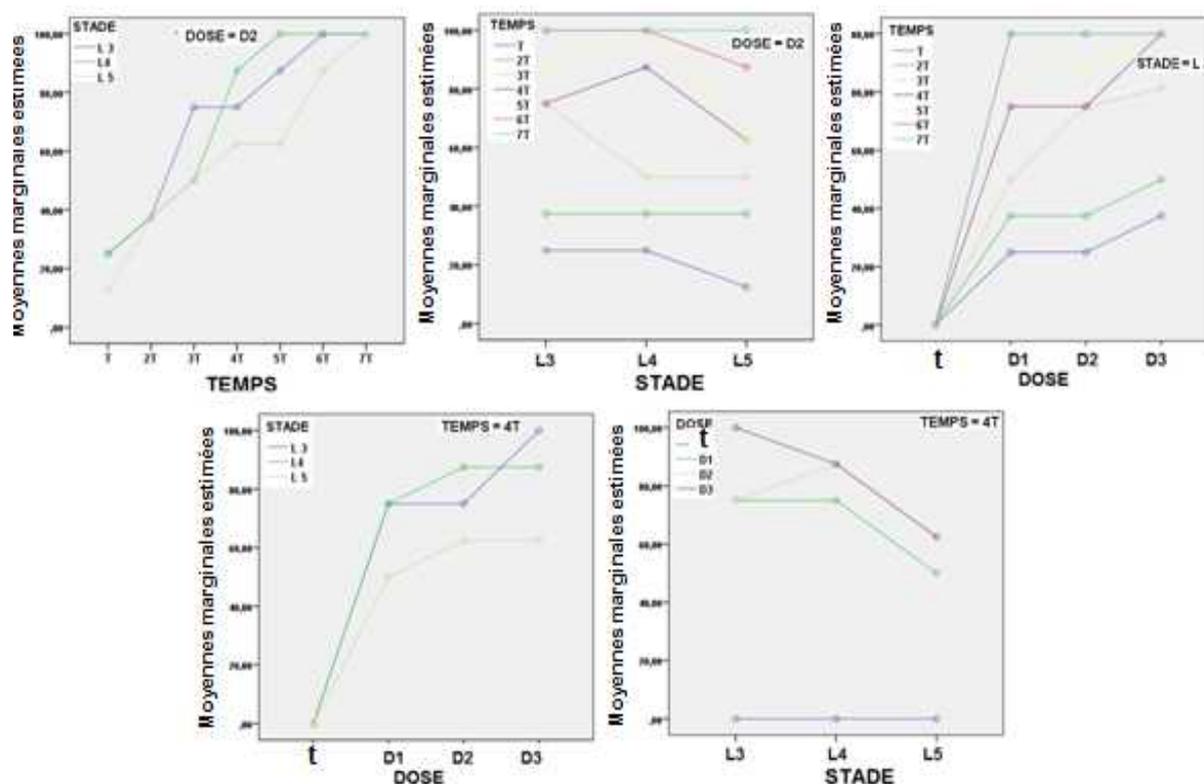


Figure 4.21: Effet de l'imidaclopride sur la mortalité chez *D. maroccanus* en fonction des facteurs dose, temps et stade larvaire (Modèle G.L.M).

T : 12h, t : témoin, D1 = 50 μ l; D2 = 100 μ l; D3 = 200 μ l.

Nous avons procédé au test G.L.M. appliqué sur la mortalité des larves traitées avec l'imidaclopride (Tableau 4.17 et figure 4.21). Les résultats obtenus montrent que la dose appliquée et le temps après traitement influencent significativement sur l'efficacité de l'insecticide ($p < 0,05$), Il en est de même pour leur interaction par paire. Cependant la combinaison des trois facteurs montre une différence non significative ($P > 0,05$) sur la mortalité des larves.

4.4.2. Calcul de TL50

Nous avons déterminé les TL50 (temps léthal au bout duquel on obtient 50 % de mortalité de la population traitée) relatifs à chaque dose et chaque stade larvaire. Pour ce faire, nous avons transformé les taux de mortalité en probits, et les temps après traitement en logarithme décimaux (Tableaux 4.18).

Nous remarquons que l'intoxication des larves de différents stades croit avec l'accroissement de la dose appliquée et que le stade larvaire avancé résiste plus aux faibles doses de l'imidaclopride et les mortalités surviennent plus tardivement.

Tableau 4.18: Logarithmes décimaux des temps et probits des taux de mortalité cumulée chez les L3, L4 et L5 traitées avec l'imidaclopride.

| Stade larvaire | Temps | Log temps | D1 = 50 µl Log (D1)=1,70 | | D2 = 100 µl Log (D2) = 2 | | D3 =200 µl Log (D3)=2,3 | |
|----------------|-------|-----------|-----------------------------|---------|-----------------------------|---------|----------------------------|---------|
| | | | M % | Probits | M % | Probits | M % | Probits |
| L3 | T | 1,079 | 25 | 4,33 | 25 | 4,33 | 37,5 | 4,67 |
| | 2T | 1,38 | 37,5 | 4,67 | 37,5 | 4,67 | 50 | 5 |
| | 3T | 1,556 | 50 | 5 | 62,5 | 5,31 | 87,5 | 6,13 |
| | 4T | 1,681 | 75 | 5,67 | 75 | 5,67 | 100 | 8,9 |
| | 5T | 1,778 | 100 | 8,9 | 87,5 | 6,13 | 100 | 8,9 |
| | 6T | 1,857 | 100 | 8,9 | 100 | 8,9 | 100 | 8,9 |
| | 7T | 1,924 | 100 | 8,9 | 100 | 8,9 | 100 | 8,9 |
| L4 | T | 1,079 | 12,5 | 3,82 | 25 | 4,33 | 37,5 | 4,67 |
| | 2T | 1,38 | 37,5 | 4,67 | 37,5 | 4,67 | 37,5 | 4,67 |
| | 3T | 1,556 | 50 | 5 | 50 | 5 | 62,5 | 5,31 |
| | 4T | 1,681 | 75 | 5,67 | 87,5 | 6,13 | 75 | 5,67 |
| | 5T | 1,778 | 87,5 | 6,13 | 87,5 | 3,82 | 87,5 | 6,13 |
| | 6T | 1,857 | 100 | 8,9 | 100 | 4,67 | 100 | 8,9 |
| | 7T | 1,924 | 100 | 8,9 | 100 | 5,31 | 100 | 8,9 |
| L5 | T | 1,079 | 00 | 00 | 12,5 | 3,82 | 25 | 4,33 |
| | 2T | 1,38 | 25 | 4,33 | 37,5 | 4,67 | 37,5 | 4,67 |
| | 3T | 1,556 | 37,5 | 4,67 | 50 | 05 | 50 | 05 |
| | 4T | 1,681 | 50 | 05 | 62,5 | 5,31 | 62,5 | 5,31 |
| | 5T | 1,778 | 62,5 | 5,31 | 62,5 | 5,31 | 75 | 5,67 |
| | 6T | 1,857 | 87,5 | 6,13 | 87,5 | 6,13 | 100 | 8,9 |
| | 7T | 1,924 | 100 | 8,9 | 100 | 8,9 | 100 | 8,9 |

M : taux de mortalité cumulée, T= 12 heures après traitement avec l'imidaclopride, Log : Logarithme décimal

A partir des équations des droites de régression mentionnées sur la figure 4.22, nous avons calculé les valeurs des TL 50 (le tableau 4.19).

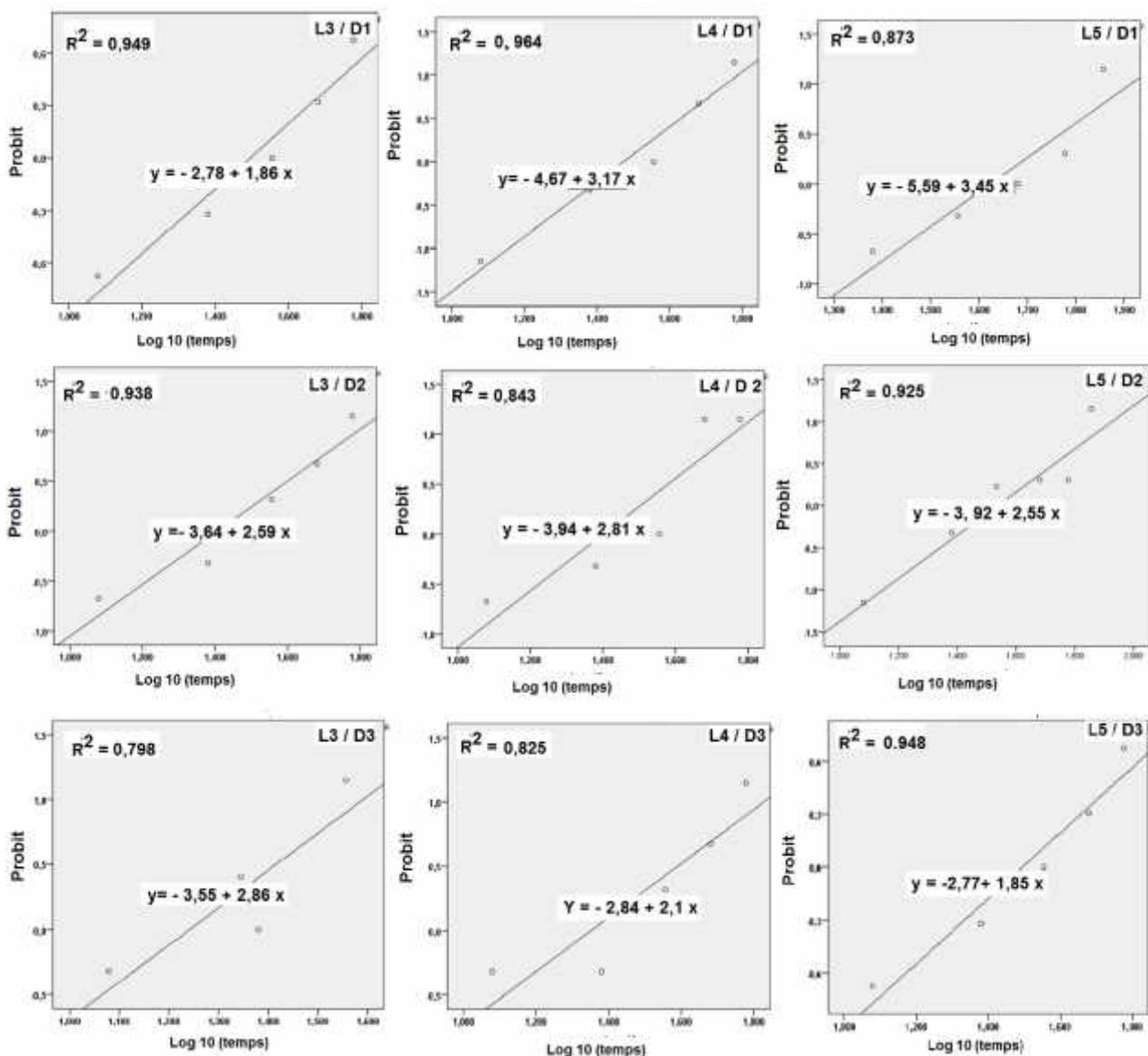


Figure 4.22: Droites de régression exprimant les probits des taux de mortalité des L3, L4 et L5 de *D. maroccanus* traitées avec l'imidaclopride en fonction des logarithmes du temps. (D1= 50 μ l, D2= 100 μ l, D3= 200 μ l)

Les temps létaux calculés varient d'une concentration à une autre. Les temps les plus élevés : 1jr et 17,3 h sont obtenues chez les L5 en appliquant la plus faible dose D1 ; Alors que les temps les plus courts sont enregistrés chez les L3 pour la plus forte concentration D3 : 1 jr et 5,8 h. D'après la figure 4.22, les valeurs du coefficient de corrélation R sont proches de 1 ($0 < R < 1$). La corrélation est dite positive [220], les taux de mortalité et le temps après traitement avec l'insecticide varient dans le même sens.

Tableau 4.19: Les valeurs des TL50 chez les larves L3, L4 et L5 de criquet marocain traitées avec l'imidaclopride à différentes doses.

| DOSE | TL50 (en jour et heures) | | |
|--------------------|--------------------------|----------------|----------------|
| | L3 | L4 | L5 |
| D1 = 50 µl | 1 jr et 10,8 h | 1jr et 11,11 h | 1 jr et 17,3h |
| D2 = 100 µl | 1 jr et 9,6 h | 1jr et 9,67 h | 1jr et 12,55 h |
| D3 = 200 µl | 1 jr et 5,8h | 1jr et 8,4 h | 1jr et 10,82 h |

4.4.3. Calcul de DL50 et de DL90

Nous avons déterminé les doses létales 50 ou DL50 concernant les L3, L4 et L5 traitées avec l'imidaclopride. Pour cela, nous avons tracé les droites de régression avec leurs équations exprimant les probits des pourcentages de mortalité en fonction des logarithmes décimaux des doses (Figure 4.23)

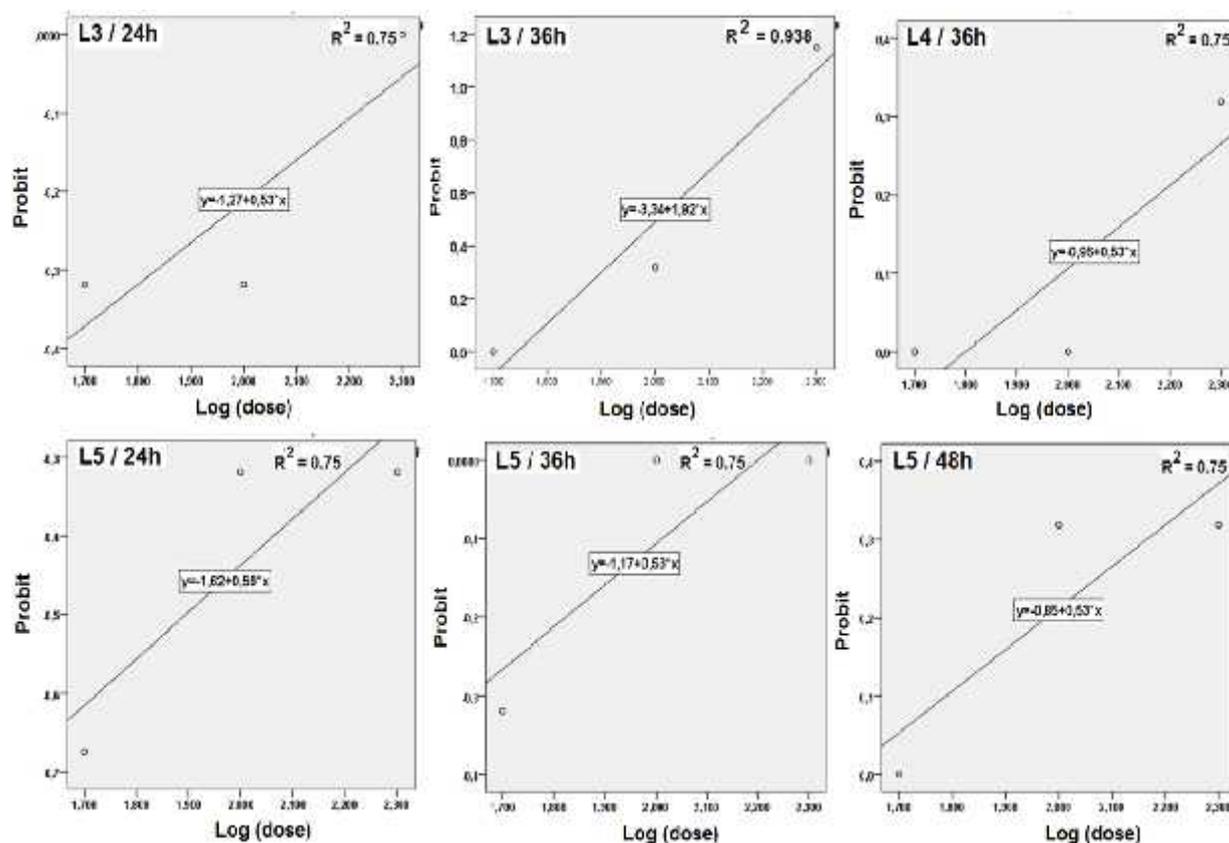


Figure 4.23: Droites de régression exprimant les probits des taux de mortalité des larves traitées avec l'imidaclopride en fonction des logarithmes des doses

La figure ci-dessus montre l'existence d'une liaison étroite entre les différentes concentrations et les taux de mortalité. 3Nous remarquons que les

valeurs de R^2 (coefficient de corrélation) sont toutes comprises entre 0 et 1 ($0 < R < 1$) ce qui signifie que la mortalité larvaire et les doses appliquées de l'imidaclopride sont fortement corrélés [220].

Tableau 4.20: Les valeurs des DL50 et DL90 (en μl) chez les larves L3, L4 et L5 de criquet marocain traitées avec l'imidaclopride. T=12h

| Temps après traitement | DL50 | | | DL90 | | |
|------------------------|--------|------|--------|----------|--------|----------|
| | L3 | L4 | L5 | L3 | L4 | L5 |
| 2T (24h) | 249,46 | NS | 562,34 | 63565,28 | NS | 92870,34 |
| 3T (36h) | 55,08 | 63,1 | 158,49 | 221,52 | 240,30 | 43220,87 |
| 4T (48h) | 28,23 | 6,53 | 40,09 | 125,97 | 225,36 | 10163,56 |
| 5T (60h) | / | / | 17,78 | / | / | 2904,444 |

Selon le tableau ci-dessus, nous avons remarqué que les valeurs des DL50 et des DL90 varient en fonction des stades larvaires des criquets marocains. 48h après traitement, la valeur de la DL50 la plus petite est enregistrée chez les L3 à 28,23 μl et la valeur de la DL50 la plus grande est enregistrée chez les L5 à 40,09 μl . Les valeurs de DL50 et DL 90 diminuent en fonction du temps.

4.4.4. Discussion

Nous avons évalué l'effet insecticide de l'imidaclopride sur les L3, L4 et L5 de criquet marocain. Nos résultats statistiques suggèrent que les mortalités larvaires sont significativement influencées par le temps et la dose appliquée. Vu les faibles taux de mortalité enregistrés toutes les 12 heures, il apparaît que le choix des doses sublétales est correct. A savoir, les formulations de traitement appliquées par contact (une seule pulvérisation) n'ont pas induit un effet Knock-down, mais causent, probablement, des effets délétères au niveau comportemental, physiologique ou biochimique avant la mort des insectes.

Dans notre recherche, la DL50 de l'imidaclopride pour les larves de *D. maroccanus* est inconnue, pour cela, il a fallu la déterminer en fonction de temps après traitement pour les différents stades larvaire. Nous avons remarqué que les valeurs de DL50 et de TL50 obtenues augmentent avec l'avancement de l'âge des individus. Cependant avec l'augmentation de la concentration de l'inoculum de traitement, les valeurs des TL50 diminuent. Des remarques similaires sont notées par CHAOUCH, [5]. Lors de l'étude de l'effet d'un dérégulateur de croissance, le

Triflumuron, sur les larves de *D. maroccanus*. Les L3 sont plus sensibles par rapport aux autres stades. La D1 (0,34 mol /l), D2 (0,11 mol /l) sont les doses les plus efficace par rapport à la D3 (0,06 mol /l). La mortalité augmente avec le temps. Le calcul des TL50 de Triflumuron a montré que le temps le plus élevé : 6,62 j est obtenu chez les L5 en appliquant la plus faible dose D3, alors que le temps le plus court (2,79 j) est enregistré chez les L2 pour la plus faible dose D1. La DL50 varie en fonction du stade larvaire. La DL50 la plus élevée est enregistrée chez les L5 (0,73 mol /l), alors que la plus faible est notée chez les L2 (0,29 mol/l).

D'après nos résultats, nous avons enregistré chez les L3 et L5 respectivement la DL50 de 24h à 249,46 µl et 562,34 µl et la DL 50 de 48h à 28,23 µl et 40,09 µl. Selon Suchail et al. [31], pour les tests de toxicité aiguë, les abeilles, *Apis mellifera* ont été traitées avec des doses de composés toxiques allant de 1 à 1 000 ng / abeille (10 à 10 000 g/kg). Les valeurs de toxicité aiguë (DL50) de l'imidaclopride étaient d'environ 24 ng/abeille à 24h, 60 ng / abeille (600 g / kg) à 48 h et environ 40 ng / abeille (400 g / kg) à 72 et 96 h. TOUDERT-DJOUBER, [221] a examiné les effets des doses sublétales de l'imidaclopride (0,034 ; 0,084 et 0,175 mg par litre de sirop pendant 13 jours) sur la physiologie des abeilles *Apis mellifera intermissa*. Le même auteur, a évalué l'impact de deux doses sublétales (34,3 ng et 343 ng d'imidaclopride par larve). Les abeilles qui ont consommé du sirop avec 0,084 mg/l ou 0,17 mg/l ont produit moins de cire que les témoins. L'imidaclopride aurait à de faibles doses un effet appétitif chez *Apis mellifera* et à l'inverse lorsque la dose en imidaclopride est de 0,175 mg d'imidaclopride /litre, les abeilles consomment moins de sirop ceci pourrait être expliqué par un effet antinutritionnel. La DL50 a été évaluée à 3,43 ng/abeille après 48h.

Nos résultats suggèrent l'excellent effet insecticide de l'imidaclopride sur les larves de *D. maroccanus* qui a prouvé son efficacité à de très faibles doses. De ce fait MIDA® peut être utilisé contre ce ravageur à condition de développer les stratégies de traitement qui visent à réduire les doses recommandées (au moins de moitié) à fin de réduire les effets toxiques de l'imidaclopride sur les espèces non cibles, notamment sur les abeilles.

4.5. Evaluation de l'efficacité de *M. anisopliae* sur les larves *D. maroccanus* dans les conditions de laboratoire

4.5.1. Effet de *M. anisopliae* sur la mortalité des larves

Les résultats concernant l'effet de *M. anisopliae* appliqué par contact sur les larves de criquet marocain de 3^e, 4^e et 5^e stade larvaire sont portés sur le tableau 32 de l'annexe 2 et illustrés sur la figure 4.24

Les résultats relatifs à cet essai montrent une évolution de la mortalité cumulée en fonction de temps, de l'augmentation de la dose de *M. anisopliae* et en fonction de l'avancement du stade larvaire. Les mortalités ont commencé le 4^e jour après traitement chez les larves L3 et L4 par les trois doses testées et chez les L5 traitées avec D3 (25%). 100 % de mortalité est enregistré à J+7 pour les L3 avec les doses D2 et D3. A J+8 nous avons enregistré la mortalité de tous les individus traités à l'exception des L5 traitées avec D1 et D2 dont la mortalité totale est retardée d'un jour. Cependant chez les larves témoins nous n'avons enregistré aucune mortalité jusqu'au 10^e jour avec un taux de 12,5%.

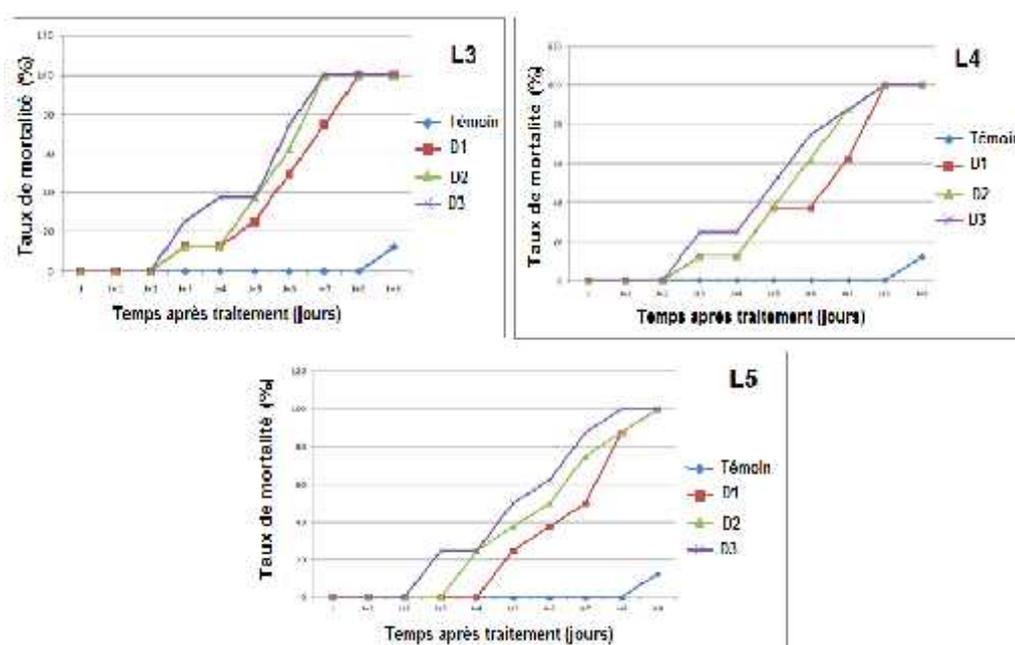


Figure 4.24 : Variations des taux de mortalité des larves L3, L4 et L5 de *D. maroccanus* traitées avec *M. anisopliae*. D1= $1,2 \times 10^3$ spores / ml, D2= $1,2 \times 10^5$ spores / ml, D3 = $1,2 \times 10^7$ spores / ml

Pour évaluer l'efficacité de *Metarhizium*, nous avons fait appel à une analyse de la variance (Tableau 33 de l'annexe 2) à trois critères de classification :

-) Facteur 1 : la dose avec 4 niveaux :(3 doses de traitement et le témoin).
-) Facteur 2 : le stade larvaire avec 3 niveaux L3, L4, L5.
-) Facteur 3 : le temps avec 10 niveaux de jours après traitement.

Les traitements réalisés avec notre champignon ont un effet non significatif pour le facteur stade larvaire ($p > 0,05$). Cependant pour le facteur dose et temps après traitement des différences hautement significatives ($p < 0,01$) sont notées. Ces résultats sont confirmés par les tests de Tukey (Tableaux 34 et 35 de l'annexe2).

Les résultats du tableau 4.21 et figure 4.24 révèlent que l'efficacité du champignon entomopathogène est hautement significativement influencée par la dose appliquée et le temps après traitement ($p < 0, 05$), Il en est de même pour leur interaction. Cependant la combinaison des trois facteurs et des facteurs stade-temps montre des effets non significatifs ($P > 0,05$) sur la mortalité.

Tableau 4.21: Modèle G.L.M appliqué sur les mortalités chez *D. maroccanus* traitées avec *M. anisopliae* selon les facteurs dose, temps et stade

| Source | Sommes des carrées | ddl | Moyennes des carrées | F | Sig. |
|----------------------|-------------------------|-----|----------------------|---------|------|
| Model corrigé | 355985,541 ^a | 119 | 2991,475 | 55,925 | ,000 |
| Intercept | 242220,834 | 1 | 242220,834 | 4528,29 | ,000 |
| Dose | 76019,586 | 3 | 25339,862 | 473,725 | ,000 |
| Stade | 55,575 | 2 | 27,787 | ,519 | ,596 |
| Temps | 209582,301 | 9 | 23286,922 | 435,346 | ,000 |
| Dose * Stade | 1420,892 | 6 | 236,815 | 4,427 | ,000 |
| Dose * Temps | 64137,736 | 27 | 2375,472 | 44,409 | ,000 |
| Stade * Temps | 1414,758 | 18 | 78,598 | 1,469 | ,113 |
| Dose * Stade * Temps | 3354,692 | 54 | 62,124 | 1,161 | ,249 |
| Erreur | 6418,875 | 120 | 53,491 | | |
| Total | 604625,250 | 240 | | | |
| Total corrigé | 362404,416 | 239 | | | |

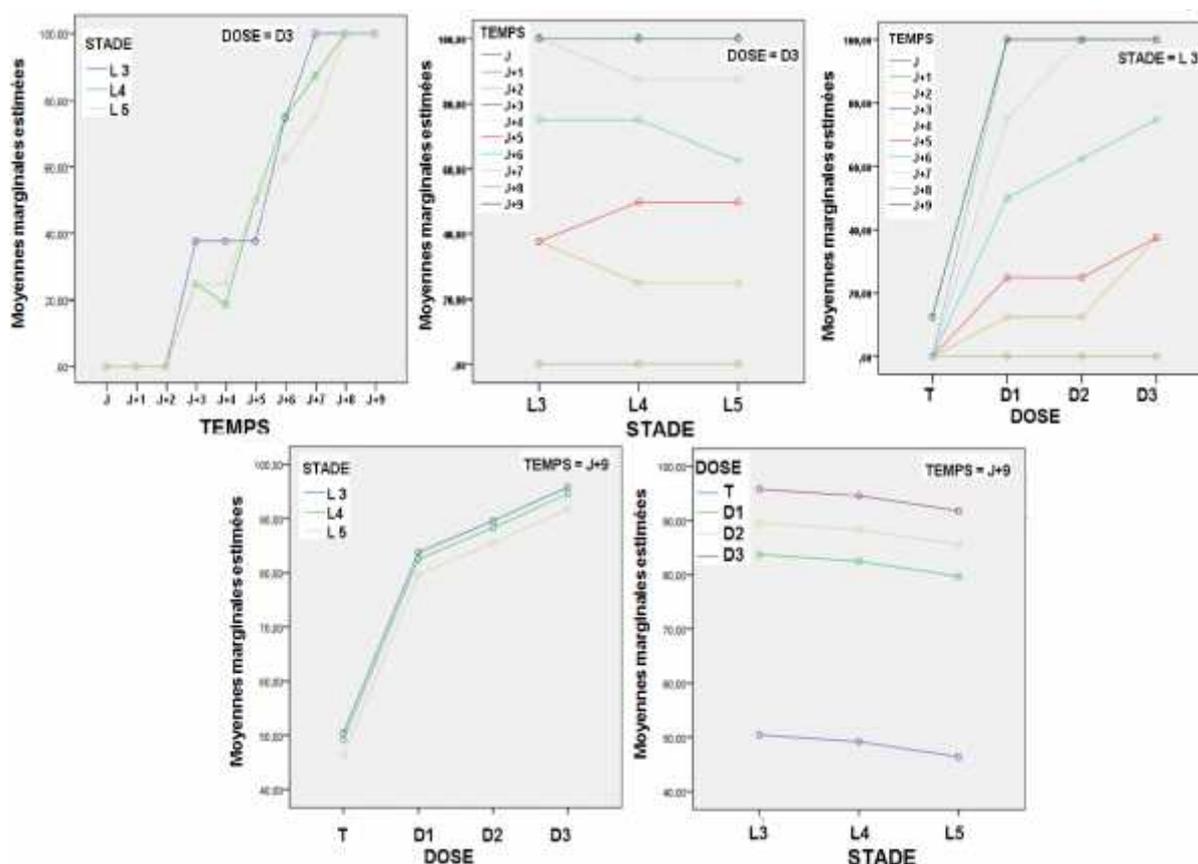


Figure 4.25: Effet de *M. anisopliae* sur la mortalité des larves de *D. maroccanus* en fonction des facteurs, dose, temps et stade (Modèle G.L.M). T : témoin, D1= $1,2 \times 10^3$, D2= $1,2 \times 10^5$, D3 = $1,2 \times 10^7$ spores / ml. J : Jour

4.5.2. Calcul de TL50

Pour calculer le TL₅₀ de *M. anisopliae*, nous avons effectué la transformation probit des pourcentages des mortalités corrigées, et la transformation en logarithme décimaux du temps (Tableau 4.22).

Les résultats des TL₅₀ illustrés sur le tableau 4.23 montrent que la sensibilité des larves du criquet marocain à la mycose au *M. anisopliae*, est fonction du temps et de la concentration de l'inoculum. Les valeurs de TL₅₀ diminuent avec l'augmentation de la dose et augmentent avec l'avancement du stade larvaire.

Tableau 4.22: Logarithmes décimaux des temps et probits des pourcentages de mortalité corrigée (MC) chez les L3, L4 et L5 de *D. maroccanus* .

| Stade | Temps | Log temps | D1 | | D2 | | D3 | |
|-----------|------------|-----------|-------------|---------|-------------|---------|-------------|---------|
| | | | MC % | Probits | MC % | Probits | MC % | Probits |
| L3 | J+2 | 0,30 | 00 | 0 | 00 | 0 | 00 | 0 |
| | J+3 | 0,48 | 12,5 | 3,82 | 12,5 | 3,82 | 37,5 | 4,67 |
| | J+4 | 0,60 | 12,5 | 3,82 | 12,5 | 3,82 | 37,5 | 4,67 |
| | J+5 | 0,70 | 25 | 4,33 | 37,5 | 4,67 | 37,5 | 4,67 |
| | J+6 | 0,78 | 50 | 5 | 62,5 | 5,31 | 75 | 5,67 |
| | J+7 | 0,84 | 75 | 5,67 | 100 | 8,9 | 100 | 8,9 |
| | J+8 | 0,90 | 100 | 8,9 | 100 | 8,9 | 100 | 8,9 |
| | J+9 | 0,95 | 100 | 8,9 | 100 | 8,9 | 100 | 8,9 |
| L4 | J+2 | 0,30 | 00 | 0 | 00 | 0 | 00 | 0 |
| | J+3 | 0,48 | 12,5 | 3,82 | 12,5 | 3,82 | 25 | 4,33 |
| | J+4 | 0,60 | 12,5 | 3,82 | 12,5 | 3,82 | 25 | 4,33 |
| | J+5 | 0,70 | 37,5 | 4,67 | 37,5 | 4,67 | 50 | 5 |
| | J+6 | 0,78 | 37,5 | 4,67 | 62,5 | 5,31 | 75 | 5,67 |
| | J+7 | 0,84 | 62,5 | 5,31 | 87,5 | 6,13 | 87,5 | 6,13 |
| | J+8 | 0,90 | 100 | 8,9 | 100 | 8,9 | 100 | 8,9 |
| | J+9 | 0,95 | 100 | 8,9 | 100 | 8,9 | 100 | 8,9 |
| L5 | J+2 | 0,30 | 00 | 00 | 00 | 0 | 00 | 0 |
| | J+3 | 0,48 | 00 | 00 | 00 | 0 | 25 | 4,33 |
| | J+4 | 0,60 | 00 | 00 | 25 | 4,33 | 25 | 4,33 |
| | J+5 | 0,70 | 25 | 4,33 | 37,5 | 4,67 | 50 | 5 |
| | J+6 | 0,78 | 37,5 | 4,67 | 50 | 5 | 62,5 | 5,31 |
| | J+7 | 0,84 | 50 | 5 | 75 | 5,67 | 87,5 | 6,13 |
| | J+8 | 0,90 | 87,5 | 6,13 | 87,5 | 6,13 | 100 | 8,9 |

MC: Mortalité corrigée, J : le jour de traitement avec *M. anisopliae*, Log : Logarithme décimaux D1= $1,2 \times 10^3$ spores/ ml; D2= $1,2 \times 10^5$ spores/ml; D3= $1,2 \times 10^7$ spores/ ml

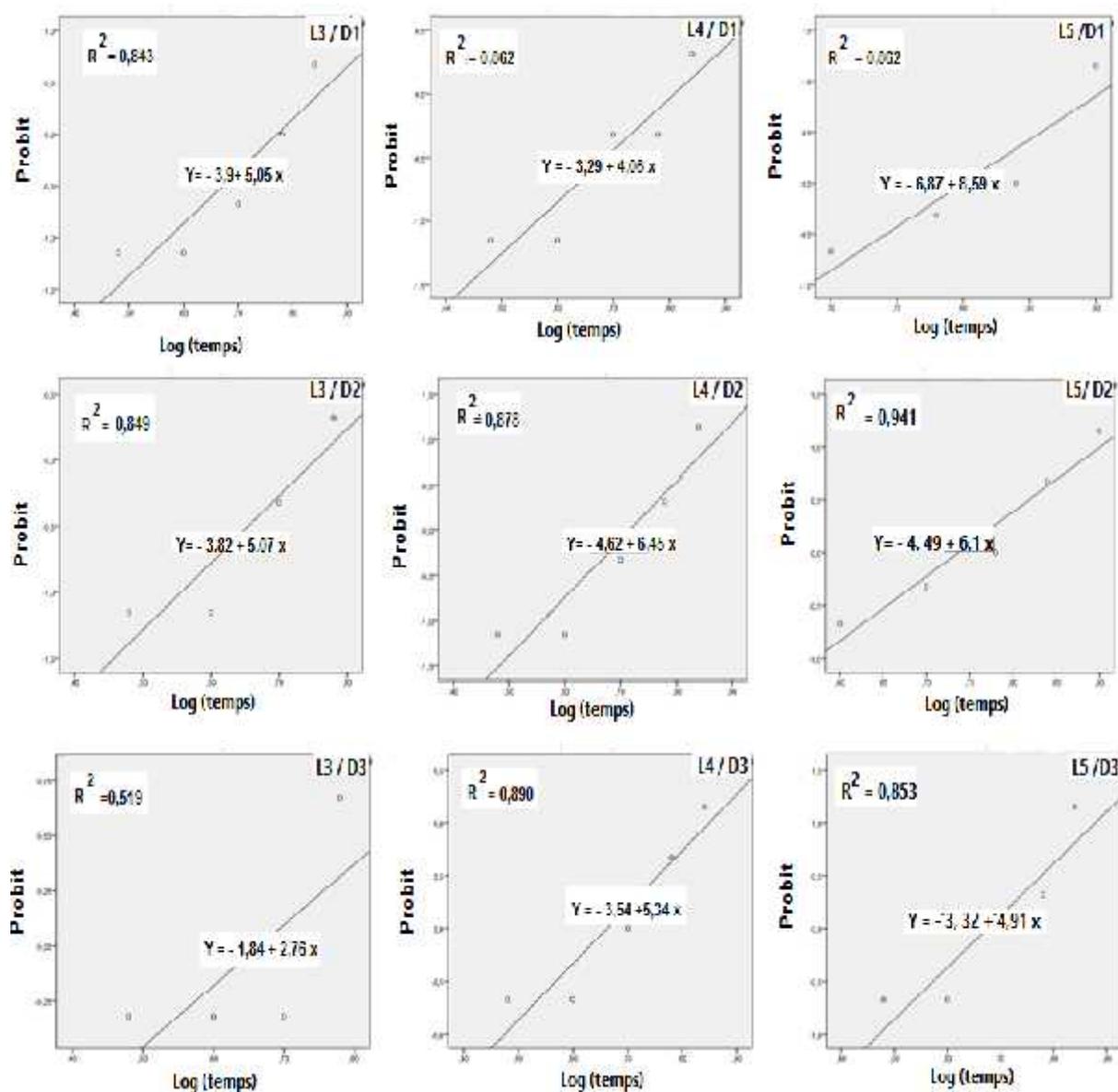


Figure 4.26 : Droites de régression logistique exprimant les probits des taux de mortalité en fonction de Log (temps) chez les larves traitées avec *M. anisopliae*.

D1= $1,2 \times 10^3$, D2= $1,2 \times 10^5$, D3= $1,2 \times 10^7$ spores/ml

Tableau 4.23: Valeurs des TL50 chez les L3, L4 et L5 de *D. maroccanus* traitées avec *M. anisopliae* à différentes doses.

| DOSE | TL50 | | |
|----------------------------------|--------|--------|--------|
| | L3 | L4 | L5 |
| D1= $1,2 \times 10^3$ spores/ ml | 7,27 j | 7,45 j | 8,01 j |
| D3= $1,2 \times 10^5$ spores/ ml | 7 j | 7,08 j | 7,41 j |
| D3= $1,2 \times 10^7$ spores/ ml | 6,32 j | 6,60 j | 6,69 j |

4.5.3. Calcul des DL50 et des DL90

Pour calculer les DL50 de *M. anisopliae*, nous avons effectué la transformation probit des pourcentages des mortalités corrigées, et la transformation en logarithme décimaux des doses (tableau 4.22).

Les tracés des droites de régression exprimant les probits des pourcentages de mortalité corrigée en fonction des logarithmes décimaux des concentrations (Figures 4.27) montrent l'existence d'une liaison étroite entre les différentes concentrations, les stades larvaires et les taux de mortalité. Ce qui est approuvé par le coefficient de corrélation ($0 < R < 1$). La corrélation est dite positive [220]. les taux de mortalité et les doses varient dans le même sens.

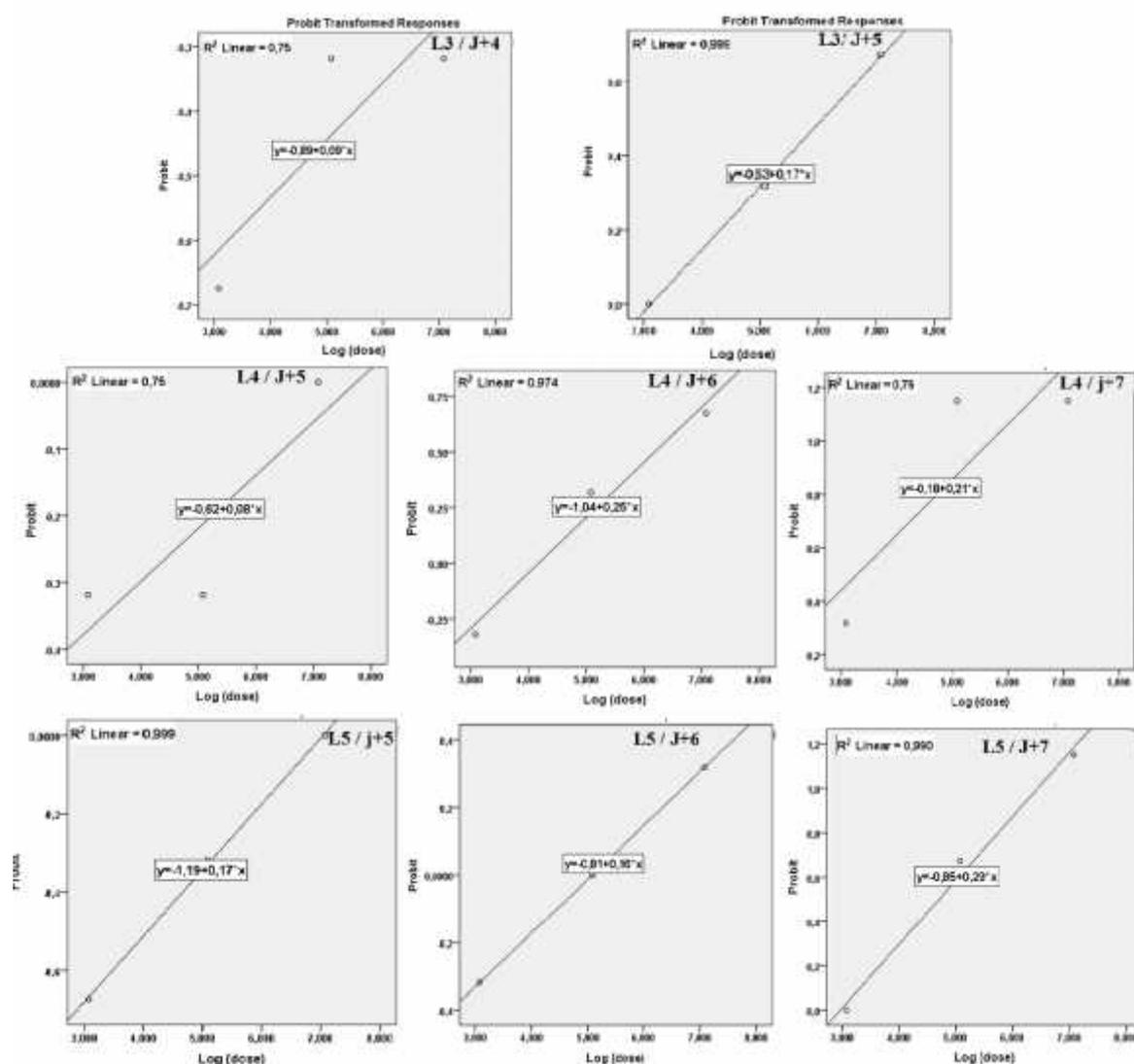


Figure 4.27: Droites de régression logistique exprimant les probits des taux de mortalité chez les L3, L4 et L5 traitées avec *M. anisopliae* en fonction des logarithmes des doses. J :le jour de traitements avec *M. anisopliae*.

Tableau 4.24 : Valeurs des DL50 et DL90 chez les L3, L4 et L5 des criquets marocains traités avec *Metarhizium anisopliae*.

| Temps | DL50 (spores / ml) | | | DL90 (spores /ml) | | |
|-------|----------------------|--------------------|-------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| | L3 | L4 | L5 | L3 | L4 | L5 |
| J+5 | $1,2 \times 10^{10}$ | $5,3 \times 10^7$ | $1,1 \times 10^7$ | $6,2 \times 10^{24}$ | $5,1 \times 10^{23}$ | $4,5 \times 10^{14}$ |
| J+6 | $1,3 \times 10^3$ | $1,5 \times 10^4$ | $1,2 \times 10^5$ | $5,3 \times 10^{10}$ | 2×10^9 | $1,3 \times 10^{13}$ |
| J+7 | $6,3 \times 10^2$ | $1,65 \times 10^1$ | $9,7 \times 10^2$ | $2,1 \times 10^3$ | $8,6 \times 10^6$ | $2,4 \times 10^7$ |
| J+8 | / | / | $8,2 \times 10^2$ | / | / | $1,7 \times 10^4$ |

Le calcul de la DL50 nous a permis de constater que cette dernière varie en fonction des stades larvaires. A j+6, les valeurs des DL50 augmentent avec l'avancement du stade larvaire, la plus élevée est obtenue chez les L5 ($1,2 \times 10^5$ spores/ml). Alors que la DL50 la plus faible est enregistrée chez les L3 ($1,3 \times 10^3$ spores/ml). La même remarque est notée pour le calcul de la DL90. Cependant quelques variations individu-dépendantes qui ne suivent pas cet ordre sont parfois notés. Les valeurs de la DL50 et la DL90 diminuent en fonction de du temps.

4.5.4 Discussion

L'essai de mortalité a montré que les trois doses de *Metarhizium anisopliae* affectent significativement les larves de *D. maroccanus*. Avec D2, nous avons obtenus 100 % de mortalité pour les L3, L4 et L5 respectivement le 7^e, le 8^e et le 9^e jour suivant le traitement avec notre cryptogame. Les résultats du TL50 de *M. anisopliae* montrent que la sensibilité des individus du criquet marocain, est en fonction du stade biologique et de la concentration de l'inoculum. Plus elles sont élevées et d'autant les mortalités le sont et surviennent plus rapidement. Les résultats des DL50 relative à chaque stade suggèrent une évolution temporelle de la mortalité larvaire. Cette évolution croit avec l'avancement du stade larvaire.

Des résultats similaires sont obtenus par CHAOUCH, [5], chez les larves de *D. maroccanus* traitées avec la même souche, le TL50 le plus élevé (4,89 jr) est obtenu chez les L5 traitées avec $12,5 \times 10^3$ spores/ml et le temps le plus court (2,39 jr) est obtenus chez les L2 traitées avec $12,5 \times 10^7$ spores/ml. De même, la DL50 la plus élevée est note chez les L5 ($12,71 \times 10^6$ spores/ml) et la plus faible est note chez les L2 ($12,74 \times 10^2$ spores /ml).

Chez les larves et les ailés de *D. maroccanus* traités avec *B. bassiana* et *M. anisopliae* par deux doses D1 ($4,7 \times 10^4$ spores /ml) et D2 ($4,7 \times 10^5$ spores /ml).

Les larves traitées par les deux champignons, atteignent 100 % de mortalité au 4^{ème} jour après traitement par les 2 doses. Les ailés, enregistrent 100 % de mortalité respectivement au 9^e et 6^e jour pour D1, et au 4^e et 5^e pour D2 [4]. Le même auteur signale qu'avec *B. bassiana*, les larves traitées par la D1 ont un TL50 de 4 jr et 3 h par rapport aux larves traitées par la D2 qui est de 4 jr et 1 h. Les ailés, sont plus résistants que les larves, car la TL50 est de 9 jr et 2 h pour les ailés traités avec D1. Des résultats identiques sont observés chez les criquets traités par *M. anisopliae*, où le TL50 des larves traitées par D1 et D2 est respectivement de 4 jr + 11 h et 4 jr + 4 h. Les ailés, ont un TL50 de 6 jours et 20 heures et 5 jours et 15 heures respectivement pour les doses 1 et 2.

Nos résultats concordent avec ceux obtenus par HADJ-RABIA-HADDADJ [2], les mortalités des individus de *S. gregaria* traités avec *M. anisopliae* à $1,46 \times 10^7$ spores /ml débutent au 2^e et au 3^e jour pour atteindre les 100% au 8^e et 10^e jour respectivement chez les L5 et les imagos. Avec la dose $1,46 \times 10^6$ spores/ml les mortalités ont commencé au 4^e jour chez les deux stades pour atteindre les 100% au 9^e jour chez les L5 et au 10^e jour chez les imagos. A la dose la plus faible $1,46 \times 10^5$ spores/ml, les mortalités ont débuté tardivement au 4^e et 5^e jours pour atteindre les 100% au 10^e et 12^e jours pour les deux stades respectivement.

Nos résultats sont assez comparables avec ceux de plusieurs auteurs réalisés sur des acridiens traités avec des micro-organismes entomopathogènes. L'entomopathogène *B. bassiana* a un effet significatif sur les imagos de *Locusta migratoria* traités à trois doses différentes : D1= $0,5 \times 10^6$ spores/ml, D2= 10^6 spores/ml et D3= 2×10^6 spores/ml par rapport aux témoins. Les individus traités à D1 sont morts 12 jours après le traitement, pour ceux traités à la dose D2= 10^6 spores/ml ils sont morts au 11^e jour, alors que par D3, les 100 % de mortalité a été enregistrés au 8^e jour [222]. Avec le même champignon, 100 % de mortalités est enregistré entre le 6^e et le 12^e jour sur les différents stades de *L. migratoria* [223]. Nos résultats suggèrent que la virulence de *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* augmente avec l'augmentation des doses appliquées. Les criquets marocains de stade supérieur développement une certaine résistance vis-à-vis de l'infection fongique, ce qui a conduit à un retard de mortalité dans le temps.

4.6. Etude de quelques aspects de la toxicité subaiguë de l'imidaclopride chez les rats Wistar femelles

Dans cette partie, notre objectif est orienté vers la recherche de quelques aspects morpho-fonctionnels de la toxicité subaiguë de l'imidaclopride (MIDA®) à raison de 1/10 DL50 (24,4 mg/ kg/ jour) et 1/80 DL50 (5,3 mg/ kg/ jour) pendant 14 jours chez les rats Wistar femelles. Le travail a porté sur l'étude de l'évolution pondérale, du profil de quelques paramètres hématologiques et biochimiques (rénaux et hépatiques) et sur l'histopathologie intestinale et des parenchymes hépatique, rénale et pulmonaire.

4.6.1. Effet des traitements sur le comportement des rats

Les traitements avec l'imidaclopride n'ont pas entravé la prise de nourriture par les rats Wistar femelles. Cependant, nous avons constaté un changement de comportement chez les rats traitées. Ces animaux présentent, la deuxième semaine du traitement, une diminution de l'activité avec tendance de rester dans les coins des cages. Durant les 14 jours de traitement avec l'imidaclopride, nous avons noté l'absence de symptôme d'allergie.

4.6.2 Effet des traitements sur l'évolution des poids corporels et sur les poids absolus et relatifs des reins et du foie chez les rats Wistar

Les résultats relatifs aux variations des poids corporels des rats Wistar témoins et traitées avec l'imidaclopride ainsi que sur les poids absolus et relatifs des reins et des foies avec leurs significations statistiques sont présentés dans la figure 4.28 et sur le tableau 4.25. Ces résultats sont détaillés sur les tableaux 36, 37, 38 et 39 de l'annexe 2.

D'après le tableau ci-dessous, tous les rats ont montré un gain de poids au cours de l'expérimentation. L'analyse statistique des différences en poids par rapport au début de l'expérimentation montre un changement hautement significatif pour le lot témoin ($p= 0,00025$) et très significatif pour les deux lots traités à raison de 24,4 mg/ kg/ jour ($p= 0,030$) et 5,3 mg/ kg/ jour ($p= 0.022$). En comparaison avec le lot témoin, l'augmentation relative des poids corporels révèle des différences très significative et hautement significative chez les individus traités avec la faible et la forte dose respectivement. Ces résultats suggèrent que l'imidaclopride interfère avec l'évolution pondérale des rats femelles traitées dans

ces conditions de toxicité. Comparativement avec le lot témoin, nous avons enregistré de légères diminutions non significatives des poids relatifs des reins et des foies (%) chez les individus traités avec l'insecticide ($p > 0,05$).

Tableau 4.25: Effet de l'imidaclopride sur l'évolution des poids corporels des rats et sur les poids absolus et relatifs des reins et du foie

| Poids | | Témoin | 1/80 DL50 | 1/10 DL50 |
|-----------|---------------------------|------------------------|--------------------------|---------------------------|
| Corporels | Début expérimentation (g) | 156,80 ± 4,44 | 171 ± 6,24 | 177 ± 6,52 |
| | Fin expérimentation (g) | 174,40 ± 4,50 (***) | 183,2 ± 7,36 (*) | 188,2 ± 7,01 (*) |
| | Augmentation relative (%) | 11,238 ± 1,62 (a) | 7,148 ± 2,64 (**) (b) | 6,324 ± 0,40 (***) (b) |
| Foie | Poids absolue (mg) | 5917,2 ± 67,2 | 6190,7 ± 45,07 | 6170,54 ± 64,2 |
| | Poids relatif (%) | 3,412 ± 0,08 (a) | 3,38 ± 0,13 (a) | 3,28 ± 0,109 (a) |
| Reins | Poids absolue (mg) | 1226,92 ± 68,4 | 1228,68 ± 24,7 | 1271,24 ± 49,5 |
| | Poids relatif (%) | 0,713 ± 0,024 (a) | 0,671 ± 0,027 (a) | 0,676 ± 0,03 (a) |

Valeurs en moyennes ± écart type. D'après le test t de *Student* et en comparaison avec le témoin, la différence est significative (*) à $p < 0,05$, très sig. (**) à $0,02 < p < 0,05$ et hautement sig. (***) à $p < 0,01$. (a) et (b) groupes homogènes définis par le test de Tukey

4.6.3 Effet des traitements avec MIDA sur quelques paramètres sanguins

4.6.3.1. Effet sur quelques paramètres hématologiques

Les résultats des fluctuations de certains paramètres de la formule de numération sanguine chez les rats femelles témoins et traitées avec l'imidaclopride avec leurs significations statistiques sont illustrés dans la figure 4.29 et le tableau 4.26. Ces résultats sont détaillés sur les tableaux 40, 41, 42 et 43 de l'annexe 2.

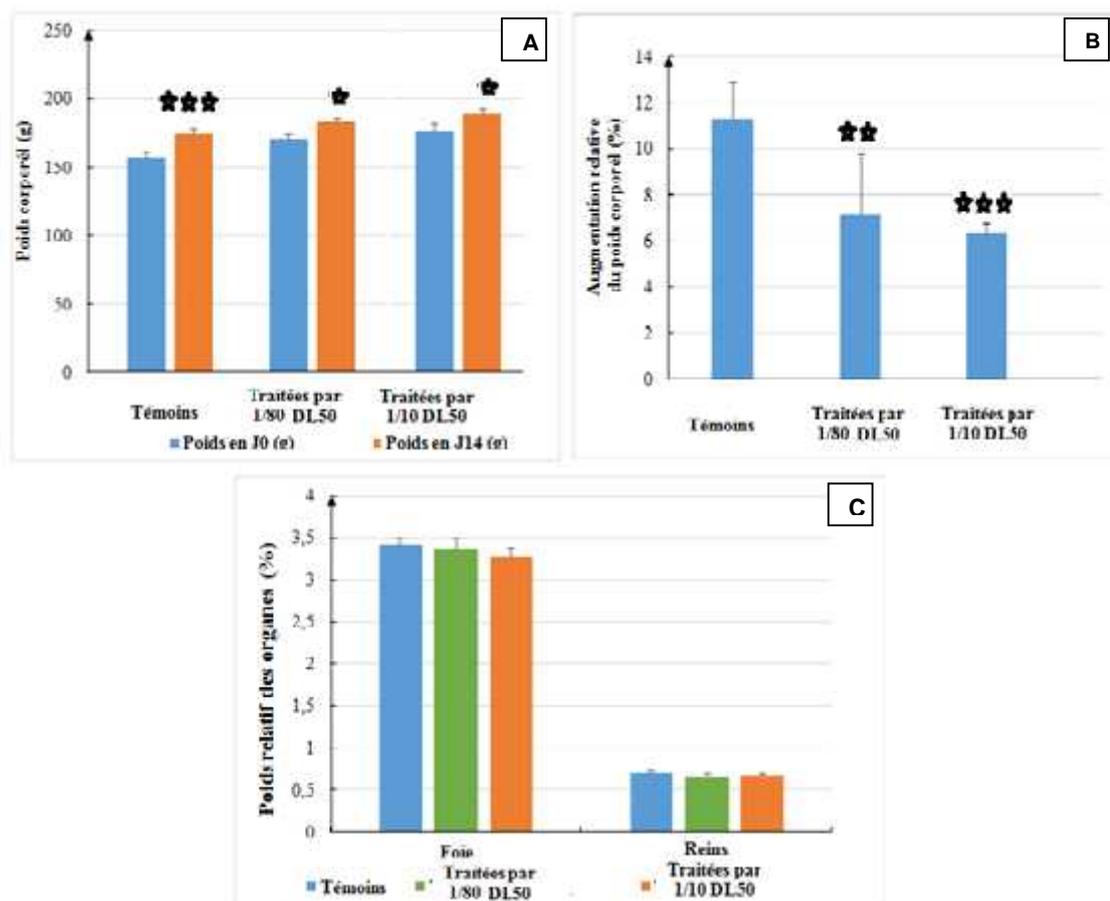


Figure 4.28: Effets de l'imidaclopride sur l'évolution du poids corporel au cours de l'expérimentation (A), sur l'augmentation relative du poids corporel (B) et sur les poids relatifs des reins et du foie chez les rats Wistar.

Différence par rapport au lot témoin : non significative (), significative (*) ; très significative (**) et hautement significative (***)

Tableau 4.26: Effet de l'imidaclopride sur de quelques paramètres hématologiques chez les rats Wistar femelles

| Paramètres | Témoin | 1/80 DL50 de l'imidaclopride | 1/10 DL50 de l'imidaclopride |
|---|-----------------------------|----------------------------------|---------------------------------|
| Globule blancs (GB) ($10^8/\text{mm}^3$) | 4,866 ± 0,32 (a) | 9,633 ± 0,42 (***) (b) | 10,3 ± 1,04 (***) (b) |
| Globules rouges (GR) ($10^6/\text{mm}^3$) | 6,833 ± 0,26 (a) | 6,523 ± 0,500 (a) | 6,363 ± 0,91 (a) |
| Hémoglobine (Hb) (g/l) | 12,466 ± 0,47 (a) | 11,90 ± 0,624 (a), (b) | 10,833 ± 0,77 (*) (b) |
| Hématocrite (Ht) (%) | 38,8 ± 0,52 (a) | 37,566 ± 0,763 (a) | 34,366 ± 4,65 (a) |
| Plaquettes (Plt) ($10^3/\text{mm}^3$) | 915 ± 29,81 (a) | 968,0 ± 77,890 (a) | 1002,33 ± 127,26 (a) |

Valeurs en moyennes \pm écart type. La différence est non significative () à $p > 0,05$. Significative (*) lorsque $0,05 > p > 0,02$ et Hautement significative (***) à $0,01 > p$. (a) et (b) groupes homogènes définis par le test de Tukey

En comparaison avec le groupe témoin, il semble que l'administration pendant 14 jours de MIDA, à raison de 1/10 et 1/80 DL50, à montré des augmentations hautement significatives en nombre de GB ($0,01 > p$). Chez le lot traité à 1/10 DL50, nous avons noté une diminution significative en taux de l'Hb.

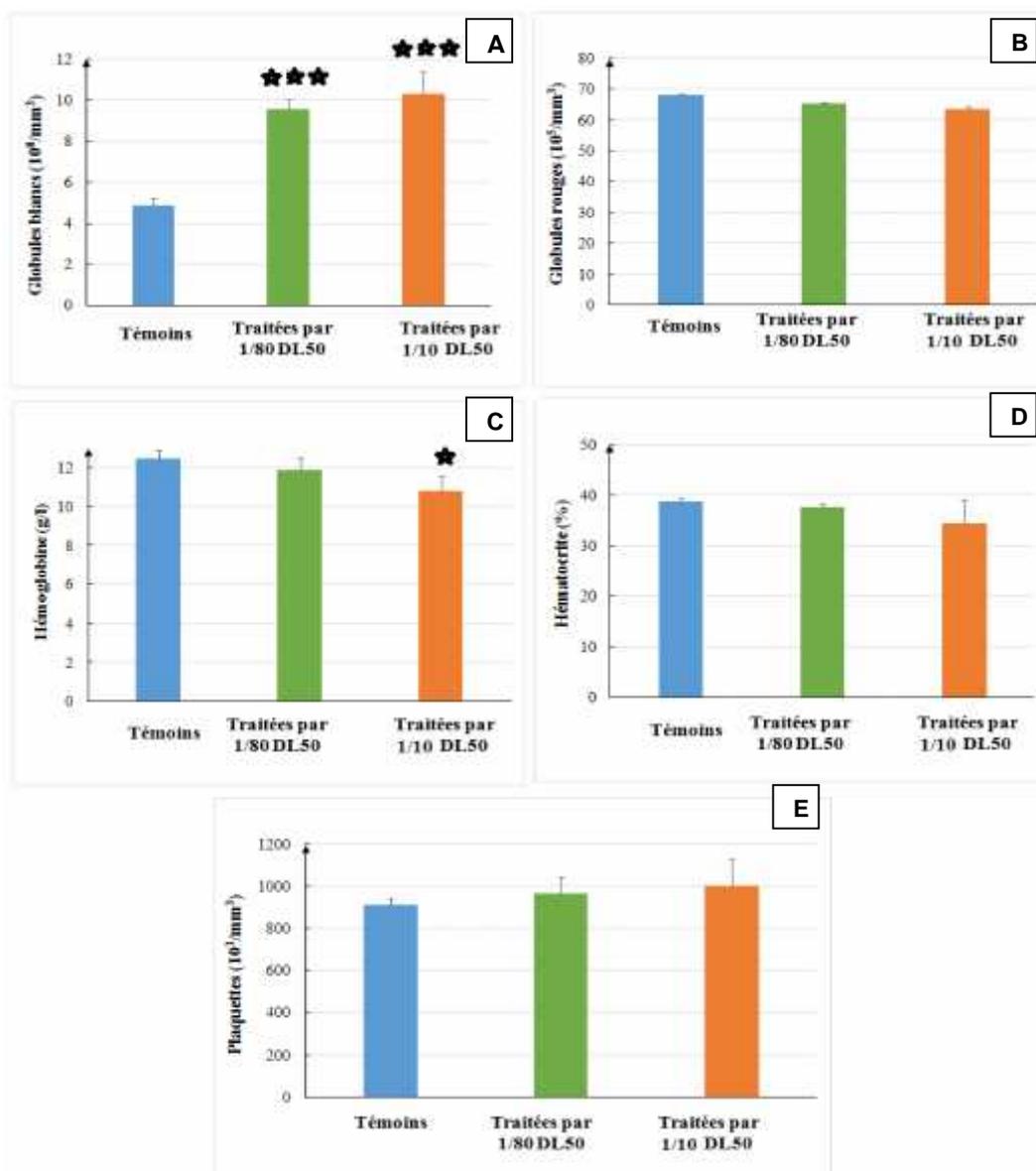


Figure 4.29: Effets de l'imidaclopride sur les paramètres hématologiques GB (A), GR (B), Hb (C), Ht (D) et Plt (E) chez les rats Wistar.

Différence non significative (), significative (*), et hautement significative (***)

4.6.3.2. Effet sur quelques paramètres biochimiques

Les résultats des variations des paramètres rénaux (urémie et créatinémie) et hépatiques (la phosphatase alcaline (PA), l'alanine aminotransférase (ASAT), l'aspartate aminotransférase (ASAT) et le taux totale des protéines plasmatiques (PT)) chez les rats témoins et traités avec MIDA avec leurs significations statistiques sont rassemblés dans la figure 4.30 et le tableau 4.27. Ces résultats sont détaillés sur les tableaux 40, 41, 42 et 43 de l'annexe 2.

Tableau 4.27: Effet de l'imidaclopride sur de quelques paramètres biochimiques rénaux et hépatiques chez les rats Wistar

| Paramètres | Témoin | 1/80 DL50 MIDA | 1/10 DL50 MIDA |
|-------------------------------------|----------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| Urée (g/l) | 0,38 ± 0,05 (a) | 0,47 ± 0,03 (*) (a) | 0,453 ± 0,05 (a) |
| Créatinine (g/dl) | 4,0 ± 0,0 (a) | 4,0 ± 1,00 (a) | 4,66 ± 0,58 (a) |
| ASAT (GOT) (UI/l) | 196 ± 8,185 (a) | 174,33 ± 12,10 (*) (b) | 174,33 ± 5,13 (**) (b) |
| ALAT (GPT) (UI/l) | 69 ± 8,00 (a) | 65,666 ± 9,50 (a) | 62,00 ± 9,85 (a) |
| Phosphatase alcaline (PA) (UI/l) | 209 ± 18,52 (a) | 173,00 ± 10,82 (a) | 157,33 ± 39,07 (a) |
| Protide totaux (PT) (UI/l) | 73,66 ± 2,52 (a) | 70,66 ± 4,04 (a) | 75,666 ± 5,86 (a) |

Valeurs en moyennes ± écart type. La différence est non significative () à $p > 0,05$; Significative (*) à $0,05 > p > 0,02$; Très sig. (**) à $0,02 > p > 0,01$. (a) et (b) groupes homogènes définis par le test de Tukey

Quand aux dosages des paramètres biochimiques, les traitements avec l'imidaclopride ont révélé des augmentations de l'urémie et de la créatinémie. En comparaison avec le lot témoin, le test *t* montre une augmentation significative de l'urémie chez les rats femelles traitées avec la faible dose (5,3 mg /kg/jr) ($p=0,036$). Cependant, l'identification des groupes homogènes par le test de Tukey montre un seul groupe renfermant le lot témoin et les deux lots traités.

Concernant les dosages plasmatiques de la PA et de l'A.L.A.T, les résultats révèlent, chez les rats traités, des diminutions jugées statistiquement non significatives par rapport au témoin ($p > 0,05$). Nous avons noté avec le taux plasmatique de l'A.S.A.T. des diminutions jugées très significatives pour le lot

traité à 1/10 DL50 et significative pour les rats traités à 1/80 DL50. En comparaison avec le témoin, l'imidaclopride, n'induit pas de changement significatif pour le taux plasmatique des protides totaux (PT).

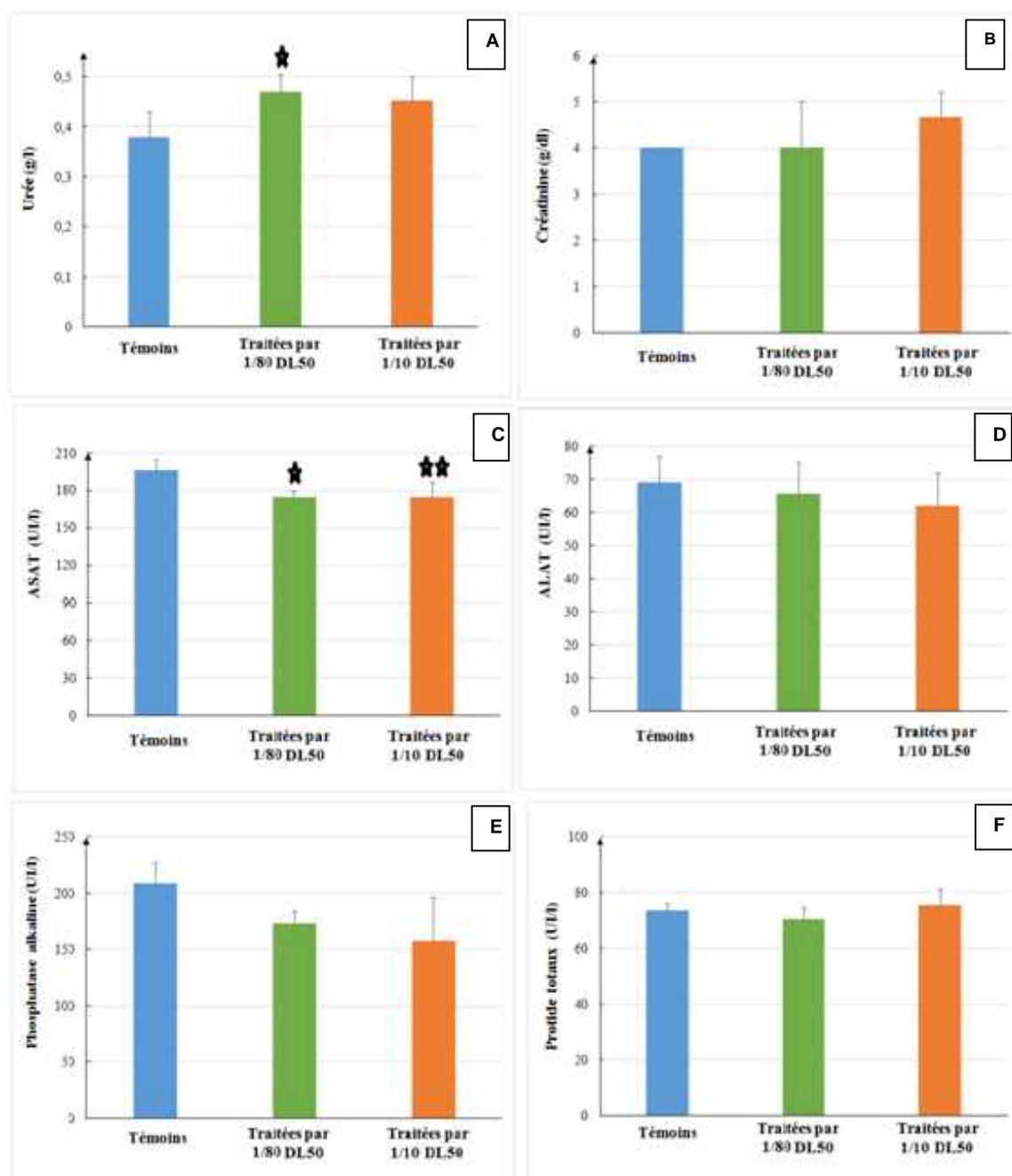


Figure 4.30 : Effets de l'imidaclopride sur le taux plasmatique des paramètres biochimiques, urée (A), créatinine (B), ASAT (C), ALAT (D), PA (E) et PT (F) chez les rats. Différence non significative (), Sig. (*), Très sig. (**)

4.6.4. Effet des traitements avec MIDA sur l'histologie de quelques organes

4.6.4.1 Effets des traitements sur l'histologie des parenchymes rénaux

➤ Chez les rats témoins

En microscopie optique le parenchyme rénal des rats témoins révèle une organisation structurale classique. Le cortex est composé de plusieurs formes tubulaires et glomérulaires. Nous observons les tubes contournés de deux types, les proximaux sont plus denses et plus nombreux que les distaux (Planche 4.8 – Figure A et B). Chaque glomérule, de forme dense et arrondie, est constitué d'une matrice conjonctive, le mésangium. Ce dernier est riche en anse capillaires et en cellules, les podocytes. La chambre glomérulaire est enveloppée par la capsule rénale de Bowman. (Planche 4.8 – Figure B). La zone médullaire (Planche 4.8 – Figure C et D) est formée de structures tubulaires. Les principaux tubules observés sont les tubes collecteurs, reconnaissables à leurs cellules cubiques et leur diamètre important, et les portions larges et grêles de l'anse de Henlé. Ces derniers sont identifiés par leur paroi fine et leur épithélium aplati. Des capillaires se trouvent entre les structures tubulaires et sont identifiable grâce à la présence de sang dans leur lumière (Planche 4.8 – Figure D).

➤ Chez les rats traités

L'étude des coupes histologiques du parenchyme rénal des individus traités avec l'imidaclopride pendant 14 jours, montre la désorganisation de l'architecture tissulaire au niveau cortical et médullaire, dont le degré vari d'un animal à l'autre. Les altérations structurales retrouvées chez les rats traités par 1/80 DL50 se manifestent principalement par :

- L'atrophie de quelques glomérules (Planche 4.8 -Figure E et F)
- La dégénérescence, par endroit, de l'épithélium tubulaire au niveau de la zone médullaire et développement de chorion riche en fibre de collagène donnant naissance à une fibrose tissulaire (Planche 4.8 -Figure G et H)
- La dilatation des capillaires glomérulaires et des capillaires interstitiels corticales et médullaires accompagnée d'hémorragie fréquente et de congestions sanguine (Planche 4.8 -Figure E, F, G et H).

Chez les rats femelles traités avec l'imidaclopride à raison de 1/10 DL50, les coupes histologiques des reins révèlent les altérations suivantes:

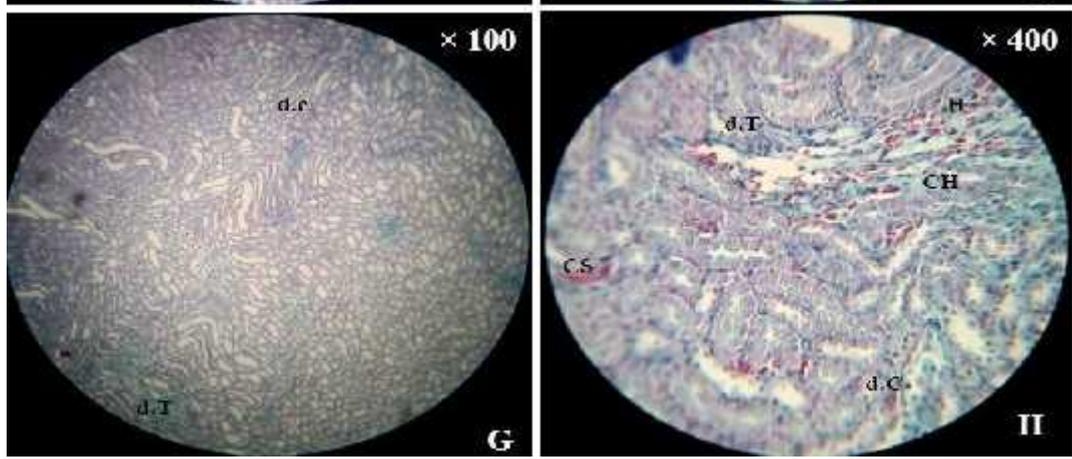
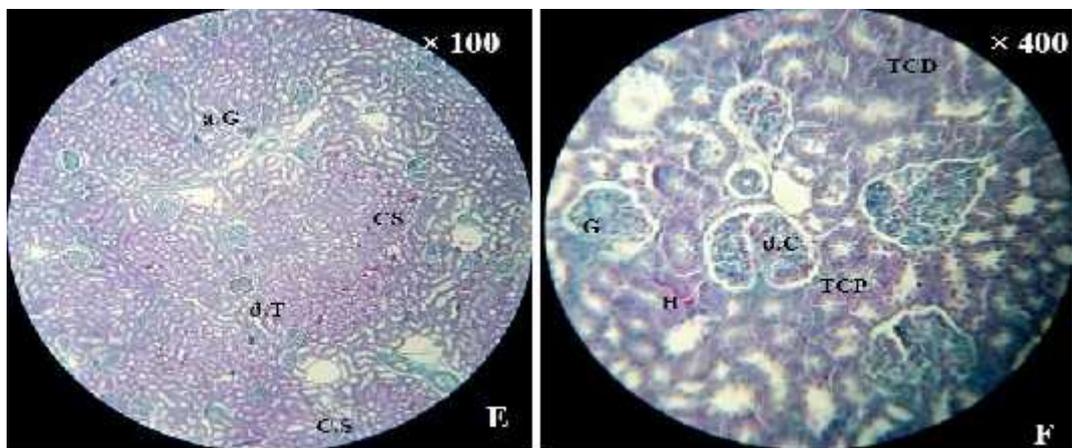
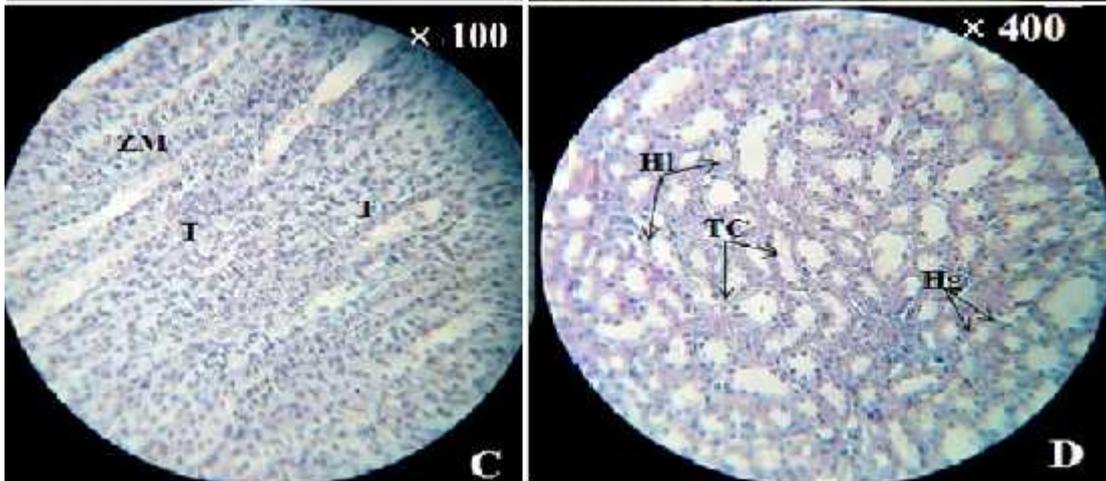
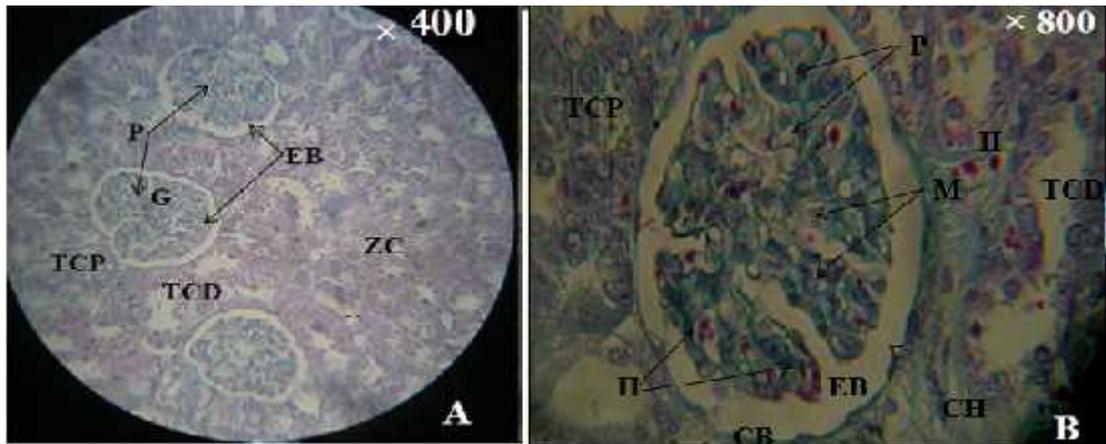
- La destruction et l'atrophie de quelques glomérules qui présentent une chambre glomérulaire réduite. Nous observons des congestions sanguines très abondantes (Planche 4.8 – Figure I et J).

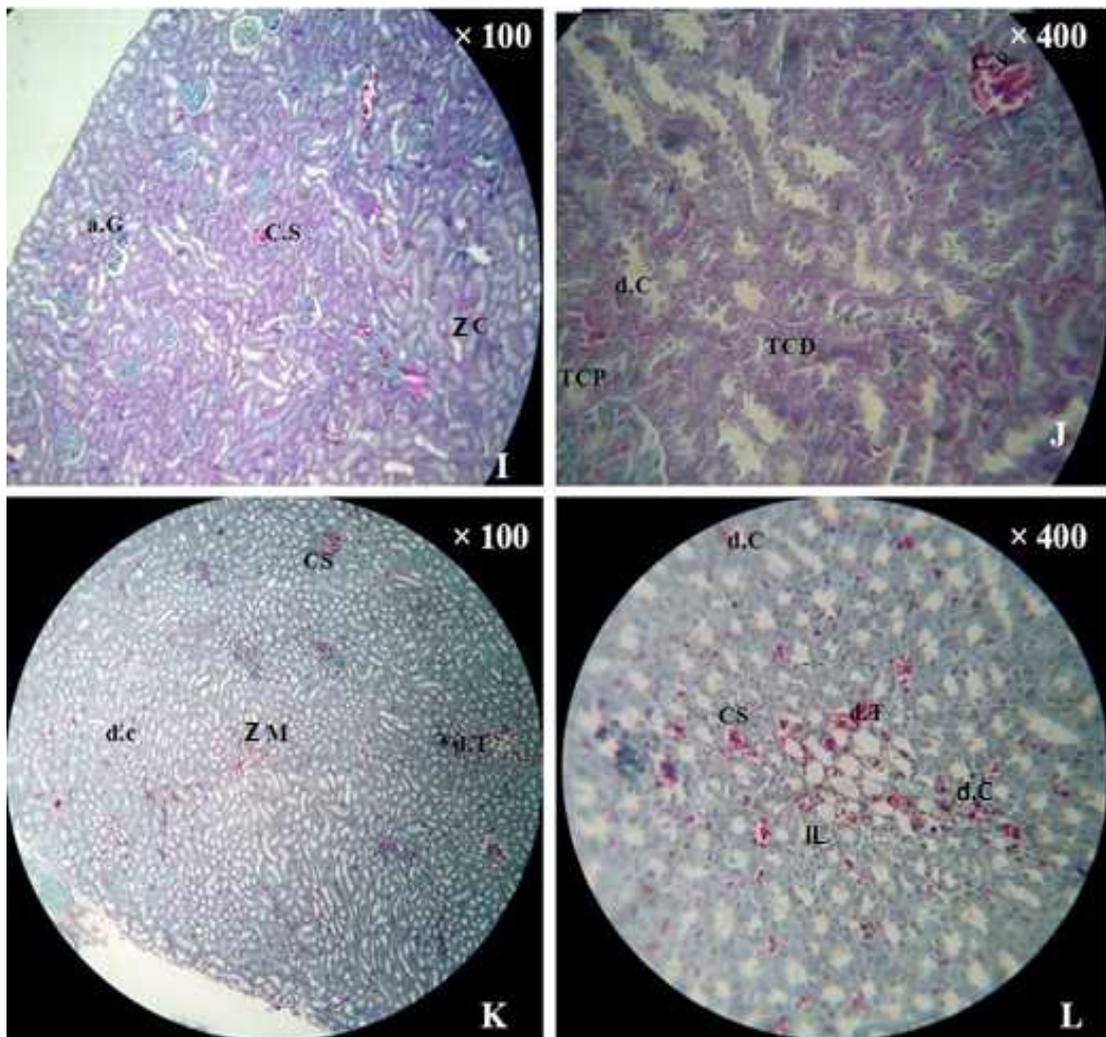
- La perte de l'architecture classique de la zone médullaire avec des dégénérescences tubulaires locales, des congestions fréquentes et la dilatation des capillaires interstitiels (Planche 4.8 - Figure K et L). Ces derniers montrent des parois endothéliales épaisses et la circulation des globules rouge dans la lumière. Nous observons des infiltrats leucocytaires (Planche 4.8 - Figure L). Ces altérations reflètent la présence de foyer inflammatoire et sont des signes de néphrotoxicité.

Planche 4.8: Photomicrographies des parenchymes rénaux chez les rats témoins (A, B, C et D) et chez les traités avec l'imidaclopride pendant 14 jours à raison de 1/80 DL50 (E, F, G et H) et 1/10 DL50 (I, J, K et L).

Coloration Trichrome de Masson. (Grossissement: figure A (x400), figure C (x100)

G: glomérule, **EB:** Espace de Bowman, **CB :** capsule de Bowman, **d.C:** dilatation des capillaires, **d.T :** dégénérescences tubulaires, **Ch:** Chorion, **TCP:** Tube contourné proximale, **TCD:** Tube contourné distale, **ZC:** Zone corticale, **ZM:** Zone médullaire, **T:** Tubules, **CS:** congestion sanguine, **IL:** infiltration leucocytaires, **CB :** capsule de Bowman, **H :** hématies, **P :** podocyte, **M :** mésengium. **a.G.** atrophie glomérulaire, **HI:** portions larges de l'anse de Henlé. **Hg :** portions grêles de l'anse de Henlé. **d.T:** dégénérescence tubulaire





4.6.4.2 Effets des traitements avec l'imidaclopride sur l'histologie des parenchymes hépatique

➤ Chez les rats témoins

L'observation microscopique des coupes histologiques du parenchyme hépatique des rats témoins a permis de mettre en évidence une architecture lobulaire normale qui présente une veine centrolobulaire limitée en périphérie par les espaces portes (Planche 4.9- Figure A). Dans les lobules, les hépatocytes s'organisent en travées composées de rangées cellulaires. Ces rangées sont séparées par des sinusoides bordés avec les cellules endothéliales et les cellules de Kupffer. Les hépatocytes sont des cellules cubiques à noyaux rond vésiculaire. Ces cellules sont parfois binucléé (Planche 4.9- Figure B).

➤ Chez les rats traités

Chez les individus traités par 1/80 DL50 de l'imidaclopride l'aspect structural du parenchyme hépatique est maintenu. Cependant nous observons quelques altérations structurales plus au moins importantes illustrées comme suit : (Planche 4.9 - Figure C et D)

- Les capillaires sinusoides sont dilatées et présentent la circulation de quelques érythrocytes et leucocytes avec épaissement des parois endothéliales.
- Le développement de tissu conjonctif fibreux diffus qui est riche en infiltrats leucocytaires et en capillaires dilatés
- Quelques hépatocytes présentent des vacuolisations cytoplasmiques

L'étude microscopique du parenchyme hépatique des rats traités par 1/10 DL50 de l'imidaclopride montre des altérations structurales semblables avec ceux notées chez les traités avec la faible dose. Nous observons également : (Planche 4.9 – Figure E et F).

- Des dilatations plus importantes au niveau des veines centrolobulaires, des veines portes et des sinusoides avec diapédèse leucocytaire très remarquable et des congestions sanguines modérées. Ces altérations reflètent la présence de foyer inflammatoire au niveau des foies des individus traités avec l'imidaclopride et sont des signes d'hépatotoxicité.

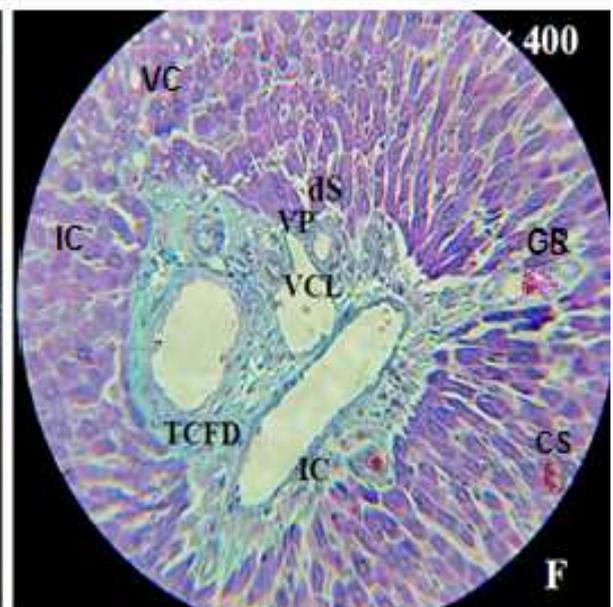
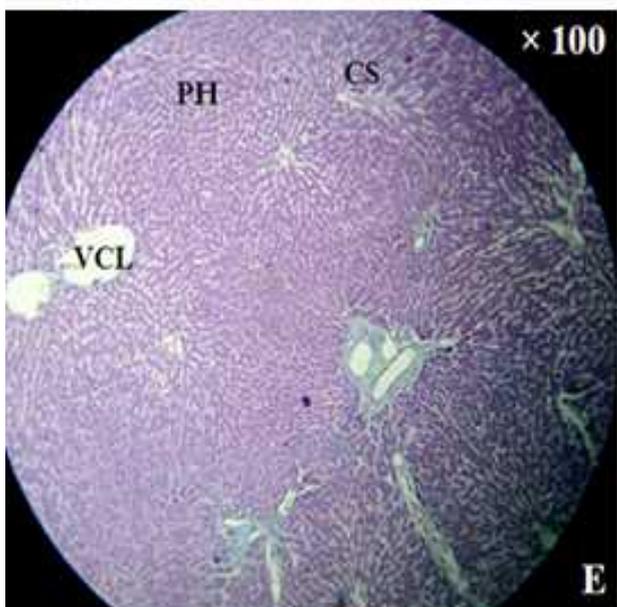
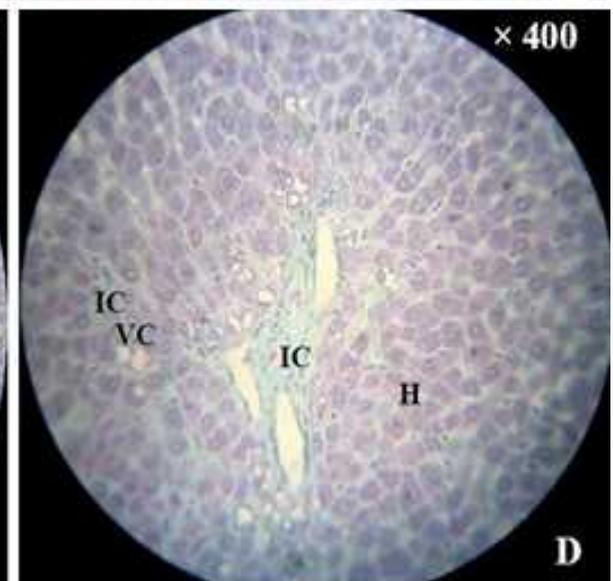
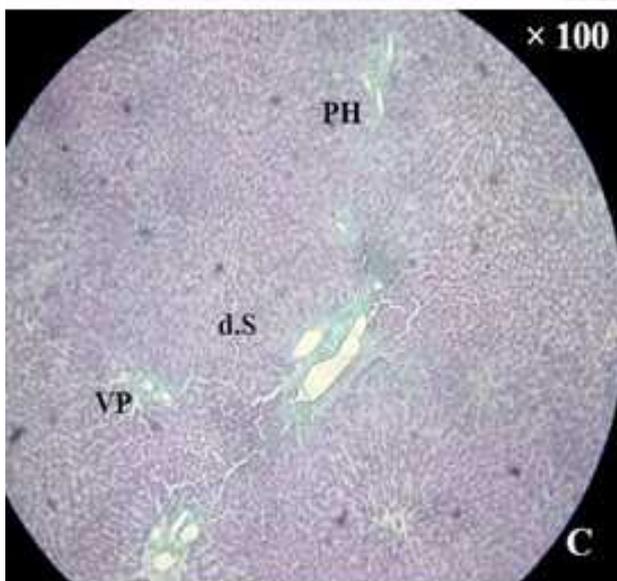
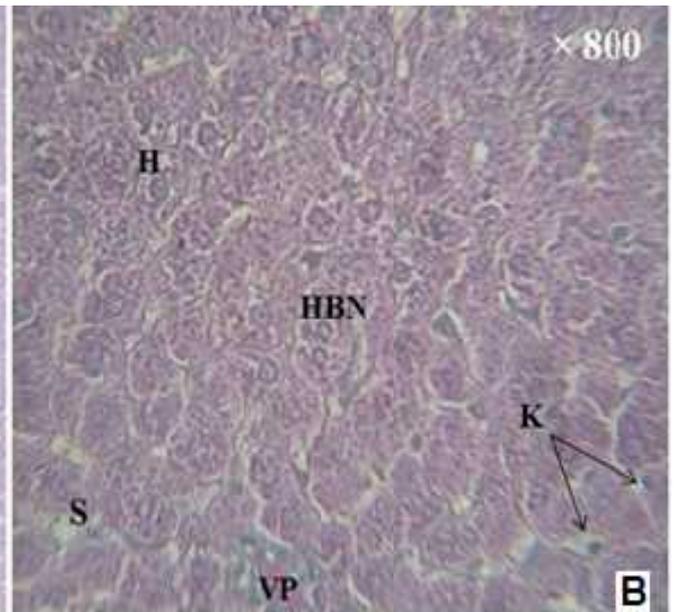
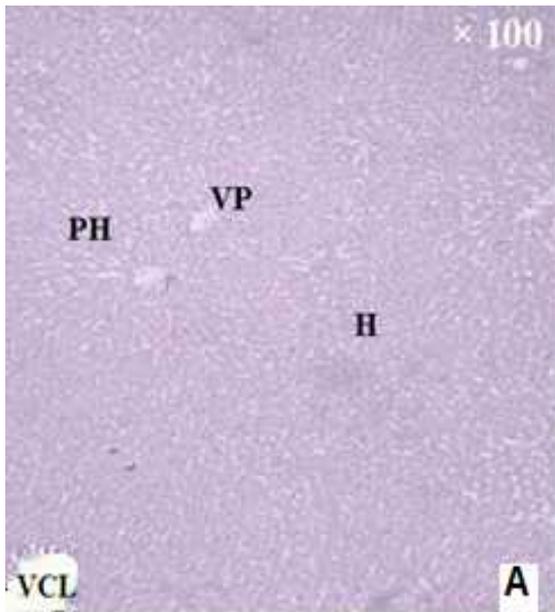


Planche 4.9 : Photomicrographies des parenchymes hépatiques des rats témoins (A et B) et des rats traités avec l'imidaclopride pendant 14 jours à raison de 1/80 DL50 (C et D), 1/10 DL50 (E et F). Coloration Trichrome de Masson. Grossissement x100, x 400 et x 800. **VCL**: Veine centrolobulaire; **VP**: Veine porte; **dS**: dilatation des sinusoides; **H**: Hépatocyte; **PH**: parenchyme hépatique, **TCFD**: Tissu conjonctif fibreux diffus; **IC**: Infiltration cellulaire; **CS**: congestion sanguine. **K**: cellules de Kupfer. **VC**: vacuolisation cytoplasmique. **GR**: globule rouge. **HBN**: hépatocyte binuclée.

4.6.4.3 Effets des traitements avec l'imidaclopride sur l'histologie des parenchymes pulmonaires chez les rats Wistar

➤ Chez les individus témoins

L'étude des coupes histologiques des poumons provenant des rats témoins montre une structure classique. Le parenchyme pulmonaire présente deux types de bronchioles, respiratoires et terminales, bordés par un épithélium cubique simple. Nous observons le tissu lymphoïde associé bronchique (BALT) (Planche 4.10 -Figure A et B). Les canaux alvéolaires sont bordés par un épithélium pavimenteux simple. Ces canaux se connectent avec les sacs alvéolaires dont chacun contient plusieurs alvéoles. Les alvéoles sont séparés les uns des autres par des cloisons inter-alvéolaires contenant des capillaires sanguins et sont bordées par des pneumocytes (Planche 4.10 -Figure B).

➤ Chez les rats traités

L'inoculation des rats avec 1/80 DL50 de l'imidaclopride pendant 14 jours montre quelques modifications architecturales au niveau du parenchyme pulmonaire. Nous observons

- L'envahissement de la lumière branchiale terminale et respiratoire par les débris cellulaires de l'épithélium (Planche 4.10 - Figure C et D).
- L'épaississement des cloisons inter-alvéolaires et par conséquent la réduction du diamètre des sacs alvéolaires et des alvéoles avec la dilatation des capillaires interalvéolaire (Planche 4.10 – Figure D)

Les coupes pulmonaires provenant des rats femelles traitées par la 1/10 DL50 d'imidaclopride pendant 14 jours (Planche 4.10 – Figure E et F) montrent un

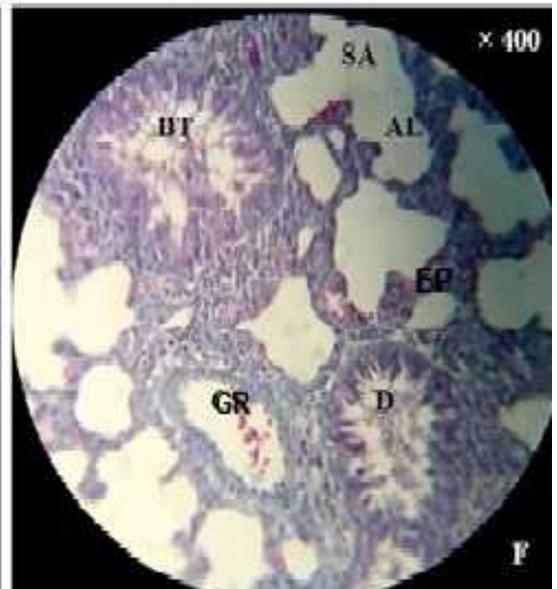
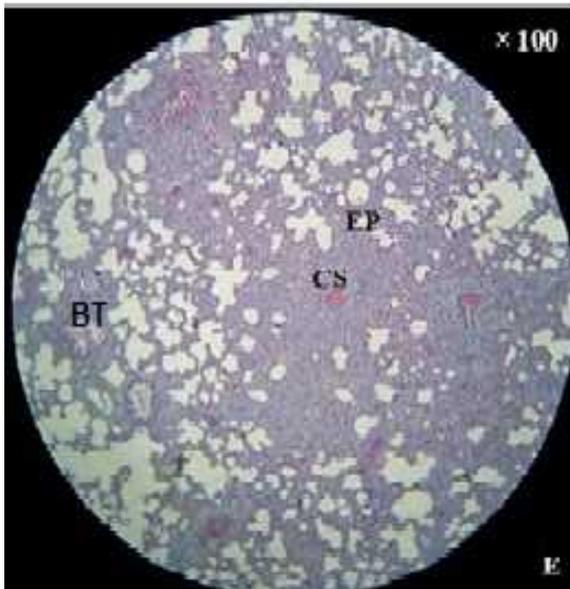
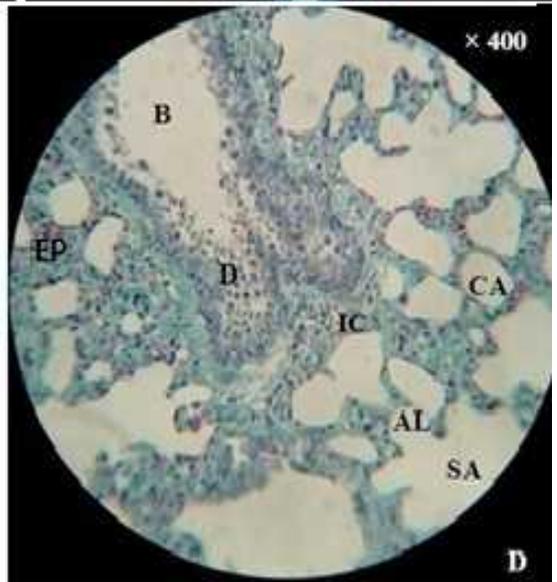
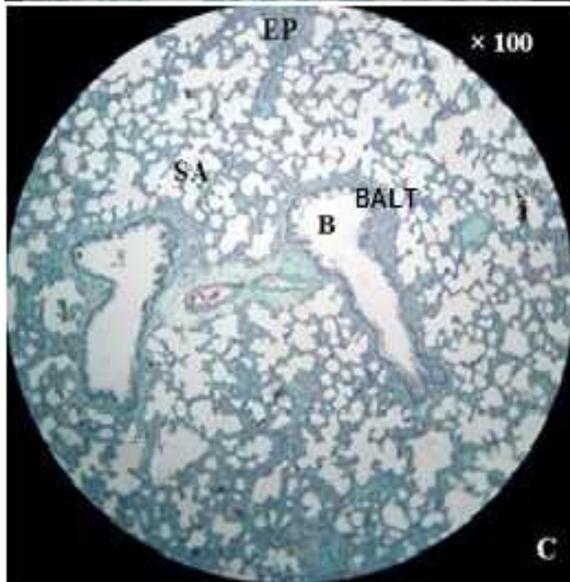
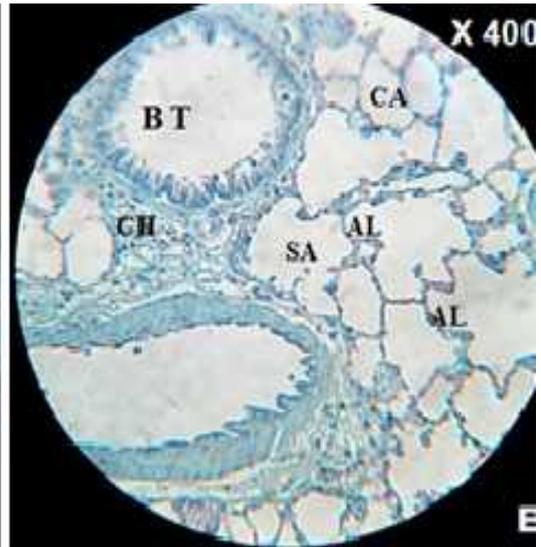
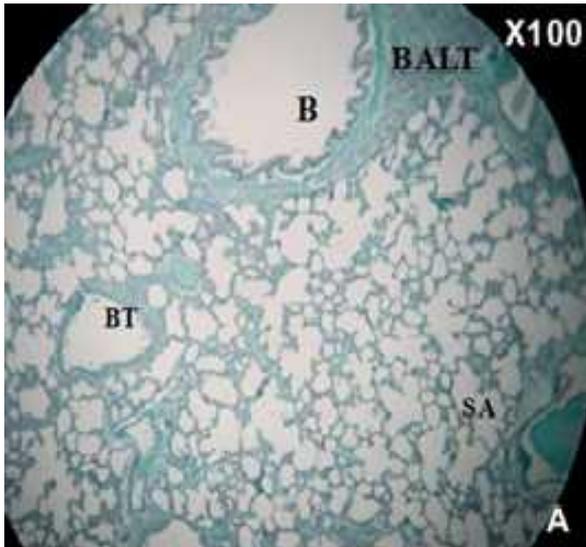
aspect général similaire à celui des rats traitées par la 1/80 DL50. Cependant, l'examen microscopique détecte des altérations plus importantes :

- Les cloisons interalvéolaires sont très épaisses par augmentation du nombre et du volume des cellules (hyperplasie et hypertrophie) et par augmentation de la matrice extracellulaire par rapport aux témoins.
- Nous remarquons un aspect hémorragique, une vasodilatation et des congestions très fréquentes.
- La lumière des bronchioles terminaux est remplies de débris cellulaires associées à une accumulation des globules rouges dans la lumière (Planche 4.10 – Figure F).

Ces altérations reflètent la présence de foyer inflammatoire et sont des signes de toxicité pulmonaire

Planche 4.10 : Photomicrographies des parenchymes pulmonaires chez les rats témoins (A et B) et traités avec l'imidaclopride à raison de 1/80 DL50 (C et D), 1/10 DL50 (E et F). Coloration Trichrome de Masson.

B: Bronchiole; **BT**: Bronchiole terminale; **CA**: canal alvéolaire; **SA**: Sac alvéolaire; **AL**: Alvéole; **CH**: Chorion; **EP**: Epaissement des cloisons alvéolaires; **CS**: Congestion sanguine; **D**: Desquamation; **IC**: infiltration leucocytaire; **BALT**: Tissus lymphoïde associé aux bronches.



4.6.4.4. Effets des traitements avec l'imidaclopride sur l'histologie des villosités intestinales

➤ Chez les rats témoins

Les coupes histologiques réalisées au niveau de l'intestin grêle des individus témoins montrent une structure intacte et présentent à partir de la lumière vers l'extérieur :

- La muqueuse constituée d'un épithélium simple prismatique à plateau strié agencé en cryptes en forme de villosités et s'ouvrant dans la lumière digestive. A la base des villosités, nous trouvons les glandes de Liberkhun (Planche 4.11- Figure A et B). L'assise épithéliale est composée de deux types cellulaires; les entérocytes et les cellules caliciformes ou mucocytes (Planche 4.11 - Figure B).
- La sous muqueuse est un tissu conjonctif riche en vaisseaux sanguins.
- La musculuse est une couche de muscles lisses
- La séreuse, entoure l'intestin et est riche en vaisseaux lymphatiques

➤ Chez les rats traités

L'observation microscopique des coupes histologiques intestinales des rats traités avec la faible dose de l'imidaclopride (1/80 DL50), montre

- La déformation des structures glandulaires et l'hypertrophie des villosités par augmentation de la largeur du chorion (Planche 4.11 - Figure C et D).
- A ce niveau nous remarquons, pour toutes les coupes histologiques préparées, la dilatation des capillaires et l'abondance de l'infiltrat leucocytaires. L'assise épithéliale présente un aspect altéré (Planche 4.11- Figure D).

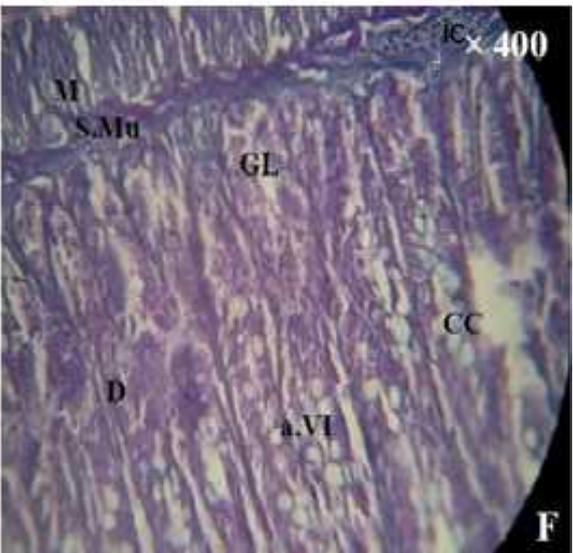
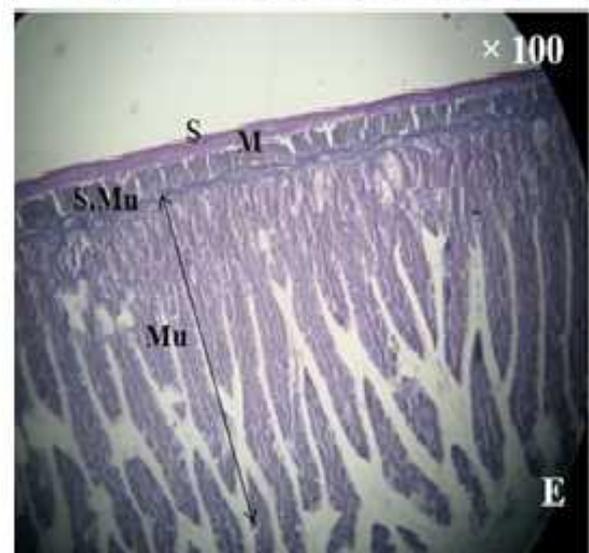
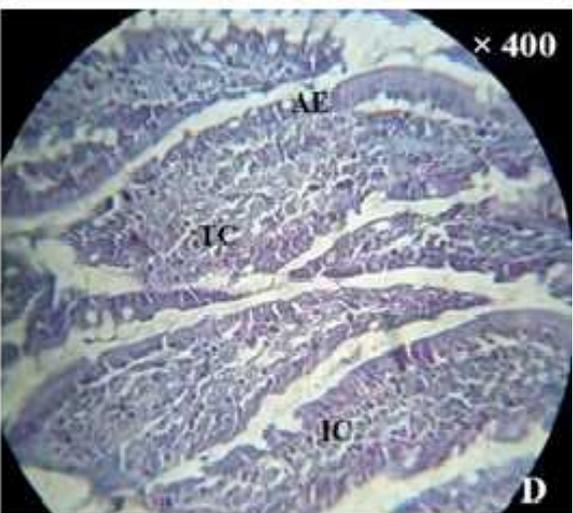
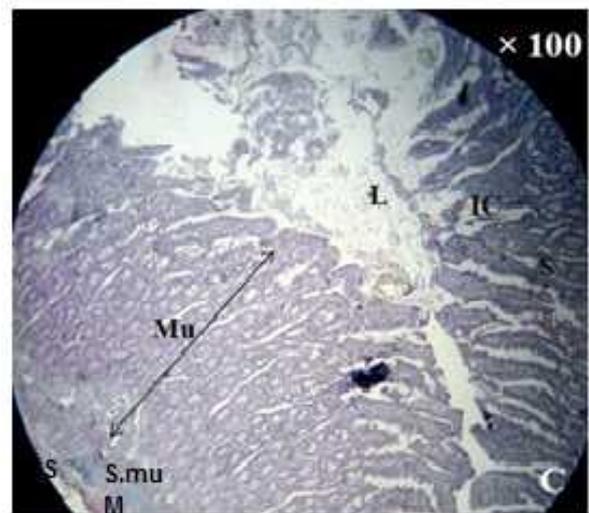
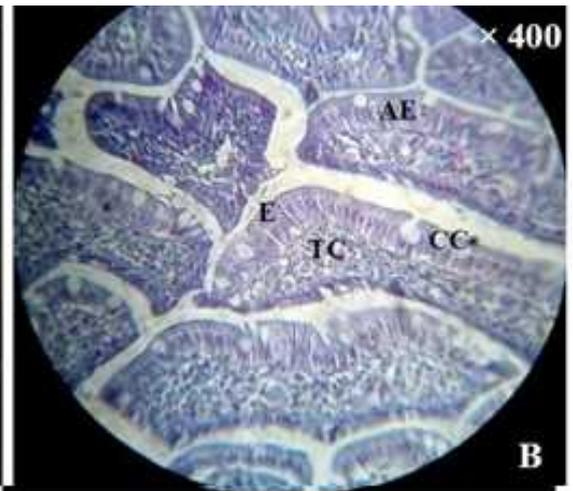
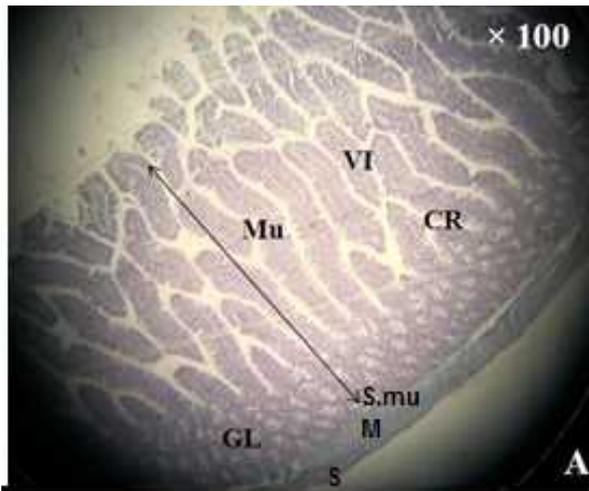
L'examen des coupes des l'intestin grêle des rats traités avec la forte concentration de l'imidaclopride (Planche 4.11 -Figure E et F) révèle des altérations plus importantes par rapport à celles retrouvées chez les individus inoculés avec la faible dose.

- Au niveau de la muqueuse, nous observons la déformation et l'atrophie des villosités intestinales.
- La modification de l'architecture du chorion et dégénérescence des assises épithéliale sont évidentes avec présence des signes d'ulcération et de nécrose tissulaire.
- Au niveau de la sous muqueuse, nous notons la dilatation des vaisseaux sanguins et la présence d'agrégats lymphoïdes envahissant et ulcérant la muqueuse en surface avec altération des cryptes de Liberkhün.

- Au niveau de la musculature, la structure des muscles lisses est plus au moins altérée. Ces lésions reflètent la présence de foyer inflammatoire et sont des signes de toxicité intestinale.

Planche 4.11: Photomicrographies de l'intestin grêle chez les rats Wistar femelles témoin (A, B) et traitées avec l'imidaclopride à raison de 1/80 DL50 (C et D), et 1/10 DL50 (E et F). Coloration Trichrome de Masson.

Mu : la muqueuse. **S.mu**: sous-muqueuse. **M**: musculature. **S** : la séreuse. **L** : lumière intestinale. **TC** : le tissu conjonctif (chorion). **GL** : Glande de Liberkhün **AE**: Assise épithéliale, **E**: Entérocytes, **CR** : cryptes de régénération, **CC**: Cellule caliciforme, **VI**: Villosités Intestinale, **D**: Dégénérescence, **IC**: Infiltrat cellulaire, **a.V**: atrophie des villosités.



4.6.5. Discussion

Quelques changements de comportement sont notés chez les rats femelles Wistar traitées par l'imidaclopride à raison de 1/10 DL50 (24,4 mg/ kg/ jour) et 1/80 DL50 (5,3 mg/ kg/ jour) pendant 14 jours. Les individus traités montrent une diminution de la vivacité et une consommation alimentaire relativement faible. Cela explique, probablement que le surplus pondéral, entre le début et la fin de l'expérimentation, qui est statistiquement hautement significatif pour le témoin et significatif pour les individus traités. Comparativement avec le témoin, Le taux relatif de la croissance pondérale révèle des différences hautement significatives chez les rats traités à 24 mg/kg/jr et très significative chez les traités à 5,3 mg/kg/jour. BHARDWAJ et al. [224], ont enregistré une salivation, une diarrhée et une diminution significative du poids corporel des rats Wistar traitées par 20 mg/kg/jr d'imidaclopride pendant 90 js, considérée comme des signes de toxicité.

Dans nos conditions expérimentales, Le calcul des poids relatifs des organes étudié montre de faibles diminutions non significatives par rapport au témoin. De même, une diminution non significatives du poids relatif du foie est constatée chez les animaux ayant reçu 1/15 de la DL50 de l'imidaclopride chaque jours pendant 85 jours et 155 jours [225]. Des résultats similaires sont notés par TOOR et al. [226] qui rapportent que le traitement par 1/10 DL50 de l'imidaclopride provoque une atrophie hépatique. L'étudié de l'effet de la 1/10 DL50 de trois insecticides, Pyriproxyfen, Fenitrothion et Spinosad chez les rats Wistar males traités une fois par semaine pendant 4 semaines révèlent des diminutions significatives pour les poids relatifs des reins et des rates et non significatives pour le poids relatifs des foies des animaux traités [227]. D'après nos résultats, les traitements avec 1/10 et 1/80 DL50 de l'imidaclopride pendant 14 jours ne semblent pas affecter la créatinémie des rats. Cependant chez les individus traités avec la faible dose, l'augmentation en urée plasmatique est jugée significative. Ce qui suggère l'existence de variations individuelles chez les rats. Le taux sérique des enzymes hépatiques, ALAT, PA montrent de légères diminutions non significatives par rapport au témoin. La diminution de l'ASAT est jugée très significative pour le lot traité à 1/10DL50 et significative pour les rats traités à 1/80 DL50. Nous avons enregistré également de légères perturbations non significatives des PT. Sur le plan histologique, les traitements avec l'imidaclopride ont décelé de multiples

lésions histologiques au niveau des organes étudiés. Les observations microscopiques suggèrent que l'imidaclopride provoque des inflammations à différents niveaux témoignées par la présence des images de vasodilatation de congestions sanguines, des infiltrats leucocytaires. Les dommages tissulaires enregistré semblent être plus sévères avec la dose 1/10 DL50 et qui peuvent être considéré comme des signes de néphrotoxicité, hépatotoxicité, pneumotoxicité et de toxicité intestinale.

Plusieurs travaux ont rapportés différents effets toxiques de l'imidaclopride à l'échelle morpho-fonctionnelle au niveau de certains organes vitaux. Ces effets sont marqués par des altérations sur les plans hématologiques, biochimiques et cyto-architecturale [7], [8], [27], [28], [29], [30]. AMMAR et *al.*, [228], qui ont rapporté que 1/10 et 1/20 DL50 de l'imidaclopride ont induit une augmentation significative en nombre de GB. L'imidaclopride affecte l'immunité innée chez les rats traités par 1/100 DL50 de l'imidaclopride, recrutement important des lymphocytes et induit une diminution significative de l'activité phagocytaire en plus de l'augmentation du taux sérique d'immunoglobuline particulièrement les IgG

Les reins des rats exposés à une dose sub létale de d'imidaclopride ont montré des altérations pathologiques, l'augmentation du poids des reins, une créatinémie qui suggère l'affaiblissement de la fonction glomérulaire et des dommages tubulaires [230]. L'effet de la 1/85 DL50 de l'imidaclopride chez les rats Wistar pendant 30 jours ne révèle aucune perturbation de la créatinémie, de l'urémie et de l'uricémie. Au niveau histologique, le traitement a induit des congestions sanguines, des œdèmes, des infiltrats leucocytaires, des vacuolisations cytoplasmiques des cellules épithéliales tubulaires, une atrophie de certains glomérules et des foyers de nécrose. Ces modifications suggèrent une néphrotoxicité [231]. Le même constat a été fait par SAADI et *al.* [232] pour une dose de 1/20 de DL50 avec le même insecticide (14, 67 mg/kg/jr) pendant 50 jours qui montre en plus une dégénérescence locale de certains tubules médullaire. ZANG et *al.* [233], qui ont rapporté une augmentation significative de l'urémie et de la créatininémie chez des souris mâles adultes traités par l'insecticide néonicotinoïde l'acétamépride à 30 mg/kg/j pendant 35 jours.

Le foie est le premier site de détoxification des xénobiotiques dont les insecticides. La toxicité avec 15 mg /kg/ jour de l'imidaclopride chez des souris

males montre une élévation significative des taux plasmatiques de l'ALAT, ASAT, PA et de la bilirubine totale. Plusieurs auteurs ont noté l'augmentation des taux des paramètres du foie suite au traitement avec l'imidaclopride ce qui reflète l'hépatotoxicité qui mène à l'altération de la perméabilité de la membrane plasmatique donc la fuite des enzymes du tissu vers le plasma ou à l'apparition de la nécrose du foie [230], [28]. MOHANY et *al.*, [229], rapportent des résultats similaires avec la 1/100 DL50 de l'imidaclopride, l'histopathologie révèle l'altération du parenchyme hépatique, des hépatocytes nécrosés marqués par des noyaux pyknotiques, et des sinus centraux fortement encombrés de sang et une diapédèse leucocytaire abondante. BOUKERSI, [235] a rapporté les effets toxiques de 1/15 DL50 de l'imidaclopride pendant deux périodes, 15 et 25 semaines, les perturbations hématologiques notés confirment les observations histologiques au niveau du parenchyme pulmonaires, hémorragie, infiltrations des lymphocytes et macrophage, altérations des l'épithélium bronchiques.

Au niveau des villosités intestinales, nous avons remarqué l'augmentation de la masse des agrégats lymphoïdes envahissant le chorion des villosités intestinales avec l'effacement des structures glandulaires par endroits chez les individus traitée avec 1/80 DL50 de l'imidaclopride. La dégénérescence des assises épithéliales et l'atrophie des villosités intestinales sont bien observés chez les individus traitées avec 1/80 DL50 de MIDA. Plusieurs auteurs rapportent des lésions au niveau de la paroi colique des animaux de laboratoire suite aux traitements par différents xénobiotiques par voie orale. Ces auteurs signalent que les pesticides sont capables de moduler des réponses immunitaires en affectant les lymphocytes chez des animaux de laboratoire et l'homme après intoxication [237], [238].

4.7. Etude de quelques aspects de la toxicité subchronique du biopesticide green muscle chez les rats Wistar femelles

Nous avons recherché quelques aspects de la biosecurite de *M. anisopliae* var. *acidum*, sous sa forme formulée en biopesticide, chez les rats Wistar femelles. Ces animaux sont traitées pendant 30 jours avec le green muscle®(GM) à raison de 200 mg de GM /Kg /jour contenant environ 10^{10} spores /kg, 20 mg de GM /kg /jour ou 10^9 spores /kg et 10 mg de GM /kg /jour ou 5×10^8 spores /kg.

Notre étude s'est axée sur la recherche des effets sur l'évolution du poids corporel et sur le poids de quelques organes vitaux. Sur quelques paramètres hématologiques et nous avons exploité la fonction rénale et hépatique par le dosage de quelques paramètres biochimiques. Nous avons recherché d'éventuelles inflammations rénales, hépatiques, pulmonaires et intestinales.

4.7.1. Effet des traitements sur le comportement des rats

Durant les 30 jours de traitement avec le biopesticide, nous avons noté l'absence de symptôme de toxicité et d'allergie. Notre souche fongique n'a pas entravé la prise de nourriture et n'a pas affecté le comportement des rats femelles.

4.7.2. Effet des traitements sur l'évolution des poids corporels et sur les poids absolus et relatifs des organes étudiés

Les résultats de la variation des poids chez les rats Wistar femelles témoins et traitées avec le Green muscle sont présentés dans les figures 4.31 et le tableau 4.28 et sur les tableaux 44, 45, 46 et 47 de l'annexe 2.

Il est évident que la surveillance du poids corporel des animaux expérimentés fournit des informations sur l'état général de santé. Tous les rats, témoins et traités, ont montré une croissance pondérale au cours de l'expérimentation. L'analyse statistique des différences en poids par rapport au début de l'expérimentation montre un changement hautement significatif pour les quatre lots de rats ($p < 0.01$). En comparaison avec le lot témoin, l'augmentation relative des poids corporels (%) révèle des différences non significatives pour les trois lots traités ($p > 0,05$). Cela indique que l'administration, pendant 30 jours, des conidies de *M. anisopliae* en formulation huileuse n'a pas interagit avec l'évolution pondérale relatives des rats traités.

Tableau 4.28 : Effet de Green muscle sur l'évolution des poids corporels des rats et sur les poids absolus et relatifs du foie, des reins et des poumons

| Poids | | Témoin | 1/10 DL50 GM | 1/100 DL50 GM | 1/200 DL50 GM |
|-----------|---------------------------|--------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|
| Corporels | Début exp. (g) | 132,8 ± 3,11 | 142,6 ± 5,03 | 151 ± 4,15 | 149,6 ± 5,86 |
| | Fin exp. (g) | 181 ± 4,00 (***) | 195,60 ± 8,50 (***) | 201 ± 4,06 (***) | 198,6 ± 7,197 (***) |
| | Augmentation relative (%) | 36,33 ± 2,82 (a) (b) | 37,21 ± 5,03 (b) | 32,57 ± 4,15 (a) (b) | 31,13 ± 5,13 (a) |
| Foie | Poids absolue (mg) | 5949,82 ± 72,06 | 6040,1 ± 60,61 | 6438,02 ± 68,28 | 6142,02 ± 40,68 |
| | Poids relatif (%) | 3,285 ± 0,04 (b) | 3,09 ± 0,12 (**)(a) | 3,204 ± 0,05 (*)(a) (b) | 3,092 ± 0,1 (**)(a) |
| Reins | Poids absolue (mg) | 1076 ± 39,93 | 1106,7 ± 71,22 | 1165,88 ± 71,7 | 1152,78 ± 39,72 |
| | Poids relatif (%) | 0,591 ± 0,01 (a) (b) | 0,568 ± 0,02 (a) | 0,578 ± 0,02 (a) (b) | 0,610 ± 0,02 (b) |
| Poumons | Poids absolue (mg) | 1909,6 ± 22,04 | 2005,4 ± 58,63 | 2081 ± 77,10 | 2010,8 ± 12,03 |
| | Poids relatif (%) | 1,055 ± 0,01 (a) | 1,026 ± 0,03 (a) | 1,035 ± 0,04 (a) | 1,014 ± 0,040 (a) |

Valeurs en moyennes ± écart type. exp : expérimentation la différence est statistiquement sig. (*) à $p < 0,05$, très sig. (**) à $0,02 < p < 0,05$ et hautement sig. (***) à $p < 0,01$. Les groupes homogènes (a) et (b) d'après le test de Tukey.

Les poids absolus (mg) des foies, des reins et des poumons des rats traités avec le biopesticide montrent de légères augmentations par rapports au témoin. Chez les rats traités avec le biopesticide à raison de 1/10DL 50 GM, nous avons enregistré, par rapport au témoin, de légères diminutions non significatives des poids relatifs des poumons et des reins (%) ($p > 0,05$). Les poids relatifs des foies révèlent une différence significative chez les rats traités avec 1/100 DL50 et très significatives chez les traités avec 1/10 DL50 GM et 1/200 DL50 GM. Il est à noter qu'il existe des variations intra-groupes hétérogènes qui sont individu-dépendants.

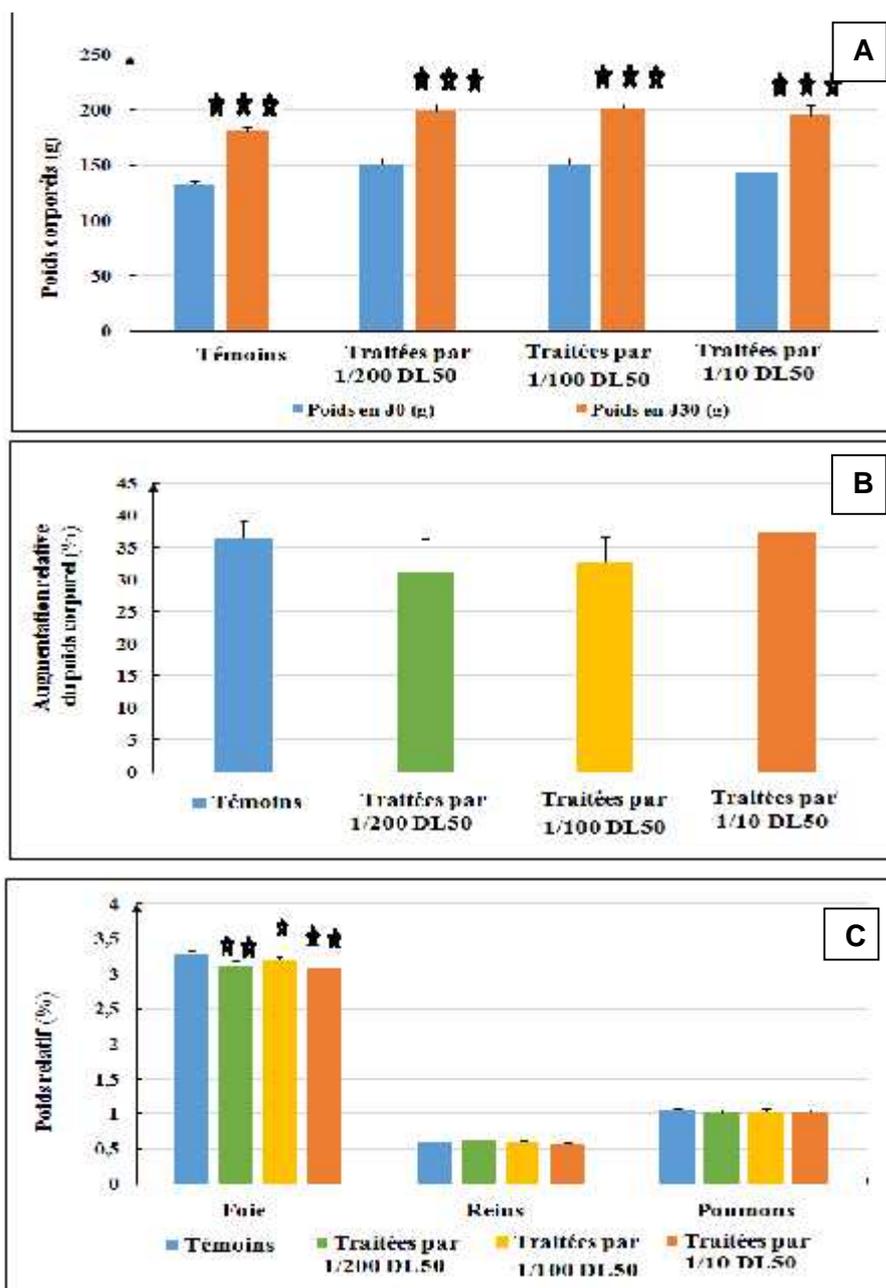


Figure 4.31: Effets de Green muscle sur l'évolution du poids corporels au cours de l'expérimentation (A), sur l'augmentation relative du poids corporel (B) et sur les poids relatifs du foie, des reins et des poumons (C) chez les rats Wistar.

Différence non sig. (), très sig (**) et hautement sig (***).

4.7.3 Effet des traitements avec GM sur quelques paramètres sanguins

4.6.3.1. Effet sur quelques paramètres hématologiques

Les résultats des variations de quelques paramètres de la formule de numération sanguine chez les rats femelles témoins et traitées avec le Green muscle et leurs

significations statistiques sont rassemblés dans la figure 4.32 et le tableau 4.29 ainsi que sur les tableaux de 48 à 53 de l'annexe 2

Tableau 4.29: Effet des traitements avec le biopesticide (GM) sur quelques paramètres hématologiques chez les rats Wistar

| Paramètres | Témoin | 1/10 DL50 GM | 1/100 DL50 GM | 1/200 DL50 GM |
|---|----------------------------|----------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| Globule blancs (GB) ($10^3/\text{mm}^3$) | 4,87 ± 0,26 (a) | 8,2 ± 1,73 (***) (b) | 5,25 ± 0,44 (a) | 5,30 ± 0,34 (a) |
| Globules rouges (GR) ($10^6/\text{mm}^3$) | 6,83 ± 0,21 (a) | 7,37 ± 0,15 (***) (b) | 7,035 ± 0,31 (c) | 6,44 ± 0,14 (c) |
| Hémoglobine (Hb) (g/l) | 12,47 ± 0,38 (a) | 13,2 ± 0,23 (**) (b) | 12,55 ± 0,17 (a) | 12,15 ± 0,53 (a) |
| Hématocrite (Ht) (%) | 38,80 ± 0,42 (a) | 41,8 ± 1,5 (*) (b) | 39,20 ± 0,35 (a) | 38,15 ± 2,02 (a) |
| Plaquettes (Plt) ($10^3/\text{mm}^3$) | 855 ± 21,43 (a) | 888,75 ± 11,09 (*) (b) | 868,75 ± 8,54 (a) (b) | 865,25 ± 16,8 (a) (b) |

Valeurs en moyennes ± écart type. La différence est significative (*) à $p < 0,05$, très significative (**) quand $0,02 < p < 0,05$ et hautement significative (***) à $p < 0,01$. (a), (b) et (c) groupes non significativement différents.

En comparaison avec le groupe témoin, il semble que l'administration répétée de *M. anisopliae* a plus au moins perturbé les paramètres hématologiques étudiés. Ces perturbations sont jugées non significatives ($P > 0,05$) chez les rats traitée avec la moyenne et la faible dose du biopesticide soit respectivement 20 mg /kg /jour et 10 mg /kg /jour.

Cependant, la formule numérique sanguine enregistrée chez le lot traité à 1/10 DL50 révèle des augmentations hautement significatives en nombre de leucocytes ($P = 0,0025$) et d'érythrocytes ($P = 0,007$) et très significative en taux de l'hémoglobine ($P = 0,018$). Nous avons noté également des augmentations significatives en taux de l'hématocrite ($P = 0,030$) et en nombre des thrombocytes (0,0312).

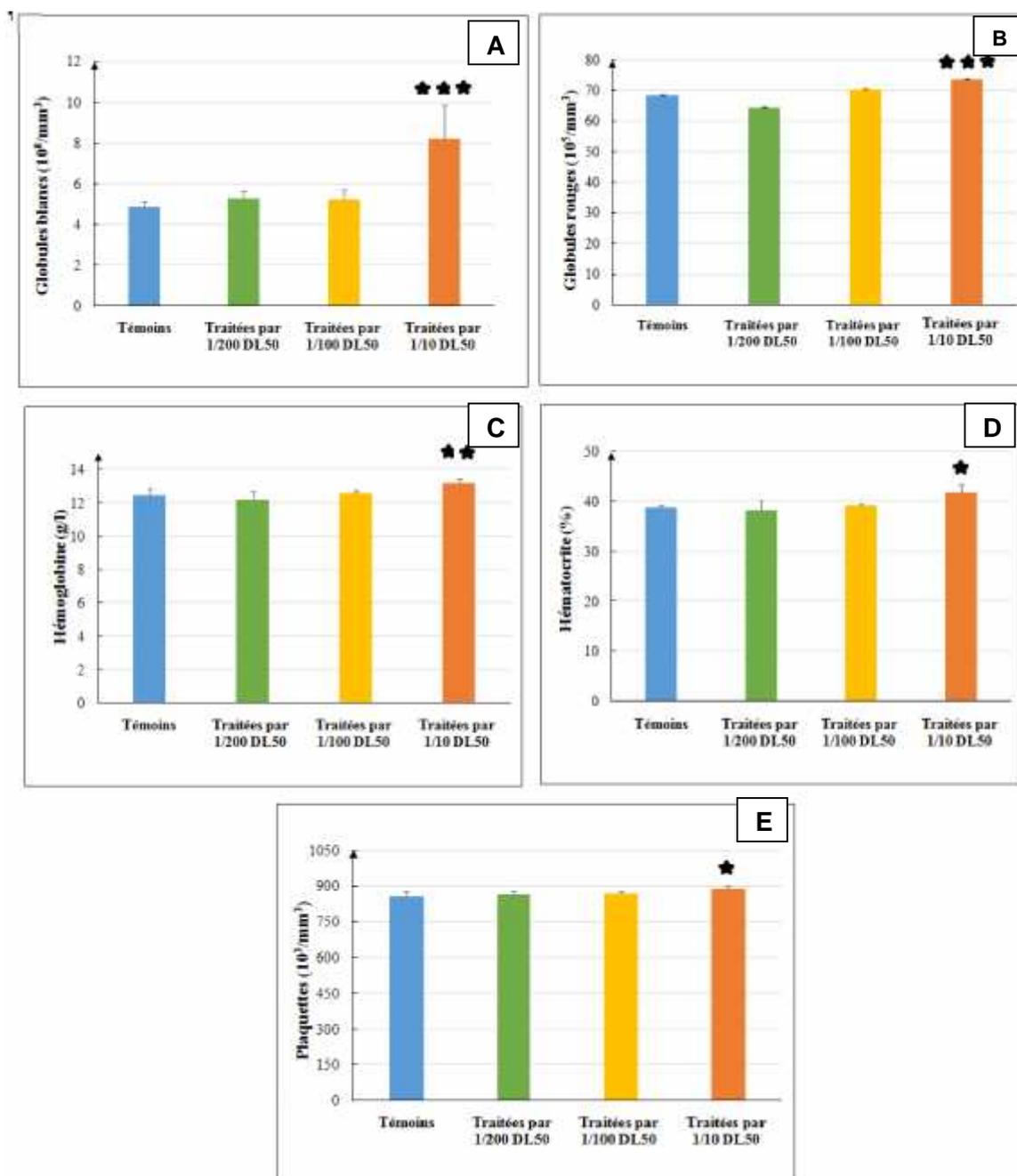


Figure 4.32: Effets de Green muscle sur les paramètres hématologiques GB (A), GR (B), Hb (C), Ht (D) et Plt (E) chez les rats Wistar.

Différence par rapport au lot témoin : non significative (), significative (*), très significative (**), et hautement significative (***)

4.7.3.2. Effet sur quelques paramètres biochimiques rénaux et hépatiques

Les résultats des variations de quelques paramètres biochimiques rénaux (l'urémie et la créatinémie) et hépatiques (les taux plasmatiques des transaminases ALAT et ASAT, de la phosphatase alcaline et des protides totaux) chez les rats témoins et traités avec le Green muscle et leurs significations statistiques sont rassemblés dans la figure 4.33 et le tableau 4.30 ainsi que sur les tableaux de 48 à 53 de l'annexe 2.

Tableau 4.30: Effet de Green muscle sur quelques paramètres biochimiques rénaux et hépatiques chez les rats Wistar

| Paramètres | Témoin | 1/10 DL50 | 1/100 DL50 | 1/200 DL50 |
|----------------------------------|--------------|---------------|---------------|---------------|
| Urée (g/l) | 0,375 ± 0,04 | 0,48 ± 0,11 | 0,400 ± 0,046 | 0,47 ± 0,01 |
| Créatinine (g/dl) | 3,75 ± 0,50 | 5,50 ± 1,73 | 4,5 ± 0,61 | 4,5 ± 0,61 |
| ASAT (GOT) (UI/l) | 170 ± 4,24 | 161 ± 8,08 | 169 ± 1,154 | 163,75 ± 2,99 |
| ALAT (GPT) (UI/l) | 79,00 ± 4,32 | 73,0 ± 4,16 | 73,50 ± 4,72 | 76,50 ± 5,45 |
| Phosphatase alcaline (PA) (UI/l) | 185,25 ± 4,5 | 177,25 ± 6,07 | 180,75 ± 6,5 | 183,5 ± 4,72 |
| Protides totaux (PT) (g/l) | 73,50 ± 2,89 | 74,50 ± 5,20 | 76,50 ± 4,04 | 77 ± 4,69 |

Valeurs en moyennes ± écart type. La différence est statistiquement non significative pour tous les paramètres biochimiques étudiés

Quand aux dosages des paramètres biochimiques rénaux après traitements avec le biopesticide à différentes doses. Ce dernier a révélé de faibles augmentations de l'urémie et de la créatinémie. Le dosage de quelques paramètres hépatiques montre de légères diminutions de la phosphatase alcaline et des transaminases (ALAT et ASAT) avec une faible augmentation du taux plasmatique des protéines totales.

Les variations de ces paramètres biochimiques sont jugées non significatives par rapport au témoin pour les trois lots traités avec le green muscle ($p > 0,05$). Ces résultats suggèrent que les fonctions rénale et hépatique des rats Wistar femelles ne sont pas altérées suite aux traitements avec le green muscle dans ces conditions de toxicité.

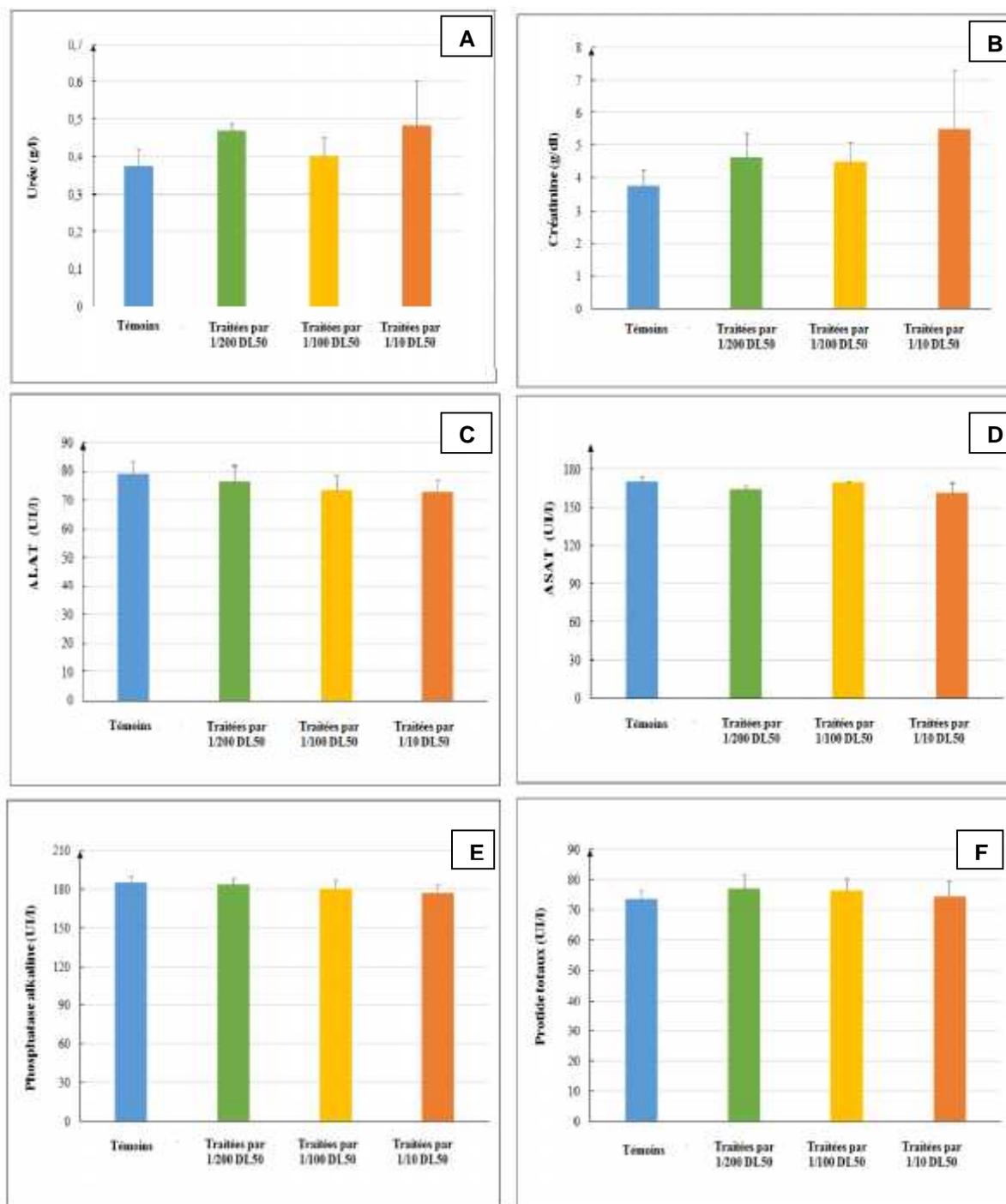


Figure 4.33 : Effet de Green muscle sur le taux plasmatique des paramètres biochimiques, urée (A), créatinine (B), ALAT (C), ASAT (D), PA (E) et PT (F) chez les rats Wistar femelles. (Différence non significative par rapport au témoin)

4.7.4. Effet des traitements avec GM sur l'histologie de quelques organes

4.7.4.1 Effets des traitements sur l'histologie des parenchymes rénaux

➤ Chez les rats témoins

L'architecture des reins des rats témoins révèle une organisation structurale classique. Le cortex rénal est composé de plusieurs glomérules de formes denses et arrondis. Ces glomérules, inclus dans l'espace de Bowman, sont entourés des tubes contournés proximaux et des tubes contournés distaux (Planche 4.12 - figure A). La médullaire présente une structure tubulaire nette. Les principaux tubules observés sont les tubes collecteurs et les portions larges et grêles de l'anse de Henlé (Planche 4.12 - figure B).

➤ Chez les rats traités avec le Green muscle

L'observation des coupes histologiques des reins des rats traités avec le Green muscle, à raison de 1/200 DL50 (10 mg /kg) pendant 30 jours, montre une structure très comparable à celle des rats témoins avec une fine capsule externe au-dessus du cortex. Nous remarquons des dilatations au niveau des capillaires glomérulaires (Planche 4.12 - figure C) et des capillaires interstitiels médullaires (Planche 4.12 - figure D).

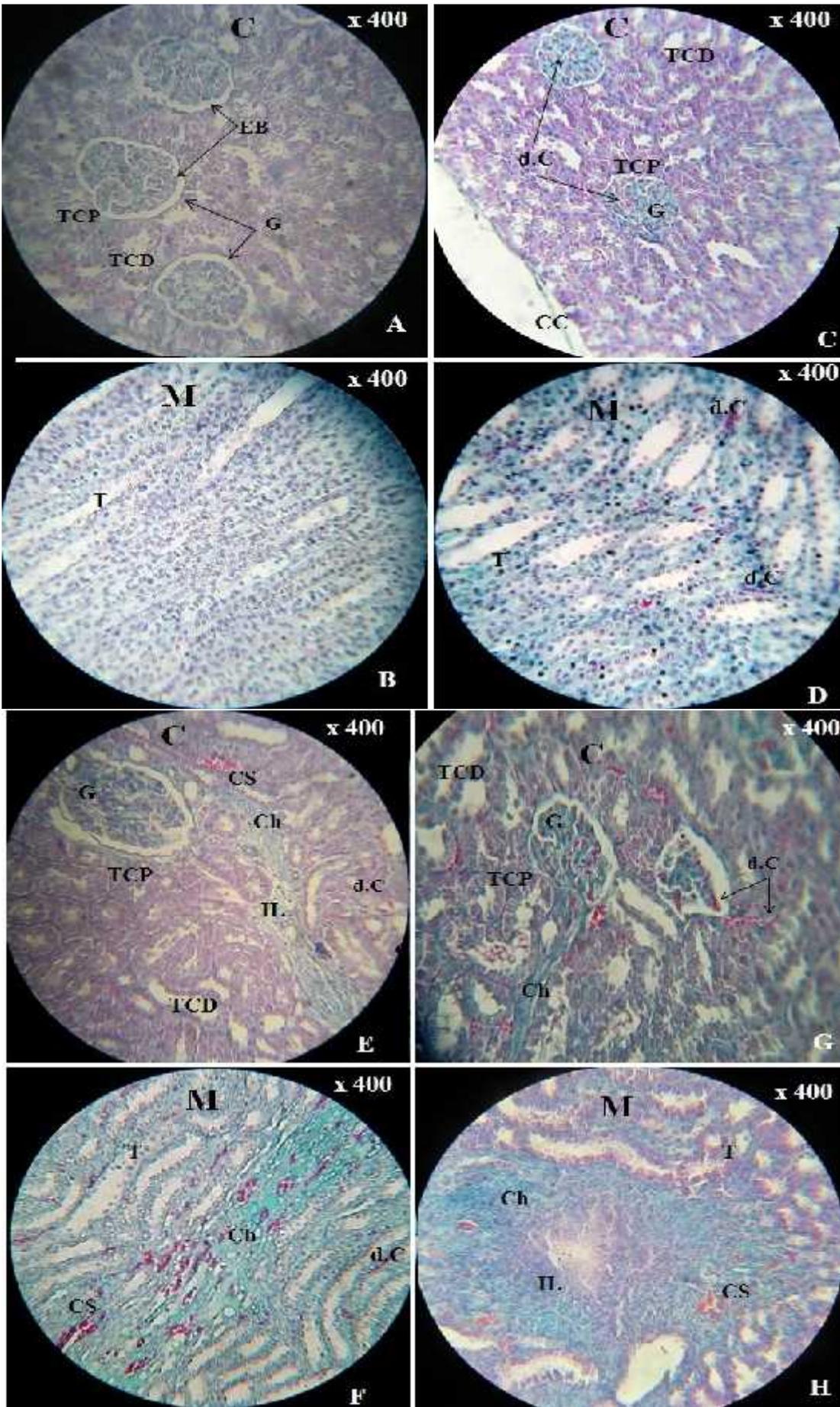
Le parenchyme rénal des rats femelles traitées avec le biopesticide à raison de 1/100 DL50 GM (20 mg /kg) montre quelques infiltrations leucocytaires et une faible congestion aux niveaux des boucles capillaires glomérulaires et du tissu interstitiel inter-tubulaire cortical (Planche 4.12 - figure E). Au niveau de la zone médullaire, l'étude microscopique révèle une dégénérescence tubulaire locale avec le développement de tissus conjonctif fibreux riche en capillaires dilatées (Planche 4.12 - figure -F). .

Chez les rats traités à 1/10 DL50 de GM (200 mg /kg) pendant 30 jours, l'histologie du cortex rénale montre une altération structurale modérée. Nous observons, par endroit, des lésions tubulo-interstitiels et une dilatation des capillaires accompagnées par des hémorragies. Quelques infiltrations leucocytaires sont remarquées au niveau des travées conjonctives .Nous remarquons le rétrécissement de quelques glomérules rénaux (Planche 4.12- figure G). La structure du parenchyme médullaire montre une dégénérescence tubulaire. Nous observons une fibrose extensive qui suggère la cicatrisation des

tubules détruits et présente quelques congestions sanguines modérée et des infiltrations leucocytaires (Planche 4.12 - figure H).

Planche 4.12: Photomicrographies des parenchymes rénaux chez les rats témoins (A et B) et traitées avec le biopesticide GM pendant 30 jours à raison de 1/200 DL50 GM (C et D), 1/100 DL50 GM (E et F) et 1/10 DL50 GM (G et H). Coloration Trichrome de Masson.

G: glomérule, **EB:** Espace de Bowman, **d.C:** dilatation des capillaires, **TCP:** Tube contourné proximale, **TCD:** Tube contourné distale, **C:** Cortex, **M:** médulla, **T:** Tubules, **CS:** congestion sanguine, **CC:** Capsule conjonctive, **IL:** infiltrations leucocytaires. **Ch:** Chorion,



4.7.4.2 Effets des traitements avec le Green muscle sur l'histologie des parenchymes hépatique

➤ Chez les rats témoins

Les coupes histologiques du foie étudiées chez les individus témoins présentent une organisation structurale normale. Les observations au microscope photonique montrent une architecture lobulaire marquée par la présence des travées hépatocytaires disposées de manière radiale au tour de la veine centrolobulaire. Les espaces portes sont situés aux angles du lobule. Les lames hépatocytaires sont bordées par des capillaires sinusoïdes (Planche 4.13–figure A).

➤ Chez les rats traités

Chez les individus traités par la faible dose de green muscle pendant 30 jours (1/200 DL50 de GM), les observations microscopiques révèlent la conservation de l'architecture lobulaire des parenchymes hépatiques. Nous notons la circulation de certains globules rouges au niveau des sinusoïdes dilatés, présent au tour des veines portes et des veines centrolobulaire (Planche 4.13– figure B).

L'histologie du parenchyme hépatique des rats femelles traitées avec le biopesticide à raison de 1/100 DL50 de GM, montre des infiltrations cellulaires au niveau des dilatations sinusoïdales et au niveau du tissu conjonctif fibreux diffus développé à proximité des veines centrolobulaires et des veines portes. Quelques hépatocytes présentent des vacuolisations cytoplasmiques (Planche 4.13 – figure C).

La structure microscopique du parenchyme hépatique des individus traités à raison de 1/10 DL50 de GM montre des altérations tissulaires semblables à celles observées chez les rats traitées avec la moyenne dose. Nous observons également des congestions sanguines modérées (Planche 4.13 - figure D).

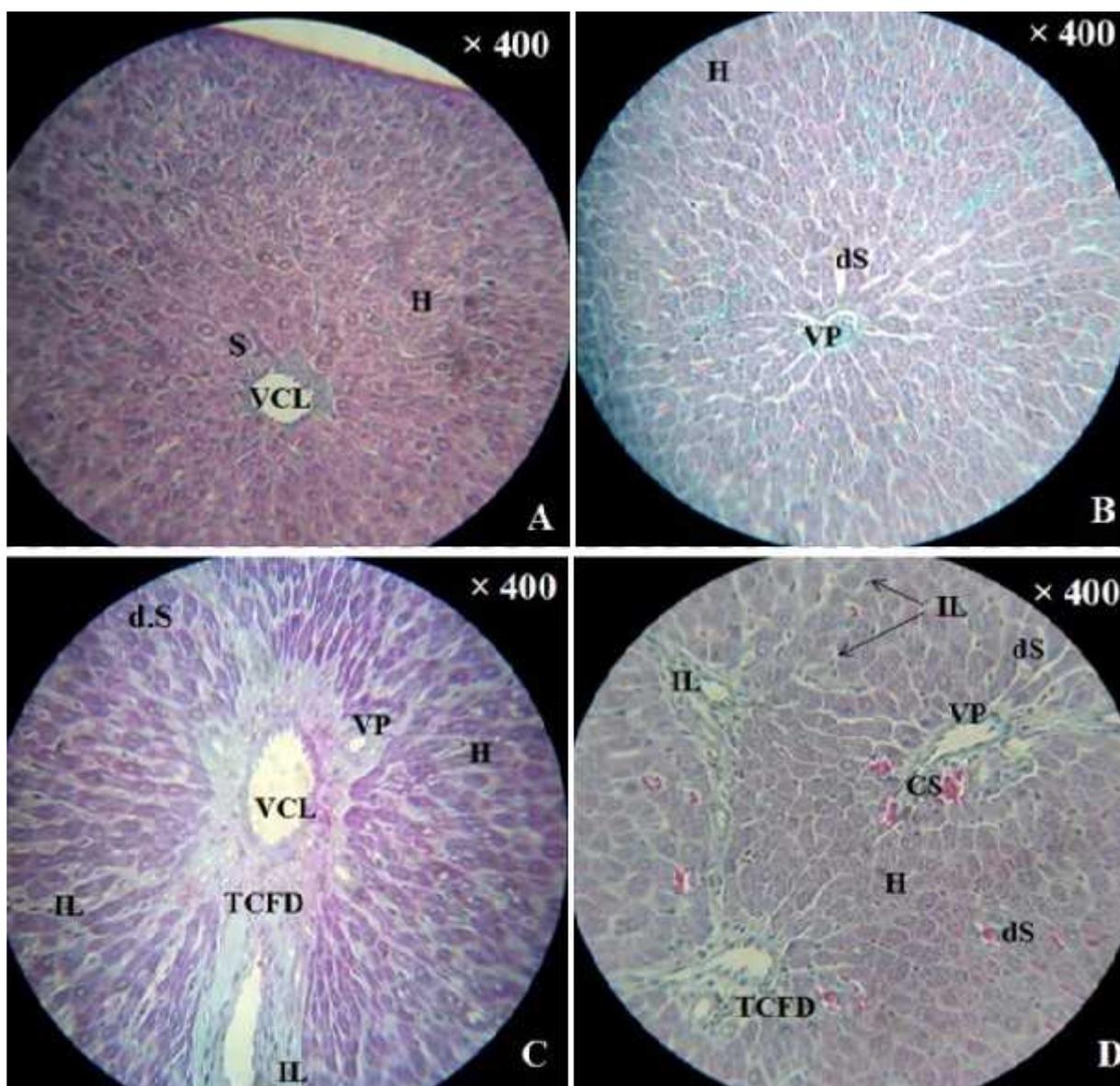


Planche 4.13 : Photomicrographies des parenchymes hépatiques chez les rats témoins (A) et traitées avec le biopesticide GM pendant 30 jours à raison de 1/200 DL50 GM (B), 1/100 DL50 GM (C) et 1/10 DL50 GM(D).

VCL: Veine centrolobulaire; **VP**: Veine porte; **dS**: dilatation des sinusoides; **H**: Hépatocyte; **TCFD**: Tissu conjonctif fibreux diffus; **IL**: Infiltration leucocytaire; **CS**: congestion sanguine, **S**: sinusoides.

4.7.4.3 Effets des traitements avec le Green muscle sur l'histologie des parenchymes pulmonaires

➤ Chez les rats témoins

L'observation des coupes histologiques des parenchymes pulmonaires des rats témoins a permis de mettre en évidence, des bronchioles terminaux et de très nombreux alvéoles de structures normales. Les bronchioles sont constituées d'une lumière plus au moins large, bordée par un épithélium disposé sur un chorion fin qui est entouré par une couche musculaire lisse peu épaisse. Les bronchioles terminaux, de petits diamètres, sont bordés par un épithélium à deux types de cellules, les cellules caliciforme et les cellules épithéliales (Planche 4.14 – figure A et B). Le tissu lymphoïde associé bronchique (BALT) est observé. Les sacs alvéolaires sont formés par plusieurs alvéoles séparées les unes des autres par des cloisons inter-alvéolaires formées de cellules, les pneumocytes, et se connectent aux canaux alvéolaires (Planche 4.14 –figure B).

➤ Chez les rats femelles traitées

Chez les individus traités avec la faible dose de Green muscle (1/200 DL50), pendant 30 jours, l'observation microscopique des coupes histologiques montre un aspect plus au moins semblable à celui des témoins. Cependant, nous remarquons l'épaississement des parois bronchiales terminales et des cloisons inter-alvéolaires (Planche 4.14 – figure C et D).

- Le parenchyme pulmonaire des rats traités avec 1/100 DL50 présente un épaississement plus remarquable des parois alvéolaires et bronchiales terminales et par conséquent la réduction du diamètre des sacs alvéolaires et des alvéoles. Une prolongation dans la largeur du tissu lymphoïde associé bronchique (BALT) est observée (Planche 4.14 –figure E et F).

L'infiltration abondante de leucocytes est notée au sein du chorion de l'épithélium bronchique (Planche 4.14 –figure F).

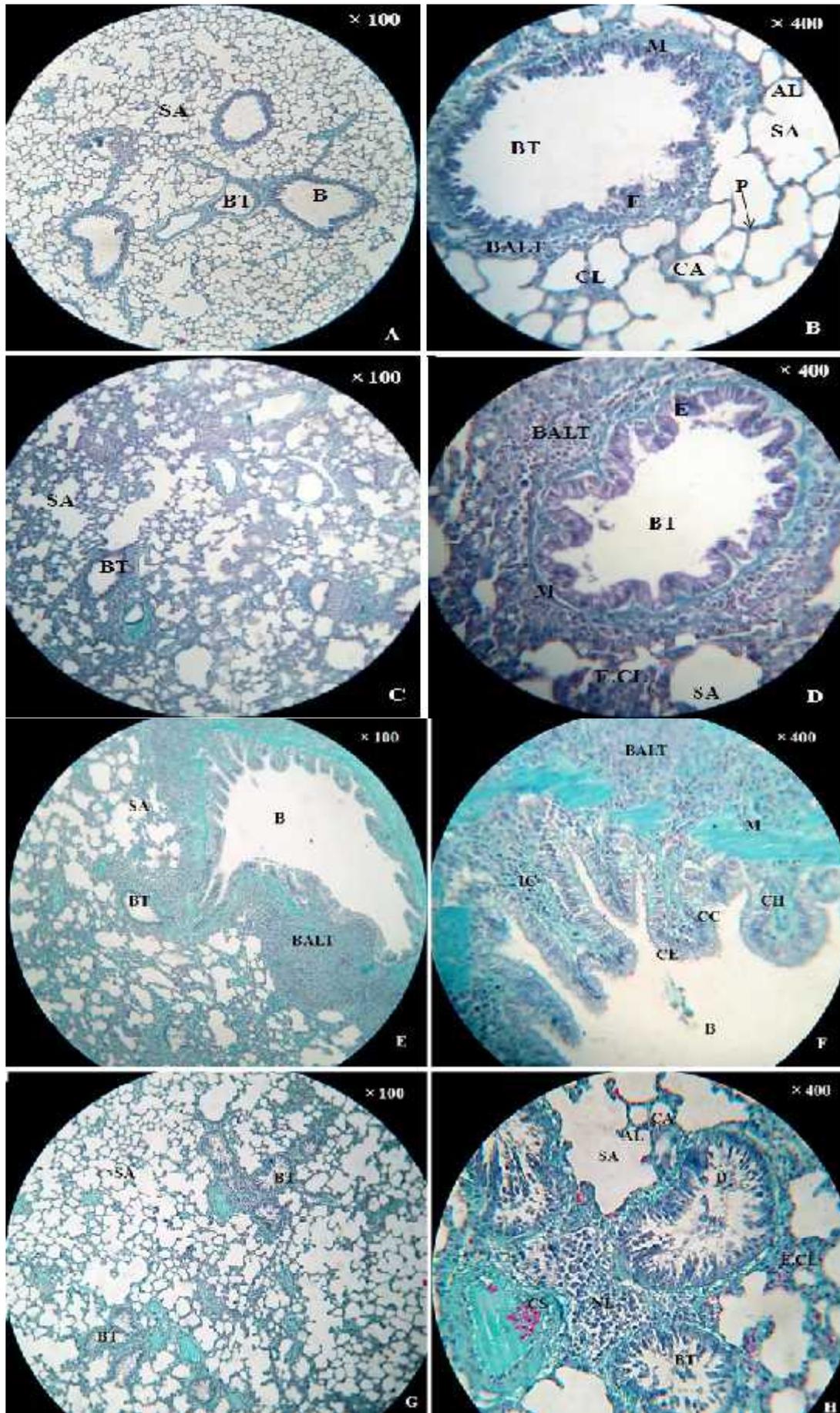
Les altérations citées ci-dessus deviennent plus remarquables chez les rats traités avec le Green muscle à raison de 1/10 DL 50 (Planche 4.14 –Figure G et H). L'étude des coupes histologiques pulmonaires montre des leucocytes avec des débris cellulaires dans la lumière des bronchioles dues à la desquamation de

l'assise épithéliale. Le parenchyme pulmonaire présente un nodule lymphatique (Planche 4.14 –Figure H).

Planche 4.14: Photomicrographies des parenchyms pulmonaires chez les rats témoins (A et B) et traités avec le biopesticide GM à raison de 1/200 DL50 GM (C et D), 1/100 DL50 GM (E et F) et 1/10 DL50 GM (G et H).

Coloration Trichrome de Masson. Grossissements : x 100 et x 400.

B: Bronchiole; **BT:** Bronchiole terminale; **CA:** canal alvéolaire; **E:** Epithélium; **M:** Muscle lisse; **SA:** Sac alvéolaire; **AL:** Alvéole; **P:** Pneumocyte, **CH:** Chorion; **CL:** Cloison alvéolaire; **E.CL:** Epaissement des cloisons alvéolaires; **CS:** Congestion sanguine; **D:** Desquamation; **CC:** Cellule caliciforme; **CE:** Cellule épithéliale; **IC:** infiltration leucocytaire; **BALT:** Tissus lymphoïde associé aux bronches.



4.7.4.4 Effets des traitements avec le Green muscle sur l'histologie de l'intestin grêle

➤ Chez les rats témoins

Les coupes histologiques au niveau de l'intestin grêle des individus témoins montrent une structure intacte et présentent à partir de la lumière vers l'extérieur (Planche 4.15 - Figure A, B et C)

- La muqueuse, constituée de glandes de Liberkhün et de villosités (Planche 4.15- Figure A, B). Chaque villosité est formée d'un épithélium simple prismatique à plateau strié agencé en cryptes s'ouvrant dans la lumière digestive. L'assise épithéliale est composée de deux types cellulaires; les entérocytes et les cellules caliciformes sécrétrices de mucus. Le chorion est riche en leucocytes, lymphocytes et plasmocytes en particulier avec la présence des lymphocytes intra-épithéliale (Planche 4.15- Figure B et C).

- La sous muqueuse formée du tissu conjonctif peu dense riche en vaisseaux sanguins.

- La musculieuse, couche musculaire relativement épaisse.

- La séreuse, une couche fine entoure l'intestin et est riche en vaisseaux lymphatiques (Planche 4.15- Figure B).

➤ Chez les rats traités

Suite à l'administration des conidies de *M. anisopliae* formulées en biopesticide, à raison de 10 mg/kg pendant 30 jours, l'histologie de l'intestin grêle révèle la conservation de l'architecture tissulaire pour toutes les coupes observées au microscope optique (Planche 4.15- Figure D, E et F). La muqueuse intestinale est très riche en plasmocytes et en lymphocytes (Planche 4.15 -Figure F).

La partie distale de l'intestin grêle, ou iléon, présente la particularité d'avoir un tissu lymphoïde intramuqueux. Ce dernier constitue les plaques de Peyer. Les coupes histologiques iléales des rats femelles traitées avec la moyenne concentration de Green muscle (1/100 DL50 de GM) révèlent l'abondance des agrégats lymphoïdes au niveau des plaque de payer ce qui cause une prolongation dans la largeur du tissu lymphoïde et par conséquent, l'effacement du relief villositaire et les structures glandulaires (Planche 4.15- Figure G). Nous

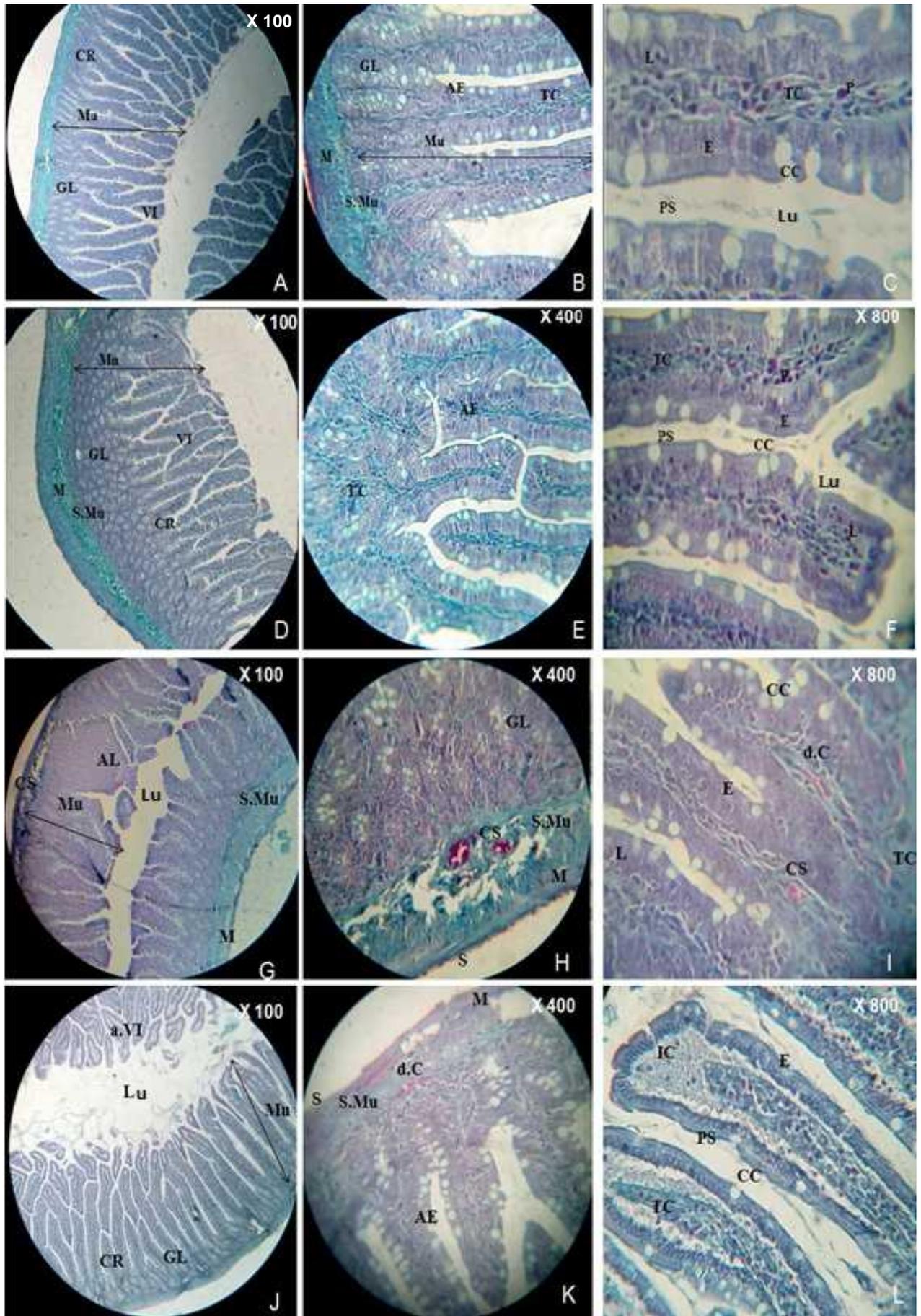
avons observé des congestions sanguines modérées au niveau de la sous muqueuse (Planche 4.15 - Figure G et H) et de la muqueuse avec la dilatation des capillaires sanguins et l'accumulation des hématies (Planche 4.15- Figure I).

Chez les rats traités avec 1/10 DL50 du biopesticide, les observations microscopiques de la sous muqueuse et de la musculature intestinales révèlent, par endroit, la dilatation des capillaires sanguins et l'accumulation des hématies. Nous notons également l'altération des structures glandulaires (Planche 4.15- Figure K et L). La muqueuse montrent, pour toutes les coupes histologiques étudiées, des modifications cyto-architecturales de l'assise épithéliale et du chorion des villosités intestinales. Ces changements sont marqués par un abondant infiltrat leucocytaire dans le chorion et par l'augmentation de la masse des lymphocytes intra-épithéliales. Ces images suggèrent la présence de foyer inflammatoire suite au passage important des conidies de *M. anisopliae* envahissant la muqueuse intestinale plus particulièrement au niveau des premières villosités face à la lumière intestinale (Planche 4.15- Figure H).

Planche 4.15: Photomicrographies de l'intestin grêle chez les rats Wistar témoin (A, B et C) et traités avec le Green muscle pendant 30 jours à raison de 1/200 DL50 (D, E et F), à 1/100 DL50 (G, H et I) et à 1/10 DL50 (J, K et L).

Coloration Trichrome de Masson.

Mu : la muqueuse. **F** : fibroblaste, **S.Mu**: sous-muqueuse. **M**: musculature. **S** : la séreuse. **Lu** : lumière intestinale. **L** : lymphocyte. **P** : plasmocyte. **TC** : le tissu conjonctif (la lamina propriae). **GL** : Glande de Liberkhün **AE**: Assise épithéliale, **E**: Entérocytes ; **CC**: Cellule caliciforme, **VI**: Villosités Intestinale, **d.C**: dilatation des capillaires, **IC**: Infiltrat cellulaire, **CS**: Congestion sanguine, **a.V**: atrophie des villosités, **FI** : Foyer inflammatoire, **LIE** : Lymphocyte intra épithéliale, **CR** : Crypte de régénération, **AL** : agrégat Lymphoïde, **PS** : plateau strié



4.7.5. Discussion

Dans nos conditions expérimentales, les rats femelles traitées avec le biopesticide, (GM), sont exposées aux *M. anisopliae* par deux voies au même temps, l'ingestion répétée et l'inhalation étendue des conidies du champignon entomopathogène. Durant les 30 jours de traitement à raison de 1/10 DL50 (200 mg de GM /Kg /jr ou 10^{10} spores /kg), 1/100 DL50 (20 mg de GM /kg /jr ou 10^9 spores /kg) et 1/200 DL50 (10 mg de GM /kg /jr ou 5×10^8 spores /kg), nous n'avons remarqué aucune anomalie clinique ou de comportement chez les rats Wistar. Suite à l'injection et à l'exposition des rats aux conidies de *M. anisopliae*, les lésions tissulaires sont limitées aux sites locaux où un grand nombre de spores sont recueillies sans aucun signe d'irritation cutanée ou oculaire [35].

Au cours de l'expérimentation, tous les rats ont montré une croissance hautement significative du poids corporels. Notre souche fongique n'a pas d'effet sur la croissance pondérale relative des rats femelles traitées par rapport aux rats témoins. Les mêmes remarques sont notées par plusieurs auteurs qui ont étudié l'activité toxique des champignons entomopathogènes vis-à-vis des cobayes. Nous citons les travaux de TORIELLO et al, [40], suite à l'administration unique orale de *M. anisopliae* var. *anisopliae* à des souris et de HADJ RABIA - HADDADJ, [2], lors de l'étude de la toxicité orale aigue de deux champignons entomopathogènes, *B. bassina* et *M. anisopliae* var. *acidum* chez les rats Wistar.

En comparaison avec le lot témoin, les perturbations des paramètres hématologiques étudiés sont jugées significatives uniquement chez le lot traité avec la forte dose du biopesticide. Le système hématopoïétique est l'une des cibles les plus stimulées suite à l'introduction des xénobiotiques et des micro-organismes. L'augmentation du nombre des GB est souvent considérée comme un signe évident de l'activation du système immunitaire de l'organisme et suggère la présence d'œdème et d'inflammation des tissus [239]. L'intensité de la réponse de la moelle osseuse est en corrélation avec la quantité des éléments phagocytés par les macrophages alvéolaires des poumons, ce qui suggère l'existence d'un lien étroit entre l'affection des poumons et l'inflammation systémique. Ces indications sont en corrélation avec nos résultats.

L'étude de l'évolution des paramètres sériques des marqueurs hépatiques n'a permis de révéler que de légères diminutions des transaminases et de la PA avec une faible augmentation des PT qui restent non significatives par rapport au témoin. Les paramètres biochimiques rénaux (urémie et la créatinémie) montrent de légères augmentations non significatives.

En microscopie optique, les coupes histologiques intestinales et celles réalisées au niveau des parenchymes rénaux, hépatiques et pulmonaires sont en faveur de la présence de foyers inflammatoires, témoignés par des vasodilatations associés à des infiltrations leucocytaires et des fibroses tissulaires. Les examens histopathologiques font ressortir l'influence de la dose administrée sur l'importance des dommages observés. Avec la dose sublétales (1/10 DL50 de GM), les altérations tissulaires s'accroissent. Au niveau des poumons et de la partie distale de l'intestin grêle (iléon), nous avons observé une prolongation dans la largeur des tissus lymphoïde associés, de la muqueuse iléale et des bronchioles (BALT) cela suggèrent que *M. anisopliae* affectent la barrière immunitaire au niveau de la muqueuse intestinale et respiratoire.

Les mécanismes de l'immunité innée sont les premiers à être mis en jeu. Cette immunité est assurée par la peau et les muqueuses, constituant une barrière physique et chimique qui empêche les micro-organismes d'accéder au tissu. L'immunité innée qui fait appel à la phagocytose, par des leucocytes, est le mécanisme immunitaire principal pour détruire les microbes pathogènes extracellulaires et plusieurs micro-organismes viraux, bactériens et fongiques [229]. Quand cette barrière est rompue, les germes pénètrent dans les tissus et les organes et déclenchent l'infection qui se traduit alors par des lésions et des inflammations. Après l'inflammation la cicatrisation passe par la constitution d'un nouveau tissu conjonctif fibreux qui va remplacer les tissus détruits au cours de l'inflammation [241]. Cela explique l'infiltration importante des leucocytes et le développement de chorion riche en fibres au niveau des parenchymes rénaux et au tour des veines portes et centrolobulaires des parenchymes hépatiques.

Chez les individus traités avec les trois doses du biopesticide, les poids absolus des foies, des reins et des poumons montrent de légères augmentations par rapport au témoin. Nos résultats révèlent que les traitements avec le Green muscle n'interfèrent pas avec les poids relatifs des reins et des poumons.

Cependant, nous avons enregistré des diminutions significative dans le poids relatif du foie chez les individus traités avec le Green muscle. RADHIKA et KALIWAL, [242], suggèrent que l'augmentation du poids absolue des organes chez les rats expérimentés est due à une fibrose extensive. D'autres auteurs expliquent cette augmentation par la présence des congestions sanguines et des vacuoles cytoplasmiques à l'origine d'œdèmes tissulaire [243]. Ces explications sont en corrélation avec nos observations histologiques.

Cependant, les études des aspects histologiques de l'effet de la toxicité aiguë de *Beauveria bassiana* [168], [2] et de *Metarhizium anisopliae* [2], n'ont révélé aucune lésion histologique sur les différents organes étudiés des rats et des souris traités. Une activité inflammatoire au niveau de la patte gauche des rats après injection locale de la suspension de spores de *B. bassiana*. Cette activité est traduite par un œdème et une augmentation du poids de la patte gauche. [168].

Nos observations au microscope optique ne nous offrent aucune preuve histologique de la germination des conidies de *Metarhizium* au niveau des tissus étudiés. SHADDUCK et al. [35], annonce que les conidies de *M. anisopliae* sont récupérées de l'estomac, des poumons et de la rate après 2 semaines d'exposition des souris aux spores, mais pas à la fin de la 3ème semaine.

TORIELLO et al. [40], ont testée la pathogénicité aiguë par voie orale chez les souris d'une souche de *M. anisopliae* var. *anisopliae* (10^8 conidies /individu). La preuve de la germination des conidies viables de cette souche est observée dans les ganglions lymphatiques, dans le foie et les poumons. L'étude histopathologique de ces organes ne révèle aucune réaction inflammatoire suggérant le statut non immunogène et non toxique de cette souche fongique. Cependant, une série d'études [43]. [49]. [245]. [246], a démontré que l'extrait brut de *M. anisopliae* contient des composants allergénique qui induisent chez les animaux de laboratoires, des réponses immunologiques, inflammatoires et histopathologiques caractéristiques de l'allergie. De pareilles affections allergiques au niveau des poumons sont également détectées chez les animaux de laboratoire traités avec *B. bassiana* [247].

ANAND et TIWARY, [248], ont étudié les réponses immunologiques et cytotoxiques de la dose intratrachéale aiguë (10^8 conidies /50 μ l) de suspension de conidies brute de *M. anisopliae* chez des souris BALB/c. Les niveaux significativement élevés de protéines totales plasmatiques, lactate déshydrogénase (LDH) et albumine et taux sérique élevé des IgE ont indiqué une cytotoxicité et suggèrent que *M. anisopliae* a la capacité d'augmenter une réponse allergénique chez la souris et, par conséquent, peut affecter la réponse allergique chez les personnes sensibles.

L'exposition accrue des humains et des animaux aux champignons en raison de leur utilisation commerciale et du nombre croissant des personnes immunodéprimées ont favorisé l'augmentation des cas de mycose causée par *Metarhizium* spp [249]. Il y a peu d'information disponible sur la sensibilité des espèces de *Metarhizium* et de ses isolats, notamment souches commerciales, aux antifongiques et aucune recommandation antifongique n'a été proposée à ces champignons [249]. Brancini et al. [250] ont démontré que *M. anisopliae* var. *acidum* a des profils de susceptibilité différentes et est moins résistante à plusieurs agents antifongiques par rapport à *M. anisopliae*, *M. brunneum* et *M. robertsii*. Ces résultats ont des implications importantes en choisissant les meilleurs marqueurs antifongiques pour traiter les rares cas de mycose humaine causés par ces champignons entomopathogène notamment avec les souches développées en biopesticide.

Dans nos conditions expérimentales, l'inhalation étendue et l'ingestion répétée des conidies de *M. anisopliae* pulvérisées sur l'appât alimentaire des rats sont probablement à l'origine des inflammations tissulaires observées à différents niveaux. Les perturbations des paramètres biochimiques sont statistiquement non significatives ce qui suggère que les altérations histologiques observées sont non fonctionnelles mais attribuées à des réponses inflammatoires normales et bien attendues après l'administration répétée des conidies de *Metarhizium*. De telles particules étrangères sont immunogènes et donc à l'origine des anomalies notées au niveau systémique et tissulaire chez les rats Wistar.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Notre travail a été entrepris dans le but de contribuer à apporter quelques connaissances concernant les effets de l'insecticide MIDA® (imidaclopride) et du biopesticide Green muscle® (*Metarhizium anisopliae* var. *acidum*) sur un fléau d'une importance économique capitale, le criquet marocain. Et ce dans les conditions de terrain et de laboratoire. Nous avons étudié la caractérisation de notre champignon entomopathogène en testant différents facteurs de viabilité, à savoir température, substrat nutritionnel et humidité, sur quelques paramètres biologiques qui nous renseignent sur l'importance du développement mycélien. Nous avons évalué également quelques aspects toxicologiques des deux produits sur les plans systémique et histologique et sur la croissance pondérale d'un mammifère, les rats Wistar femelle.

Nous avons évalué l'efficacité des doses réduites de l'imidaclopride appliquées en UBV contre les larves de la sauterelle marocaine dans les conditions de terrain. L'insecticide pulvérisé sur la végétation engendre un effet répulsif et anti-appétant. Les criquets contaminés présentent les symptômes de neurotoxicité. Les concentrations réduites jusqu'à 1/4 de la dose recommandée ont un effet «Knock-Down» en une heure. L'action létale significative est atteinte dans les 24h qui suivent l'application avec les doses réduites jusqu'à 1/8. Dans nos conditions de traitement, l'imidaclopride a montré une faible persistance d'action. Les taux de mortalité enregistrés 72h après la libération des larves dans les enclos traités avec la dose recommandée ne dépassent pas 40%. L'imidaclopride peut être appliqué pour le contrôle des larves de la sauterelle marocaine à faible doses et sans avoir une longue persistance nocive pour l'environnement. Le choix de l'insecticide et les bonnes stratégies de pulvérisation peuvent rendre ainsi possible de diminuer (au moins de la moitié) les quantités utilisées et d'éviter les problèmes de résistance vis-à-vis des insecticides couramment appliqués, tout en préservant la même efficacité.

L'étude des effets du biopesticide, Green muscle sur quelques paramètres biophysiques des larves de *D. maroccanus* dans les conditions de terrain nous a permis d'obtenir les résultats suivants :

- ❖ Quelques jours après traitement, les insectes sont inspectés pour des signes d'infection avec *M. anisopliae*. Les larves sont devenues clairement affaiblies ce qui augmente la susceptibilité de la population traitées à la prédation. Des changements morphologiques ont affectés les individus morts. Ces derniers prennent une coloration

rougeâtre et se momifient. Le phénomène de la muscardine verte est noté, une couche poudreuse de spores recouvre progressivement quelques cadavres mis en incubation. Dans les conditions sèches de terrain, la sporulation s'est passée au niveau du tégument interne, ce qui est constaté après dissection. Alors qu'aucune larve témoin n'a montré ces symptômes.

❖ L'activité acridicide de Green muscle® a prouvée son efficacité contre les larves de criquet marocain. Au 9^e jour après traitement, les taux de mortalité ont atteint 57,5 % ± 3,53, 46,22 % ± 2,51 et 30,31 % ± 4,28, dans respectivement les parcelles traitées avec 50 g /ha, 25 g /ha et 12,5 g /ha contre 8,67 % ± 6,60 enregistré dans la parcelle témoin. Il résulte que la durée de survie de *D. maroccanus* en plein champs dépend de la dose appliquée. En terme d'efficacité, la dose de $2,5 \cdot 10^{12}$ spores /ha (50 g/ha) est la plus performante avec un taux d'efficacité de 53,20% contre 41,80 % et 25 % pour les doses $1,25 \cdot 10^{12}$ conidies /ha et $6,25 \cdot 10^{11}$ conidies /ha.

❖ L'infection fongique s'est révélée par des lésions tissulaires progressives notées au niveau du tégument et du tube digestif. Ces dommages sont, probablement, à l'origine de la réduction de la voracité et de la motricité avec perturbation de la mue larvaire remarqués chez les criquets avant de succomber au traitement.

- Chez les larves provenant des enclos de terrain traités à 50 g/ha, des altérations histo-pathologiques de la cuticule sont apparues dès le 3^e jour après infection, nous avons observé une disparition complète de l'épicuticule et une nette diminution dans l'épaisseur de l'exocuticule et de l'endocuticule. L'unité infectieuse du champignon entomopathogène, la spore, a été repérée dans les parties de la cuticule digérée. Les traitements avec les doses plus faibles, 25 et 12,5 g/ha, montrent des altérations tissulaires semblables mais plus tardives.

- Au niveau intestinal, la microscopie optique montre des modifications cyto-architecturales installées dès le 3^e jour après traitement à 50 g/ha. Le champignon entomopathogène a affecté la structure caractéristique du stomodeum et des villosités intestinales des cæca gastriques, marqués par la destruction des épithéliums et l'altération des muscles. Au niveau du proctodeum, les altérations sont moins importantes et plus tardives. Le 7^e jour de l'infection au *Metarhizium*, le mésentéron et le cæcum gastrique sont les plus endommagés par l'altération de l'architecture épithéliale et la présence des signes typiques de nécrose et d'ulcération.

❖ L'entomopathogène colonise l'hémolymphe de l'hôte dès le 3^e jour après traitement et exerce un effet cytopathologique sur les hémocytes. Cet effet se traduit

par l'apparition des altérations structurales et la perturbation de l'hémogramme. Nous avons noté des diminutions significatives en nombre moyen total et différentiel des plasmocytes, prohémostocytes et granulocytes. Les altérations observées sont plus importantes le 5^e jour après traitement et induisent, probablement, des changements dans les défenses antimicrobiennes entraînant la mort des criquets par septicémie. La virulence du *M. anisopliae* dépend de la concentration en spores qui envahit l'hémolymphe et s'est montré efficace du moment que ce champignon entomopathogène a échappé à la barrière phagocytaire du système immunitaire des individus traités.

L'étude de l'effet des températures (18°C, 24°C, 28°C et 38°C) et des milieux de culture (PDA, MALT et V8) sur la croissance et la sporulation a apporté des informations complémentaires, nous renseignant sur le comportement écologique de notre souche fongique. Cette dernière est peu exigeante et se développe à des degrés variables selon les facteurs étudiés. Les températures 24°C et 28°C sont les plus adaptées pour une meilleure croissance mycélienne de *M. anisopliae* obtenue sur les milieux PDA et V8. La croissance radiale la plus faible est enregistrée sur le milieu MALT incubé à 18°C suivis des milieux PDA et puis le V8. Les meilleurs gains de poids, pour toutes les périodes d'incubation étudiées, sont obtenus à la température 38°C sur le milieu PDA, suivi du milieu V8 et puis le MALT. La plus faible croissance pondérale, après 15 jours d'incubation, est obtenue sur le milieu MALT incubé à 18°C. L'analyse du modèle G.L.M montre que la croissance mycélienne de notre souche est significativement influencée par les facteurs, température, milieux de culture et période d'incubation étudiés en interaction ($p < 0,05$). Cependant, la croissance pondérale ne montre pas de différence significative pour l'interaction des paramètres milieux de culture et période d'incubation. De même, la production des spores est influencée significativement par la température et la nature du substrat cultural. La meilleure sporulation ($7,163 \times 10^6$ spores /ml) est obtenue sur le milieu PDA d'abord incubé à 28°C et puis à 38°C ($7,063 \times 10^6$ spores /ml). A 18°C, nous avons enregistré la plus faible sporulation de notre champignon obtenue sur PDA. Les faibles températures (18°C) ralentissent la fructification de *M. anisopliae*, alors que les fortes températures l'accélèrent. Le MALT semble être moins adapté pour la sporulation de notre souche par rapport aux autres milieux étudiés.

Les résultats de l'analyse de la variance relative à l'effet des différentes teneurs en activité de l'eau (a.w) sur la sporulation de *M. anisopliae* sur différents milieux PDA,

MALT, V8 et Baath révèlent des effets hautement significatifs. La production des spores évolue parallèlement avec l'évolution des teneurs en a.w. En effet, pour une activité de 0,99 nous avons obtenu la meilleure concentration en spores sur le milieu V8 qui s'évalue à $1,976 \times 10^6$ spores /ml puis diminue progressivement pour atteindre le plus faible nombre de spores avec la plus faible a.w (0,75) obtenue sur le milieu MALT ($8,5 \times 10^4$ spores /ml). Nos résultats suggèrent que le milieu V8 semble offrir les meilleures conditions à notre champignon pour la germination des spores à différentes teneurs en a.w comparativement au MALT, Baath et au PDA dont l'action est très proche.

Dans les conditions de laboratoire, nous avons rapproché l'aspect lutte avec des doses sublétales de l'imidaclopride appliqué à raison de 50 μ l (D1), 100 μ l (D2), 200 μ l (D3), diluées chacune dans 100ml d'eau distillé. Avec D1 et D2, 100% de mortalité des L5 est retardé jusqu'à 84h après traitement. L'analyse de l'ANOVA révèle que le stade larvaire a un effet non significatif sur les mortalités enregistrées ($p > 0,05$). Cependant les facteurs dose et temps après traitement influencent d'une manière hautement significative. La valeur de la DL50 la plus petite est enregistrée chez les L3 (28,23 μ l) après 48h et la plus grande est notée chez les L5 (562,34 μ l) après 24h. Les valeurs de TL50 varient d'une concentration à une autre. La durée la plus élevée (1 jr et 17,3h) est obtenu chez les L5 en appliquant la faible dose. Alors que la durée la plus courte (1 jr et 5,8h) est enregistrée chez les L3 traitées avec la forte dose.

Dans les conditions de laboratoire, notre souche fongique s'est montrée efficace contre les larves de *D. maroccanus* traitées avec $1,2 \times 10^3$ spores /ml (D1), $1,2 \times 10^5$ spores /ml (D2) et $1,2 \times 10^7$ spores /ml (D3). Plus la concentration de l'inoculum est élevée et plus les mortalités le sont et surviennent plus rapidement. L'analyse de la variance révèle un effet hautement significatif des mortalités pour les facteurs dose appliquée et temps. Les stades larvaires avancés résistent plus aux faibles doses des traitements. Le traitement avec la D1 donne un TL50 de 7,27 j pour les L3 et 8,01 j pour les L5. Tandis que le traitement des L4 avec les concentrations D1, D2 et D3 montrent des TL50 de 7,45 j, 7,08 j et 6,60 j respectivement. Les valeurs des DL50 et DL90 augmentent avec l'avancement du stade larvaire et diminue en fonction du temps. Nous avons noté le 6^e jour après traitement les DL50 suivantes $1,3 \times 10^3$ spores/ml, $1,5 \times 10^4$ spores/ml et $1,2 \times 10^5$ spores/ml pour respectivement les L3, L4 et L5.

Dans un autre volet, nous avons étudié la toxicité de l'imidaclopride, administré par voie orale à raison de 1/10 et 1/80 DL50 pendant 14 jours. En comparaison avec les rats Wistar témoins, nos résultats suggèrent que l'imidaclopride interfère

significativement avec l'évolution pondérale relative des rats femelles traités. Cependant, les traitements avec l'imidaclopride n'ont pas d'effet sur le poids rénal et hépatique des animaux expérimentés. Chez les rats traités avec la forte dose, la formule numérique sanguine a montré une augmentation hautement significative en nombre des GB, et significative en taux de l'Hb. Quand au dosage des paramètres hépatiques, nous avons enregistré une diminution significative de l'ASAT, des diminutions non significatives de l'ALAT et de la PA et une augmentation non significative des PT. L'exploitation fonctionnelle rénale chez les rats traités à 1/80 DL50 montre une augmentation significative de l'urémie et non significative de la créatininémie comparativement aux rats témoins.

Au niveau structural, les traitements avec l'imidaclopride ont décelé de multiples lésions histologiques importantes au niveau des organes étudiés à savoir le foie, les reins et les poumons ainsi que la muqueuse intestinale. D'après les résultats nous pouvons conclure que l'imidaclopride provoque :

- Au niveau rénal, la désorganisation de l'architecture du parenchyme avec dégénérescence locale de l'épithélium tubulaire et glomérulaire et présence d'infiltrats leucocytaires.
- Au niveau du parenchyme hépatique, la présence de congestion vasculaire avec infiltration leucocytaire et une fibrose extensive en plus de la dilatation des capillaires sinusoides et des espaces portes.
- Au niveau des poumons, des hémorragies fréquentes avec des congestions intra-alvéolaires et l'épaississement des cloisons interalvéolaires.
- Au niveau des villosités intestinales, nous avons remarqué l'augmentation de la masse des agrégats lymphoïdes envahissant la muqueuse avec l'effacement des structures glandulaires par endroits, l'atrophie des assises épithéliales.

La forte dose par rapport à la faible dose a induit des effets plus remarquables considérés comme des signes de toxicité. Nous concluons que l'imidaclopride peut avoir des effets délétères à l'échelle cellulaire pour les mammifères.

Nous avons rapproché l'aspect biosécurité de Green muscle (GM) chez les rats Wistar femelles inoculées, pendant 30 jours, avec 200 mg de GM /Kg /j, 20 mg de GM /kg /j et 10 mg de GM /kg /j . *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*, sous sa forme formulée en biopesticide, s'est montré très peu agressif vis-à-vis des animaux traités. En comparaison avec le lot témoin, les traitements n'ont pas d'effets sur l'augmentation relative des poids corporels des rats et sur les poids relatifs des organes étudiés à

l'exception de celui du foie. Le traitement avec la forte dose a perturbé quelques paramètres hématologiques, nous avons enregistré des augmentations hautement significatives en nombre de leucocytes et d'érythrocytes, très significative en taux de l'hémoglobine et significatives très significatives en taux de l'hémoglobine en nombre de thrombocytes et en taux de l'hématocrite. Chez les individus traités avec le GM, l'exploration fonctionnelle hépatique a montré de légères diminutions non significatives de la PA et des transaminases (ALAT et ASAT) et une augmentation non significatives du taux plasmatique des PT. L'exploration fonctionnelle rénale a révélé des augmentations non significatives de l'urémie et de la créatinémie.

Les observations microscopiques des coupes histologiques provenant des rats traitées avec le biopesticide pendant 30 jours montrent quelques altérations cyto-architecturales. L'histologie des parenchymes pulmonaire, rénale et hépatique a révélé des lésions plus ou moins importantes et qui semblent être accentuées, en fonction de la quantité des conidies de *M. anisopliae* administrée chez les rats Wistar. Ces altérations sont témoignées par la présence des images de diapédèse leucocytaire, de fibroses tissulaires associées à une vasodilatation et une congestion sanguine modérée. L'étude des coupes intestinales des rats traités avec la faible dose du biopesticide, révèle la conservation de l'architecture tissulaire. Chez les rats traités avec 1/100 DL50, nous avons observé l'augmentation de la masse des agrégats lymphoïdes envahissant la muqueuse intestinale et la dilatation des capillaires. Avec la forte dose, la microscopie optique révèle l'abondance de l'infiltrat leucocytaire et la prolongation dans la largeur du tissu lymphoïde intramuqueux avec l'effacement, par endroits, du relief villositaire et des structures glandulaires iléales. Des vasodilatations sont observées au niveau de la sous muqueuse. Les lésions observées au niveau de la muqueuse intestinale sont bien attendues au niveau de cette première ligne de défense.

Les perturbations des paramètres biochimiques sont jugées non significatives par rapport au témoin. Cela suggère que les altérations tissulaires observées sont non fonctionnelles mais transitoires. Ces résultats reflètent le caractère immunogène et inflammatoire de l'administration massive, pendant 30 jours, des conidies du champignon entomopathogène. Nous suggérons l'absence d'effet toxique remarquable du Green muscle vis-à-vis des mammifères une fois appliqué en plein champ. Cependant son utilisation nécessite une certaine précaution (évitiez l'inhalation et le contact cutané ou oculaire avec les poussières de spores).

En revanche, Nos essais avec l'insecticide imidaclopride et le biopesticide green muscle ne sont qu'une ébauche dans les recherches sur la nature des produits et les doses appliqués en lutte antiacridienne, des essais complémentaires seront nécessaires et devront confirmer les performances mises en évidence. A partir de ce modeste travail, plusieurs voies de recherche s'ouvrent notamment Il s'avère très intéressant de:

- Tester des doses réduites des autres insecticides, moins toxiques que l'imidaclopride, et sur d'autres espèces acridiennes selon les nouvelles méthodes et techniques de traitement avec des dispositifs performants de pulvérisation en UBV. Ce qui vise à revoir les doses recommandées des insecticides chimiques.

- Rechercher les effets toxiques de l'imidaclopride sur d'autres organes des rats et surtout les effets sur la fonction reproductrice, le système endocrinien, nerveux et l'hématopoïèse. Et cela à fin de mieux sensibiliser les agriculteurs pour réduire les doses et les fréquences d'application des insecticides.

- Réaliser plusieurs études sur le terrain Algérien à grande échelle avec le Green muscle, dans des biotopes différents notamment sur le criquet pèlerin et le criquet migrateur pour adapter les techniques de traitement aux différentes conditions météorologiques en vue d'une éventuelle homologation du produit.

- Etudier la réponse du système immunitaire des criquets vis-à-vis des mycoses et l'utilisation de la thermorégulation (fièvre comportementale) par ce dernier à fin de réguler les perturbations physiologiques induites. Ces connaissances nous servirons à mieux maîtriser l'utilisation de Green Muscle

- Réaliser des études épidémiologiques afin de rechercher des souches locales de micro-organismes entomopathogènes pour augmenter l'efficacité de ces agents biologiques en vue d'une production en masse.

- Il serait souhaitable de développer d'une part et de combiner d'autre part les moyens de lutte jugés efficaces et de favoriser l'application des biopesticides, notamment le Green muscle, sur les premiers stades larvaires des criquets dans un programme de lutte intégrée. Ce qui contribue à promouvoir une agriculture biologique soucieuse et de préserver la biodiversité et l'humanité.

LISTE DES SYMBOLES ET DES ABREVIATIONS

A.L.A.T. : Alanine Amino-Transférase.

A.S.A.T. : Aspartate Amino-Transférase.

ADN: Acide Désoxyrube Nucléotide

ANOVA : ANalysis Of Variance

D R: Dose recommandée.

DL50/ DL90 : Dose létale 50/ Dose létale 90.

E.P.P.O: Organisation Européenne et Méditerranéenne pour la Protection des plantes

EC : Concentré émulsionnable.

EDTA : Acide Ethylène Diamine Tétracétique

FAO : Organisation des Nations Unies pour l'Agriculture et l'Alimentation.

FNS : Formule Numération Sanguine

GB : Globule blanc

GM : Green muscle

GR : Globule rouge

Hb : Hémoglobine

Ht : Hématocrite

I.N.P.V. : Institut National de la Protection des Végétaux.

Ig : Immunoglobuline

IGR : Les hormones dérégulateurs de croissance des insectes

L (1, 2, 3, 4, 5): Larve de différents stades (1^{er}, 2^{ème}, 3^{ème}, 4^{ème} et 5^{ème} stade)

LUBILOSA : Lutte Biologique contre les Locustes et les Sautereaux.

MC% : Pourcentage de mortalité corrigée.

OF : Formulation huileuse (Oil formulation)

PA : Phosphatase alcaline

PAN : Le phénylacétonitrile

Plt : Plaquette

PT : Protéines totales plasmatiques

S.P.S.S : Statistic Package for the Social Science.

TL50 : Temps létal 50

UBV : Ultra-Bas-Volume.

ANNEXES 1

Matériels et appareillages

| utilisés sur le terrain | utilisés lors des essais réalisés au laboratoire | Pour la dissection des animaux et pour l'étude de toxicité |
|---|---|---|
| <ul style="list-style-type: none"> -Vêtement et gants de protection - Verre gradué - Seau - Bidons de 5 l - Cages à insectes - Sachets de prélèvement - Filet fauchoir, - Ruban décimètre - Chronomètre - Papier oléosensible - Compteurs manuel - Balises - Piquets en fer - Film en plastique - Outils pour installer les enclos. - Pulvérisateurs de traitement en UVB - Appareillages pour les mesures de la vitesse de vent, de la température et de l'humidité | <ul style="list-style-type: none"> -Emporte-pièce - Erlen Meyer - Tubes à essai - Boîtes de Pétri - Milieux de culture - Béchers - Pipettes Pasteur - Flacons - Compteur manuel -Pied à coulisse - Hotte - Etuve - Loupe binoculaire - Balance de précision -microscope optique - Réfrigérateur - Bec bunsen - Papier filtre - Entonnoir - Cellule de malassez – Autoclave Bécher. Entonnoir. -Eprouvette graduée - Erlen meyer. - Parafilm. - Pince en bois. - Pissette d'eau distillée. - Spatule | <ul style="list-style-type: none"> - Loupe binoculaire - Epingles entomologique - Eppendorf -microtubes capillaire - Piluliers et flacon remplies de formol - Lames et lamelles. - Porte-lames - Trousse de dissection - Boîte à dissection - Balance électrique. - Balance de précision. - Bain d'eau thermostatée. - Centrifugeuse. - Microtome «Leica ». -Platine refroidissante - Réfrigérateur. - Cages en plastiques. - Mangeoires et biberons. - Sonde de gavage - Trousse de dissection - Pochette thermique. - Tube à EDTA - Tubes héparinés. - Boîtes en verre. - Cassette en plastique. - Moules en métal (porte-cassette). - Appareil photos numérique |

2. Fiches techniques2.1. Fiche technique de l'imidaclopride➤ **Noms commerciaux de l'imidaclopride et caractéristiques :**

Gaucho®, **Admir®**, **Intercept®** et **Confidor®** pour le traitement du sol.

Hachikusan® et **Premise®** pour le traitement des termites.

Mérit® et **Provado®** pour le soin professionnel des jardins et de gazon.

Avantage® pour le control des puces des chats et des chiens.

MIDA® possède un très large spectre d'action et est très efficace sur les pucerons et aleurodes qui ravagent les arbres fruitiers, agrumes et cucurbitacées. MIDA® permet une excellente protection des plantes en phase de croissance surtout si il est employé en hase d'irrigation grâce a sa puissante systémie. MIDA est hydrosoluble, non ionisable, incapable d'adhérer aux particules et il est non volatile sur le terrain.

➤ Caractéristiques

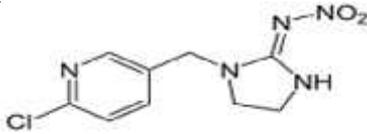
- J **Solubilité** : 609 mg.l⁻¹
- J **Hydrolyse à pH 7** : très stable,
- J **Coefficient de partage carbone organique-eau** : 247 cm³.g⁻¹. Ce paramètre, noté **Koc**, représente le potentiel de rétention de cette substance active sur la matière organique du sol. La mobilité de la matière active est réduite par son absorption sur les particules du sol.
- J **Durée de demi-vie** : 180 jours. Ce paramètre, noté DT50, représente le potentiel de dégradation de cette substance active, et sa vitesse de dégradation dans le sol.
- J **Stabilité** : instable si exposé au soleil (photolyse), mais stabilisée dans des récipients en polyéthylène, si ces derniers sont exposés à la lumière durant 24, 48, 72, 168 et 336 heures³¹.
- J **Pression de vapeur saturante** : à 20 °C: 1,54 g.cm⁻³¹ : négligeable
- J **Durée de demi-vie** : 180 jours, ce paramètre noté DT50 représente le potentiel et la vitesse de dégradation ce la matière active dans le sol..



Figure 1: Les insecticides appliqués sur terrain, MIDA et DECIS (Originale).

Tableau 1: Propriétés physico-chimiques des insecticides, imidaclopride et deltaméthrine

| Insecticide | Imidaclopride (MIDA) (AL-Sayeda, 2007) | Deltaméthrine (DECIS) (INRS,1987) |
|-------------|---|--------------------------------------|
| Structure | | |

| | | |
|-----------------------|---|---|
| |  | |
| Apparence | cristaux incolores ou poudre beige ¹ | poudre cristalline incolore, inodore |
| Formule brute | <u>C₉H₁₀ClN₅O₂</u> [Isomères] | <u>C₂₂H₁₉Br₂NO₃</u> [Isomères] |
| Masse molaire | 255,661 ± 0,012 g/mol C 42,28 %, H 3,94 %, Cl 13,87 %, N 27,39 %, O 12,52 % | 505,199 ± 0,022 g/mol C 52,3 %, H 3,79 %, Br 31,63 %, N 2,77 %, O 9,5 % |
| Température de fusion | 136,4 °C ou 143,8 °C (deux <u>structures cristallines</u>) | 100-102°C ⁴ |
| Solubilité | dans l'eau à 20 °C : 0,61 g·l ⁻¹¹ , 50–100 g·l ⁻¹ <u>dichlorométhane</u> | eau: <0,2 µg/l (25 °C) <u>acétone</u> : 500 g·L ⁻¹ (20 °C) <u>éthanol</u> : 15 g·L ⁻¹ (20 °C) |
| Masse volumique | 1–2 g·l ⁻¹ <u>isopropanol</u> | 0,5 g·cm ⁻³⁴ |
| Classe de toxicité | 2 et 3 | 3 |

2.2. Fiche technique de GREEN MUSCLE

➤ Information Générale

-) **Nom commercial du produit: GREEN MUSCLE**
-) **Catégorie d'usage:** Biopesticide (acridicide)
-) **Domaine d'application :** Lutte biologique antiacridienne
-) **Ravageurs cibles:** Les criquets de l'infra-ordre Acrididea (Orthoptera).
-) **Cultures:** Toutes cultures attaquées par les criquets

➤ Matière active

-) **Matière active :** Matériel biologique
-) **Nom scientifique de l'agent biologique :** *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* souche IMI 330189
-) **Stade de développement :** Conidies (spores).
-) **Nature de l'organisme :** un champignon pathogène appartenant au groupe des champignons mitosporiques, qui sont des anamorphes (stades asexués) de champignons dans l'embranchement Ascomycota. Il est très spécifique aux criquets. Parce que les criquets ont la capacité de détoxifier les toxines des autres champignons entomopathogènes, *M. acridum* a développé une autre stratégie pour tuer son hôte et dans le processus a perdu les gènes pour la synthèse de toxines.
-) **Contenu en matière active :** { 5*10¹⁰ spores sèches par g
-) **Viabilité à l'issue de l'usine :** Au moins 90%
-) **Impuretés :** moins d'1%
-) **Contenu en eau :** moins de 6%

) **Taille des particules** : moins de 60 μ m

➤ Formulation

) **Type de formulation**: TC

) **Liquide de mélange** : Gasoil ou une autre huile appropriée, par ex. 70% pétrole lampante plus 30% huile végétale.

) **Dose recommandée** : 50 g/ha dans 1 L (application aérienne) ou 2 L (application terrestre) de gasoil.

) **Doses appliquées** : 25 à 100 g/ha : selon la densité de la végétation et la viabilité des spores.

) **Efficacité au champ**: Une dose de 50 g/ha dans 1-4 L de gasoil (en fonction de la densité de la végétation) ou une autre huile appropriée réduit les populations par au moins 80% dans 3 semaines (ou moins dans la présence d'ennemis naturels tels que des oiseaux).

➤ Propriétés physico-chimiques

) **Apparence** : Poudre fine de couleur vert marin.

) **Odeur** : sans odeur particulière

) **Stabilité** : Durée de stockage > 5 ans à 4°C.

) **Incompatibilités** : Incompatible avec la plupart des fongicides

) **Compatibilité avec d'autres pesticides** : compatible avec certaines pesticides utilisés dans la lutte antiacridienne, par ex. les pyréthriinoïdes.

) **Stabilité en stockage** : Des données expérimentales montrent que des conidies sèches (5% contenu en eau) peuvent être stockées jusqu'à 2 ans à $\pm 20^{\circ}\text{C}$ et pendant plus de 3 ans à $< 10^{\circ}\text{C}$. Des modèles de stockage indiquent qu'une viabilité des conidies de >80% peut être maintenue pendant >10 ans, si le matériel technique est stocké dans des sachets imperméables sous réfrigération ($< 10^{\circ}\text{C}$). Sous des conditions de stockage tropicales, une durée de vie de >2 ans peut être attendue à des températures de nuit/jour de 20 - 30°C et approximativement 6 mois sous un régime de 30 - 40°C.

➤ Toxicité et pathogénicité

) **Toxicité acute orale (rat)** : $DL_{50} > 2$ g/kg poids vif

) **Toxicité acute dermique (rat)** : $DL_{50} > 2$ g/kg poids vif

) **Toxicité acute inhalation (rat)** : $CL_{50} > 17,25$ mg/kg poids vif

) **Toxicité intrapéritonéale (rat)** : $DL_{50} > 100$ mg/kg poids vif

) **Irritation œil (lapin)** : Oui

) **Irritation peau (lapin)** : Oui, mais exposition doit dépasser 24 h

) **Sensibilisation** : Très rare

) **Toxicité envers les poissons** : CL_{50} de 96 heures > 100 mg/L

) **Toxicité envers les abeilles** : $DL_{50} > 100$ μ g/individu (mortalité dans test au laboratoire due à la pathogénicité, pas la toxicité ; tests dans des ruches n'ont pas montré des signes d'intoxication ni de pathogénicité)

) **Toxicité envers les vers de terre** : $CL_{50} > 1$ g/kg de sol sec.

-) **Toxicité envers les oiseaux** : Non toxiques dans des tests d'alimentation contaminée.
-) **Phytotoxicité**: La matière active n'est pas phytotoxique. Le mélange dans les épandeurs n'est pas phytotoxique non plus si le volume d'application ne dépasse pas 5 L/ha.



Figure 2: Le biopesticide Green Muscle (IMI 330139) (a), le manuel d'utilisateur (b) et la fiche technique (c) (Originale).

2.3 Fiche technique du mode opératoire de l'études histologique

➤ Fixation et rinçage

Les organes prélevés sont trempés dans le formol dilué à 10 % pendant une semaine. Cette opération a pour but d'immobiliser et de conserver les structures en respectant dans la mesure du possible leur morphologie, et permet le durcissement des pièces prélevées.

Après fixation, les organes sont rincés à l'eau courante écoulee pendant 24 heures pour éliminer l'excès du fixateur.

➤ Déshydratation et éclaircissement

Le but de la déshydratation est d'éliminer l'eau à partir du tissu pour permettre ensuite l'imprégnation à la paraffine et cela par le passage des échantillons dans différents bains d'alcool éthylique à concentration croissante :

- Trois bains d'alcool 70°30 minutes chacun.
- Trois bains d'alcool 95°30 minutes chacun.
- Trois bains d'alcool 100°30 minutes chacun.

L'éclaircissement est effectué dans deux bains de xylène pendant 20 minutes chacun. Cette étape permet d'éliminer l'alcool à partir du tissu et le remplacer par le réactif de compensation (le xylène).

➤ Imprégnation à la paraffine

Dans un automate réglée à 58°C, les fragments sont imprégnés dans deux bains successifs d'une heure chacun : le premier bain de 50% de xylène et 50% de paraffine dissoute et le deuxième bain comprend que de la paraffine pure.

Ces trois dernières étapes ont été réalisées à l'aide d'un appareil de circulation.

➤ Inclusion à la paraffine et mise en bloc

L'inclusion est réalisée dans des cassettes en plastique selon les étapes suivantes :

- Écoulement de la paraffine dans des moules métalliques.
- Inclusion et orientation des fragments dans la paraffine.
- Placement des cassettes, sur lesquelles sont inscrits des informations sur l'échantillon.
- Refroidissement des blocs de paraffine sur une plaque métallique réfrigérée environ 10 minutes. Puis démoulage des blocs.

➤ Confection des coupes

Les blocs obtenus sont coupés au microtome «type Leica» avec une épaisseur de 5 µm pour le tube digestif et 10 µm pour la cuticule (difficulté à réaliser les coupes plus fines).

➤ Collage des rubans des coupes et leur séchage

Les rubans des coupes sont étalés dans un bain d'eau thermo statée (37°) puis récupérés et collés sur les lames gélatinées, suivi par le séchage de ces lames dans une étuve à 37°C pendant 24 à 48 heures.

➤ Déparaffinage et hydratation

Le déparaffinage sert à enlever la paraffine du tissu pour que les colorants puissent le pénétrer. Les coupes sont passées dans deux bains de xylène pendant 15 minutes chacun.

L'hydratation a pour objet de retirer le xylène du tissu et de le remplacer par l'eau. Les fragments sont placés dans trois bains d'éthanol : 100°, 96°, 70° d'une durée de trois minutes chacun.

➤ Coloration et déshydratation

Le but de la coloration est de visualiser les divers composants tissulaire et cellulaire. Dans notre étude on a appliqué la coloration de Trichrome de Masson C'est une coloration spécifique. Elle est utilisée pour mettre en évidence les éléments du tissu de soutien, en particulier le collagène ainsi les altérations tissulaires tel que les fibres et les inclusions.

➤ Montage et observation

Après le montage d'une lamelle sur chaque coupe à l'aide d'un Eukit, les lames sont séchées sur papier absorbant, nettoyées au xylène puis observées au microscope photonique aux différents grossissements X40, X100, X400, X1000. Les observations microscopiques sont réalisées avec un objectif

micrométrique et un dispositif de prise de photos au photomicroscope «Zeis» Au niveau du laboratoire d'anatomie pathologique à hôpital Hussein-Dey- Alger.

2.4. Fiche technique des colorations

➤ Coloration de Trichrome de Masson

- Un bain d'hématoxyline 10 sec
- Rinçage à l'eau courante.....5 min
- Un bain de Fuchsine Ponçeau.....2 min
- Rinçage rapide à l'eau courante
- Un bain d'acide phosphomolybdique.....15 min
- Un bain de Vert lumière..... 5 min
- Rinçage rapide à l'eau courante.

➤ Coloration May-Grünwald Giemsa (MGG)

- * Couvrir la lame par 20 gouttes du fixateur May-Grünwald pendant 3 minutes.
- * Ajouter quelques gouttes d'eau distillée sur la lame pendant une minute.
- * Enlever l'excès du fixateur par rinçage avec de l'eau courante.
- * Rajouter ensuite 40 gouttes de Giemsa sur la lame pendant 10 minutes.
- * Rincer la lame avec de l'eau courante. La lame est séchée ensuite à l'air libre.
- Pour la conservation des frottis on réalise un montage entre lame et lamelle on appliquant une fine couche du liquide de Faune.
- Observations microscopiques sont réalisées avec un objectif micrométrique et un dispositif de prise de photos au grossissement x 100 et x 400.

2.5. Fiche technique du test de germination

- Peser 0,2g des spores en poussière de Green muscle formulé
- Ajouter 1 ml de Tween 80, mélanger jusqu'à l'obtention d'une pâte
- diluer la pâte dans 99 ml de pétrole (a).
- Prélever 1 ml de (a) et diluer dans 9 ml de pétrole (b).
- Ensemencer avec trois gouttes de la solution (b) grâce à une pipette la boîte de pétri renfermant le milieu PDA sous des conditions stériles.
- Etaler avec un étaleur préalablement stérilisé au bec benzène.
- Refermer les boîtes de pétri, les étiqueter et les placer à 28°C pendant 24 heures.
- Couper un morceau d'agar (max. 2x2cm), le placer sur une lame, ajouter une goutte d'huile d'immersion et poser une lamelle.
- Observer au microscope, grossissement 100. Compter si possible avec deux compteurs manuels, l'un pour les spores ayant germé et l'autre pour les spores n'ayant pas germé, jusqu'à 300 spore. Compter toutes les spores dans un champ de vue avant de faire bouger la lame. Evitez de compter les spores qui se trouvent en agrégats.
- Répéter l'opération de comptage trois fois et calculer le taux de germination (TG) avec la formule suivante :

$$TG = \frac{a \times 100}{(a+b)} \quad \text{ou}$$

a : nombre de spores ayant germé

b : nombre de spores n'ayant pas germé

Tableau 2: Nombre de spores germés et non germés du test de germination

| | Champ 1 | Champ 2 | Champ 3 | Champ 4 | Champ 5 | Moyenne |
|--------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| Spores germées | 228 | 230 | 239 | 242 | 240 | 235,8 |
| Spores non germées | 72 | 70 | 61 | 58 | 60 | 64,2 |

Les résultats illustrés dans le tableau ci-dessus montrent que le Green muscle possède une viabilité de spores de 78,33 % après 48 heures.

2.6. La composition des milieux de cultures [170]

- Milieu de culture PDA (Potatos Dextros Agar)
 -) 200 g de pomme de terre (pour obtenir le jus).
 -) 20 g de Glucose
 -) 20 g de Gélose (Agar agar)
 -) 1000 ml d'eau distillée.
- Milieu MALT :
 -) 20 g d'extrait de MALT
 -) 20 g de gélose
 -) 1000 ml d'eau distillée
- Milieu V8 :
 -) 20 g extrait de V8
 -) 25 g de Ca Co3 dilué dans 200 ml de V8
 -) 20 g de gélose
 -) 1000 ml d'eau distillé.
- Milieu Baath :
 -) 20 g extrait de Malt
 -) 200 mg de CuSo4
 -) 20 g de gélose
 -) 1000 ml d'eau distillé

Une fois le milieu prêt, il est mis dans un autoclave pendant une durée de 20 à 30 minutes à 120°C pour stériliser son contenu.

Tableau 3 : Les réactifs du dosage de l'urée

| Réactifs | Composition | |
|----------|---------------------------------------|------------|
| R1 | - Uréase | 30000 U/L |
| | - Tampon phosphates pH 6,7 | 50 mmol/L |
| | - EDTA | 2 mmol/L |
| R2 | - Salicylate de sodium | 400 mmol/L |
| | - Nitroprusiate de sodium | 10 mmol/L |
| | - Hypochlorite de sodium | 7 mmol/L |
| | - Hydroxyde de sodium | 62 mmol/L |
| Etalon | - Parton primaire de détection d'urée | 50 mg/dl |

Tableau 4: Les réactifs du dosage de la créatinine

| Réactifs | Composition | |
|----------|-----------------------------|-------------|
| R1 | - Acide picrique | 38,2 mmol/L |
| | - Tampon non réactif | |
| R2 | - Hydroxyde de potassium | 900 mmol/L |
| | - Phosphate | 135 mmol/L |
| | - Conservateur | |
| | - Stabilisateur | |
| Etalon | Créatinine aqueuse 20 mg/l. | |

Tableau 5: Les réactifs du dosage de l'aspartate amino- transférase (A.S.A.T)

| Réactifs | Composition | |
|----------|--------------------------------|--------------|
| R1 | - TRIS pH 7,8 | 80 mmol/l. |
| | - L-aspartate | 200 mmol/l. |
| R2 | - NADH | 0,18 mmol/l. |
| | - Lactate déshydrogénase (LDH) | 800 UI/l. |
| | - Malate déshydrogénase (MD) | 600 UI/l. |
| | - α -Cetoglutarate | 12 mmol/l. |

Tableau 6 : Les réactifs du dosage de l'alanine amino-transférase (A.L.A.T.)

| Réactifs | Composition |
|----------|---|
| R1 | - TRIS pH 7, 8 100 mmol/l. - L-alanine 500 mmol/l. |
| R2 | - NADH 0,18 mmol/l. - Lactate déshydrogénase (LDH) 1200 U/l. - α -Cetoglutarate 15 mmol/l. |

Tableau 7: Les réactifs du dosage de la Phosphatase alcaline

| | | |
|----------------------|--------------------------------|--------------|
| Réactif 1 : Tampon | Diéthanolamine (DEA) pH 10,4 | 1 mmol / L |
| | Chlorure de Magnésium | 0,5 mmol / L |
| Réactif 2 : Substrat | p- Nitrophénylphosphate (pNPP) | |

Tableau 8: préparation solutions pour le dosage des protéines totales plasmatiques

| | Blanc | Etalon | Echantillon |
|-------------------------|-------|--------|-------------|
| Réactif de travail (ml) | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| Etalon (μ l) | - | 25 | - |
| Echantillon (μ l) | - | - | 25 |



Figure 4: Matériels et dispositifs de traitement au *M. anisopliae* dans de la région Marhoum. (a) : enclos de terrain. (b) : appareil de pulvérisation (Micronaire, AU 8115). (c) : papiers oléo-sensibles implantés dans la parcelle traitée.



Figure 5: Parcelle traitée avec l'imidaclopride à sa dose recommandée
1 : enclos de terrain pour évaluer l'effet par contact, **2** : enclos de terrain pour évaluer l'effet rémanent (Originale)

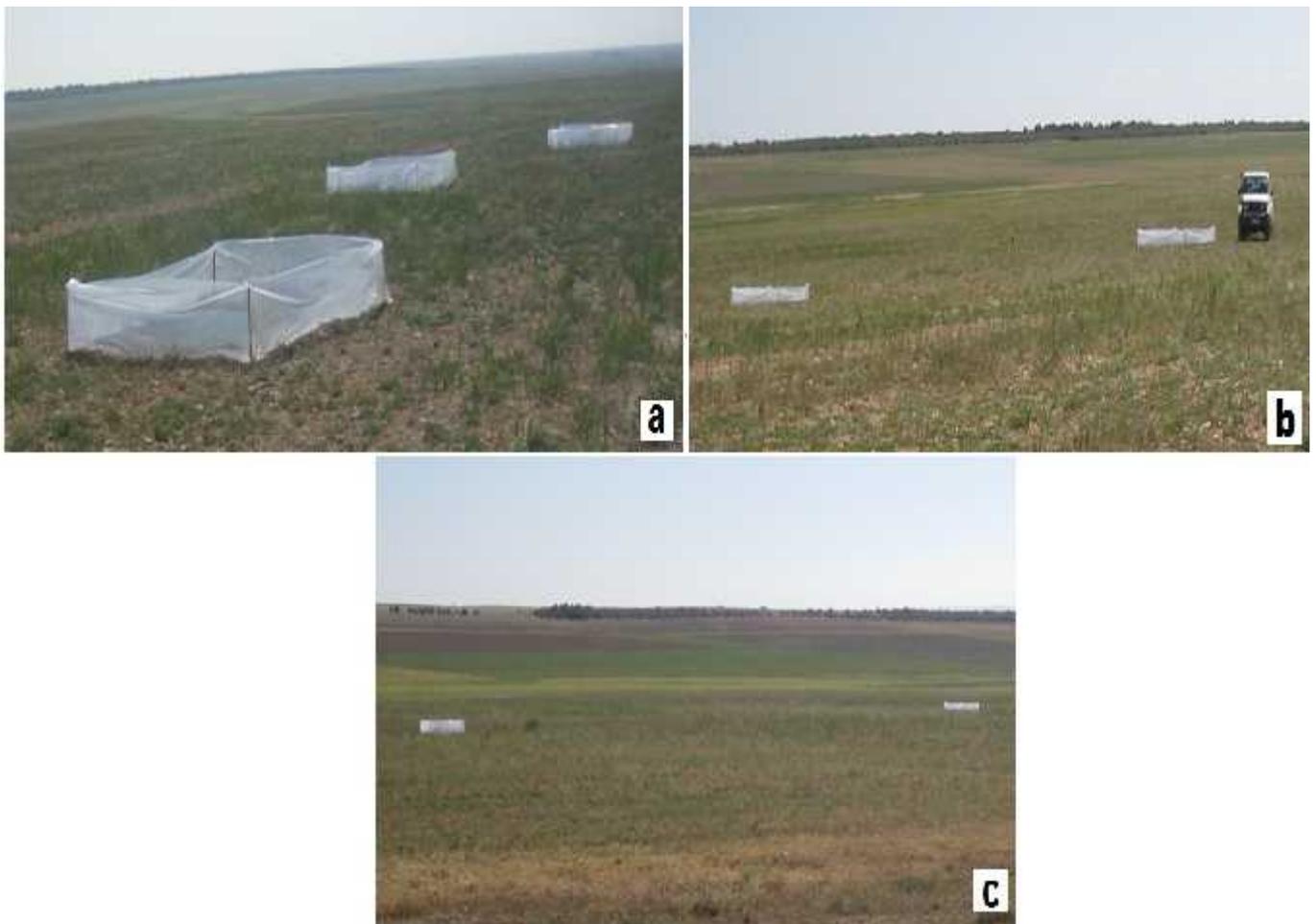


Figure 6: Parcelles de terrain traitées avec le Green muscle. **a** : traitement à raison de 50 g/ha, **b** : traitement à 25g/ha, **c** : traitement à 12,5 g/ha (Originale).

ANNEXE 2

Tableau 1: Evolution de la densité des larves *D maroccanus* (nombre d'individus /m²) au niveau des enclos de terrain témoins et traitées avec le Green muscle.

| Enclos terrain | de | Temps en jours après application des traitements avec le Green muscle | | | | | | | | | |
|---|---------|---|-------------|-------------|-------------|---------------|---------------|--------------|---------------|--------------|--------------|
| | | J | J+1 | J+2 | J+3 | J+4 | J+5 | J+6 | J+7 | J+8 | J+9 |
| Témoin | R 1 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 24 | 24 |
| | R 2 | 15 | 15 | 15 | 15 | 15 | 15 | 14 | 13 | 13 | 13 |
| | M ± E.t | 20 ± 7,071 | 20 ± 7,071 | 20 ± 7,071 | 20 ± 7,071 | 20 ± 7,071 | 20 ± 7,071 | 19,5 ± 7,778 | 19 ± 8,485 | 18,5 ± 9,192 | 18,5 ± 9,192 |
| 12,5 g/ha 6,25 x 10 ¹¹ Conidies/ha | R 1 | 11 | 11 | 11 | 11 | 11 | 9 | 8 | 8 | 8 | 8 |
| | R 2 | 15 | 15 | 15 | 15 | 15 | 13 | 13 | 12 | 11 | 10 |
| | M ± E.t | 13 ± 2,828 | 13 ± 2,828 | 13 ± 2,828 | 13 ± 2,828 | 13 ± 2,828 | 11 ± 2,828 | 10,5 ± 3,535 | 10 ± 2,828 | 9,5 ± 2,121 | 9 ± 1,414 |
| 25 g/ha 1,25 x 10 ¹² Conidies/ha | R 1 | 25 | 25 | 25 | 25 | 23 | 20 | 18 | 17 | 16 | 13 |
| | R 2 | 27 | 27 | 27 | 27 | 27 | 25 | 20 | 18 | 16 | 15 |
| | M ± E.t | 26 ± 1,414 | 26 ± 1,414 | 26 ± 1,414 | 26 ± 1,414 | 25 ± 2,828 | 22,5 ± 3,535 | 19 ± 1,414 | 17,5 ± 0,707 | 16 ± 0 | 14 ± 1,414 |
| 50 g/ha 2,5 x 10 ¹² Conidies/ha | R 1 | 20 | 20 | 20 | 20 | 18 | 15 | 12 | 10 | 9 | 8 |
| | R 2 | 40 | 40 | 40 | 40 | 35 | 30 | 30 | 25 | 20 | 18 |
| | M ± E.t | 30 ± 14,142 | 30 ± 14,142 | 30 ± 14,142 | 30 ± 14,142 | 26,5 ± 12,020 | 22,5 ± 10,606 | 21 ± 12,727 | 17,5 ± 10,606 | 14,5 ± 7,778 | 13 ± 7,071 |

J : le jour de l'application des traitements R : répétition, M : moyenne. E.t : écart type

Tableau 2: Analyse de la variance relative à l'effet des doses appliquées de Green muscle et de temps après traitement sur la mortalité des larves

| Facteurs | | Groupes | Somme des carrés | ddl | Moyenne des carrés | F |
|----------|---------------|---------|------------------|-------|--------------------|------|
| Temps | Inter-groupes | 109,278 | 25 | 4,371 | 3,130 | ,004 |
| | Intra-groupes | 30,722 | 22 | 1,396 | | |
| | Total | 140,000 | 47 | | | |
| Dose | Inter-groupes | 53,578 | 25 | 2,143 | 7,341 | ,000 |
| | Intra-groupes | 6,422 | 22 | ,292 | | |
| | Total | 60,000 | 47 | | | |

Tableau 3: Groupes homogènes pour la variable taux de mortalité chez les larves traitées avec Green muscle, facteur temps après traitement (Test de

| Temps | N | Groupes | | | | |
|-------|---|---------|---------|---------|---------|---------|
| | | 1(a') | 2 (b') | 3 (c') | 4(d') | 5 (e') |
| J - | 8 | 3,8125 | 13,6163 | 20,7775 | 26,6825 | 31,6275 |
| J+4 | 8 | | | | | |
| J+5 | 8 | | | | | |
| J+6 | 8 | | | | | |
| J+7 | 8 | | | | | |
| J+8 | 8 | | | | | |
| J+9 | 8 | 1,000 | ,124 | ,282 | ,468 | 35,6763 |
| Sig. | | | | | | ,670 |

Tableau 4 Test de comparaison multiples entre les groupes témoin et traités avec le green muscle pour la variable dépendante taux de mortalité (Test de Tukey)

| Dose | | | | | Borne inférieure | Borne supérieure |
|-----------|-----------|-----------|---------|------|------------------|------------------|
| Témoin | 12,5 g/ha | -14,9417* | 2,20937 | ,000 | -21,0365 | -8,8469 |
| | 25 g/ha | -22,4308* | 2,20937 | ,000 | -28,5256 | -16,3360 |
| | 50 g/ha | -32,5258* | 2,20937 | ,000 | -38,6206 | -26,4310 |
| 12,5 g/ha | Témoin | 14,9417* | 2,20937 | ,000 | 8,8469 | 21,0365 |
| | 25 g/ha | -7,4892* | 2,20937 | ,012 | -13,5840 | -1,3944 |
| | 50 g/ha | -17,5842* | 2,20937 | ,000 | -23,6790 | -11,4894 |
| 25 g/ha | Témoin | 22,4308* | 2,20937 | ,000 | 16,3360 | 28,5256 |
| | 12,5 g/ha | 7,4892* | 2,20937 | ,012 | 1,3944 | 13,5840 |
| | 50 g/ha | -10,0950* | 2,20937 | ,001 | -16,1898 | -4,0002 |
| 50 g/ha | Témoin | 32,5258* | 2,20937 | ,000 | 26,4310 | 38,6206 |
| | 12,5 g/ha | 17,5842* | 2,20937 | ,000 | 11,4894 | 23,6790 |
| | 25 g/ha | 10,0950* | 2,20937 | ,001 | 4,0002 | 16,1898 |

Tableau 5: Détermination des groupes homogènes pour la variable taux de mortalité chez *D. maroccanus* traitées avec Green muscle, facteur dose (Test de Tukey)

| Dose | N | Groupes | | | |
|-----------|----|---------|---------|---------|---------|
| | | 1 (a) | 2 (b) | 3 (c) | 4 (d) |
| Témoin | 12 | 4,5575 | 19,4992 | 26,9883 | 37,0833 |
| 12,5 g/ha | 12 | | | | |
| 25 g/ha | 12 | | | | |
| 50 g/ha | 12 | | | | |
| Sig. | | 1,000 | 1,000 | 1,000 | 1,000 |

Tableau 6: Nombres moyens totaux et différentiels des trois catégories d'hémocytes dans l'hémolymphe chez les L4 de criquet marocain traités avec *le Green muscle*

| blocs | R | Nombre total | Plasmocyte | | Prohémocyte | | Granulocyte | | |
|---|------|--------------|------------|--------|-------------|--------|-------------|--------|--------|
| | | | nombre | taux | nombre | taux | nombre | Taux | |
| Témoïn | R1 | 460 | 185 | 39,361 | 160 | 30,042 | 125 | 26,595 | |
| | R2 | 452 | 176 | 39,819 | 147 | 33,257 | 119 | 26,923 | |
| | M | 456 | 180,5 | 39,583 | 153,5 | 33,662 | 122 | 26,754 | |
| | E.t | 5,656 | 6,363 | 0,323 | 9,192 | 2,273 | 4,242 | 0,231 | |
| 12,5 g/ha 6,25 x10 ¹¹ Conidies | 3e j | R1 | 227 | 91 | 40,088 | 86 | 37,885 | 50 | 22,026 |
| | | R2 | 198 | 81 | 40,909 | 68 | 34,343 | 49 | 24,747 |
| | | M | 212,5 | 86 | 40,47 | 77 | 36,235 | 49,5 | 23,294 |
| | | E.t | 20,506 | 7,071 | 0,580 | 12,727 | 2,504 | 0,707 | 1,924 |
| | 5e j | R1 | 147 | 55 | 37,414 | 49 | 33,333 | 43 | 29,251 |
| | | R2 | 140 | 50 | 35,714 | 51 | 36,428 | 39 | 27,857 |
| | | M | 143,5 | 52,5 | 36,585 | 50 | 34,843 | 41 | 28,571 |
| | | E.t | 4,949 | 3,535 | 1,202 | 1,414 | 2,188 | 2,828 | 0,985 |
| 25 g/ha 1,25x10 ¹² Conidies | 3e j | R1 | 175 | 78 | 44,571 | 66 | 37,71 | 31 | 17,71 |
| | | R2 | 170 | 71 | 41,764 | 60 | 35,294 | 39 | 22,941 |
| | | M | 172,5 | 74,5 | 43,188 | 63 | 36,521 | 35 | 20,29 |
| | | E.t | 3,535 | 4,949 | 1,984 | 4,242 | 1,708 | 5,656 | 3,698 |
| | 5e j | R1 | 106 | 46 | 43,396 | 37 | 34,905 | 23 | 21,698 |
| | | R2 | 104 | 40 | 38,461 | 35 | 33,653 | 29 | 27,884 |
| | | M | 105 | 43 | 40,952 | 36 | 34,285 | 26 | 24,761 |
| | | E.t | 1,414 | 4,242 | 3,489 | 1,414 | 0,885 | 4,242 | 4,374 |
| 50 g/ha 2,5x10 ¹² Conidies | 3e j | R1 | 146 | 63 | 43,15 | 54 | 36,986 | 29 | 19,863 |
| | | R2 | 140 | 57 | 40,714 | 48 | 34,285 | 35 | 25 |
| | | M | 143 | 60 | 41,958 | 51 | 35,664 | 32 | 22,377 |
| | | E.t | 4,242 | 4,242 | 1,722 | 4,242 | 1,909 | 4,242 | 3,632 |
| | 5e j | R1 | 51 | 20 | 39,215 | 18 | 35,294 | 13 | 25,49 |
| | | R2 | 52 | 27 | 51,923 | 15 | 28,846 | 10 | 19,23 |
| | | M | 51,5 | 23,5 | 45,569 | 16,5 | 32,07 | 11,5 | 22,36 |
| | | E.t | 0,707 | 4,949 | 8,985 | 2,121 | 4,559 | 2,121 | 4,426 |

J : le jour de l'application des traitements ,R : répétition, M : moyenne. E.t : écart type

Taux en % , Nombre en cellules comptée dans 5ml d'hémolymphe

Tableau 7: Analyse de variance relative à l'effet du facteur temps après traitement sur le nombre total des hémocytes comptés le 3^e et le 5^e jour après traitement

| | Somme des carrés | ddl | Moyenne des carrés | F | Sig |
|---------------|------------------|-----|--------------------|-------|------|
| Inter-groupes | 12996,000 | 1 | 12996,000 | 1,155 | ,287 |
| Intra-groupes | 697398,000 | 62 | 11248,355 | | |
| Total | 710394,000 | 63 | | | |

Tableau 8: Analyse de la variance relative à l'effet de Green muscle sur le nombre total et différentiel des différentes des hémocytes pour le facteur dose appliqué

| | | Somme des carrés | ddl | Moyenne des carrés | F | Sig. |
|------------------------------------|---------------|------------------|-----|--------------------|---------|------|
| Nombre total des hémocytes le 3e j | Inter-groupes | 122467,000 | 3 | 40822,333 | 338,073 | ,000 |
| | Intra-groupes | 483,000 | 4 | 120,750 | | |
| | Total | 122950,000 | 7 | | | |
| Nombre total des hémocytes le 5e j | Inter-groupes | 198643,000 | 3 | 66214,333 | 4489,11 | ,000 |
| | Intra-groupes | 59,000 | 4 | 14,750 | | |
| | Total | 198702,000 | 7 | | | |
| Nombre des prohéocytes le 3e jr | Inter-groupes | 12782,375 | 3 | 4260,792 | 60,330 | ,001 |
| | Intra-groupes | 282,500 | 4 | 70,625 | | |
| | Total | 13064,875 | 7 | | | |
| Nombre des prohéocyte le 5e jr | Inter-groupes | 22493,000 | 3 | 7497,667 | 322,480 | ,000 |
| | Intra-groupes | 93,000 | 4 | 23,250 | | |
| | Total | 22586,000 | 7 | | | |
| Nombre des plasmocytes le 3e jr | Inter-groupes | 17852,500 | 3 | 5950,833 | 178,972 | ,000 |
| | Intra-groupes | 133,000 | 4 | 33,250 | | |
| | Total | 17985,500 | 7 | | | |
| Nombre des plasmocyte le 5e jr | Inter-groupes | 30625,375 | 3 | 10208,458 | 427,579 | ,000 |
| | Intra-groupes | 95,500 | 4 | 23,875 | | |
| | Total | 30720,875 | 7 | | | |
| Nombre des granulocytes le 3e jr | Inter-groupes | 10725,375 | 3 | 3575,125 | 208,766 | ,000 |
| | Intra-groupes | 68,500 | 4 | 17,125 | | |
| | Total | 10793,875 | 7 | | | |
| Nombre des granulocyte le 5e jr | Inter-groupes | 14646,375 | 3 | 4882,125 | 402,649 | ,000 |
| | Intra-groupes | 48,500 | 4 | 12,125 | | |
| | Total | 14694,875 | 7 | | | |

Tableau 9: Analyse de la variance relative à l'effet de Green muscle sur le taux des différentes hémocytes le 3^e et 5^e jour après traitement (facteurs doses appliquée)

| | | Somme des carrés | ddl | Moyenne des carrés | F | Sig |
|-----------------------------|---------------|------------------|-----|--------------------|-------|------|
| Taux plasmocytes le 3e jr | Inter-groupes | 14,907 | 3 | 4,969 | 2,705 | ,180 |
| | Intra-groupes | 7,349 | 4 | 1,837 | | |
| | Total | 22,255 | 7 | | | |
| Taux plasmocytes le 5e jr | Inter-groupes | 84,185 | 3 | 28,062 | 1,188 | ,420 |
| | Intra-groupes | 94,474 | 4 | 23,618 | | |
| | Total | 178,659 | 7 | | | |
| Taux prohémyocytes le 3e jr | Inter-groupes | 30,249 | 3 | 10,083 | 2,240 | ,226 |
| | Intra-groupes | 18,007 | 4 | 4,502 | | |
| | Total | 48,256 | 7 | | | |
| Taux prohémyocytes le 5e jr | Inter-groupes | 15,335 | 3 | 5,112 | ,649 | ,624 |
| | Intra-groupes | 31,530 | 4 | 7,882 | | |
| | Total | 46,865 | 7 | | | |
| Taux granulocytes le 3e jr | Inter-groupes | 43,041 | 3 | 14,347 | 1,946 | ,264 |
| | Intra-groupes | 29,497 | 4 | 7,374 | | |
| | Total | 72,537 | 7 | | | |
| Taux granulocytes le 5e jr | Inter-groupes | 42,441 | 3 | 14,147 | 1,424 | ,360 |
| | Intra-groupes | 39,753 | 4 | 9,938 | | |
| | Total | 82,193 | 7 | | | |

Tableau 10: Les groupes homogènes pour le facteur de doses de Green muscle et la variable nombre total des hémocytes le 3^e et le 5^e jour après traitement

| | N | Sous-ensemble pour alpha = 0.05 | | | |
|---------------------------|---|---------------------------------|---------|----------|----------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 3^e jour | | | | | |
| Tr 50 g/ha | 2 | 143,0000 | | | |
| Tr 25 g/ha | 2 | 172,5000 | | | |
| Tr 12,5 g/ha | 2 | | 212,500 | | |
| Témoin | 2 | | | 456,0000 | |
| Signification | | ,055 | 1,000 | 1,000 | |
| 5^e jour | | | | | |
| Tr 50 g/ha | 2 | 51,5000 | | | |
| Tr 25 g/ha | 2 | | 105,000 | | |
| Tr 12,5 g/ha | 2 | | | 143,5000 | |
| Témoin | 2 | | | | 456,0000 |
| Signification | | 1,000 | 1,000 | 1,000 | 1,000 |

Tableau 11: Les groupes homogènes pour le facteur de doses de traitement et la variable nombre des prohémyocytes le 3^e et le 5^e jour

| | N | Sous-ensemble pour alpha = 0.05 | | | |
|---------------------------|---|---------------------------------|----------|---|---|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 3^e jour | | | | | |
| Tr 50 g/ha | 2 | 51,00000 | | | |
| Tr 25 g/ha | 2 | 63,00000 | | | |
| Tr 12,5 g/ha | 2 | 77,00000 | | | |
| Témoin | 2 | | 153,5000 | | |
| Signification | | ,076 | 1,000 | | |

| | | | | | |
|---------------------------|---|----------|----------|---------|-----------|
| 5^e jour | | | | | |
| Tr 50 g/ha | 2 | 16,50000 | | | |
| Tr 25 g/ha | 2 | | 36,00000 | | |
| Tr 12,5 g/ha | 2 | | | 50,0000 | |
| Témoin | 2 | | | | 153,50000 |
| Signification | | 1,000 | 1,000 | 1,000 | 1,000 |

Tableau 12: Les groupes homogènes pour le facteur dose de traitement avec Green muscle et la variable nombre des plasmocytes le 3^e j et le 5e jou

| | N | Sous-ensemble pour alpha = 0.05 | | |
|---------------------------|---|---------------------------------|----------|-----------|
| | | 1 | 2 | 3 |
| 3^e jour | | | | |
| Tr 50 g/ha | 2 | 60,00000 | | |
| Tr 25 g/ha | 2 | 74,50000 | 74,50000 | |
| Tr 12,5 g/ha | 2 | | 86,00000 | |
| Témoin | 2 | | | 180,50000 |
| Signification | | ,066 | ,117 | 1,000 |
| 5^e jour | | | | |
| Tr 50 g/ha | 2 | 23,50000 | | |
| Tr 25 g/ha | 2 | | 43,00000 | |
| Tr 12,5 g/ha | 2 | | 52,50000 | |
| Témoin | 2 | | | 180,50000 |
| Signification | | 1,000 | ,124 | 1,000 |

Tableau 13: Les groupes homogènes de doses de traitement pour la variable nombre des granulocytes le 3^e j et le 5e jour

| | N | Sous-ensemble pour alpha = 0.05 | | | |
|---------------------------|---|---------------------------------|----------|----------|----------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 3^e jour | | | | | |
| Tr 50 g/ha | 2 | 11,50000 | | | |
| Tr 25 g/ha | 2 | 18,40000 | | | |
| Tr 12,5 g/ha | 2 | | 45,00000 | | |
| Témoin | 2 | | | 124,0000 | |
| Signification | | 1,100 | ,174 | 1,000 | |
| 5^e jour | | | | | |
| Tr 50 g/ha | 2 | 11,50000 | | | |
| Tr 25 g/ha | 2 | | 26,00000 | | |
| Tr 12,5 g/ha | 2 | | | 41,0000 | |
| Témoin | 2 | | | | 122,0000 |
| Signification | | 1,000 | 1,000 | 1,000 | 1,000 |

Tableau 14: Evolution de la croissance diamétrale (en millimètre) de *M. anisopliae* sous différentes températures et différents milieux de cultures

| T °C | Milieu de culture | | Période d'échantillonnage | | | | | | |
|------|-------------------|---------|---------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| | | | 1 ^{er} jour | 3 ^e jour | 5 ^e jour | 8 ^e jour | 10 ^e jour | 12 ^e jour | 15 ^e jour |
| 18°C | PDA | R1 | 0 | 8,24 | 15,2 | 23,28 | 30,56 | 31,03 | 32,78 |
| | | R2 | 0 | 6,32 | 14,07 | 23,55 | 25,72 | 27,36 | 28,17 |
| | | R3 | 0 | 4,2 | 11,3 | 18,2 | 20,3 | 25,88 | 27,89 |
| | | M ± E.t | 0 | 6,253± 2,020 | 13,523± 2,006 | 21,676± 3,013 | 25,526± 5,132 | 28,09± 2,651 | 29,613± 2,745 |
| | Malt | R1 | 0 | 5,64 | 16,3 | 18,47 | 22,62 | 23,1 | 23,21 |
| | | R2 | 0 | 4,45 | 12,87 | 16,41 | 19,54 | 22,64 | 22,75 |
| | | R3 | 0 | 3,2 | 10,84 | 14,25 | 17,45 | 21,01 | 21,99 |
| | | M ± E.t | 0 | 4,43± 1,220 | 13,336± 2,759 | 16,376± 2,110 | 19,87± 2,600 | 22,2± 1,0982 | 22,65± 0,616 |
| | V8 | R1 | 0 | 6,19 | 8,88 | 11,77 | 24,23 | 29,33 | 33,51 |
| | | R2 | 0 | 6,33 | 8,45 | 20,41 | 27,13 | 31,35 | 34,35 |
| | | R3 | 0 | 4,5 | 6,3 | 9,8 | 20,18 | 26,3 | 34,73 |
| | | M ± E.t | 0 | 5,673± 1,018 | 7,876± 1,382 | 13,993± 5,643 | 23,846± 3,49 | 28,993± 2,541 | 34,196± 0,624 |
| 24°C | PDA | R1 | 0 | 6,6 | 16,2 | 31,28 | 34,7 | 33,52 | 36 |
| | | R2 | 0 | 7,29 | 17,06 | 29,38 | 32,27 | 33,09 | 36 |
| | | R3 | 0 | 8,61 | 21,3 | 33,35 | 34,48 | 35,15 | 36 |
| | | M ± E.t | 0 | 7,5± 1,021 | 18,186± 2,73 | 31,336± 1,985 | 33,816± 1,343 | 33,92± 1,086 | 36± 00 |
| | Malt | R1 | 0 | 4,37 | 9,61 | 18,94 | 23,94 | 27,91 | 28,66 |
| | | R2 | 0 | 2,6 | 10,03 | 16,77 | 18,55 | 19,11 | 19,2 |
| | | R3 | 0 | 2,46 | 8,09 | 19,75 | 20,87 | 21,15 | 21,39 |
| | | M ± E.t | 0 | 3,143± 1,064 | 9,243± 1,02 | 18,486± 1,54 | 21,12± 2,703 | 22,723± 4,606 | 23,083± 4,952 |
| | V8 | R1 | 0 | 7,32 | 15,38 | 27,65 | 28,81 | 30,86 | 36 |
| | | R2 | 0 | 6,1 | 13,56 | 20,69 | 30,97 | 32,53 | 35,69 |
| | | R3 | 0 | 8,38 | 15,72 | 27,6 | 30,49 | 31,15 | 35,15 |
| | | M ± E.t | 0 | 7,266± 1,14 | 14,886± 1,161 | 25,313± 4,0 | 30,09± 1,134 | 31,513± 0,892 | 35,613± 0,43 |
| 28°C | PDA | R1 | 0 | 7,02 | 19,54 | 33,04 | 34,2 | 36 | 36 |
| | | R2 | 0 | 5,6 | 21,1 | 34,4 | 36 | 36 | 36 |
| | | R3 | 0 | 7,42 | 22,12 | 29,72 | 34,56 | 36 | 36 |
| | | M ± E.t | 0 | 6,68± 0,956 | 20,92± 1,299 | 32,386± 2,407 | 34,92± 2,952 | 36± 00 | 36± 00 |
| | Malt | R1 | 0 | 5,66 | 16,26 | 22,25 | 25,68 | 26,25 | 30,76 |
| | | R2 | 0 | 4,2 | 15,75 | 24,56 | 27,59 | 26,74 | 26,93 |
| | | R3 | 0 | 4,9 | 16,4 | 24,8 | 26,3 | 26,49 | 27,8 |
| | | M ± E.t | 0 | 4,92± 0,73 | 16,136± 0,342 | 23,87 ± 1,408 | 26,523± 0,974 | 26,493± 0,245 | 28,496± 2,007 |
| | V8 | R1 | 0 | 4,98 | 20,09 | 27,36 | 31 | 36 | 36 |
| | | R2 | 0 | 5,33 | 20,28 | 32,99 | 35,18 | 36 | 36 |
| | | R3 | 0 | 5,52 | 15,38 | 25,25 | 34,77 | 36 | 36 |
| | | M ± E.t | 0 | 5,276± 0,273 | 18,583± 2,775 | 28,533± 4,001 | 33,65± 2,304 | 36± 00 | 36± 00 |

| | | | | | | | | | |
|-------|------|------------|---|-----------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| 38 °C | PDA | R1 | 0 | 4,38 | 16,84 | 25,74 | 27,74 | 32,51 | 33,18 |
| | | R2 | 0 | 8,24 | 20,6 | 28,22 | 30,92 | 31,53 | 32,02 |
| | | R3 | 0 | 5,2 | 18,31 | 27 | 29,33 | 31,4 | 32 |
| | | M ± E.t | 0 | 5,94± 2,033 | 18,583± 1,894 | 26,986± 1,240 | 29,33± 1,59 | 31,813± 0,606 | 32,4± 0,675 |
| | Malt | R1 | 0 | 2,89 | 11,1 | 20,2 | 27,32 | 28,1 | 28,29 |
| | | R2 | 0 | 1,41 | 10,77 | 19,6 | 24,52 | 26,24 | 26,52 |
| | | R3 | 0 | 2,15 | 9,8 | 18,87 | 25,03 | 26,18 | 27,4 |
| | | M ± E.t | 0 | 2,15± 0,74 | 10,556± 0,675 | 19,556± 0,666 | 25,623± 1,491 | 26,84± 1,091 | 27,403± 0,885 |
| | V8 | R1 | 0 | 6,34 | 19,48 | 26,44 | 27,68 | 27,85 | 29,37 |
| | | R2 | 0 | 4,34 | 15,34 | 23,47 | 24,65 | 26,07 | 26,48 |
| | | R3 | 0 | 4,73 | 16,21 | 25,21 | 26,71 | 28,29 | 28,87 |
| | | M ± E.t | 0 | 5,136± 1,060 | 17,01± 2,182 | 25,04± 1,492 | 26,346± 1,547 | 27,403± 1,175 | 28,24± 1,544 |

Tableau 15: Evolution de la croissance pondérale (en gramme) de *M. anisopliae* sous différentes températures et différents milieux de cult

| Milieu | | R | J | 3 ^e jour | 5 ^e jour | 8 ^e jour | 10 ^e jour | 12 ^e jour | 15 ^e jour |
|--------|------|------------|---|---------------------|---------------------|---------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| 28°C | PDA | R1 | 0 | 0,445 | 0,464 | 0,731 | 0,976 | 1,432 | 1,697 |
| | | R2 | 0 | 0,493 | 1,057 | 1,47 | 1,932 | 2,79 | 2,9 |
| | | R3 | 0 | 0,751 | 0,785 | 1,02 | 1,381 | 1,905 | 2,24 |
| | | M ± E.t | 0 | 0,563± 0,164 | 0,768± 0,296 | 1,073± 0,372 | 1,429± 0,479 | 2,042± 0,689 | 2,279± 0,602 |
| | Malt | R1 | 0 | 0,917 | 1,713 | 2,113 | 2,851 | 3,852 | 4,4 |
| | | R2 | 0 | 1,606 | 1,819 | 2,355 | 2,83 | 3,66 | 3,72 |
| | | R3 | 0 | 0,798 | 1,386 | 1,865 | 2,608 | 3,9 | 4,46 |
| | | M ± E.t | 0 | 1,107± 0,436 | 1,639± 0,225 | 2,111± 0,245 | 2,763± 0,134 | 3,804± 0,126 | 4,193± 0,411 |
| | V8 | R1 | 0 | 0,978 | 1,406 | 1,62 | 1,866 | 2,324 | 2,609 |
| | | R2 | 0 | 0,814 | 0,667 | 1,225 | 1,406 | 2,471 | 2,5 |
| | | R3 | 0 | 0,739 | 0,674 | 0,93 | 1,177 | 1,625 | 1,908 |
| | | M ± E.t | 0 | 0,843± 0,122 | 0,915± 0,424 | 1,258± 0,346 | 1,483± 0,350 | 2,14± 0,452 | 2,339± 0,377 |
| 24°C | PDA | R1 | 0 | 0,557 | 1,34 | 2,615 | 2,726 | 2,896 | 3,216 |
| | | R2 | 0 | 0,25 | 0,555 | 1,145 | 1,404 | 1,449 | 1,561 |
| | | R3 | 0 | 0,449 | 1,095 | 2,119 | 2,392 | 2,427 | 2,531 |
| | | M ± E.t | 0 | 0,418±0, 1557 | 0,996± 0,401 | 1,959± 0,747 | 2,174± 0,687 | 2,257±0, 738 | 2,436± 0,831 |
| | Malt | R1 | 0 | 0,52 | 1,137 | 2,11 | 2,5 | 2,66 | 2,951 |
| | | R2 | 0 | 0,477 | 1,078 | 1,902 | 2,16 | 2,193 | 2,272 |
| | | R3 | 0 | 0,455 | 1,067 | 2,144 | 2,101 | 2,147 | 2,251 |
| | | M ± E.t | 0 | 0,484 ±0,033 | 1,094± 0,037 | 2,052± 0,131 | 2,253± 0,215 | 2,333± 0,283 | 2,491± 0,398 |
| | V8 | R1 | 0 | 0,564 | 1,255 | 1,796 | 2,179 | 2,268 | 2,408 |
| | | R2 | 0 | 0,475 | 1,134 | 1,681 | 2,075 | 2,149 | 2,231 |
| | | R3 | 0 | 0,597 | 1,34 | 1,948 | 2,506 | 2,989 | 3,289 |
| | | M ± E.t | 0 | 0,545± 0,063 | 1,243± 0,103 | 1,808± 0,133 | 2,253± 0,224 | 2,468± 0,454 | 2,642± 0,566 |
| 18°C | PDA | R1 | 0 | 0,146 | 0,485 | 0,552 | 0,657 | 0,787 | 0,904 |
| | | R2 | 0 | 0,781 | 1,134 | 1,318 | 1,575 | 1,82 | 2,098 |
| | | R3 | 0 | 0,942 | 0,953 | 0,963 | 1,137 | 1,295 | 1,453 |
| | | M ± | 0 | 0,623 ± | 0,857± | 0,944± | 1,123± | 1,300± | 1,485 ± |

| | | | | | | | | | |
|-------|------------|------------|-----------------|------------------|------------------|-----------------|-----------------|------------------|------------------|
| | E.t | | 0,42 | 0,334 | 0,383 | 0,459 | 0,516 | 0,597 | |
| Malt | R1 | 0 | 0,266 | 0,46 | 0,392 | 0,472 | 0,58 | 0,694 | |
| | R2 | 0 | 0,357 | 0,613 | 0,906 | 0,927 | 0,946 | 0,992 | |
| | R3 | 0 | 0,475 | 0,591 | 0,789 | 0,955 | 1,114 | 1,32 | |
| | M ± E.t | 0 | 0,366± 0,104 | 0,554 ±0,082 | 0,695± 0,269 | 0,784± 0,271 | 0,88± 0,273 | 1,002 ± 0,313 | |
| V8 | R1 | 0 | 0,441 | 0,736 | 0,982 | 1,255 | 1,483 | 1,847 | |
| | R2 | 0 | 0,191 | 0,321 | 0,294 | 0,419 | 0,529 | 0,842 | |
| | R3 | 0 | 0,363 | 0,583 | 1,002 | 1,424 | 1,713 | 2,041 | |
| | M ± E.t | 0 | 0,331± 0,127 | 0,546± 0,209 | 0,759± 0,403 | 1,032± 0,538 | 1,241 ±0,627 | 1,576 ± 0,643 | |
| 38 °C | PDA | R1 | 0 | 1,651 | 3,263 | 5,688 | 7,153 | 8,697 | 11,057 |
| | | R2 | 0 | 1,271 | 2,61 | 4,604 | 5,928 | 7,416 | 9,591 |
| | | R3 | 0 | 1,497 | 4,953 | 8,091 | 10,041 | 11,469 | 12,977 |
| | | M ± E.t | 0 | 1,473± 0,191 | 53,608± 1,209 | 6,127± 1,784 | 7,707± 2,111 | 9,194 ± 2,071 | 11,208± 1,698 |
| | Malt | R1 | 0 | 1,042 | 3,154 | 4,376 | 6,35 | 7,218 | 8,926 |
| | | R2 | 0 | 1,011 | 1,246 | 1,719 | 2,142 | 2,557 | 3,56 |
| | | R3 | 0 | 0,921 | 1,888 | 3,176 | 3,82 | 4,555 | 5,7 |
| | | M ± E.t | 0 | 0,991 ± 0,062 | 2,096± 0,970 | 3,090± 1,330 | 4,104± 2,118 | 4,776± 2,338 | 6,062 ± 2,701 |
| | V8 | R1 | 0 | 1,333 | 3,16 | 5,399 | 6,636 | 8,087 | 10,427 |
| | | R2 | 0 | 1,606 | 1,94 | 3,26 | 4,227 | 5,272 | 6,949 |
| | | R3 | 0 | 1,449 | 3,444 | 6,073 | 8,00 | 9,919 | 12,609 |
| | | M ± Et | 0 | 1,462± 0,137 | 2,848± 0,799 | 4,910± 1,468 | 6,287± 1,910 | 7,759± 2,340 | 9,995 ± 2,854 |

Tableau 16: Analyse de la variance relative à l'effet des facteurs étudiés sur la croissance mycélienne et pondérale de *Metarhizium anisopliae*

| Facteurs | Variables dépendantes | | Sommes des carrées | d.d.l | Moyennes des carrées | F | Sig. |
|--------------------------|-----------------------|--------------|--------------------|-------|----------------------|--------|------|
| Milieu de culture | Croissance mycélienne | Inter-groups | 1718,383 | 2 | 859,191 | 8,861 | ,000 |
| | | Intra-groups | 20654,107 | 213 | 96,968 | | |
| | | Total | 22372,489 | 215 | | | |
| | Croissance pondérale | Inter-groups | 9,543 | 2 | 4,771 | ,797 | ,452 |
| | | Intra-groups | 1275,249 | 213 | 5,987 | | |
| | | Total | 1284,791 | 215 | | | |
| Température d'incubation | Croissance mycélienne | Inter-groups | 1091,859 | 3 | 363,953 | 3,626 | ,014 |
| | | Intra-groups | 21280,630 | 212 | 100,380 | | |
| | | Total | 22372,489 | 215 | | | |
| | Croissance pondérale | Inter-groups | 506,751 | 3 | 195,504 | 59,100 | ,000 |
| | | Intra-groups | 698,041 | 212 | 3,293 | | |
| | | Total | 1284,791 | 215 | | | |
| Période d'incubation | Croissance mycélienne | Inter-groups | 17712,299 | 5 | 3542,460 | 159,63 | ,000 |
| | | Intra-groups | 4660,190 | 210 | 22,191 | | |
| | | Total | 22372,489 | 215 | | | |
| | Croissance pondérale | Inter-groups | 257,822 | 5 | 51,564 | 10,54 | ,000 |
| | | Intra-groups | 1026,969 | 210 | 4,890 | | |
| | | Total | 1284,791 | 215 | | | |

Tableau 17: Définition des groupes de milieux de culture homogènes pour la variable croissance mycélienne

| MILIEUX | N | Sous-ensembles pour for alpha = 0.05 | |
|---------|----|--------------------------------------|---------|
| | | 1 (a) | 2 (b) |
| MALT | 72 | 18,1368 | 22,7701 |
| V8 | 72 | | |
| PDA | 72 | | |
| Sig. | | 1,000 | ,401 |

Tableau 18: Définition des groupes homogènes de températures pour les variables dépendantes croissance mycélienne et pondérale

| | Température | N | Sous-ensembles for alpha = 0.05 | | |
|-----------------------|-------------|----|---------------------------------|---------|---------|
| | | | 1 (a'') | 2 (b'') | 3 (c'') |
| Croissance mycélienne | 18°C | 54 | 18,7876 | | |
| | 24°C | 54 | 21,4644 | 21,4644 | |
| | 28°C | 54 | 22,4024 | 22,4024 | |
| | 38°C | 54 | | 25,0772 | |
| | Sig. | | 0,242 | 0,243 | |
| Croissance pondérale | 18°C | 54 | ,89472 | | |
| | 24°C | 54 | 1,77289 | 1,77289 | |
| | 28°C | 54 | | 1,81965 | |
| | 38°C | 54 | | | 5,20570 |
| | Sig. | | ,061 | ,999 | 1,000 |

Tableau 19: Groupes homogènes non significativement différents des périodes d'incubation pour les variables croissance mycélienne et pondéral de *Metarhizium*

| Variables | Période | N | Sous groupes pour alpha = 0.05 | | | | |
|-----------------------|----------------------|---------|--------------------------------|---------|---------|---------|--------|
| | | | 1 (a') | 2 (b') | 3 (c') | 4(d') | 5 (e') |
| Croissance mycélienne | 3ème jr | 36 | 5,3642 | | | | |
| | 5ème jr | 36 | | 14,9036 | | | |
| | 8ème jr | 36 | | 23,6297 | | | |
| | 10ème jr | 36 | | | 27,5553 | | |
| | 12ème jr | 36 | | | 29,3367 | 29,3367 | |
| | 15ème jr | 36 | | | | 30,8081 | |
| | Sig. | | 1,000 | 1,000 | 1,000 | 0,597 | 0,771 |
| | Croissance pondérale | 3ème jr | 36 | 0,76744 | | | |
| 5ème jr | | 36 | 1,43072 | 1,43072 | | | |
| 8ème jr | | 36 | | 2,23258 | 2,23258 | | |
| 10ème jr | | 36 | | | 2,78300 | 2,78300 | |
| 12ème jr | | 36 | | | 3,34983 | 2,34983 | |
| 15ème jr | | 36 | | | | 3,97586 | |
| Sig. | | | 0,205 | 0,125 | 0,084 | 0,60 | |

Tableau 20: Dénombrement des spores de *M. anisopliae* après 15 jours d'incubation sous différents milieux et aux différentes températures

| Milieu | Concentration | 18°C | | 24°C | | 28°C | | 38°C | |
|--------|---------------|---------------------------------|---------------------|---------------------------------|---------------------|---------------------------------|---------------------|---------------------------------|---------------------|
| | | [C] X 10 ⁶ Spores/ml | Log L ₁₀ | [C] X 10 ⁶ Spores/ml | Log L ₁₀ | [C] X 10 ⁶ Spores/ml | Log L ₁₀ | [C] X 10 ⁶ Spores/ml | Log L ₁₀ |
| PDA | R1 | 3,97 | 6,60 | 5,16 | 6,712 | 7,58 | 6,88 | 6,72 | 6,827 |
| | R2 | 4,01 | 6,603 | 5,42 | 6,734 | 6,7 | 6,826 | 6,81 | 6,833 |
| | R3 | 4,42 | 6,645 | 4,95 | 6,694 | 7,21 | 6,858 | 7,66 | 6,884 |
| | M ± ET | 4,133± 0,249 | 6,616± 0,025 | 5,176± 0,235 | 6,713± 0,02 | 7,163± 0,441 | 6,854± 0,027 | 7,063± 0,518 | 6,848± 0,031 |
| MALT | R1 | 1,16 | 6,064 | 3,09 | 6,490 | 4,66 | 6,668 | 2,81 | 6,449 |
| | R2 | 0,83 | 5,919 | 3,13 | 6,495 | 5,04 | 6,702 | 2,97 | 6,473 |
| | R3 | 1,07 | 6,029 | 2,97 | 6,473 | 4,25 | 6,628 | 3,36 | 6,526 |
| | M ± ET | 1,02± 0,17 | 6,004± 0,075 | 3,063± 0,083 | 6,486± 0,011 | 4,65± 0,395 | 6,666± 0,037 | 3,046± 0,282 | 6,482± 0,039 |
| V8 | R1 | 3,94 | 6,595 | 5,57 | 6,746 | 5,62 | 6,75 | 5,57 | 6,746 |
| | R2 | 4,5 | 6,653 | 6,86 | 6,836 | 5,81 | 6,764 | 6,48 | 6,811 |
| | R3 | 3,59 | 6,555 | 6,93 | 6,840 | 5,52 | 6,742 | 6,9 | 6,839 |
| | M ± ET | 4,01± 0,459 | 6,601± 0,049 | 6,453± 0,765 | 6,807± 0,053 | 5,65± 0,147 | 6,752± 0,011 | 6,316± 0,679 | 6,798± 0,047 |

Tableau 21: Analyse de la variance relative à l'effet des milieux de culture et de température sur le logarithme concentration de spores de *M. anisopliae*

| Facteur | | Sommes des carrées | d.d.l | Moyenne des carrées | F | Sig. |
|-------------|---------------|--------------------|-------|---------------------|--------|------|
| Milieu | Inter-groupes | ,922 | 2 | ,461 | 15,793 | ,000 |
| | Intra-groupe | ,964 | 33 | ,029 | | |
| | Total | 1,886 | 35 | | | |
| Température | Inter-groupes | ,664 | 3 | ,221 | 5,790 | ,003 |
| | Intra-groupe | 1,223 | 32 | ,038 | | |
| | Total | 1,886 | 35 | | | |

Tableau 22: Classement des groupes de milieu de culture non significativement différents pour le test de la sporulation (Variable : Log Nombre de spo

| Milieux de culture | N | Sous-ensembles for alpha = 0.05 | |
|--------------------|----|---------------------------------|---------|
| | | 1 (a) | 2 (b) |
| MALT | 12 | 6,40967 | 6,73975 |
| V8 | 12 | | |
| PDA | 12 | | |
| Sig. | | 1,000 | ,963 |

Tableau 23: classement des groupes de températures non significativement différents de la variable logarithme concentration de spores de *M. anisopliae*

| Température | N | Sous groupes pour alpha = 0.05 | |
|-------------|---|--------------------------------|---------|
| | | 1 (a') | 2 (b') |
| 18°C | 9 | 6,40700 | |
| 24°C | 9 | | 6,66889 |
| 38°C | 9 | | 6,70978 |
| 28°C | 9 | | 6,75756 |
| Sig. | | 1,000 | ,772 |

Tableau 24: Fluctuations des concentrations en spores de *M. anisopliae* développé sur différents milieux et aux différentes teneurs en activités de l'eau.

| Milieu de Culture | R | Teneurs de l'activité de l'eau (a.w) | | | | | | | | | | | |
|-------------------|-------|--------------------------------------|-------|----------------------------------|-------|----------------------------------|-------|----------------------------------|-------|----------------------------------|-------|--------------------------------|------|
| | | 0,75 | | 0,80 | | 0,85 | | 0,90 | | 0,95 | | 0,99 | |
| | | [C] X *10 ⁵ Spor es/ml | L10 | [C] X 10 ⁵ Spore s/ml | L 10 | [C] X 10 ⁵ Spore s/ml | L10 | [C] X 10 ⁵ Spore s/ml | L 10 | [C] X 10 ⁵ Spore s/ml | L10 | [C] 10 ⁵ Spor es/ml | L10 |
| PDA | R1 | 2,5 | 5,4 | 2,6 | 5,41 | 3,4 | 5,53 | 5,7 | 5,76 | 7,2 | 5,86 | 10,9 | 6,04 |
| | R2 | 2,3 | 5,36 | 2,8 | 5,45 | 4,7 | 5,67 | 4,4 | 5,64 | 8,3 | 5,92 | 8,9 | 5,95 |
| | R3 | 2 | 5,30 | 2,9 | 5,46 | 3 | 5,48 | 3,3 | 5,52 | 7,1 | 5,85 | 11,4 | 6,06 |
| | M | 2,266 | 5,35 | 2,766 | 5,44 | 3,7 | 5,56 | 4,466 | 5,64 | 7,533 | 5,87 | 10,4 | 6,01 |
| | ± | ± | ± | ± | ± | ± | ± | ± | ± | ± | ± | ± | ± |
| ET | 0,251 | 0,05 | 0,152 | 0,02 | 0,888 | 0,10 | 1,201 | 0,12 | 0,665 | 0,04 | 1,325 | 0,06 | |
| MALT | R1 | 0,79 | 4,9 | 2,02 | 5,30 | 3,65 | 5,56 | 3,23 | 5,51 | 4,68 | 5,67 | 5,5 | 5,74 |
| | R2 | 0,86 | 4,93 | 2,22 | 5,35 | 3,2 | 5,50 | 3,67 | 5,56 | 5,23 | 5,72 | 4,89 | 5,69 |
| | R3 | 0,9 | 4,95 | 2,52 | 5,40 | 3 | 5,48 | 4,25 | 5,63 | 5,11 | 5,71 | 6,15 | 5,79 |
| | M | 0,85 | 4,93 | 2,25 | 5,35 | 3,28 | 5,51 | 3,71 | 5,57 | 5,01 | 5,70 | 5,51 | 5,74 |
| | ± | ± | ± | ± | ± | ± | ± | ± | ± | ± | ± | ± | ± |
| ET | 0,055 | 0,03 | 0,251 | 0,05 | 0,332 | 0,04 | 0,511 | 0,06 | 0,289 | 0,02 | 0,63 | 0,05 | |
| V8 | R1 | 4,7 | 5,67 | 5,6 | 5,75 | 7,4 | 5,87 | 10,3 | 6,01 | 14,1 | 6,15 | 19,2 | 6,28 |
| | R2 | 4 | 5,60 | 5,4 | 5,73 | 8,4 | 5,92 | 11,3 | 6,05 | 17,5 | 6,24 | 23,8 | 6,38 |
| | R3 | 4,6 | 5,66 | 6,3 | 5,79 | 9,9 | 5,99 | 13,4 | 6,12 | 14,3 | 6,15 | 16,3 | 6,21 |
| | M | 4,433 | 5,64 | 5,766 | 5,76 | 8,566 | 5,92 | 11,67 | 6,06 | 15,3 | 6,18 | 19,77 | 6,29 |
| | ± | ± | ± | ± | ± | ± | ± | ± | ± | ± | ± | ± | ± |
| ET | 0,378 | 0,04 | 0,472 | 0,03 | 1,258 | 0,06 | 1,582 | 0,06 | 1,907 | 0,05 | 3,78 | 0,08 | |
| Baath | R1 | 2,3 | 5,36 | 2,5 | 5,40 | 2,8 | 5,45 | 3 | 5,48 | 6,8 | 5,83 | 8,8 | 5,94 |
| | R2 | 2 | 5,30 | 2 | 5,30 | 3,4 | 5,64 | 4,7 | 5,67 | 6,6 | 5,81 | 7,6 | 5,88 |
| | R3 | 1,5 | 5,17 | 1,8 | 5,25 | 2,1 | 5,32 | 4,4 | 5,64 | 5 | 5,69 | 5,9 | 5,77 |
| | M | 1,933 | 5,28 | 2,1 | 5,39 | 2,766 | 5,47 | 4,03 | 5,6± | 6,13 | 5,78 | 7,43 | 5,86 |
| | ± | ± | ± | ± | ± | ± | ± | ± | 5,6± | ± | ± | ± | ± |
| ET | 0,404 | 0,09 | 0,36 | 0,07 | 0,65 | 0,16 | 0,91 | 0,10 | 0,99 | 0,07 | 1,46 | 0,09 | |

Tableau 25: Analyse de la variance relative à l'effet des milieux de culture et des teneurs en activité de l'eau sur le log concentration de spores de *M. anisopliae*

| facteur | | Sommes des carrées | d.d.l | Moyennes des carrées | F | Sig. |
|------------------------|---------------|--------------------|-------|----------------------|--------|------|
| Milieu de culture | Inter-groupes | 2,716 | 3 | ,905 | 14,171 | ,000 |
| | Intra-groupes | 4,344 | 68 | ,064 | | |
| | Total | 7,060 | 71 | | | |
| activité de l'eau (aw) | Inter-groupes | 3,858 | 5 | ,772 | 15,904 | ,000 |
| | Intra-groupes | 3,202 | 66 | ,049 | | |
| | Total | 7,06 | 71 | | | |

Tableau 26: Classement des groupes de milieux de culture non significativement différents (Test de l'activité de l'eau)

| Milieux de culture | N | Sous ensembles alpha = 0.05 | |
|--------------------|----|-----------------------------|------------------|
| | | 1 (a') | 2 (b') |
| MALT | 18 | 5,46661 | 5,97889 1,000 |
| Baath | 18 | 5,55211 | |
| PDA | 18 | 5,64750 | |
| V8 | 18 | | |
| Sig. | | ,149 | |

Tableau 27: Classement des groupes des différentes teneurs en activité de l'eau non significativement différents

| Activité de l'eau | N | Sous-ensembles pour alpha = 0.05 | | |
|-------------------|----|----------------------------------|---|-------|
| | | 1 (a) | 2 (b) | 3 (c) |
| 0,75 | 12 | 5,30225 | 5,46742 5,61850 5,71692 5,88508 5,97750 ,055 | |
| 0,80 | 12 | 5,46742 | | |
| 0,85 | 12 | | | |
| 0,90 | 12 | | | |
| 0,95 | 12 | | | |
| 0,99 | 12 | | | |
| Sig. | | ,450 | ,074 | |

Tableau 28: Taux moyen des mortalités cumulées chez les larves de 3^{ème}, 4^{ème} et 5^{ème} stade de criquet marocain traitées avec l'insecticide imidaclopride.

| Temps (h) | Témoin (a'') | L3 (a) | | | L4 (a) | | | L5 (a) | | |
|---------------|--------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| | | D1 (b'') | D2 (b'') | D3 (b'') | D1 (b'') | D2 (b'') | D3 (b'') | D1 (b'') | D2 (b'') | D3 (b'') |
| T (12h) (a') | 00 | 25 | 25 | 37,5 | 12,5 | 25 | 37,5 | 00 | 12,5 | 25 |
| 2T (24h) (b') | 00 | 37,5 | 37,5 | 50 | 37,5 | 37,5 | 37,5 | 25 | 37,5 | 37,5 |
| 3T (36h) (c') | 00 | 50 | 62,5 | 87,5 | 50 | 50 | 62,5 | 37,5 | 50 | 50 |
| 4T (48h) (d') | 00 | 75 | 75 | 100 | 75 | 87,5 | 75 | 50 | 62,5 | 62,5 |
| 5T (60h) | 00 | 100 | 87,5 | 100 | 87,5 | 87,5 | 87,5 | 62,5 | 62,5 | 75 |

Tableau 31: Classement en groupes homogènes des doses de traitement avec l'imidaclopride (Test de Tukey appliqué sur la variable taux de mortalité)

| DOSE | N | Sous-ensembles pour alpha = 0.05 | |
|-----------|----|----------------------------------|---------|
| | | 1(a'') | 2(b'') |
| témoin | 42 | ,0000 | |
| D1= 50µl | 42 | | 62,5000 |
| D2= 100µl | 42 | | 67,2619 |
| D3= 200µl | 42 | | 74,1071 |
| Sig. | | 1,000 | ,183 |

Tableau 32 : Taux moyen des mortalités corrigées (%) chez les L3, L4 et L5 de criquet marocain traitées avec *M. anisopliae* en fonction du temps après traitement.

| Temps | Témoin (a) | L3 (a'') | | | L4 (a'') | | | L5 (a'') | | |
|-----------------------|---------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | | D1 (b) | D2 (b) | D3 (b) | D1 (b) | D2 (b) | D3 (b) | D1 (b) | D2 (b) | D3 (b) |
| J – J+2 (a') | 00 | 00 | 00 | 00 | 00 | 00 | 00 | 00 | 00 | 00 |
| J+3 (a') (b') | 00 | 12,5 | 12,5 | 37,5 | 12,5 | 12,5 | 25 | 00 | 00 | 25 |
| J+4 (a') (b') | 00 | 12,5 | 12,5 | 37,5 | 12,5 | 12,5 | 25 | 00 | 25 | 25 |
| J+5 (a')(b')(c') | 00 | 25 | 37,5 | 37,5 | 37,5 | 37,5 | 50 | 25 | 37,5 | 50 |
| J+6 (b') (c') (d') | 00 | 50 | 62,5 | 75 | 37,5 | 62,5 | 75 | 37,5 | 50 | 62,5 |
| J+7 (c') (d') (e') | 00 | 75 | 100 | 100 | 62,5 | 87,5 | 87,5 | 50 | 75 | 87,5 |
| J+8 (d') (e') | 00 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 87,5 | 87,5 | 100 |
| J+9 (e') | 12,5 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |

D1= $1,2 \times 10^3$ spores/ml ; D2= $1,2 \times 10^5$ spores/ml. D3= $1,2 \times 10^7$ spores/ml. J : le jour de l'application des traitements. Les groupes (a) (b) / (a'),(b'),(c') (d') (e') et (a'') : groupes homogènes pour les facteurs dose, temps et stade respectivement .

Tableau 33 : Analyse de la variance relative aux taux de mortalité des larves de *D. maroccanus* traitées avec *M. anisopliae* selon les facteurs étudiés.

| Facteurs | | Sommes des carrées | ddl | Moyenne des carrées | F | Sig. |
|----------|---------------|--------------------|-----|---------------------|--------|------|
| Stade | Inter-groupes | 55,575 | 2 | 27,787 | 0,018 | ,982 |
| | Intra-groupes | 362348,841 | 117 | 1528,898 | | |
| | Total | 362404,416 | 119 | | | |
| Dose | Inter-groupes | 76019,586 | 3 | 25339,862 | 20,882 | ,000 |
| | Intra-groupes | 286384,829 | 236 | 1213,495 | | |
| | Total | 362404,416 | 239 | | | |
| Temps | Inter-groupes | 209582,301 | 9 | 23286,922 | 35,047 | ,000 |
| | Intra-groupes | 152822,115 | 230 | 664,444 | | |
| | Total | 362404,416 | 239 | | | |

Tableau 34: Classement des groupes homogènes d différents des lots témoin et traités avec *M. anisopliae*. D1= $1,2 \times 10^3$; D2= $1,2 \times 10^5$; D3= $1,2 \times 10^7$ spores/ ml

| DOSE | N | Sous ensembles pour alpha = 0.05 | |
|--------|----|----------------------------------|---------|
| | | 1 (a) | 2 (b) |
| Témoin | 30 | 1,2500 | |
| D1 | 30 | | 34,5833 |
| D2 | 30 | | 40,4167 |
| D3 | 30 | | 46,6667 |
| Sig. | | 1,000 | ,527 |

Tableau 35: Regroupement des ensembles non significativement différents des périodes de temps après traitement avec *M. anisopliae*

| TEMPS | N | Subset for alpha = 0.05 | | | | |
|-------|----|-------------------------|---------|---------|---------|---------|
| | | 1 (a') | 2 (b') | 3 (c') | 4 (d') | 5 (é) |
| J | 12 | ,0000 | | | | |
| J+1 | 12 | ,0000 | | | | |
| J+2 | 12 | ,0000 | | | | |
| J+3 | 12 | 11,4583 | 11,4583 | | | |
| J+4 | 12 | 13,5417 | 13,5417 | | | |
| J+5 | 12 | 28,1250 | 28,1250 | 28,1250 | | |
| J+6 | 12 | | 42,7083 | 42,7083 | 42,7083 | |
| J+7 | 12 | | | 60,4167 | 60,4167 | 60,4167 |
| J+8 | 12 | | | | 72,9167 | 72,9167 |
| J+9 | 12 | | | | | 78,1250 |
| Sig. | | ,187 | ,092 | ,071 | ,118 | ,793 |

Tableau 36: Effet des traitements avec l'imidaclopride sur l'évolution des poids corporels et sur les poids relatifs des reins et des foies chez les rats Wistar

| Lots de rats | Poids | Poids | Aug. | Poids | Poids |
|--------------|-------|-------|------|-------|-------|
|--------------|-------|-------|------|-------|-------|

| | | J0 (g) | J14 (g) | relative p.c | relatifs foie | relatifs Reins |
|----------------|---------|----------------|------------|--------------|---------------|----------------|
| Témoin | R1 | 160 | 176 | 10 | 3,33 | 0,75 |
| | R2 | 155 | 174 | 12,25 | 3,43 | 0,721 |
| | R3 | 150 | 167 | 11,33 | 3,49 | 0,707 |
| | R4 | 161 | 176 | 9,32 | 3,49 | 0,707 |
| | R5 | 158 | 179 | 13,29 | 3,32 | 0,682 |
| | M ± E.t | 156,8±4,4 4 | 174,4±4,51 | 11,24±1,6 | 3,41± 0,08 | 0,71± 0,02 |
| 1/80 DL50 MIDA | R1 | 178 | 192 | 7,86 | 3,25 | 0,65 |
| | R2 | 172 | 189 | 9,88 | 3,25 | 0,635 |
| | R3 | 162 | 177 | 9,26 | 3,49 | 0,693 |
| | R4 | 175 | 183 | 4,57 | 3,40 | 0,69 |
| | R5 | 168 | 175 | 4,17 | 3,51 | 0,69 |
| | M ± E.t | 171,0±6,2 4 | 183,2±7,36 | 7,15 ± 2,6 | 3,38± 0,13 | 0,67 ± 0,03 |
| 1/10 DL50 MIDA | R1 | 178 | 190 | 6,74 | 3,25 | 0,633 |
| | R2 | 175 | 186 | 6,28 | 3,31 | 0,68 |
| | R3 | 169 | 180 | 6,5 | 3,44 | 0,723 |
| | R4 | 187 | 199 | 6,42 | 3,14 | 0,67 |
| | R5 | 176 | 186 | 5,68 | 3,26 | 0,673 |
| | M ± E.t | 177,0±6,5 2 | 188,2±7,01 | 6,32± 0,4 | 3,28 ± 0,11 | 0,68 ± 0,03 |

Valeurs en moyen ± écart type (M ± E.t). p.c : poids corporel. R : répétitio

Tableau 37: comparaison des poids corporels et des poids relatifs des organes entre témoin (T) et traités (Tr) avec MIDA et comparaison de l'évolution des poids entre le début et la fin de l'expérimentation avec leurs significations statistiques
 Test F : test d'égalité des variances de Fisher avec P unilatérale, ddl =4
 Test T : Test d'égalité des espérances : deux observations de variance ddl = 8.

| Paramètre | Calculs | Comparaison | |
|---|---------------|--|-----------------------|
| | | T – Tr 1/10 DL50 MIDA | T – Tr 1/80 DL50 MIDA |
| Augmentations relative du poids corporels (%) | Test F (P %) | 0,0093 | 0,1820 |
| | Test T (P %) | 0,0027 | 0,0183 |
| | La différence | Hautement significative | Très significative |
| Poids relatifs reins (%) | Test F (P %) | 0,3155 | 0,4341 |
| | Test T (P %) | 0,0719 | 0,0545 |
| | La différence | Non Sig. | Non sig. |
| Poids relatifs foie (%) | Test F (P %) | 0,3075 | 0,2217 |
| | Test T (P %) | 0,0633 | 0,6476 |
| | La différence | Non sig. | Non sig. |
| Lots de rats | Calculs | Poids début exp. (J0) – Poids fin exp. (J14) | |
| Lot témoin | Test F (P %) | 0,4887 | |
| | Test T (P %) | 0,00025 | |
| | La différence | Hautement Significative | |
| Traité à 1/10 DL50 de MIDA | Test F (P %) | 0,4452 | |
| | Test T (P %) | 0,0300 | |
| | La différence | Significative | |
| Traité à 1/80 DL50 de MIDA | Test F (P %) | 0,3787 | |
| | Test T (P %) | 0,0222 | |
| | La différence | Significative | |

La différence est non significative lorsque $p > 0,05$; Significative lorsque $0,05 > p > 0,02$;
Très significative lorsque $0,02 > p > 0,01$ et Hautement significative lorsque $0,01 > p$.

Tableau 38: Analyse de la variance relative à l'effet des traitements avec l'imidaclopride sur l'augmentation relative des poids corporels et sur le poids relatif du foie et des reins

| variable | | Sommes des carrées | ddl | Moyenne des carrés | F | Sig |
|----------------------------|---------------|-----------------------|-----|-----------------------|--------|------|
| Augmentation relative | Inter-groupes | 69,257 | 2 | 34,629 | 10,647 | ,002 |
| | Intra-groupes | 39,030 | 12 | 3,253 | | |
| | Total | 108,288 | 14 | | | |
| Poids relatif du foie | Inter-groupe | ,047 | 2 | ,024 | 2,057 | ,171 |
| | Intra- groupe | ,138 | 12 | ,012 | | |
| | Total | ,186 | 14 | | | |
| Poids relatif des reins | Inter-groupe | ,005 | 2 | ,003 | 3,337 | ,070 |
| | Intra- groupe | ,010 | 12 | ,001 | | |
| | Total | ,015 | 14 | | | |

Tableau 39: Classement des groupes des lots de rats non significativement différents selon la variable augmentation relative du poids corporels des rats Wistar

| Lots de rats | N | Seuil de signification = 0.05 | |
|----------------|---|-------------------------------|---------|
| | | 1 | 2 |
| 1/10 DL50 MIDA | 5 | 6,3240 | 11,2380 |
| 1/80 DL50 MIDA | 5 | 7,1480 | |
| Témoin | 5 | | |
| Sig. | | ,755 | 1,000 |

Tableau 40: Effet des traitements avec l'imidaclopride sur de quelques paramètres sanguins chez les rats Wista

| Paramètres | | Témoin | 1/80 DL50 | 1/10 DL50 |
|--|------------|-------------------|--------------------|-----------------------|
| Globule blancs (10 ⁸ /mm ³) | R1 | 4,5 | 9,30 | 11,00 |
| | R2 | 5,00 | 9,30 | 10,80 |
| | R3 | 5,10 | 10,10 | 9,10 |
| | M ±E.t | 4,866 ± 0,321 | 9,633 ± 0,41 | 10,3 ± 1,044 |
| Globules rouges (10 ⁶ /mm ³) | R1 | 6,73 | 6,53 | 6,30 |
| | R2 | 6,64 | 6,02 | 5,49 |
| | R3 | 7,13 | 7,02 | 7,30 |
| | M ±E.t | 6,833 ± 0,260 | 6,523 ± 0,500 | 6,363 ± 0,906 |
| Hémoglobine (g/l) | R1 | 12,30 | 12,60 | 11,50 |
| | R2 | 13,00 | 11,70 | 11 |
| | R3 | 12,10 | 11,40 | 10 |
| | M ± E.t | 12,466 ± 0,472 | 11,90 ± 0,624 | 10,833 ± 0,764 (*) |
| Hématocrite (%) | R1 | 38,50 | 37,40 | 37,90 |
| | R2 | 38,50 | 38,40 | 29,10 |
| | R3 | 39,40 | 36,90 | 36,10 |
| | M ± E.t | 38,8 ± 0,519 | 37,566 ± 0,763 | 34,366 ±4,65 (*) |
| Plaquettes (10 ³ /mm ³) | R1 | 915 | 886 | 889 |
| | R2 | 942 | 977 | 978 |
| | R3 | 883 | 1041 | 1140 |
| | M ±E.t | 915 ± 29,815 | 968,00 ± 77,890 | 1002,33 ± 127,25 |
| Urée (g/l) | R1 | 0,420 | 0,445 | 0,470 |
| | R2 | 0,320 | 0,50 | 0,400 |
| | R3 | 0,360 | 0,470 | 0,490 |
| | M ±E.t | 0,37 ± 0,05 | 0,47 ± 0,03 | 0,453 ± 0,047 |
| Créatinine (g/dl) | R1 | 4,00 | 5,00 | 5,00 |
| | R2 | 4,00 | 4,00 | 5,00 |
| | R3 | 4,00 | 3,00 | 4,00 |
| | M ±E.t | 4,0 ± 0,0 | 4,0 ± 1,00 | 4,66 ± 0,577 |
| ASAT (GOT) (UI/l) | R1 | 187,00 | 188,00 | 173 |
| | R2 | 203,00 | 165,00 | 170 |
| | R3 | 198,00 | 170,00 | 180 |
| | M ±E.t | 196 ± 8,185 | 174,3 ± 12,09 | 174,33 ± 5,13 |
| ALAT (GPT) (UI/l) | R1 | 61,00 | 66,00 | 65,00 |
| | R2 | 69,00 | 56,00 | 51,00 |
| | R3 | 77,00 | 75,00 | 70,00 |
| | M ±E.t | 69 ± 8,000 | 65,666 ± 9,504 | 62,00± 9,85 |
| Phosphatase alcaline (UI/l) | R1 | 208,00 | 185,00 | 192,00 |
| | R2 | 228,00 | 164,00 | 115,00 |
| | R3 | 191,00 | 170,00 | 165,00 |
| | M ±E.t | 209 ± 18,52 | 173,00± 10,816 | 157,33 ± 39,068 |
| Protide totaux | R1 | 76,00 | 67,00 | 78,00 |
| | R2 | 71,00 | 70,00 | 69,00 |
| | R3 | 74,00 | 75,00 | 80,00 |
| | M ±E.t | 73,66 ± 2,516 | 70,66 ± 4,041 | 75,666± 5,86 |

Tableau 41: comparaison des paramètres sanguins étudiés entre les rats témoins et les rats traités avec l'imidaclopride (MIDA) avec leurs significations statistiques

Test F : test d'égalité des variances de Fisher avec P unilatérale, ddl = 3

Test T : Test d'égalité des espérances : deux observations de variance égale entre les lots de rats témoins (T) et traités avec l'imidaclopride (Tr), ddl = 6.

| Paramètre | Calculs | T – Tr 1/10 MIDA | T – Tr 1/80 MIDA |
|--|---------------|----------------------------|----------------------------|
| Globule blancs (10 ⁸ /mm ³) | Test F (P %) | 0,08659 | 0,3519 |
| | Test T (P %) | 0,0009 | 0,0001 |
| | La différence | Hautement Significative | Hautement Significative |
| Globules rouges (10 ⁶ /mm ³) | Test F (P %) | 0,0764 | 0,2138 |
| | Test T (P %) | 0,4368 | 0,3949 |
| | La différence | Non Sig. | Non sig. |
| Hémoglobine (g/l) | Test F (P %) | 0,2768 | 0,3641 |
| | Test T (P %) | 0,0345 | 0,2783 |
| | La différence | Significative | Non sig. |
| Hématocrite (%) | Test F (P %) | 0,0111 | 0,2948 |
| | Test T (P %) | 0,2422 | 0,0786 |
| | La différence | Non Sig. | Non sig. |
| Plaquettes (10 ³ /mm ³) | Test F (P %) | 0,0511 | 0,1257 |
| | Test T (P %) | 0,3033 | 0,3191 |
| | La différence | Non Sig. | Non sig. |
| Urée (g/l) | Test F (P %) | 0,4685 | 0,3318 |
| | Test T (P %) | 0,0953 | 0,0364 |
| | La différence | Non sig. | Significative |
| Créatinine (g/dl) | Test F (P %) | 0,0003 | 0,0009 |
| | Test T (P %) | 1 | 1 |
| | La différence | Non sig. | Non sig. |
| ASAT (GOT) (UI/l) | Test F (P %) | 0,2821 | 0,3140 |
| | Test T (P %) | 0,0177 | 0,0420 |
| | La différence | Très significative | Significative |
| ALAT (GPT) (UI/l) | Test F (P %) | 0,3975 | 0,4146 |
| | Test T (P %) | 0,3934 | 0,6662 |
| | La différence | Non sig. | Non sig. |
| Phosphatase alkaline (UI/l) | Test F (P %) | 0,1834 | 0,2543 |
| | Test T (P %) | 0,1072 | 0,437 |
| | La différence | Non sig. | Non sig. |
| Protide totaux (UI/l) | Test F (P %) | 0,1557 | 0,2794 |
| | Test T (P %) | 0,6158 | 0,3364 |
| | La différence | Non sig. | Non sig. |

Tableau 42: Analyse de la variance relative à l'effet des traitements avec l'imidaclopride sur quelques paramètres sanguins chez les rats Wistar femelles

| Variable | | Somme des caréess | d.d.l | Moyenne des carrées | F | Sig. |
|----------------------|---------------|-------------------|-------|---------------------|--------|------|
| Globule blanc | Inter-groupe | 52,149 | 2 | 26,074 | 56,537 | ,000 |
| | Intra- groupe | 2,767 | 6 | ,461 | | |
| | Total | 54,916 | 8 | | | |
| Globule rouge | Inter-groupe | ,343 | 2 | ,171 | ,451 | ,657 |
| | Intra- groupe | 2,280 | 6 | ,380 | | |
| | Total | 2,623 | 8 | | | |
| Hémoglobine | Inter-groupe | 4,127 | 2 | 2,063 | 5,173 | ,049 |
| | Intra- groupe | 2,393 | 6 | ,399 | | |
| | Total | 6,520 | 8 | | | |
| Hématocrite | Inter-groupe | 31,416 | 2 | 15,708 | 2,100 | ,204 |
| | Intra- groupe | 44,881 | 6 | 7,480 | | |
| | Total | 76,297 | 8 | | | |
| Plaquette | Inter-groupe | 12088,222 | 2 | 6044,111 | ,784 | ,498 |
| | Intra- groupe | 46267,333 | 6 | 7711,222 | | |
| | Total | 58355,556 | 8 | | | |
| Urée | Inter-groupe | ,019 | 2 | ,009 | 5,124 | ,050 |
| | Intra- groupe | ,011 | 6 | ,002 | | |
| | Total | ,030 | 8 | | | |
| Créatinine | Inter-groupe | ,667 | 2 | ,333 | ,618 | ,570 |
| | Intra- groupe | 3,237 | 6 | ,539 | | |
| | Total | 3,903 | 8 | | | |
| Transaminase GOT | Inter-groupe | 938,889 | 2 | 469,444 | 5,876 | ,039 |
| | Intra- groupe | 479,333 | 6 | 79,889 | | |
| | Total | 1418,222 | 8 | | | |
| Transaminase GPT | Inter-groupe | 73,556 | 2 | 36,778 | ,439 | ,664 |
| | Intra- groupe | 502,667 | 6 | 83,778 | | |
| | Total | 576,222 | 8 | | | |
| Phosphatase alcaline | Inter-groupe | 4210,889 | 2 | 2105,444 | 3,180 | ,114 |
| | Intra- groupe | 3972,667 | 6 | 662,111 | | |
| | Total | 8183,556 | 8 | | | |
| Protides totaux | Inter-groupe | 38,000 | 2 | 19,000 | 1,000 | ,422 |
| | Intra- groupe | 114,000 | 6 | 19,000 | | |
| | Total | 152,000 | 8 | | | |

Tableau 43: Définition des groupes homogènes de quelques paramètres sanguins étudiés chez les rats témoins et traités avec l'imidaclopride

| Paramètres | Lots de rats | N | Sous ensemble pour $\alpha = 0,05$ | |
|---------------|----------------|---|------------------------------------|--------|
| | | | 1 | 2 |
| Globule blanc | 1/10 DL50 MIDA | 3 | 10,300 | |
| | 1/80 DL50 MIDA | 3 | 9,5667 | |
| | Témoin | 3 | | 4,8667 |
| | Signification | | | 1,000 |

| | | | | |
|-----------------------|----------------|---|---------|---------|
| Hémoglobine | 1/10 DL50 MIDA | 3 | 10,8333 | |
| | 1/80 DL50 MIDA | 3 | 11,9000 | 11,9000 |
| | Témoin | 3 | | 12,4667 |
| | Signification | | | 0,177 |
| Transaminase G.O.T | 1/10 DL50 MIDA | 3 | 174,333 | |
| | 1/80 DL50 MIDA | 3 | 174,333 | |
| | Témoin | 3 | | 196,000 |
| | Signification | | | 1,000 |
| Urée | 1/10 DL50 MIDA | 3 | 0,36667 | |
| | 1/80 DL50 MIDA | 3 | 0,45333 | |
| | Témoin | 3 | 0,47167 | |
| | Signification | | | 0,055 |

Tableau 44: Effet des traitements avec le Green muscle sur l'évolution des poids corporels et sur les poids relatifs des organes étudiés des rats Wistar

| Lots de rats | | Poids J0 (g) | Poids J30 (g) | Aug. relative p.c | Poids relatifs foie | Poids relatifs Reins | Poids relatifs poumons |
|---------------------|---------|----------------|----------------|-------------------|---------------------|----------------------|------------------------|
| Témoin | R1 | 128 | 178 | 39,06 | 3,310 | 0,570 | 1,054 |
| | R2 | 132 | 181 | 37,12 | 3,257 | 0,600 | 1,051 |
| | R3 | 135 | 187 | 38,52 | 3,236 | 0,603 | 1,033 |
| | R4 | 136 | 180 | 32,35 | 3,330 | 0,590 | 1,072 |
| | R5 | 133 | 179 | 34,59 | 3,290 | 0,590 | 1,066 |
| | M ± E.t | 132,8± 3,11 | 181± 3,54 | 36,33± 2,82 | 3,285 ± 0,038 | 0,591± 0,013 | 1,055 ± 0,015 |
| 1/10 DL 50 GM | R1 | 143 | 194 | 35,66 | 3,060 | 0,560 | 1,047 |
| | R2 | 147 | 191 | 29,93 | 3,170 | 0,550 | 1,068 |
| | R3 | 137 | 195 | 42,34 | 3,110 | 0,600 | 1,020 |
| | R4 | 138 | 188 | 36,23 | 3,200 | 0,560 | 1,016 |
| | R5 | 148 | 210 | 41,89 | 2,900 | 0,57 | 0,980 |
| | M ± E.t | 142,6± 5,03 | 195,6± 8,5 | 37,21± 5,11 | 3,088± 0,118 | 0,568± 0,019 | 1,026± 0,033 |
| 1/100 DL50 GM | R1 | 148 | 199 | 34,46 | 3,180 | 0,540 | 1,105 |
| | R2 | 154 | 203 | 31,82 | 3,210 | 0,560 | 1,013 |
| | R3 | 150 | 204 | 36 | 3,190 | 0,590 | 1,028 |
| | R4 | 149 | 194 | 30,2 | 3,290 | 0,590 | 1,025 |
| | R5 | 158 | 206 | 30,38 | 3,150 | 0,610 | 1,002 |
| | M ± E.t | 151,8± 4,15 | 201,2± 4,76 | 32,57± 2,56 | 3,204± 0,053 | 0,578± 0,028 | 1,035± 0,041 |
| 1/200 DL50 GM | R1 | 148 | 192 | 29,73 | 3,180 | 0,621 | 1,058 |
| | R2 | 159 | 208 | 30,82 | 2,960 | 0,603 | 0,970 |
| | R3 | 154 | 204 | 32,47 | 3,010 | 0,636 | 0,980 |
| | R4 | 146 | 192 | 31,51 | 3,170 | 0,597 | 1,045 |
| | R5 | 151 | 198 | 31,13 | 3,140 | 0,593 | 1,019 |
| | M ± E.t | 151,6± 5,13 | 198,8± 7,16 | 31,13± 1,0 | 3,092± 0,10 | 0,610± 0,018 | 1,014± 0,039 |

Valeurs en moyen ± écart type (M ± E.t). p.c : poids corporel. R : répétition. PR : poids relatif

Tableau 45: comparaison des poids corporels, des poids relatifs des organes étudiés entre rats témoin et traités et comparaison de l'évolution des poids des rats entre le début et la fin de l'expérimentation avec leurs significations statistiques

Test F : test d'égalité des variances de Fisher avec P unilatérale, ddl =4

Test T : Test d'égalité des espérances : deux observations de variance avec P bilatérale (% de risque), ddl = 8. T : témoin, Tr : traité avec le green muscle

| Paramètre | Calculs | Comparaison | | |
|---|---------------|---|--------------------|--------------------|
| | | T – Tr 1/10 GM | T – Tr 1/100 GM | T – Tr 1/200 GM |
| Augmentations relative du poids corporels (%) | Test F (P %) | 0,1373 | 0,430 | 0,0347 |
| | Test T (P %) | 0,7441 | 0,0587 | 0,115 |
| | La différence | Non Sig. | Non sig. | Non sig. |
| Poids relatifs reins (%) | Test F (P %) | 0,2247 | 0,0815 | 0,2579 |
| | Test T (P %) | 0,0610 | 0,3870 | 0,0858 |
| | La différence | Non Sig. | Non sig. | Non sig. |
| Poids relatifs foie (%) | Test F (P %) | 0,0254 | 0,2761 | 0,0445 |
| | Test T (P %) | 0,0166 | 0,02452 | 0,0102 |
| | La différence | très sig. | sig. | Très sig. |
| Poids relatifs poumon (%) | Test F (P %) | 0,0784 | 0,04137 | 0,0485 |
| | Test T (P %) | 0,1150 | 0,3374 | 0,0800 |
| | La différence | Non sig. | Non sig. | Non sig. |
| Lots de rats | Calculs | Poids début exp. (J 0) – Poids fin exp. (J 30) | | |
| Lot témoin | Test F (P %) | 0,4059 | | |
| | Test T (P %) | 1,4146 x 10 ⁻⁸ | | |
| | La différence | Hautement Significative | | |
| Traité à 1/10 DL50 de GM | Test F (P %) | 0,1667 | | |
| | Test T (P %) | 2,1493 x 10 ⁻⁶ | | |
| | La différence | Hautement Significative | | |
| Traité à 1/100 DL50 de GM | Test F (P %) | 0,3927 | | |
| | Test T (P %) | 1,1668 x 10 ⁻⁷ | | |
| | La différence | Hautement Significative | | |
| Traité à 1/200 DL50 de GM | Test F (P %) | 0,2673 | | |
| | Test T (P %) | 2,1519 x 10 ⁻⁶ | | |
| | La différence | Hautement Significative | | |

La différence est non significative à $p > 0,05$; Significative à $0,05 > p > 0,02$; Très significative lorsque $0,02 > p > 0,01$ et Hautement significative lorsque $0,01 > p$

Tableau 46: Analyse de la variance de l'augmentation relative des poids corporels et des poids relatifs des organes chez les rats témoins et traités avec le green muscle

| | | Sommes des carrées | d.d.l | Moyennes des carrées | F | Sig. |
|--|----------------|--------------------|-------|----------------------|-------|------|
| Poids relatif foie | Inter- groupes | ,135 | 3 | ,045 | 6,379 | ,005 |
| | Intra- groupes | ,113 | 16 | ,007 | | |
| | Total | ,248 | 19 | | | |
| Poids relatif reins | Inter- groupes | ,005 | 3 | ,002 | 4,015 | ,026 |
| | Intra- groupes | ,007 | 16 | ,000 | | |
| | Total | ,011 | 19 | | | |
| Poids relatif poumon | Inter- groupes | ,004 | 3 | ,001 | 1,341 | ,304 |
| | Intra- groupes | ,018 | 16 | ,001 | | |
| | Total | ,022 | 19 | | | |
| Augmentation relative du poids corporels | Inter- groupes | 128,013 | 3 | 42,671 | 4,097 | ,025 |
| | Intra- groupes | 166,630 | 16 | 10,414 | | |
| | Total | 294,643 | 19 | | | |

Tableau 47: Définition des groupes homogènes entre les lots témoin et traités avec le Green muscle pour les paramètres poids relatifs des organes et sur l'augmentation relative du poids corporel

| Paramètres | lots de rats | N | Subset for alpha = 0.05 | |
|--|--------------|---|-------------------------|---------|
| | | | 1 | 2 |
| Poids relatif du foie | GM 1/10 | 5 | 3,08800 | 3,20400 |
| | GM 1/200 | 5 | 3,09200 | |
| | GM 1/100 | 5 | 3,20400 | |
| | Témoin | 5 | | |
| | Sig. | | ,171 | |
| Poids relatif des reins | GM 1/10 | 5 | ,56800 | ,57800 |
| | GM 1/100 | 5 | ,57800 | |
| | Témoin | 5 | ,59060 | |
| | GM 1/200 | 5 | ,61000 | |
| | Sig. | | ,323 | |
| Augmentation relative du poids corporels | GM 1/200 | 5 | 31,1320 | 32,5720 |
| | GM 1/100 | 5 | 32,5720 | |
| | Témoin | 5 | 36,3280 | |
| | GM 1/10 | 5 | | |
| | Sig. | | ,090 | |
| Poids relatif des poumons | GM 1/200 | 5 | 1,01440 | 1,05520 |
| | GM 1/10 | 5 | 1,02620 | |
| | GM 1/100 | 5 | 1,03460 | |
| | Témoin | 5 | | |
| | Sig. | | ,258 | |

Tableau 48: Effet des traitements avec le biopesticide Green muscle sur quelques paramètres hématologiques chez les rats Wistar .

| Paramètres | | Témoin | 1/10 DL50 | 1/100 DL50 | 1/200 DL50 |
|--|------------|----------------|------------------|----------------|-----------------|
| Globule blancs (10 ⁸ /mm ³) | R1 | 4,5 | 9,60 | 5,10 | 5,60 |
| | R2 | 5,00 | 6,80 | 5,90 | 5,00 |
| | R3 | 5,10 | 9,70 | 5,10 | 5,60 |
| | R4 | 4,86 | 6,70 | 4,90 | 5,00 |
| | M ± E.t | 4,865 ± 0,262 | 8,200 ± 1,732 | 5,250 ± 0,443 | 5,300 ± 0,346 |
| Globules rouges (10 ⁶ /mm ³) | R1 | 6,73 | 7,51 | 6,77 | 6,32 |
| | R2 | 6,64 | 7,24 | 7,30 | 6,56 |
| | R3 | 7,13 | 7,51 | 6,77 | 6,32 |
| | R4 | 6,83 | 7,24 | 7,30 | 6,56 |
| | M ± E.t | 6,832 ± 0,212 | 7,375 ± 0,155 | 7,035 ± 0,306 | 6,440 ± 0,138 |
| Hémoglobine (g/l) | R1 | 12,30 | 13,00 | 12,70 | 12,60 |
| | R2 | 13 | 13,50 | 12,40 | 11,70 |
| | R3 | 12,10 | 13,00 | 12,70 | 12,60 |
| | R4 | 12,46 | 13,30 | 12,40 | 11,70 |
| | M ± E.t | 12,465 ± 0,385 | 13,200 ± 0,230 | 12,550 ± 0,173 | 12,150 ± 0,519 |
| Hématocrite (%) | R1 | 38,5 | 43,10 | 38,90 | 39,90 |
| | R2 | 38,5 | 40,50 | 39,50 | 36,40 |
| | R3 | 39,40 | 43,10 | 38,90 | 39,90 |
| | R4 | 38,80 | 40,50 | 39,50 | 36,40 |
| | M ± E.t | 38,800 ± 0,424 | 41,800 ± 1,501 | 39,200 ± 0,346 | 38,15 ± 2,020 |
| Plaquettes (10 ³ /mm ³) | R1 | 860 | 895 | 865 | 842 |
| | R2 | 842 | 885 | 870 | 867 |
| | R3 | 883 | 875 | 880 | 882 |
| | R4 | 835 | 900 | 860 | 870 |
| | M ± E.t | 855 ± 21,432 | 888,750 ± 11,086 | 868,75 ± 8,539 | 865,25 ± 16,800 |

Tableau 49 : Effet des traitements avec le Green muscle sur quelques paramètres biochimiques hépatiques et rénaux chez les rats Wistar

| Paramètres | | Témoin | 1/10 DL50 | 1/100 DL50 | 1/200 DL50 |
|----------------------|--------|---------------|---------------|--------------|---------------|
| Urée (g/l) | R1 | 0,40 | 0,58 | 0,36 | 0,48 |
| | R2 | 0,32 | 0,38 | 0,44 | 0,46 |
| | R3 | 0,36 | 0,59 | 0,35 | 0,49 |
| | R4 | 0,42 | 0,37 | 0,45 | 0,45 |
| | M ±E.t | 0,375 ± 0,04 | 0,480 ± 0,115 | 0,40 ± 0,046 | 0,480 ± 0,011 |
| Créatinine (g/dl) | R1 | 4 | 4 | 4 | 5 |
| | R2 | 4 | 7 | 5 | 4 |
| | R3 | 4 | 4 | 4 | 5 |
| | R4 | 3 | 7 | 5 | 4 |
| | M ±E.t | 3,750 ± 0,500 | 5,50 ± 1,732 | 4,50 ± 0,577 | 4,50 ± 0,61 |
| ASAT (GOT) (UI/l) | R1 | 176 | 154 | 168 | 167 |
| | R2 | 167 | 168 | 170 | 160 |
| | R3 | 167 | 154 | 168 | 165 |
| | R4 | 170 | 168 | 170 | 163 |
| | M ±E.t | 170 ± 4,242 | 161 ± 8,082 | 169 ± 1,154 | 163,75 ± 2,98 |

| | | | | | |
|-----------------------------------|---------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| ALAT (GPT) (UI/l) | R1 | 79,00 | 78,00 | 77,00 | 81,00 |
| | R2 | 85,00 | 72,00 | 73,00 | 74,00 |
| | R3 | 77,00 | 74,00 | 77,00 | 81,00 |
| | R4 | 75,00 | 68,00 | 67,00 | 70,00 |
| | M ±E.t | 79 ± 4,32 | 73± 4,163 | 73,5 ± 4,725 | 76,5 ± 5,446 |
| Phosphatase alkaline (UI/l) | R1 | 180,00 | 175,00 | 180,00 | 184,00 |
| | R2 | 185,00 | 170,00 | 175,00 | 180,00 |
| | R3 | 191,00 | 180,00 | 178,00 | 190,00 |
| | R4 | 185,00 | 184,00 | 190,00 | 180,00 |
| | M ±E.t | 185,25 ± 4,5 | 177,25 ± 6,5 | 180,75 ± 6,0 | 183,5 ± 4,725 |
| Protide totaux (UI/l) | R1 | 76,10 | 69,8 | 72,90 | 81,15 |
| | R2 | 71,10 | 70,20 | 79,80 | 73,20 |
| | R3 | 75,90 | 78,80 | 73,20 | 80,80 |
| | R4 | 70,90 | 79,20 | 80,10 | 72,85 |
| | M ± E.t | 73,50 ± 2,886 | 74,50 ± 5,196 | 76,50 ± 4,041 | 77,00 ± 4,59 |

Tableau 50: comparaison des paramètres sanguins étudiés entre les rats témoins et les rats traités avec le Green muscle avec leurs significations statistiques

-Test F : test d'égalité des variances de Fisher avec P unilatérale, ddl : =3

-Test T : Test d'égalité des espérances : deux observations de variance égale entre les lots de rats témoin (T) et traité (Tr) avec P % de risque, ddl : = 6

| Paramètre | Calculs | Comparaison (Témoin – traité) | | |
|---|---------------|-------------------------------|-----------------|-----------------|
| | | T – Tr 1/10 GM | T – Tr 1/100 GM | T – Tr 1/200 GM |
| Globule blancs (10 ⁸ /mm ³) | Test F (P %) | 0,0065 | 0,2059 | 0,2932 |
| | Test T (P %) | 0,0028 | 0,1857 | 0,1036 |
| | La différence | Hautement Sig. | Non sig. | Non sig. |
| Globules rouges (10 ⁶ /mm ³) | Test F (P %) | 0,3525 | 0,254 | 0,2700 |
| | Test T (P %) | 0,0071 | 0,336 | 0,0224 |
| | La différence | Hautement Sig. | Non sig. | Non sig. |
| Hémoglobine (g/l) | Test F (P %) | 0,2374 | 0,1293 | 0,3058 |
| | Test T (P %) | 0,0182 | 0,7049 | 0,3745 |
| | La différence | Très Sig. | Non sig. | Non sig. |
| Hématocrite (%) | Test F (P %) | 0,0336 | 0,4038 | 0,0145 |
| | Test T (P %) | 0,0307 | 0,2024 | 0,5739 |
| | La différence | Significative | Non sig. | Non sig. |
| Plaquettes (10 ³ /mm ³) | Test F (P %) | 0,1538 | 0,0824 | 0,3494 |
| | Test T (P %) | 0,0312 | 0,2782 | 0,4800 |
| | La différence | Significative | Non sig. | Non sig. |
| Urée (g/l) | Test F (P %) | 0,0661 | 0,3966 | 0,0894 |
| | Test T (P %) | 0,1552 | 0,4932 | 0,074 |
| | La différence | Non sig. | Non sig. | Non sig. |
| Créatinine (g/dl) | Test F (P %) | 0,0325 | 0,3868 | 0,3868 |
| | Test T (P %) | 0,1116 | 0,1065 | 0,1065 |
| | La différence | Non sig. | Non sig. | Non sig. |
| ASAT (GOT) (UI/l) | Test F (P %) | 0,1588 | 0,0345 | 0,2893 |
| | Test T (P %) | 0,0961 | 0,6811 | 0,0526 |
| | La différence | Non sig. | Non sig. | Non sig. |

| | | | | |
|--------------------------------|---------------|----------|----------|----------|
| ALAT (GPT) (UI/l) | Test F (P %) | 0,4764 | 0,4431 | 0,3563 |
| | Test T (P %) | 0,0924 | 0,1366 | 0,4990 |
| | La différence | Non sig. | Non sig. | Non sig. |
| Phosphatase alkaline (UI/l) | Test F (P %) | 0,3170 | 0,2806 | 0,4688 |
| | Test T (P %) | 0,0786 | 0,2983 | 0,6110 |
| | La différence | Non sig. | Non sig. | Non sig. |
| Protide totaux (UI/l) | Test F (P %) | 0,1799 | 0,3049 | 0,2330 |
| | Test T (P %) | 0,748 | 0,2687 | 0,2446 |
| | La différence | Non sig. | Non sig. | Non sig. |

La différence est non significative lorsque $p > 0,05$; Significative I : $0,05 > p > 0,02$;
Très significative lorsque $0,02 > p > 0,01$ et Hautement significative lorsque $0,01 >$

Tableau 51: Analyse de la variance relative à l'effet des traitements avec le Green muscle sur quelques paramètres sanguins chez les rats Wistar

| | | Somme des carrés | ddl | Moyenne des carrés | F | Significati on |
|-------------------------|---------------|------------------|-----|--------------------|--------|----------------|
| Globule blanc | Inter-groupes | 28,575 | 3 | 9,525 | 11,254 | ,001 |
| | Intra-groupes | 10,157 | 12 | ,846 | | |
| | Total | 38,731 | 15 | | | |
| Globule rouge | Inter-groupes | 1,833 | 3 | ,611 | 13,394 | ,000 |
| | Intra-groupes | ,547 | 12 | ,046 | | |
| | Total | 2,381 | 15 | | | |
| Hémoglobine | Inter-groupes | 2,332 | 3 | ,777 | 6,190 | ,009 |
| | Intra-groupes | 1,507 | 12 | ,126 | | |
| | Total | 3,838 | 15 | | | |
| Hématocrite | Inter-groupes | 30,767 | 3 | 10,256 | 6,181 | ,009 |
| | Intra-groupes | 19,910 | 12 | 1,659 | | |
| | Total | 50,677 | 15 | | | |
| Plaquette | Inter-groupes | 2397,688 | 3 | 799,229 | 3,410 | ,053 |
| | Intra-groupes | 2812,250 | 12 | 234,354 | | |
| | Total | 5209,937 | 15 | | | |
| Urée | Inter-groupes | ,032 | 3 | ,011 | 2,435 | ,115 |
| | Intra-groupes | ,053 | 12 | ,004 | | |
| | Total | ,085 | 15 | | | |
| Créatinine | Inter-groupes | 6,250 | 3 | 2,083 | 1,923 | ,180 |
| | Intra-groupes | 13,000 | 12 | 1,083 | | |
| | Total | 19,250 | 15 | | | |
| Transaminase GOT | Inter-groupes | 220,188 | 3 | 73,396 | 3,137 | ,065 |
| | Intra-groupes | 280,750 | 12 | 23,396 | | |
| | Total | 500,938 | 15 | | | |
| Transaminase GPT | Inter-groupes | 94,000 | 3 | 31,333 | 1,424 | ,284 |
| | Intra-groupes | 264,000 | 12 | 22,000 | | |
| | Total | 358,000 | 15 | | | |
| Phosphatase alcaline | Inter-groupes | 146,188 | 3 | 48,729 | 1,601 | ,241 |
| | Intra-groupes | 365,250 | 12 | 30,438 | | |
| | Total | 511,438 | 15 | | | |
| Protide totaux | Inter-groupes | 32,750 | 3 | 10,917 | ,598 | ,628 |
| | Intra-groupes | 219,000 | 12 | 18,250 | | |
| | Total | 251,750 | 15 | | | |

Tableau 53: Définition des groupes homogènes des paramètres sanguins étudiés chez les rats témoins et traités avec le Green muscle

| Paramètres | Lots de rats | N | Sous ensemble pour $\alpha = 0,05$ | | |
|---------------|---------------|---|------------------------------------|--------|--------|
| | | | 1 | 2 | 3 |
| Globule blanc | Témoin | 4 | 4,8650 | | |
| | GM 1/100 | 4 | 5,250 | | |
| | GM 1/200 | 4 | 5,300 | | |
| | GM 1/10 | 4 | | 8,200 | |
| | Signification | | 0,786 | 1,000 | |
| Globule rouge | Témoin | 4 | 6,4400 | | |
| | GM 1/100 | 4 | | 6,8325 | |
| | GM 1/200 | 4 | | 7,0350 | |
| | GM 1/10 | 4 | | | 7,3750 |
| | Signification | | 1,000 | 0,205 | 1,000 |
| Hémoglobine | Témoin | 4 | 12,1500 | | |
| | GM 1/100 | 4 | 12,4650 | | |
| | GM 1/200 | 4 | 12,550 | | |
| | GM 1/10 | 4 | | 13,200 | |
| | Signification | | 0,285 | 1,000 | |
| Hématocrite | Témoin | 4 | 38,1500 | | |
| | GM 1/100 | 4 | 38,800 | | |
| | GM 1/200 | 4 | 39,200 | | |
| | GM 1/10 | 4 | | 41,800 | |
| | Signification | | 0,502 | 1,000 | |

REFERENCES

1. Chaichi, W., Djazouli, Z., Djemai, I., Abdelkader, S., Ribera, I. et Nancé, J., “Stimulation des défenses naturelles par l’application d’un Lombricompost. Effet sur les paramètres populationnels d’*Aphis fabae* scop. (Homoptera: Aphididae) et la qualité Phytochimique de la fève”, *Lebanese Science Journal*, V.18, n°1, (2017), 1- 97.
2. Hadj Rabia-Haddadj F., “Influence de certain paramètres sur la viabilité et le développement de deux champignons entomopathogènes *Beauverea Bassiana* et *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*: Effet sur un aspect physiologique de *Schistocerca gregarea*”, Thèse Doc, Sci. Agro., Ecol. Nat. Sup. Agro., El-Harrach, (2014), 117p.
3. Doumandji-Mitiche, B., Doumandji, S. et Benfekih, L., “Données préliminaires sur la bioécologie de la sauterelle Marocaine *Dociostaurus maroccanus* (Thunberg, 1815) à Ain Boucif (Médéa – Algérie)”, *Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent.*, 57/3a, (1992), 659-665.
4. Chaouch, A., “États phasaire de *Dociostaurus maroccanus* Thunberg, 1815 (*Acrididae*, *Gomphocerinae*) Effets de deux champignons entomopathogènes, *Beauveria bassiana* (Balsamo) et *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* sur quelques paramètres biophysologiques”, Thèse Magistère, Ecol. Nat. Sup. Agro, El-Harrach. (2009)., 107p.
5. Chaouch A., “Bioécologie du criquet marocain *Dociostaurus marocanus*, (Thunberg, 1815) (*Acrididae*, *Gomphocerinae*) dans la phase grégaire en Algérie et perspectives de lutte biologique”, Thèse Doctorat, Ecol. Nat. Sup. Agro., El-Harrach-Alger, (2015), 174 p.
6. I.N.P.V., “Bilans des campagnes nationales de lutte contre le criquet marocain”. Institut National de Protection des Végétaux, El-Harrach - Alger, (2013), 25p.
7. Thany, S.H., “Neonicotinoid insecticides: historical evolution and resistance mechanisms”, *Adv. Exp. Med. Biol.*, 683, (2010), 75 - 83.
8. Bass, C., Denholm, L., Williamson, M. S., Nauen, R., “The global status of insect resistance to neonicotinoid insecticides”, *Pestic. Biochem. Physiol.*, V.121, (2015), 78-87.

9. Tomizawa, M., & Casida, J.E., "Selective toxicity of neonicotinoids attributable to specificity of insect and mammalian nicotinic receptors", *Annual review entomol*, V. 48, (2003), 339 –364.
10. Tomizawa, M., Casida, J. E., "Neonicotinoid insecticides: highlights of a symposium on strategic molecular designs", *J. Agrical. Food Chem.*, V. 9, (2010), 2883 - 2886.
11. Chao; S.L., Casida, J.E., "Interaction of imidacloprid metabolites and analogs with the nicotinic acetylcholine receptor of mouse brain in relation to toxicity", *Pest. Biochem. Physiol.*, V. 58, (1997), 77–88.
12. F.A.O., "Evaluation des données d'essais de terrain sur l'efficacité et la sélectivité des insecticides sur les criquets et les sauteriaux", 9eme reunions, 18-21 Octobre 2004, Rome, Italy, (Décembre, 2004).
13. Ferron, P., Fargues, J. et Riba, G., "Les champignons agents de lutte microbiologique contre les ravageurs", In: *Handbook of applied mycology*, V. 2, (1991), 237-270.
14. Jourdheuil, P., Grison, P. et Fraval, A., "La lutte biologique: un aperçu historique. La lutte biologique", *Dossier de la Cellule environnement de l'INRA* 5, (1992), 11-35.
15. Zakaria, O. et Sagnia, S.B., "Lutte intégrée contre les sauteriaux et les locustes: importance du biopesticide Green Muscle", *Bulletin trimestriel d'information du Centre Régional AGRHYMET, Niamey, Niger*, V. 5, n°3, (2003), 16p.
16. Douthwaite, B., Langewald, J., and Harris, J., "Development and commercialization of the Green Muscle biopesticide", © International Institute of Tropical Agriculture, Ibadan, Nigeria, (2001), 23p.
17. Kooyman, C., "Report of the Workshop on the use of Green Muscle ® (*Metarhizium anisopliae* var. *acidum*) and desert locust adult pheromone (Phenylacetoneitrile: PAN) to control desert locust hopper bands", Port Sudan, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy, 10-20 January, (2003).
18. Van der Valk, H., "Review of the efficacy of *Metarhizium anisopliae* var. *acidum* against the Desert Locust", Rome, FAO, Desert Locust Technical Series, No. AGP/DL/TS/34, (2007).

19. Atheimine, M., Ely S., Mohamed, S., Barry, A. et Mounsif, B., "Simulation de traitement en barrière avec *Metarhizium anisopliae* var. *acidum* (green muscle®) contre des larves grégaires du criquet pèlerin, *Schistocerca gregaria*", afpp – Dixième conférence internationale sur les ravageurs en agriculture, Montpellier, 22 et 23 Octobre, (2014), 10 p.
20. Douro Kpindou, O.K., Gbongboui, C., Badou, R., Paa-Kwessi, E., Ackonor, J.B., Langewald, J., "Optimisation de l'application du *Metarhizium anisopliae* var. *acidum* sur le criquet puant, *Zonocerus variegatus* (Orthoptera: Pyrgomorphidae)" *Int. J. of Trop. Insect Sci.*, V. 25, n°, 4, (2005), 251–258.
21. Konor, J.B. et Langewald, J., "Optimisation de l'application du *Metarhizium anisopliae* var. *acidum* sur le criquet puant, *Zonocerus variegatus* (Orthoptera: Pyrgomorphidae)", *International Journal of Tropical Insect Science*, V. 25, n°4, (2005), 251 – 258.
22. Niassy, S., Diarra, K., Ndiaye, S., & Niassy, A., "Pathogenicity of local *Metarhizium anisopliae* var. *acidum* strains on *Locusta migratoria migratorioides* Reiche and Farmaire and *Zonocerus variegatus* Linnaeus in Senegal", *African Journal of Biotechnology*, V. 10, n°1, (2011), 28 - 33.
23. Douro-Kpindou, O.K., Niassy, A., Badji K., Kooyman, C., "Application of mixtures of *Metarhizium anisopliae* var. *acidum* and cyhalothrin against the Senegalese grasshopper in Senegal", *Int. J. Trop. Insect. Sci.* V. 3, (2008), 136 -143.
24. Toure, M. et Ndiaye, M., "Efficacité comparée de *Metarhizium anisopliae* (Hypocreale Clavicipitaceae) sur les différents états biologiques du criquet sénégalais: *Oedaleus senegalensis* (Orthoptères : Acrididea) ", *Afrique SCIENCE*, V. 6, n°3, (2010), 37 – 46.
25. Paraiso, A., Sossou, A., Thomas-Odjo, A. et Ogouchi, G., "Évaluation de l'efficacité des spores de *Metarhizium anisopliae* var. *acidum* dans une formulation aqueuse contre les sautériaux au Nord-Bénin", *Bulletin de la Recherche Agronomique*. V. 62, (2008), 14 - 23.
26. Kooyman, C., Ammati, M., Moumene, K., Chaouch, A. et Ahmed Zaid, A., "Essai de Green Muscle® sur les larves du criquet pèlerin dans la wilaya d'El-Oued, Sud-Est Algérie", *Raport FAO - TAC 715*, (2005), 23p.
27. Saadi, L., Mahboubi, Y. & Matallah, R., "Inflammatory effects of Imidacloprid on Thyroid Activity in Rats", *International Conference on Civil, Biological and*

- Environmental Engineering (CBEE - 2014), Istanbul, Turkey, (May 27- 28, 2014).
28. Kumar, A., Tomar, M., Kumar Kataria, S., “Effect of sub-lethal doses of imidacloprid on histological and biochemical parameters in female albino mice”, *Journal Of Environmental Science, Toxicology And Food Technology (IOSR-JESTFT)*, V. 8, n°1, (2014), 09-15
 29. Vohra, P., Khera, K.S., Sangha, G.K., “Physiological, biochemical and histological alterations induced by administration of imidacloprid in female albino rats, *Pestic. Biochem. Phys.*, V. 110, (2014), 50 – 56.
 30. Vohra, P., Khera, K.S., “Alterations in key enzymes and micromorphology of vital organs during exposure of imidacloprid in albino rats”, *International Journal of Advanced Research* V.3, n° 3, (2015), 134 - 144.
 31. Suchail, S., Guez, D., and Belzunces, L.P., “Discrepancy between acute and chronic toxicity induced by imidacloprid and its metabolites in *Apis mellifera*”, *Environmental Toxicology and Chemistry*, V. 20, n°11, (2001), 2482 – 2486.
 32. Suchail, S., Belzunces, Luc P. et Vaissière, Bernard-E., “Toxicité aiguë de l'imidaclopride et de ses métabolites chez l'abeille domestique *Apis mellifera*”, *Revue Abeilles et Fleurs*, n° 64, (2003), 27 - 30.
 33. Sandrock, C., Tanadini, M., Tanadini, L.G., Fauser-Misslin, A., Potts, S.G., Neumann P., “Impact of chronic neonicotinoid exposure on honeybee colony performance and queen superse dure”. *PLoS ONE*, V. 9, (2014), 1 - 13.
 34. Craig, M.S. Gupta, R.C., Candery, T.D. and Britton, D.A., “Human exposure to imidacloprid from dogs treated with Advantage®”. *Toxicol. Mech.Method.*, V. 15, (2005)., 287p.
 35. Shadduck, J.A., Roberts, D.W., Lause, S., “Mammalian safety tests of *Metarhizium anisopliae*: preliminary results”, *Environ. Entomol.*, V. 80, (1982), 189 –192.
 36. El-Kadi, M.K., Xara' L.S., De Matos, P.F., Da Rocha, J.V.N. and De Oliveira, D.P., “Effects of the entomopathogen *Metarhizium anisopliae* on guinea pigs and mice”, *Env. Entomol.*, V. 12, (1983), 37 – 42.
 37. Siegel, J.P., “Testing the pathogenicity and infectivity of entomopathogens to mammals”, In: Lacey, L.A. (Ed.), *Manual of Techniques in Insect Pathology*, Academic Press, San Diego, (1997), 325–336.

38. Goettel, M.S., Hajek, A.E., Siegel, J.P. & Evans, H.C., "Safety of fungal biocontrol agents" In: Butt, T.M., Jackson, C., Magan, N. (Eds.), *Fungi as Biocontrol Agents*, CAB International, (2001), 347–375.
39. Vestergaard, S., Cherry, A., Keller, S., Goettel, M., "Safety of hyphomycete fungi as microbial control agents", In: Hokkanen HMT, Hajek AE, editors, *Environmental impacts of microbial insecticides*, Dordrecht, NL: Kluwer Academic Publishers, (2003), 35 - 62.
40. Toriello, C., Perez-Torres, A., Burciaga-Diaz, A., Navarro-Barranco, H., Perez-Mejia, A., Lorenzana-Jimenez, M. & Mier, T., "Lack of acute pathogenicity and toxicity in mice of an isolate of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* from spittlebugs", *Ecotoxicology and Environmental Safety*, V. 65, (2006), 278 - 287.
41. Zimmerman, G., "The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and its potential as a biocontrol agent", *Pest. SCI.*, N°37, (1993), 375 – 379.
42. Zimmermann, G., "Review on Safety of the Entomopathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae*", *Biocontrol Science and Technology*, V. 17, (2007), 879-920.
43. Goettel, M.S., Jaronski, S.T., "Safety and registration of microbial agents for control of grasshoppers and locusts", In: Goettel, M.S., Johnson, D.L. (Eds.), "Microbial Control of Grasshoppers and Locusts", *Mem. Entomol. Soc. Can.*, V. 171, (1997), 83–99.
44. Muir, D., Martin, P., Kendall, K., Malik, R., "Invasive hyphomycotic rhinitis in a cat due to *Metarhizium anisopliae*", *Med Mycol.*, V. 36, (1998), 51– 54.
45. Burgner, D., Eagles, G., Burgess, M., Procopis, P., Rogers, M., Muir, D., Pritchard, R., Hocking, A. et Priest M., "Disseminated invasive infection due to *Metarhizium anisopliae* in an immunocompromised child", *J. Clin. Microbiol.*, V. 36, (1998), 1146–1150.
46. Revankar, S.G., Sutton, D.A., Sanche, S.E., Rao, J., Zervos, M., Dashti, F. & Rinald, M.G., "*Metarhizium anisopliae* as a cause of sinusitis in immunocompetent hosts", *J. Clin. Microbiol.*, V. 37, (1999), 195 – 198.
47. Cepero de Garcia, M.C., Arboleda, M.L., Barraquer F. & Grose, E., "Fungal keratitis caused by *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*" *J. Med. Vet. Mycol.* V. 35, (1997), 361–363.

48. Osorio, S, De la Camara, R, Monteserin, M.C., "Recurrent disseminated skin lesions due to *Metarhizium anisopliae* in an adult patient with acute myelogenous leukemia", *J. Clin. Microbiol.*, V. 45, (2007), 651 – 655.
49. Barbieri, R. T., Croce, J., Gandra, R. F., Gagete, E., Paula, C. R., & Gambale, W., "Allergenic extracts from *Metarhizium anisopliae* obtainment and characterization", *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*, V. 15, n° 2, (2005), 131–139.
50. Chopard, L., "Orthoptéroïdes de l'Afrique du Nord", Ed. Librairie Larose, Paris, coll. « Faune de l'empire français », T1, (1943), 450p.
51. Louveaux, A. et Benhalima, T., "Catalogue des orthopteres *Acridoidea* d'Afrique du nord-ouest". *Bull. Soc. Ent., France*, T.91, n° (3-4), (1987), 73-87.
52. Appert, J. et Deuse, J., "Les ravageurs des cultures vivrières et maraîchères sous les tropiques", Ed. Maison Neuve et Larose, Paris, (1982), 419 p.
53. Latchininsky, A.V. et Launois-Luong, M.H., "Le criquet Marocain, *Dociostaurus maroccanus* (Thunberg, 1815) dans la partie orientale de son aire de distribution, Étude monographique relative à l'ex-URSS et aux pays proches", CIRAD-GERDAT-PRIFAS : Montpellier /VIZR : Saint-Pétersbourg, (1992), 270p.
54. Grasse, P.P., "Traité de zoologie, Anatomie, systématique et biologie", Ed. Masson et Cie, Paris, T. IX, (1949), 1117p.
55. Popov, G.B., et Launois-Luong, M.H., et Van Der Weel, J., "Les oothèques des criquets du Sahel", Ed. CIRAD-PRIFAS, Coll. Acrid. Opérat, n°7, Pays-Bas, (1990), 92p.
56. Uvarov, B.P., "Grasshoppers and Locusts. A Handbouk of general acridology", Cambridge, Univ. Press, n°. 2, (1977), 613 p.
57. Bellmann, H. et Luque, T.G., "Guide des Sauterelles, Grillons et Criquets d'Europe Occidentale", Delachaux et Niestle, Lausanne, (1995), 384 p.
58. Benhalima, T., Etude expérimentale de la niche trophique de *Dociostaurus maroccanus* (Thunb, 1815) en phase solitaire au Maroc, Thèse Doc, Univ. Paris-Sud, (1983), 178 p.
59. Benfekih, L., "Données préliminaires sur la bioécologie de la sauterelle marocaine *Dociostaurus maroccanus* (Thunb, 1815). (Ort, Gomph.) dans la région de Aïn Boucif (W. Médéa)", Thèse Magister, Sci. agro., Int. Nat. Agro., El Harrach, (1993), 129 p.

60. Doumandji, S. et Doumandji-Mitiche, B., "Criquets et sauterelles (acridologie)" Ed. Off. Pub.Uni., Alger, (1994), 99 p.
61. Chara, B., "Polymorphisme phasaire chez les acridiens. Stage de formation de lutte antiacridienne", Ed. I.N.P.V -O.A.D.A., Alger, (1995b), 1-4.
62. Roffey, J., "Caractéristiques des débuts de recrudescence du criquet pèlerin. Lutte contre le criquet pèlerin par les techniques existantes, évaluation des stratégies", Compte rendu du séminaire de Wageningen, Pays Bas, (6-11 décembre 1993), (1993), 57 - 64.
63. Dhouibi, H.M., "Introduction à l'entomologie : morphologie, anatomie, systématique et biologie des principaux ordres d'insectes", Centre de publication universitaire, Tunis, (2002), 226p.
64. Albrecht, F.O., "Polymorphisme phasaire et biologie des acridiens migrants", Ed. Collection GPB Masson et Cie, Paris, (1967), 194 p.
65. Duranton, J.-F., Launois, M., Launois-Luong, M.H. et Lecoq M. "Guide anti-acridien du sahel", Min. Coop. Dev., Ed. CIRAD-PRIFAS, Montpellier, (1987), 344 p.
66. Chara, B., "Eléments sur la biologie et l'écologie du criquet pèlerin *Schistocerca gregaria* (FORSKAL, 1775). Stage de formation de lutte antiacridienne", Ed. I.N.P.V-O.A.D.A., Alger, (1995a), 32-45.
67. Duranton, J.F., Launois, M., Launois-Luong, M.H. et Lecoq, M., "Manuel de prospection acridienne en zone tropicale sèche", Tome I, Editions Gerdat, Paris, (1982), 695 p.
68. Louveaux, A. et Ben Halima, T., Catalogue des orthoptères Acridoidea Afrique du Nord-Ouest, Bull. Soc. Ent., France, n° 91, (1986), 73-87.
69. Pasquier, R., "Contribution a l'étude du criquet marocain *D. maroccanus* (Thunb. 1815) en Afrique mineure, Ext. Bull. Soc. Hist. Nat., Afrique du Nord, (1934),167- 200.
70. Pasquier, R., "Le criquet marocain en Algérie. Les recherches scientifiques récentes et leur répercussion sur la lutte rationnelle" Agrid., n°53, (1937), 1-14.
71. I.N.P.V., Surveillance et lutte contre les fléaux agricoles, situation acridienne de *Dociostaurus maroccanus*, Campagne 2015, Bulletin d'informations phytosanitaires N° 39, INPV, El-Harrach, Alger, (Juillet 2015), 4p.
72. Chapman, R.F., "The insects. Structure and function", Ed. The English Universities Press, New York, (1972), 819p.

73. Locke, M., Epidermis, (1998), 75-138 in Harrison F.W. and Locke M., "Microscopic anatomy of invertebrates", Insecta, V. 11A, (1998), Ed. Wiley-Liss Inc., New York, (1998), 2517p.
74. Fan, Y., Zurek, L., Dykstra, M.J. and Schal, C., "Hydrocarbon synthesis by enzymatically dissociated oenocytes of the abdominal integument of the german cockroach, *Blattella germanica*", Naturwissenschaften, V. 90, (2003), 121-126.
75. Vincent, J.F.V., "Cuticle", (2001), 1924-1928 in Buschow K.H.J., Cahn R.W., Flemings M.C., Ilshner B., Kramer E.J., and Mahajan S., Encyclopedia of materials: Science and technology, Ed. Elsevier Science Ltd.
76. Beaumont, A. et Cassier, P., "Travaux pratiques de biologie Animale : Zoologie, embryologie et histologie", Ed. Dunod, Paris, (1970), 472 p
77. Jankowiak, C., (2013), "Les insectes - le criquet migrateur". Disponible sur www.biopathe.fr
78. Wigglesworth, B., "The principles of insect physiology", Ed. Chapman and Hall, London, New York, (1972), 827 p.
79. Raccaud-Schoeller, J., "Les insectes : Physiologie et développement", Ed. Masson, Paris, (1980), 296 p.
80. Arnold, J.W., "Controversies about haemocyte types in insects", In: Insect Haemocytes. [Éd. A.P. Gupta]. Cambridge University Press, Cambridge, (1979), 231-258.
81. Gupta, A.P., "Haemocytes types: their structures, synonymies, interrelationships, and taxonomic significance", (1979), 85 -127. In: Insect haemocytes. A.P. Gupta, Ed., Cambridge University Press, GB.
82. Gupta, A.P., "Cellular elements in the haemolymph", In: Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology. [Eds. G.A. Kerkut and L.I. Gilbert]. Pergamon Press, Oxford, New York, Toronto, Sydney, Paris, Frankfurt, 3, (1985), 401-451.
83. Gillespie, J.P., Burnett, C., and Charnley, A.K. "The immune response of the desert locust *Schistocerca gregaria* during mycosis of the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae* var. *acidum*", Journal of Insect Physiology, V. 46, (1999), 429-437.

84. Showler, A.T., "A summary of control strategies for the desert locust, *Schistocerca gregaria* (Forsk.)". *Agriculture, Ecosystem and Environment*, 1753, (2001), 1 - 7.
85. Lomer, C.J., Bateman, R.P., Johnson, D.L., Langewald, J. & Thomas, M.B., "Biological control of locusts and grasshoppers", *Annu. Rev. Entomol.* 46, (2001), 667–702.
86. Launois-Luong, M.H., Launois, M. et Rachadi, T., "La lutte chimique contre les criquets du Sahel", Éd. Dehan, CIRAD/PRIFAS, Montpellier, V.3 (1988), 83 p.
87. Ould El Hadj, M.D., Bouziane, N., Minami, A. et Ould El Hadj-Khelil, A., "Problèmes de la lutte chimique au Sahara algérien: cas des acridicides", *Algerian journal of arid environment*, V.1, n°1, (2011), 77 - 83.
88. Moretau, B., Etude de certains aspects de la physiotoxicologie d'insecticide de synthèse chez *Locusta migratoria*. In : Essaid A. La lutte antiacridienne, Ed. AUPELF UREF, John Libbey Eurotext, Paris, France, (1991), 167-178.
89. Thiam, A., "Problématique de l'utilisation des insecticides chimiques dans la lutte antiacridienne au Sahel", *La lutte antiacridienne*, Ed. AUPELF-UREF, John Libbey, Eurotext, Paris ©, (1991), 193 - 206.
90. Bidochka M.J et Small C. (2005). Phylogeography of *Metarhizium*, an insect pathogenic fungus. In: F.E. Vega & M. Blackwell (Eds.) *Insect-Fungal Associations*. 28-49. Oxford University Press Inc., New York.
91. Doumandji-Mitiche, B., Doumandji, S., Benfekih, L., Bouanane, M. & Frah, N., "Les prédateurs et les parasites du Criquet marocain, *Dociostaurus maroccanus* (Thunberg, 1815) (Orthoptera, Gomphocerinae) en Algérie", *Bulletin de Zoologie Agricole et Forestière* n°13, Inst. Nati. Agr., El-Harrach Alger, (1996), 1-4.
92. Mwangi, R.W., Kabaru, J.M. and Rembold, H., "Potential for *Melia volkensii* fruit extract in the control of locusts", (1997), 193 - 200 in Krall S., Peveling R. and Ba Diallo D., *New strategies in locust control*, Ed. Birkhäuser Verlag, Basel/ Switzerland, 522p.
93. Lomer, C.J., Bateman, R.P., Dent, D., Groote, H.D., Douro-Kpindou, O.K., Kooyman, C., Langewald, J., Ouambama, Z., Peveling, R., Thomas, M., "Development of strategies for the incorporation of biological pesticides into the integrated management of locusts and grasshoppers", *Agric. Forest. Entomol.*, V.1, (1999), 71- 88.

94. Kouassi, M., "Les possibilités de la lutte microbiologique emphase sur le champignon entomopathogène *Bauverea bassina* Vertigo", La revue électronique en science de l'environnement, V. 2, n° 2, (2001), 2-6.
95. Keith, D. et Kevan, M.E., "Les agents de la lutte biologique existant en potentiels contre les orthoptéroïdes nuisibles", (1992), 107 – 150 cités par Vincent C. et Coderred D., "La lutte biologique", Ed. Gaëtan Morin, Québec, (1992), 67 p.
96. Aseno, L., Carbonnell, T., Lopez, J. et Lopez, L. V., "Entomopathogenic fungi in soils from Alicante province, Spanish Journal of Agricultural Research, V.1, n°3, (2003), 37-45.
97. Amouriq, L., "Rapport entomologo-cryptogamiques : Éléments sur la relation entre les insectes et les champignons", Éd. Herman, Paris, (1973), 135p.
98. LUBILOSA., "Green Muscle, Manuel d'utilisateur, Version 4", lutte Biologique contre les Locustes et les Sautériaux, programme, International Institute of Tropical Agriculture, Cotonou, Bénin, (1999).
99. Kooyman C., "*Metarhizium anisopliae* var. *acridum*, la matière active du Green muscle®", (2007), 11 – 13, cité par Wade, V., "Atelier international sur l'avenir des biopesticides dans l'avenir contre le criquet pèlerin", Ed. The orthopterist's society, Sénégal, (12-15 février 2007), 32 p.
100. Bischoff, J.F., Stephen, A.R., Richard, A.H., "A multi locust phylogeny of *Metarhizium acridum* lineage", Mycologia, V. 101, n°4, (2009), 512-530.
101. Burges, DH, "Formulation of mycoinsecticides In: Formulation of microbial biopesticides: beneficial microorganisms, nematodes and seed treatments", (Editor) by Burges HD, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, (1998), 31-185.
102. Bateman, R. P., "L'application de mycopesticides antiacridiens en gouttelettes calibrées", (1991), 250-257 cité par LOMER C.J. et PRIOR C., 1991, *Lutte biologique contre les acridiens. Compte rendu d'un atelier (29 avril – 1^{er} mai) Bénin*. Ed. C.A.B International, Wallingford, 399 p.
103. Langewald, J., Kpindou, D. et Zakaria, O., "Green Muscle Manuel", Lutte Biologique contre les Locustes et les Sautériaux (LUBILOSA), (2000), 12p.
104. Geottel, M.S., "Des champignons comme agents de lutte biologique", pp : 122 – 132 in Lomer C.J. et Prior C., (1991), "Lutte biologique contre les

- acridiens”, Compte rendu d’un atelier (29 Avril – 1 Mai), Bénin. Ed. C.A.B. International, Royaume Uni, (1991), 399 p.
105. Inglis, G.D., Johnson, D.L. & Geottel, M.S., “Field Laboratory evaluation of two conidial batches of *Beauveria bassiana* (Balsamo) against grasshoppers”, Canadian Entomology, V. 29, (1997), 171-186.
106. Bissaad, F.Z., Youcef, M., Bounacerur, F. et Doumandji-Mitiche, B., “Activité biologique d’un biopesticide le Green Muscle sur le tégument du criquet pèlerin *Schistocerca gregaria* (Forskål, 1775) (Orthoptera, Acrididae)”, Nature & Technologie, V. 6, (2012), 51 -58.
107. St-Leger, “Biology and mechanisms of insect-cuticle invasion by Deuteromycete fungal pathogens”. In: Parasites and pathogens of insects. Vol. 2. Pathogens. N.E., Beckage and B. Federici. Academic Press, New York, (1993), 211- 230. New York.
108. Stoltz, I., “The effect of *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin (= flavoviride) Gams and Rozsypal var. acridum (Deuteromycotina: Hyphomycetes) on non-target Hymenoptera”, PhD thesi., University of Basel, (1999), 19p.
109. Kleespies, R.G., Huger, A.M., and Stephan, D., “Diagnosis and pathology of diseases from locusts and other orthopterans”. Ed. Gesellschaft für pflanzenzucht und B.B.A., Berlin, (2000), 43p.
110. Inglis, G.D., Goettel, M., Butt, T., Strasser, H., “Use of hyphomycetous fungi for managing insect pests”, In: T.M. Butt, C.W. Jackson et N. Magan (Eds.) “Fungi as Biocontrol Agents: progress, problems and potential”, CABI Publishing, Wallingford, United Kingdom, (2001), 23 - 70.
111. Culmsee, F. H., “The habitat functions of vegetation in relation to the behavior of the Desert Locust *Schistocerca gregaria* (Forskål) (Acrididea: Orthoptera) – A study in Mauritania (West Africa)”, Phytocoenologia, V. 32, n°4, (2002), 645-664.
112. Langewald, J., Control of hopper bands of *Schistocerca gregaria* with the entomopathogenic fungus *Metarhizium flavoviride* in the North –East of Mauritania in April 1995. LUBILOSA report, IITA, Cotonou, Bénin, (1995).
113. Langewald, J., Kooyman, C., Douro-Kpindou, O.K., Lomer, C.J., Dahmoud, A.O., Mohamed, H.O., “Field treatment of desert locust (*Schistocerca gregaria* Forskal) hoppers in the field in Mauritania with an oil formulation of the

- entomopathogenic fungus *Metarhizium flavoviridae*", Biocontrol Science and Technology, V. 7, (1997), 603 - 611.
114. Ould Taleb, MEH., Rapport sur l'étude de l'efficacité du *Metarhizium anisopliae* contre le croquet pelerine en Mauritanie, Centre de lute antiacridienne, Ministère du développement rural et de l'environnement, Nouakchott, (2004).
 115. Aston, "Medium scale field trials with the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Green muscle) against desert locust (*Schistocerca gregaria*) in Niger", Draft project report, OSRA/RAF/801/USA, February 2004, FAO, Rome, (2004).
 116. Ouambama, Z., Mullié, WC., Rananou, M., Coolibaly, B.M., Mamadou, A., Tankouano, A., "Essai du mycoinsecticide Green muscle[®] sur les aillés du criquet pèlerin dans la vallée d'Agheliough, près d'Arlit, Niger, 5 au 30 novembre 2005", F.A.O. Niamey, Dakar, (final draft Septembre 2006).
 117. Suckow, M.A., Weisbroth, S.H., and Franklin, C.I., "The laboratory Rat". 2nd edition. Academic Press, San Diego, USA, (2006), 72-106.
 118. Baker, J.H., Lindsey J.R. & Weisbroth, S.H., The laboratory Rat, New York: Academic press, (1980), V.2, 276p.
 119. Guez. D., (2001), "Effets sublétaux de l'imidaclopride sur le comportement de l'abeille domestique *Apis mellifera*". Thèse de doctorat. Université de Pierre et Marie Curie
 120. Mohany, M., Badr G., Refaat, I. and El-Feki, M., "Immunological and histological effects of exposure to imidacloprid insecticide in male albino rats", African Journal of Pharmacy and Pharmacology, V. 5, n°18, (2011), 2106 - 2114.
 121. Laramee, S., "L'abeille domestique comme bio-indicateur ecotoxicologique de pollution. Le cas de l'insecticide imidaclopride", Université Catholique de Louvain, (2007)15p.
 122. Fossen, M., "Environmental fate of Imidacloprid", Departement of Pesticide Regulation, California, (2006), 10-15.
 123. Azevedo, P.H., Lemos, M. and Soares, A., "Effects of imidacloprid exposure on *Chironomus riparius* Meigen larvae: Linking acetylcholine esterase activity to behavior", Ecotoxicology and Environmental Safety, V. 74, (2011), 1210-12015.

124. Masaru, S., Maiko, Y., Masako O., Kazuhiko, M., Miki, A., David, B.S. and Koichiro, K., (2003), Combinatorial mutations in loops D and F strongly influence responses of the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor to imidacloprid. *Brain Research*, 991, (2003), 71-74
125. Bourg, S., "Abeille et insecticides phytosanitaires", Thèse de Doctorat, Ecole Nationale Vétérinaire, Paris, (2006), 125p
126. Herron, G.A., & Wilson, L.J. "Neonicotinoid resistance in *Apis gossypii* glover (Aphididae : Hemiptera) from Australian cotton", *Australian journal of Entomology*, V. 50, (2011), 93-98.
127. Anatra-Cordone, M., and Durkin, P., "Imidacloprid Human health assessment and ecological risk assessment", Final report, Syracuse Environmental Research Associates, Inc., New York, SERA TR 05-43-24-03a. (2005).
128. Riaz, M., "Bases moléculaires de la résistance métabolique au néonicotinoïde imidacloprid chez la moustique *Aedes aegypti*". Thèse de Doctorat, Université de Grenoble Biodiv., *Ecol. Environ.*, (2011), 8-19.
129. Benbrook, C.M., "Sustainable Agriculture Research and Education in the field", National Academy Press, Washington, DC, USA, (1991).
130. Mullins, J.W., "Imidacloprid, a new nitroguanidine insecticide, *Am. Chem. Soc.*, (1993), 183-198.
131. Sudakin, D.L., "Occupational exposure to aluminium phosphide and phosphine gas, A suspected case report and the review of literature", *Hum. Exp. Toxicol.*, V. 24, (2005), 27-33.
132. Beachet, M. and Whalen, M.M., "Effects of organochlorine pesticides on interleukin secretion from lymphocytes", *Hum. Exp. Toxicol.*, V. 25, (2006), 651-659.
133. Yu, F., Wang, Z., Ju, B., Wang, Y., Wang, J., Bai, D., "Apoptotic effect of organophosphorus insecticide chlorpyrifos on mouse retina in vivo via oxidative stress and protection of combination of vitamin C and E", *Exp. Toxicol. Pathol.*, V. 59, (2008), 415-423.
134. El-Gendy, K.S., Aly, N.M., Mahmoud, F.H., Kenawy, A. and El-Sebae, A.K., "The role of vitamin C as antioxidant in protection of oxidative stress induced by imidacloprid", *Food chem. Toxicol.*, V. 48, (2010), 215-221.
135. Stephan, B., Kyle, L. and Yong, X., Role of oxidative stress in the mechanism of dieldrin's hepatotoxicity, *Ann. Clin. Lab. Sci.* V. 27, (1997), 196-208.

136. Kumar, S. (2004), "Occupational exposure associated with reproductive dysfunction", *J. Occup. Health.*, V. 46, n°1, (2014), 1-19.
137. Abou- Donia, M.B., Goldstein, L.B., Buliman, S., TU T., Khan, W.A., Dechkovskaia, A.M. and Abdel-Rahman, A.A., "Imidacloprid induces neurobehavioral deficits and increases expression of glial fibrillary acidic protein in motor cortex and hippocampus in offspring rats following in utero expression", *J.toxicol. Environ. Health.*, V.71, (2008),119-130.
138. Paolini, M., Sapane, A. and Gonzalez, F.J., "Parkinson's disease, pesticides and individual vulnerability", *Trends Pharmacol. Sci.*, V. 25, (2004), 124 - 129.
139. Cantoreggi, S. et Lutz, W.K., Covalent binding of styrene to DNA in rat and mouse . *Carcinogenesis*, V. 14, (1993), 355 - 360.
140. Karaby, N.U. and Oguz M.G., Cytogenetic and genotoxic effects of the insecticides, imidacloprid and methamidophos, *Genet. Mol. Res.*, V. 4 (2005), 653 - 662.
141. Demisia, G., Vlastos, D., Goumenou, M., Malhopoulos, D.P., "Assesment of the génotoxicity of imidacloprid and metalaxyl in cultured human lymphocytes and rat bone merrow. *Mutation research*", V. 634, (2007), 32-39.
142. Santé CANADA, Rapport d'évaluation, Confidor 200 SL. (imidaclopride). Publication, Agence de reglementation de la lutte antiparasitaire, Santé Canada. CANADA, (2011).
143. Eiben R., Pilot Range - finding study for a chronic toxicity on Wistar rats ninety eight day feeding study, Bayer AG, Fachbereich toxicology wuppertal, Germany, Study No. 99672. DPR Vol. 51950 - 0012 – 119477 (1988).
144. Schulz-Jander D. and Casida, J., Imidacloprid insecticide metabolisme humancytochrome P450 isoenzymes differ in selectivity for imidazolidine oxidation verso nitroimine reduction, *Toxicology Letters*, V. 132, (2002), 65 - 70.
145. Al- Sayda, H., "Transfert d'un insecticide systémique, l'imidaclopride chez la tomate : implication du transport phlo émien", Thèse de Doctorat, Institut National Polytechnique,Toulouse, France (2007), Pp.174.
146. Moriya, K., Shibuya, K., Hattori J., "Structural modification of the 6-chloropyridyl moiety in the imidacloprid Skeleton: Introduction of a five-membered heteroaromatic ring and the resulting insecticidal activity", *Biosci. Biotech. Biochem.*, V. 56, (1992), 364 – 365.

147. Goyal, S., Sandhu, H. S. and Brar, R. S., "Histopathological alterations induced after oral sub-acute thiacloprid toxicity in *Gallus domesticus*", *Vet. Arhiv.*, V.80, (2008), 673 - 682.
148. Struger, Fletcher J., Martos T.P., Riplay B., and Gris, G., pesticide concentration in the Don and Humber River Watersheds (1998-2000). Environment Canada, Ontario Ministry of the environment , and city of Toronto. (2002), Pp21.
149. Craig, M.S., Gupta R.C., Candery T.D. and Britton D.A., Human exposure to imidaclopride from dogs treated with Advantage. *Toxicol Mech Method.* V.15, (2005), 287
150. Benabdeli, K., "Evaluation de l'impact des nouveaux mode d'elevage sur l'espace et l'environnement steppique : Commune de Ras-EI-Ma (Sidi-Bel-Abbes- Algerie)" *Options Méditerranéennes*, CIHEAM, Séie A, n. 39 (Rupture... nouvelle image de l'élevage sur parcours), (2000), 129-141.
151. Bouchettata, T.B., "Diagnostic écologique, désertification et analyse des stratégies en milieu steppique", *Ecosystems*, UDL-INRA de Sidi- Bel- Abbes, Vol. 2, n°2, (2002), 43-51
152. D.S.A., "L'agriculture à Sidi-Bel-Abbes". Rapport de la direction des services agricole de la Wilaya de Sidi-Bel-Abbes, (2009), 14p.
153. Meterfi, B., Letreuch-Belarouci, N. et Benabdelli, K., "Incidence de la fluctuation des précipitations sur l'occupation des sols dans les hutes plaines de Sidi-Bel-Abbes", *Varia revue Physio-géo.*, V.5, (2011), 191-210.
154. E.P.A., "Environmental Protection Agency, Imidacloprid risk characterization document dietary and drinking water exposure", health assessment section, medical toxicology branch, department of pesticide regulation, California, (2006),
155. Ceballos L., 2012. Evaluation toxicologique des pesticides. *Rev. Le champ de la terre.*
156. Bognaho, Md C., "Etude comparée de l'efficacité de ndipel 2X (*B. thuringiensis*) et de Decis (deltaméthrine) sur les différents stades larvaires de *Maruca testulalis* (GEYER)", (1996).
157. E.P.P.O., "Hoppers hands of *Schistocerca gregaria* undesr natural conditions. European and Mediterranean Plant Protection Organisation Standard for the

- efficacy evaluation of plant protection product”, EPPO, 2nd edition, Paris, France, V. B3, (2004), 191p.
158. F.A.O., “Directive sur le criquet pèlerin, fascicule 4 : Lutte antiacridienne”, Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome, Italy, (2001), 85p.
159. F.A.O., “Guideline- Operational-Scale field trial with Green muscle (*Metarhizium anisopliae* var. *acridum*)”, Migratory pests Group, Food and Agriculture Organisation of the United Nations Rome, Italy. Version 3, February 28, (2005).
160. Bateman, R.P., “Simple standardized methods for recording droplet measurements and estimation of deposits from controlled droplet application”, Journal of Crop Protection, V. 12, (1993), 201-206.
- 161.. Lomer, C.J., Thomas, M.B., Godonou, I., Shah, P.A., Douro-Kpindu, O.K. & Langewald, J., “Control of grasshoppers particularly *Hieroglyphus daganensis* in northern Benin using *Metarhizium flavoviride*”, Memoirs of the Entomological Society of Canada. 171, (1997), 301- 311.
162. Henderson, C.F. & Tilton, E.W., “Tests with acaricides against the brown wheat mite”, Journal of Economic Entomology, V. 48, (1955), 157-161.
163. Gabe, M., “Techniques histologiques”, Ed. Masson, Paris, (1968), 1113p.
164. Martoja, R. et Martoja-Pierson, M., “Initiation aux techniques de l’histologie animale Ed. Masson et Cie, Vle, Paris (1967), 345p.
165. Guzo, D. and Stolz, D.B., “Observations on cellular immunity and parasitism in the tissor moth”, Journal of Insect Physiology, V. 33, (1987), 19 - 31.
166. Kaidi, N., “Bioécologie de *Schistocerca gregaria* Forskål, 1775 (Orthoptera, Cyrtacanthacridinae) dans la région de l’Ahaggar. Essais de lutte biologique au moyen de champignons entomopathogènes : *Beauveria bassiana* et *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*”, Mém. Magi., École. Nati. Sup. Agro., El-Harrach, (2007), 109 p.
167. Halouane, F., “Cycle biologique de *Schistocerca gregaria* (Forskål, 1775) et de *Locusta migratoria* (Linné, 1758) (Orthoptera, Acrididae). Efficacité de *Metarhizium anisopliae* (Metch) (Hyphomycètes, Deuteromycotina) et effet sur quelques paramètres physiologiques de *Schistocerca gregaria*”, Thèse Magister, Ecol. Nati. Sup. Agro., El-Harrach, Alger. (1997).

168. Halouane, F., "Recherche fondamentales sur l'entomopathogène *Beauverea bassiana* (Ascomycota : Hypocreales): Bioécologie, production et application sur *Schistocerca gregaria* (Forsk., 1775) et *Locusta migratoria* (Linné, 1758) (Orthoptera, Acrididae)", Thèse Doctorat, Sci. Agro., Ecol. Nat. Sup. Agro., El-Harrach, (2008), 190p.
169. Kara, F.Z., "Evaluation du statut phasaire dans les biotopes solitaires du criquet pèlerin *Schistocerca gregaria* en Algérie et essai de lutte par un biopesticide" Thèse de Doctorat en Sci. Agro, Entomologie appliquée, Ecol. Nat. Sup. Agr. El-Harrach, (2010), 184 p.
170. Rasily, F., (1968), "Les techniques de mycologie en pathologie végétale", Ann. Epiphyties (19). 102 p.
171. Abbot, W.B., "A method for computing effectiveness of insecticides", J. Econ. Ent., V.19, (1925), 265 – 267.
172. Cavelier, A., Cours de phytopharmacie, Ed. Inst. Nat. Agro. El-Harrach-Alger. T1, (1976), 514p
173. Tabacco, A., Meiattini, F., Moda, E., Tarli, P., (1979), Simplified enzymic/colorimetric serum urea nitrogen determination, Clinical chemistry, V. 25: (1979), 336-337.
174. Bartels, H., Bohmer, M., "Micro-determination of creatinine", Clin. Chim. Acta., V.17, (1971), 696- 700.
175. Tomas L., Clinical laboratory diagnostics. Ed., Verlagege sellschaft, Frankfurt, (1998), 55-65.
176. Bradford, M.M., "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding", Ana de Biochimie, V. 72, (1976), 248-254.
177. Bai, D., Tumonis, S.C.R., Leicht, W., "Actions of imidacloprid and a related nitromethylene ou cholinergic receptors of and identified insect motor neurone", Pestic. Sci. V. 33, (1991), 197 - 204 in (R. Chauvet et al., 2004).
178. Tomizawa, M., & Casida, J.E., "Selective toxicity of neonicotinoids attributable to specificity of insect and mammalian nicotinic receptors", Annual review entomol, V. 48, (2003), 339 –364.
179. Moreteau, B., "Etude de certains aspects de la physiotoxicologie d'insecticides de synthèse chez le Criquet migrateur : *Locusta migratoria* R. &

- F." Laboratoire de Zoologie et a"Ecologie, URA CNRS 690, Université Paris-Sud, Centre d'Orsay, Bât. 442, 91405 Orsay Cedex, France, (1991), 167-177.
180. Bal, A. B. et Sidati, S. M., "Réduction des doses efficaces d'insecticides contre les larves de criquet pèlerin (*Schistocerca gregaria* Forskål, 1775: Orthoptera, Acrididae) par l'utilisation de quantités réduites de phénylacétonitrile", *Journal de Biotechnologie, Agronomie Société et Environnement*, V.17, n°4, (2013)., 572 - 579.
181. F.A.O., "Workshop on spray equipment used in desert locust control. FAO Commission for Controlling the Desert Locust in the Near East", Cairo, Egypt, August 21-23, (1994).
182. Inglis, G.D., Goettel, M.S., Johnson, D.L., "Persistence of the entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* on phylloplanes of crested wheatgrass and alfalfa", *Biol. Control*, V.03 (1993), 258-270.
183. Kane, C.M.H., SAKHO, El B.L. et WILPS, H., "Comparaison de la virulence de deux souches de *Metarhizium anisopliae var acridum* sur le Criquet Pèlerin, *Schistocerca gregaria* et l'effet de la température sur leur efficacité", 17^{ème} Conférence de l'Association Africaine des Entomologistes, Université Cheikh Anta Diop de Dakar, Ed. The African Association Of Insect Scientists, Nairobi, Kenya. (11 - 15 juin 2007),
184. Bateman, R. P., Douro-Kpindou, O. K., Kooyman, C., Lomer, C, Ouambama, Z. "Some observations on the dose transfer of mycoinsecticide sprays to desert locusts"? *Crop Protection*, V. 17, n°2, (1998) 151-158.
185. Delgado, F.X., Brittos H.J., Ossager, A.J., Enberg, J., "Field assessment of *Beauveria Bassiana* (Balsamo) Vuillemin and potential synergism with diflubenzuron for the control of savana grasshopper complex (Orthoptera) in Mali" *J. Invert. Pathol.* V. 73, (1999), 34-39.
186. Halouane, F., Bissaad, F. Z, Doumandji-Mitiche, B., Benzina, F., Chahbar, N. & Hamid, S. "Study of the effect of *Beauveria bassiana* (Vuil.) on the biochemistry and structure of the cuticle of *Schistocerca gregaria* (Forskål)", *Annals of Biological Research*, V.12, (2013), 68 – 74.
187. Grassé, P.P., "Traité de Zoologie", Tome VIII, Masson, Paris, (1976), 226-259.
188. Oulebsir-Mohandkaci, H. et Doumandji-Mitiche, B., "Etude de l'impact biologique de *Pseudomonas spp.* Fluorescents sur les métabolites

- hémolyphatiques et l'histologie du tube digestif des larves L5 du criquet migrateur *Locusta migratoria* (linné, 1758)", Lebanese Science Journal. V. 13, n°2, (2012), 99 - 115.
189. Mohand Kaci, H. Ait Kaci, K. Doumandji- Mitiche, B. et Fazouane, F., "Study of the insecticidal activity of alkaloids of the hairybroom *Cytisus triflorus* and of the bacterium *Bacillus thuringiensis* against the desert locust *Schistocerca gregaria*", The XX International Congress of Zoology, Paris, (26-29 August 2008).
190. Chaieb, I., Ben Halima-Kamel, M. et Ben Hamouda, M., "Toxicity experiments of the saponic extract of *Cestrum parqui* (Solanaceae) on some insect species" Journal of Entomology, V. 4, (2007), 113-120.
191. Abdellaoui, K., Ben Halima-Kamer, M., Ben Hamouda, M. H. "Insecticidal Activity of Gibberellic Acid against *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera, Noctuidae) and *Locusta migratoria* (Orthoptera, Acrididae) ", Pest technology, V.3, n°1, (2009), 28-33.
192. Ammar, M. et N'cir, S., "Incorporation of *Cestrum parquii* (Solanaceae) leaves in an artificial diet affected larval longevity and gut structure of the desert locust *Schistocerca gregaria*", Tunis. J. Plant Prot., V.3, (2008), 27-34.
193. Quesada-Moraga, E. & Santiago-Alvarez, C., "Histopathological effects of *Bacillus thuringiensis* on the midgut of the Mediterranean locust *Dociostaurus maroccanus*", J. of invertebr. Pathol., V. 78, (2001), 183 - 186.
194. Idrissi Hassani, L.M. et Hermas, J., "Effets de l'alimentation en *Peganum harmala* L. (Zygophyllaceae) sur le tube digestif du criquet pèlerin *Schistocerca gregaria* Forsk. (Orthoptera, Acrididae) ", Zool. Baetica., V.19, (2008), 71-84.
195. Abbassi, K., Mergaoui, L., Atay-Kadiri, Z., Stambouli, A. et Ghaout, S., "Effets des extraits de *Peganum harmala* (Zygophyllaceae) sur le criquet pèlerin (*Schistocerca gregaria* Forskål, 1775)" , Zoologica baetica, V.13, n°14, (2003b), 203-217.
196. Messgo-Moumene, S., Merzouk, D.E., Houmani, Z., et Moumene, K., "Valorization of three plant species of arid areas in biological control of the desert locust *Schistocerca gregaria*", Tunis. J. Plant Prot., V. 10, (2015), 117-130.

197. Quesada-Moraga, E., "Histopathological effects of *Bacillus thuringiensis* on the midgut of the Mediterranean locust *Dociostaurus maroccanus*", *Journal of Invertebrate Pathology*, V. 78, (2001), 183 –186.
198. Nasiruddin, M., et Mordue (Luntz), A.J., "The effet of azdirachtine on the midgut histology of the locusts, *Schistocerca gregaria* and *Locusta migratoria*", *Tissues and Cell.*, V. 25, n°06, (1993), 875-884.
199. Ouali-N'goran, S.W.M., Koua, K.H., Tano, Y. et Glitho, A.I., "Effects of sub-lethal doses of fenitrothion on the microscopic structure of the midgut of the desert locust, *Schistocerca gregaria* (Forsk. 1775; Orthoptera, Acrididae)", *J. Biol. Food. Sci. Res.*, V.2, n°7, (2013), 79 - 84.
200. Bidoshka, M.J., Leger, R.J. et Roberts, D.W., "Mechanisms of Deuteromycete fungal infections in grasshoppers and locust: an overview", *Memoirs of the Entomological Society of Canada*, V. 171, (1997), 213 - 224.
201. Bouhacein, M., "Effet de deux entomopathogène (Hyphomycètes, Deuteromycotina), *Beauveria bassiana* (Balasmo) Veuillemin et *Metarhizium flavoviride* Gams et Rozyspal sur les métabolites hémolympatiques, l'hémogramme et les protéines circulaires chez *Locusta migratoria* (Linné, 1758)". *Mém. Ing. Agro., Ecol. Nati. Sup. Agro., El-Harrach*, (1999), 121 p.
202. Halouane, F., Benzara, A., Doumandji-Mitiche, B., Bouhacein, M., "Effet de deux entomopathogènes, *Beauveria bassiana* et *Metarhizium flavoviride* (Hyphomycètes, Deuteromycotina) sur l'hémogramme des larves 5^e stade et des adultes de *Locusta migratoria* (Orthoptera: Acrididae)". *J. Orth. Res*, V. 10, n°2, (2001), 331-334.
203. Vey, A., Quiot, J. M. et Pais, M. "Toxémie d'origine fongique chez les invertébrés et ses conséquences cytotoxiques : étude sur l'infection à *Metarhizium anisopliae* (Hyphomycètes, Moniliales) chez les Lépidoptères et les Coléoptères", *Journal de la Société de Biologie*. 180 (1986) 105 – 112.
204. Lavine, M.D. and Strand, M.R., "Insect haemocytes and their role in immunity", *Insect Biochem. mol. Biol.*, 32, (2002), 1295-1309.
205. Bissaad, F.Z., Bounaceur, F., Behidj, N., Chebouti, N., Halouane, F. et Doumandji-Mitiche, B., "Effect of two entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* var. *acidum* on the heamolymph of the desert locust *Schistocerca gregaria*", *International journal of biological*,

- biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering, V. 8, n°11, (2014), 1298 -1301.
206. Xia, Y., Dean, P., Judge, A.J., Gillespie, J.P., Clarkson, J.M. & Charnley, A.N., "Acid phosphatases in the haemolymph of the desert locust *Schistocerca gregaria*, infected with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*", J. insect. physio., V. 46, (2000), 1249 – 1257.
207. Coulibaly Adama, M., "Effet de *Beauveria bassiana* (B) et *Metarhizium flavoviride* (Get R) sur l'hémogramme et les protéines de l'hémolymphe d'*Anacridiuma egyptium* (L, 1764) (Orthoptera, Acrididae). Étude de la persistance des spores sur le support végétal", Mém. Ing., Ecol. Nat. Agr., El-Harrach, (2002), 99p.
208. Habbes, D., "Effet de *Bacillus thuringiensis* sur l'intestin, les hemocytes et sur le métabolisme général de *Thaumetopea pityocampa* Schiff (Mepidoptera, Notodontidae)", Thèse de Magister, Sci. Agr., Univ. Annaba, (1989), 83p.
209. Avulova, S. and Rosengaus, R.B., "Losing the battle against fungal infection: suppression of termite immune defenses during mycosis", Journal of Insect Physiology, V.57, (2011), 966-971.
210. Badji, K., "Efficacité et impact de *Metarhizium anisopliae* (Metschinkof) Sorokin en lute antiacridienne au Sénégal", Atelier international, PAN Africa, Protéger les populations contre les invasions des criquets et des pesticides, Dakar, (Janvier 2013).
211. Kara-Toumi F.Z., "Evaluation du statut phasaire dans les biotopes solitaires du criquet pèlerin *Schistocerca gregaria* en Algérie et essai de lutte par un biopesticide", Thèse de Doctorat en Science Agronomique, Spécialité : Entomologie appliquée, Ecole Nationale Supérieure Agronomique d'El Harrach –Alger (2010), 184p.
212. Vey, F. Cavalier B. Courtiade (1996) ""Au secours de la protection des plantes contre les insectes : des substances produites par des champignons. Phytoma, 489 : 16-20.
213. Fargues, J., Goettel, M.S., Smits, N., Ouedraogo, A., & Rougier, M., "Effect of temperature on vegetative growth of *Beauveria bassiana* isolates from different origins. Mycologia", V. 89, (1997), 383-392.
214. Haddadj, F., "Evaluation de l'activité biologique de l'entomopathogène *Beauveria bassiana* (Bals) (Hyphomycetes, Deuteromycotina): efficacité sur la

- cuticule des L5 de *Schistocerca gregaria* (Forskäl, 1775) (Acrididae, Cyrtacantharidinae)”, Thèse Magister, Sci. Agr., Ecol. Nat. Sup. Agro., El-Harrach, (2001), 96p.
215. Vidal, C., Fargues, J., & Lacey, L.A., “Effect of various liquid culture media on morphology, growth, propagule reduction and pathogenic activity to *Bemisia argentifolia* of the entomopathogenic hypomycètes, *Poecilomyces fumosoroseus*”, Mycopathologica, 143, (1997), 33 – 46.
216. Davet, P. et Pouxel, F., “Détection et isolement des champignons du sol”. Ed. INRA. France (2007), 203 p.
217. Scanlan, J.C., Grant, W.E., Hunter, D.M. & Milner, R.J., “Habitat and environmental factors influencing the control of migratory locust (*Locusta migratoria*) with an entomopathogenic fungus (*Metarhizium anisopliae*)” Ecological Modelling, V. 136, (2001), 223-236.
218. Hallsworth, J.E. & Magan, N., “Water and temperature relations of growth of the entomophagous fungi *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces farinosus*”. Journal of Invertebrate pathology, V. 74, (1999), 261-266.
219. Cavelier, A., 1976- Cours de phytopharmacie. Ed. Indt. Nat. Agro. El-Harrach. T1, 514 p.
220. Held U., Pièges des correlations: les coefficients de corrélation de Pearson et Spearman .Forum. Med. Suisse, V.10, n°38, (2010), 652-653.
221. Toudert- Djouber, F., “Contribution à l’étude des effets sublétaux de l’imidaclopride sur la physiologie des ouvrières et des reines de l’abeille domestique (*Apis mellifera intermissa*)”, Magistère en Sci. Agr., Option : Alimentation animale et produits animaux Université Mouloud Mammeri, Tizi-Ouzou (2011), 96p.
222. Kaidi, N., “Effet de la température et des milieux de cultures sur *Beauveria bassiana* Bals. (Hyphomycètes, Deuteromycotina). Activité biologique de cet entomopathogène vis-à-vis des imagos de *Schistocerca gregaria* (Forskäl, 1775) (Cyrtacantharidinae, Acrididae)”, Mémoire Ing., Inst. Nati. Agro., El Harrech, (2004), 115 p.
223. Doumandji-Mitiche, B., Halouane F., Bensaad, H., Bissaad, F.Z. et Cherief, A., “The efficiency of *Beauveria bassiana* (Bals.) Against *Locusta migratoria*

- and *Schistocerca gregaria* (Orthoptera, Acrididae)". Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent., 64/3A, (1999), 205 – 209.
224. Bhardwaj, S., Srivastava, M.K., Kapoor, U. and Srivastava, L.P., "A 90 days oral toxicity of imidacloprid in female rats: Morphological, biochemical and histopathological evaluations", *Food and Chemical Toxicology*, V. 48, (2010), 1185- 1190.
225. Agoud, D., "Recherche des effets de la toxicité subchronique et chronique de la 1/15 DI50 de l'imidaclopride sur le foie chez les rats femelles de souche Wistar", Thèse de Magistère, Ecole Normale Supérieure – Kouba – Alger (2013).
226. Toor, H.K., Sangha, G.K. and Khera, K.S., "Imidacloprid induced histological and biochemical alterations in liver of femelle albinorats", *Pesticide Biochemistry and Physiology*, (2012).
227. Sulaiman, A. A., Al-Rajhi, D.H. and Kmel A., "Effects of Sub-Lethal Doses of Pyriproxyfen, Fenitrothion and Spinosad on Certain Biochemical Systems of Male Albino Rats" *Alexandria Science Exchange Journal*, V.29, n°4 (october-december 2008).
228. Ammar, M., Rabeih, K., Abou El-Khear, A., Nema, M., "Hematological studies of some pesticides on albino rats, *Rattus norvegicus albinus*", *Alex J. Pharmaceut. Sci. Egy.*, V.17, (2003), 21-27.
229. Mohany, M., Badr, G., Refaat, I. and El-Feki, M., "Immunological and histological effects of exposure to imidacloprid insecticide in male albino rats", *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* V.5, n°18, (2011), 2106-2114.
230. Bhardwaj, S., Srivastava, M.K., Kapoor, U. and Srivastava, L.P., "A 90 days oral toxicity of imidacloprid in female rats: Morphological, biochemical and histopathological evaluations", *Food and Chemical Toxicology*. 48, (2010), 1185- 1190.
231. Aouragh, H., "Recherche des aspects de la toxicité orale subchronique de la 1/85 DI50 de l'imidaclopride sur les reins chez les rats femelles de souche Wistar", Thèse de Magistère, Ecole Normale Supérieure, Kouba – Alger, (2013), 55p.
232. Saadi, L., Matalah, R., Yahia, M., Aoula, F., "Recherche des signes de toxicité d'un insecticide neonicotinoïde au niveau renal chez des rats adultes",

- 3e Séminaire International de Biologie Animale, Université Mentouri, Constantine, (Mai 2011).
233. Zhang, J.J., Wang, Y., Xiang, H.Y., Zhang, J.H., Wang, X.Z., “Nephrotoxicity of acetamidiprid on male mice and the rescue of vitamin E”, *Journal of Animal and Veterinary Advances*, V. 11, (2012), 2721 - 2726.
234. Arfat, Y., Mahmood, N., Tahir, M.U., Rashid, M., Anjum, S., Zhao, F., Li, D-J., Sun, Y-L., Hu, L., Zhihao, C., Yin, C., Shang, P., Qian, A-R., “Effect of imidacloprid on hepatotoxicity and nephrotoxicity in male albino mice” *Toxicology Reports*, V.1, (2014), 554–561
235. Boukersi, H., “Recherche d’indice d’inflammation subchronique et chronique chez les rats femelles de souche wistar traitées à l’imidaclopride”, Thèse de Magistère, Ecole Normale Supérieure –Kouba –Alger, (2012), 60p.
237. Koner, B.C., Banerjee, B.D. and Ray, A., “Organochlorine pesticide, induced oxidative stress and immune suppression in rats” *Indian J. Exp. Biol.*, V. 36, n°8, (1998), 388-395.
238. Banerjee, B.D., Koner, B.C. and Ray, A., “Influence of stress on DOT induced humoral Immune responsiveness in mice”, *Environ Res*, V. 74, (1997), 43 -7.
239. Yousef, M.I., “Aluminium-induced changes in hemato-biochemical parameters, lipid peroxidation and enzyme activities of male rabbits: protective role of ascorbic acid”, *Toxicology*, V. 199, (2004), 47 - 57.
240. Tamagawa, E., Bai, N., Morimoto, K., Gray, C., Mui, T., Yatera, K., Zhang, X., Xing, L., Li, Y., Laher, I., Sind, D., Mans, F. and Ven Eeden S. F., “Particulate matter exposure induces persistent inflammation and endothelial dysfunction”, *Am. J. Physiol., Lung cell Mol Physiol.*, 295, (2008), L79- L85.
241. Benzar, A.B., “Pour comprendre l’immunologie”. Ed. Dés Iris, Paris, (1999), 192p.
242. Radhika, P. & Kaliwal, B.B. “Monocrotophos induced dysfunction on estrous cycle and follicular development in mice” *Ind. Health*, V. 40, (2001), 237- 244.
243. Kara, N., “Toxicité du *Datura stramonium* chez les animaux d’élevage: Enquête et expérimentation sur les animaux de laboratoire”, Thèse de Magistère, Université Farhet Abbas Sétif, Algerie, (2008), 63p.
244. Instanes, C., Ward, M.D.W. and Hetland, G., “The fungal biopesticide *Metarhizium anisopliae* has an adjuvant effect on the allergic response to ovalbumin in mice”, *Toxicology Letters*, V.161, n°3, (2006), 219 – 225.

245. Ward, M.D.W., Chung, Y.J., Copeland, L.B. and Doerfler, D.L., "Allergic Responses Induced by a Fungal Biopesticide *Metarhizium anisopliae* and House Dust Mite Are Compared in a Mouse Model", (2011), 1-13
246. Ward, M.D.W., Madison, S.L., Sailstad, D.M., Gavett, S.H. & Selgrade, M.J.K., , Allergen-triggered airway hyperresponsiveness and lung pathology in mice sensitized with the biopesticide *Metarhizium anisopliae*, *Toxicology*. V. 143, (2000), 141-154.
247. Greg, S. W., Shih-Wen, H. & Nemat, D.K., "Allergens of the entomopathogenic fungus *Beauveria Bassiana*", *Clinical and molecular allergy*, Vol 3, (2005)
248. Anand, R. et Tiwary, B.R., "Profil de cytokine et cytotoxicité en réponse à une dose intratrachéale aiguë de *Metarhizium anisopliae* chez des souris BALB / c ", *Med Mycol.*, V.48, n°8, (2010), 1039-1048.
249. Nourrisson, C., Dupont, D., Lavergne, R.-A., Dorin, J., Forouzanfar, F., Denis, J., Weeks, K., Joubert, R., Chiambaretta, F., Bourcier, T., Roux, S., Sen echal, A., Benaim, G., Wallon, M., Candolfi, E., Letscher-Bru, V., Poirier, P., Sabou, M., "Species of *Metarhizium anisopliae* complex implicated in human infections: retrospective sequencing study", *Clin. Microbiol. Infect.*; V 23, (2017), 994- 999.
250. Brancini GTP, Tonani L, Rangel DEN, Roberts DW, Braga GUL. "Species of the *Metarhizium anisopliae* complex with diverse ecological niches display different susceptibilities to antifungal agents", *Fungal Biology*; (2018), 1-7.

Productions scientifiques

Articles scientifiques

- J) ARKAM F, KARA-TOUMI F. Z., TAIL-HALIL G., SAIDI F. et AHMED SERIR B. **Principales lésions hémolymphatiques observées chez les larves de *Dociotaurus maroccanus* traitées sur terrain par le Green muscle®**, revue Agrobiologia (2017) 7(2): 401-411
- J) ARKAM F, KARA-TOUMI F. Z., TAIL-HALIL G., SAIDI F. **Effets des traitements avec le Green muscle® en milieu naturel (Nord-Ouest de l'Algérie) sur les larves de *Dociostaurus maroccanus* (Thunberg, 1815) et sur l'histologie du tégument**, Algerian J. Nat. Products, 5:3 (2017) 530-540.

Manifestations scientifiques international

| Congés et séminaires | Date et lieu | Communication |
|--|---|--|
| 4 ^e Workshop International sur les stress Environnementaux et la conduite des cultures (WISECC4) | Le 13 et 14 Décembre 2016 Université de Blida1 BLIDA | Poster : Activité biologique de <i>Metarhizium anisopliae</i> (green muscle) sur l'histologie de la cuticule des larves <i>Dociostaurus maroccanus</i> (Thunb., 1815) dans la région de Sidi-Bel-Abbes |
| V ^e congrès international de Biotechnologie et Valorisation des Bio-ressources (AT-BVBR) | Du 22 au 25 Mars 2017 Tabarka-Tunisie | Orale : Evaluation de l'efficacité de <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acidum</i> (Green muscle) sur les larves de <i>Dociostaurus maroccanus</i> (Thunb., 1815) traitées au Nord-Ouest de l'Algérie |
| V ^e congrès international de Biotechnologie et Valorisation des Bio-ressources (AT-BVBR) | Du 22 au 25 Mars 2017 Tabarka-Tunisie | Poster : Impact des traitements de terrain au <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acidum</i> (Green muscle) sur l'hémolymphe des larves de criquet marocain au Nord-Ouest de l'Algérie |
| 9 ^e conférence internationale Francophone d'entomologie (Société entomologique de France) | Du 2 au 6 juillet 2018 Montpellier – France | Poster : Etude de la toxicité du biopesticide Green muscle (<i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acidum</i>) sur les larves de criquet et des rats Wistar femelles en conditions contrôlées |
| 6 ^e ème Congrès Franco-Tunisien et Franco-Maghrébin de Zoologie 119 ^{èmes} Journées annuelles de la Société Zoologique de France | 21-23 Novembre 2018 Paris (Maison de la Tunisie) France | Orale : Recherche d'éventuels indices de l'inflammation rénale, hépatique et pulmonaire chez les rats Wistar femelles traitées avec le biopesticide Green muscle |

Manifestations scientifiques national

| Congés et séminaires | Date et lieu | Communication |
|---|--|---|
| 1 ^{er} Séminaire Bioinformatique et génomique | Du 04 au 06 Avril 2017 Université de Blida1- | Poster : Rappels sur quelques aspects de la génomique de <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acidum</i> (Green muscle) |
| 1 ^{ère} Journées Nationale de l'Agro-Alimentaire, Engineering et Environnement (JNAEE) | Le 16 Avril 2017 Université M'Hamed Bougara-Boumerdes | Poster : Etude de l'effet rémanent de <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acidum</i> sur la végétation traitée puis ingérée par les larves de criquet marocain en milieu naturel |
| 1 ^{er} séminaire National Phytothérapie et Santé | Du 16 au 18 Mai 2017 Université de Blida1- | Poster : Etude de la biosécurité de <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acidum</i> chez le rat Wistar |
| 1 ^{er} séminaire National Phytothérapie et Santé | Du 16 au 18 Mai 2017 Université de Blida1- BLIDA | Orale : Etude de l'histopathologie intestinale chez les larves de <i>Doclostaurus maroccanus</i> (Thunb., 1815) traitées sur terrain avec le biopesticide Green muscle |
| Forum Interprofessionnel des Cultures Végétales AGRISIME | Le 12 Octobre 2017 Palais des Expositions Pins Maritimes (SAFEX) Alger | Poster : Réduction des doses efficaces de l'imidaclopride sur les larves de criquet marocain traitées en milieu naturel à Sidi-Bel-Abbes |
| Séminaire national de Biochimie | Du 19 au 21 juin 2018 Université de Blida1- | Poster : Recherche d'éventuels indices de l'inflammation intestinale chez les rats Wistar traités avec le biopesticide Green muscle |
| 1 ^{ère} Journées nationales de stress oxydant et maladies du siècle | 12-13 juin 2019 Université de Blida1- | Poster : Inflammation pulmonaire et intestinale induites par l'administration subaiguë de l'imidaclopride chez les rats Wistar femelles |