

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

UNIVERSITE SAAD DAHLAB - BLIDA 1



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie

## Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master dans le domaine SNV  
Filière Sciences Biologiques

**Option : Biochimie**

**Thème**

Étude histomorphométrique de foie et rein chez les rats wistar  
femelles traitées avec un bio pesticides enthomopathogene sous sa  
forme brute et mise en culture.

Présenté par :

**Date de soutenance :14/07/2022**

**\*Aouane Manel**

**\*Ben zemmouri Menal**

**Devant le jury :**

**Pr SAIDI.F**

**Professeur /USDB1**

**Présidente**

**Dr OUZERDINE.W**

**MCB/USDB1**

**Examinatrice**

**Dr ARKAM.F**

**MCB/USDB1**

**Promotrice**

**Promotion : 2021-2022**

## *Remerciements*

On remercie dieu le tout puissant de nous avoir donné la santé et la volonté d'entamer et de terminer ce mémoire.

Nous tenons à remercier notre chef d'option **Pr SAIDI F** de l'université de Blida-1 pour sa bienveillance et ses conseils durant notre cursus Universitaire, nous tenons à la remercier d'avoir pris de son temps pour présidé le jury.

Nous remercions également **Dr OUZERDINE W**, pour son aide durant notre période de stage, et d'avoir accepté d'examiner notre modeste travail.

Nous tenons à remercier notre encadreur **Dr ARKEM Fatima** de nous avoir fait confiance durant la réalisation de ce travail. Nous la remercions aussi pour son aide ainsi que pour le temps qu'elle nous a bien voulu accorder mais aussi pour ses précieux conseils.

Nous remercions **Pr DJAZOULI** de l'Université de Blida-1 de nous avoir apporter une aide inestimable qui a permis de finaliser notre projet de fin d'étude.

Nous sommes reconnaissantes envers **Mme GHANIA et Mme ZAKIA**. Ingénieurs du laboratoire de Microbiologie au niveau de la Station Expérimentale (Blida 1), pour leurs disponibilités et leurs bienveillances

Nos sincères remerciements s'adressent en particulière à **Dr MIDOUN Amel** pour ses conseils et son amabilité ainsi que son aide si précieuse.

Nos remerciements les plus sincères s'adressent aux membres du service d'anatomie pathologie en particulier **Pr ABDELALIA** chef de service de biologie cellulaire du CHU de Hussein dey, de leurs accueils bienveillants, et **Mme KENZA** qui nous a aidés à réaliser les coupes histologiques et leurs colorations. Nos remerciements s'adressent aussi à **Mme KARAOUI** qui nous a permis d'effectuer la coloration au niveau du CHU.

Nous remercions les membres de l'Ecole Vétérinaire de Mostaganem d'avoir accepté notre présence pour la réalisation des coupes histologiques.

Nous remercions aussi tous ceux qui nous ont aidés de près ou de loin à réaliser ce travail.



## *Dédicaces*

***En premier lieu je remercie ALLAH de m'avoir guidé, et donner le courage, la santé et la force pour réaliser ce travail.***

***Je dédie ce modeste travail à :***

*Ma famille qui m'a toujours soutenue, pour l'amour qu'ils m'ont toujours apporté, leurs encouragements et toute l'aide qu'ils m'ont apportée durant mes études.*

Je remercie ma grand-mère qui m'a élevée et qui a tout fait pour moi. Sachant qu'aucun mot, aucune dédicace ne pourrait exprimer mon respect, ma gratitude, et mon Amour pour toi Mami que dieu miséricordieux te protège

Je remercie mes formidables tantes (HAYET et ATIKA) merci pour tous l'amour et le soutien que vous m'apportez chaque jour, d'être présentes à chaque fois dont j'ai besoin de vous, aucun mot pourrait décrire l'Amour que je vous porte

A ma chère tante Dina-Lila qui a été toujours là pour moi, merci pour tous tes bons conseils, ainsi que pour ton soutien

**Que Dieu vous préserve et apporte le bonheur que vous méritez, et vous aide à réaliser tous vos vœux et vous offre un bel avenir.**

Je dédie aussi ce travail à ma chère mère j'espère que j'ai pu te rendre heureuse, que tu sois fière de moi, repose en paix.

*الله يرحمك ويجعل قبرك روضة من رياض الجنة*

Je remercie aussi mon père, pour tout l'Amour qui me porte

A mes cousines bien évidemment

Sans oublier un très cher ami Massy qui m'a aidé et ma soutenu pour finaliser mon mémoire merci à toi.

*Manel Aouane*





## *Dédicaces*

*En premier lieu je remercie Allah le tout puissant de m'avoir donné la volonté, la santé et le courage pour réaliser ce travail.*

*Je dédie ce modeste travail :*

*A mes chères parents NORA Zemmit et SALAH, pour l'amour qu'ils m'ont toujours donné, leurs encouragements et toute l'aide qu'ils m'ont apportée durant mes études.*

*A mes adorables sœurs Rania, Hiba et Âlaa et mon chère frère Mohamad, qui m'avez toujours soutenu et encouragé durant ces années.*

*A tout ma Famille, mes collègues, et mes amis spécialement Manel.*

*A mon très chère ami Ali qui m'a toujours encouragé et soutenu pour mes études et mes rêves.*

*Son oublier ma binôme Manel, pour sa compréhension sa patience son soutien moral, tout au long de ce projet.*

*Benzemmouri Menal*



## *Liste des abréviations*

<b>ASAT :</b>	Aspartate aminotransférase
<b>ALAT :</b>	Alanine-Amino-Transférase
<b>PAL :</b>	Les phosphatases alcalines
<b>DA :</b>	La destruxine A
<b>FNS :</b>	Formule Numération Sanguine
<b>GB :</b>	Globule blanc
<b>GR :</b>	Globule rouge
<b>PLQ :</b>	Plaquette
<b>Hb :</b>	Hémoglobine
<b>Ht :</b>	Hématocrite
<b>I.N.P.V :</b>	Institut National de la Protection des Végétaux
<b>HE :</b>	hématoxyline éosine
<b>TCD :</b>	Tube Contourné Distal
<b>TCP :</b>	Tube Contourné Proximal
<b>MCSFR1 :</b>	Récepteur 1 du facteur de stimulation des colonies de macrophages
<b>ACE :</b>	Enzyme de conversion de l'angiotensine
<b>ARB :</b>	Bloqueurs des récepteurs de l'angiotensine II
<b>NSAIDs :</b>	Anti-inflammatoires non stéroïdiens
<b>TNF:</b>	Facteur de nécrose tumoral,
<b>GST:</b>	Glutathione S-transférase
<b>CSFs :</b>	Facteurs de stimulation des colonies,
<b>GLDH :</b>	Glutamate Déshydrogénase
<b>COX-2</b>	cyclooxygénase 2
<b>L-FABP</b>	Protéine de liaison aux acides gras de type L

## Liste des figures

- Figure I.1 :** Test d'amplicon PCR multiplexé spécifique à l'espèce pour faire la distinction entre *Metarhizium anisopliae*, *M. brunneum*, *M. pingshaense* et *M. Robertsii* (Mayerhofer, et al., 2019) (modifié).....6
- Figure I.2 :** Micrographies de *M. anisopliae* var. *acridum* a germé sur du polystyrène pendant 24 h avec des extraits d'insectes (Wang et St. Leger, 2005). .....7
- Figure I.3 :** A) Microphotographie de *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* infectant *Brevipalpus phoenicis* 3 jours après inoculation, par microscopie à fluorescence. (Magalhães et al., 2005).....10
- Figure II.4 :** La souche EVCH 077 de *Metarhizium acridum*, **A :** aspect des spores sous microscope optique au grossissement 100 ; **B :** aspect des spores en culture âgée de 20 jours.....25
- Figure II.5 :** Méthodes de traitements des rats Wistar avec *Metarhizium acridum* **A :** gavage intragastrique ; **B :** injection intradermique .....28
- Figure II.6 :** Photo d'un écran ordinateur montrant un exemple de mesures morphométriques réalisées par le logiciel de traitement d'image ImageView. ....32
- Figure III. 7 :** Evolution du poids corporel au cours de l'expérimentation chez les rattes Wistar témoins et traités avec *Metarhizium acridum*. ....34
- Figure III.8 :** Variations de l'augmentation relative du poids corporel (%) chez les rats Wistar témoins et traités avec *Metarhizium acridum*.....35
- Figure III.9 :** Variations du poids absolu moyens du foie chez les rattes Wistar témoins et traités avec *Metarhizium anisopliae*. ....36
- Figure III.10 :** Variations du poids relatif du foie chez les rattes Wistar témoins et traités avec *Metarhizium anisopliae*. ....37
- Figure III. 11 :** Variations du poids moyens des reins chez les rattes Wistar témoins et traités avec *Metarhizium anisopliae*. **A :** le poids absolu du rein. **B :** le poids relatif du rein.....38
- Figure III.12 :** Aspect macroscopique des pattes gauches 4h après le traitement par injection de *Metarhizium acridum* ; (A) : Patte normale d'un rat témoin. (B) et (C) : Patte enflammée des rats traité avec les spores issues de leurs mises en culture.....39

<b>Figure III.13 :</b> Evaluation de l'activité inflammatoire de <i>Metarhizium acridum</i> : (A) : les variations de poids moyen des pattes gauches et droites ; (B) : la différence relative entre le poids des pattes. ....	40
<b>Figure III.14:</b> Effets du <i>Metarhizium anisopliae</i> sur les paramètres hématologiques :(A) Hb ; (B) GR ; (C) PLQ ; (D Ht) ;(E) GB chez les rats Wistar.....	44
<b>Figure III.15 :</b> Variations des taux moyens de l'urémie chez les rats Wistar témoins et traitées avec les formulations germinative et conditionnée de <i>Metarhizium acridum</i> .....	45
<b>Figure III.16 :</b> Variations des taux moyens de la créatinine chez les rats Wistar témoins et traitées avec les formulations germinative et conditionnée de <i>Metarhizium acridum</i> .....	46
<b>Figure III.17 :</b> Variations des taux moyens de l'Aspartate aminotransférase chez les rats Wistar témoins et traitées avec les formulations germinative et conditionnée de <i>Metarhizium acridum</i> .....	47
<b>Figure III.18 :</b> Variations des taux moyens de l' Alanine-Amino-Transférase chez les rats Wistar témoins et traitées avec les formulations germinative et conditionnée de <i>Metarhizium acridum</i> .....	48
<b>Figure III.19 :</b> Variations des taux moyens de la phosphatase alcaline chez les rats Wistar témoins et traitées avec les formulations germinative et conditionnée de <i>Metarhizium acridum</i> .....	49
<b>Figure III.20 :</b> Photomicrographie du parenchyme rénal chez les rats Wistar témoins.....	51
<b>Figure III.21 :</b> Photomicrographie du parenchyme rénal chez les rats traités avec les spores du biopesticide à raison de $6 \times 10^8$ spores /ml /250g de poids corporel. ....	54
<b>Figure III.22 :</b> Photomicrographie du parenchyme rénal chez les rats traités avec les spores de culture à raison de $6 \times 10^8$ spores /ml /250g de poids corporel.....	57
<b>Figure III.23 :</b> Photomicrographie du parenchyme hépatique chez les rats témoins.....	59
<b>Figure III.24 :</b> Photomicrographie du parenchyme hépatique chez les rats traités avec les spores du biopesticide à raison de $6 \times 10^8$ spores /ml /250g de poids corporel pendant 20 jrs.....	62
<b>Figure III.25 :</b> Photomicrographie du parenchyme hépatique chez les rats traités avec les spores issus de culture à raison de $6 \times 10^8$ spores /ml /250g de PC pendant 20 jours.....	66
<b>Figure III.26 :</b> Nombre moyen des hépatocytes sur les coupes du parenchyme hépatique des individus témoins et traités avec <i>M. acridum</i> .....	68
<b>Figure III.27 :</b> Rapport nucléo-cytoplasmique des hépatocytes chez les rats témoins et traitées avec les spores de <i>M. acridum</i> issus de culture et du biopesticide.....	69
<b>Figure III.28 :</b> Diamètre du corpuscule glomérulaire chez les rats témoins et traitées avec les spores de <i>M. acridum</i> issus de culture et du biopesticide. ....	70

**Figure III.29 :** Diamètre du corpuscule glomérulaire chez les rats témoins et traitées avec les spores de *M. acridum* issus de culture et du biopesticide .....71

**Figure III.30 :**Diamètre du corpuscule glomérulaire chez les rats témoins et traitées avec les spores de *M. acridum* issus de culture et du biopesticide. ....72



## *Liste des tableaux*

**Tableau III.1** : Effet de *Metarhizium anisopliae* sur quelques paramètres hématologiques .....43

## Résumé

L'emploi généralisé de bioinsecticide à base de champignon peut induire des mycoses chez les humains. Notre étude vise à rechercher des signes de l'inflammation chez les rats Wistar femelles traitées avec *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* (EVCH 077).

Deux lots traitées administrées de formulations à base de spores issues de culture et des spores de Novacrid® à raison de  $6 \times 10^8$  spores /mL /jours /250g de poids corporel pendant 20 jours. Le lot témoin reçoit de l'eau distillée stérile par gavage. L'étude porte sur l'évaluation des paramètres de poids, le dosage de quelques paramètres biochimiques et hématologiques et l'histomorphométrie du foie et des reins. Nous avons appliqué le test de l'œdème de la patte gauche par injection intra dermique à raison de  $1.3 \times 10^6$  spores /mL /250g de poids corporel.

Les traitements n'ont pas d'effets significatifs sur l'augmentation relative du poids corporel, ni sur le poids des reins et du foie. La perturbation des paramètres hématologiques et biochimiques sont jugées statistiquement non significatives à l'exception des leucocytes avec une augmentations significative pour le lot du biopesticide. Concernant le lot de culture on observe une augmentation significative en nombre de leucocyte et de la créatininémie, et une diminution significative des paramètres hématologique à l'exception des globules rouges, avec conservation de la fonction hépatique. L'œdème inflammatoire de la patte induit par les spores de culture est très hautement significatif que celui induit par les spores conditionnées.

Chez les rattes traitées, l'histo-morphométrie du foie révèle la dilatation des sinusoides, des infiltrats inflammatoires et l'hypertrophie discrète des hépatocytes avec augmentation significative en nombre et en rapport nucléocytoplasmique enregistrés chez le lot culture ( $0,71 \mu m \pm 0,15$ ) comparé au témoin ( $0,55 \mu m \pm 0,15$ ). Le tissu rénal provenant des rats traités montre par endroits des lésions épithéliales tubulaires modérées, des infiltrations leucocytaires et des congestions sanguines. En comparaison avec le témoin ( $59,03 \mu m \pm 8,55$ ), le lot culture ( $50,96 \mu m \pm 4,11$ ) et le lot biopesticide ( $48,84 \mu m \pm 6,65$ ) montrent le rétrécissement très hautement significatif du diamètre des glomérules conduisant ainsi à la régression du diamètre du peloton glomérulaire.

Nos résultats suggèrent les effets immunogène et inflammatoire de notre souche fongique, jugés plus accentués avec les spores fraîches (à 100 % viables) comparé avec les spores sèches conditionnées en biopesticide.

**Mots clés:** *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*, Novacrid®, rats Wistar femelles, histomorphométrie, spores germées, spores conditionnées, inflammation.

## Abstract

The use of fungus-based bioinsecticide can induce fungal infections in humans. Our study aims to look for signs of inflammation in female Wistar rats treated with *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* (EVCH 077).

Two batches of treated rats administered formulations based on spores from culture and Novacrid® spores at a rate of  $6 \times 10^8$  spores /ml /day /250g body weight for 20 days. A third control batch receives sterile distilled water by gavage. The study focuses on the evaluation of weight parameters, the determination of some biochemical and hematological parameters and the histo-morphometry of the liver and kidneys. We applied the left leg edema test by intradermal injection at a rate of  $1.3 \times 10^6$  spores /mL /250g body weight.

The treatments have no significant effects on the relative increase in body weight, or on the weight of the kidneys and liver. The disruption of hematological and biochemical parameters are measured statistically non-significant with the exception of leukocytes a significant increase for the batch of biopesticide. Concerning the culture batch there is a significant increase in the number of leukocyte and serum creatinine, and a significant decrease in hematological parameters with the exception of red blood cells, with preservation of liver function. Inflammatory edema of the paw induced by culture spores is very highly significant than that induced by conditioned spores.

In treated rats, liver histo-morphometry reveals sinusoid dilation, inflammatory infiltrates and discrete hepatocyte hypertrophy with significant increase in number and nucleocytoplasmic ratio recorded in the culture batch ( $0.71 \mu\text{m} \pm 0.15$ ) compared to the control ( $0.55\mu\text{m} \pm 0.15$ ). Renal tissue from treated rats shows moderate tubular epithelial lesions, leukocyte infiltration and blood congestion in places. In comparison with the control ( $59.03 \mu\text{m} \pm 8.55$ ), the culture batch ( $50.96 \mu\text{m} \pm 4.11$ ) and the biopesticide batch ( $48.84 \mu\text{m} \pm 6.65$ ) show the very highly significant narrowing of the diameter of the glomeruli thus leading to the regression of the diameter of the glomerular plateau.

Our results suggest the immunogenic and inflammatory effects of our fungal strain, considered more accentuated with fresh spores (100% viable) compared with dry spores packaged in biopesticide.

**Keywords:** *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*, Novacrid®, female Wistar rats, histo-morphometry, sprouted spores, conditioned spores, inflammation.

## ملخص

الاستخدام الواسع النطاق للمبيدات الحشرية الحيوية القائمة على الفطريات قد تؤدي على ظهور التهابات فطرية لدى البشر. تهدف دراستنا على البحث عن علامات التهاب عند إناث الجرذان *Wistar* معالجة ب *Metarhizium anissopilae var. acridum* (EVCH 007).

تم معالجة مجموعتين من جرذان ويستر بأبواغ مستنبتة واخرى مباشرة من المبيد *Novacrid* بمعدل  $6 \times 10^8$  بوغ /ملل/ 250 غ من وزن الجسم لمدة 20 يوما. تتلقى المجموعة الشاهدة الماء مقطر بالتزقيم. تركزت الدراسة على تقييم معايير الوزن، و تقييم بعض معايير البيوكيميائية و الدموية ودراسة هيستومورفمتية للكبد و الكلى. تقييم التورم قدم الايسر عن طريق حقن جرعة من الابواغ بمعدل  $1.3 \times 10^6$  بوغ /ملل/ 250 غ من وزن الجسم.

لم يكن للعلاجات تاثير على زيادة النسبية للوزن الجسم الجرذان، كذلك على وزن الكبد و الكلى. تم تقييم تغيرات في المعايير الدموية و الكيميائية التي تظهر دلالة احصائية غير معتبرة باستثناء زيادة معتبرة لعدد الكريات الدموية البيضاء للمجموعة المعالجة بالمبيد نوافكريد . فيما يتعلق بالمجموعة معالجة بالابواغ مستنبتة ملاحظة زيادة معتبرة في عدد الكريات الدم البيضاء و الكرياتينين في الدم، و انخفاض كبير في تحاليل الدموية باستثناء عدد الكريات الدموية الحمراء، مع حفاظ وظيفة الكبد. التورم الالتهابي للقدم المستحث من الابواغ المستنبتة اكثر اعتبارا مقارنة مع الابواغ الخامة.

عند الجرذان المعالجة، تكشف الدراسة النسيجية و مورفومتريا للكبد تمدد الجيوب، و ترشيع لمفاوي، مع تضخم الخفي لخلايا الكبد و زيادة معتبرة في نسبة نكليوسيتوبلاسم ملحوظة عند مجموعة الابواغ المستنبتة ( $0,15 \mu m \pm 0,71$ ) مقارنة مع المجموعة الشاهدة ( $0,55 \mu m \pm 0,15$ ). النسيج الكلوي الجرذان المعالجة يشير وجود تلف نهائية في النبيب الكلوي الموضعي، و تسلل للمفاوي مع احتقان الدم. مقارنة مع المجموعة الشاهدة ( $59,03 \mu m \pm 8,5$ )

و مجموعة معالجة بابواغ المستنبتة ( $50,96 \mu m \pm 4,11$ ) مع مجموعة معالجة بنوافكريد ( $48,84 \mu m \pm 6,65$ ) يظهر تقليص شديد الاعتبار في قطر الكبيبة الكلوية الذي يؤدي الى تقليص في قطر حفنة الكبيبي.

تفرض نتائجنا الى وجود اثار مناعية و التهابية لهذه السلالة الفطرية، اكثر اعتبارا للابواغ المستنبتة(100% حية ) مقارنة مع الابواغ الجافة من *Novacrid*

**الكلمات المفتاحية:** *Novacrid*, *Metharizium anisopliae var acridum*, جرذان ويستر اناث، ابواغ مستنبتة، ابواغ الجافة، التهاب ، الدراسة النسيجية و المورفومتريّة.

## *Glossaire*

- Atrophie :** Diminution de volume d'une cellule, d'un tissu, d'un organe, survenant après la naissance (Jeuge-Maynard et al., 2010).
- Congestion :** Accumulation anormale du sang dans les vaisseaux d'un organe, d'une partie du corps (Jeuge-Maynard et al., 2010).
- Hypertrophie :** Augmentation de volume d'un tissu, d'un organe, due à une augmentation de volume de ses cellules (Jeuge-Maynard et al., 2010).
- La bioaccumulation :** Est le résultat des processus par lesquels le contaminant entre dans l'organisme et des processus de décontamination, une combinaison des mécanismes d'excrétion vers l'environnement et de biotransformation endogène. Les termes de transfert et d'accumulation sont fortement liés. Le premier représente un changement d'état du second. (Casas, 2005).
- Phéromones :** Les phéromones se définissent ainsi comme des molécules olfactives libérées par des glandes exocrines vers l'environnement pour agir en tant que messagers chimiques au sein des membres d'une espèce. (Giurfa, 2018).

**MCSFR1 :**

C'est un autre marqueur de l'activation du système immunitaire. Il est fortement augmenté en cas d'hépatotoxicité idiosyncrasique (Kullak-Ublick et al., 2017 ; Barnhill et al., 2018 ; Church et al., 2019 ; (Meunier & Larrey, 2019).

**GLDH :**

C'est une protéine intégrée à la matrice des mitochondries qui participe à la désamination oxydative du glutamate. Le foie est riche en mitochondries riches en matrice et est donc très riche en GLDH, tandis que des quantités beaucoup plus faibles sont présentes dans les reins et le cerveau (Meunier & Larrey, 2019).

**Cytokératine 18 :**

C'est une protéine du cytosquelette qui est très abondante dans le foie. Mais non spécifique, elle est libérée en cas de nécrose hépatocytaire. Son augmentation est précoce en cas de toxicité hépatique, avant celle des ALAT. Elle pourrait également être un marqueur pronostique de l'atteinte hépatique (Thulin et al., 2014 ; Church et Watkins, 2017 ; Kullak-Ublick et al., 2017 ; Church et al., 2019)(Meunier & Larrey, 2019).

**Entomopathogène :**

Le mot « champignons entomopathogènes » ou « champignons qui provoquent des maladies aux insectes » est limité aux genres ou aux espèces qui peuvent être des agents pathogènes d'arthropodes (Benserradj, 2014).

- Mésophile:** Est une forme de vie qui prospère au mieux dans des conditions de température modérée (Jeuge-Maynard et al., 2010).
- Isoenzymes :** Sont des formes alternatives de la même activité enzymatique qui existent dans des proportions différentes dans différents tissus ( Pelley, 2011).
- épizootie :** Désigne une maladie animale contagieuse (Samuel Robin,2006).
- Cytokines :** Représentent un groupe diversifié de glycoprotéines qui agissent comme des médiateurs et régulateurs des processus immunitaires (Pflanz et al ,2004).
- La chitine :** Est l'élément structural des parois cellulaires des champignons, des levures, des algues, des exosquelettes des crustacés et des arthropodes ainsi que les parois de nombreux invertébrés (Wirth et Wolf ,1990).
- Les actinomycètes :** Ce sont des bactéries formant des filaments minces et ramifiés, septées, bacilles à Gram positif (Dgigal, 2003).

# SOMMAIRES

*Remerciements*

*Dédicaces*

*Liste des abréviations*

*Liste des figures*

*Liste des tableaux*

*Résumé*

*Glossaire*

INTRODUCTION.....1

## CHAPITRE I : Rappels Bibliographique

<b>I.1</b>	<b>GENERALITES SUR BIOPESTICIDES.....</b>	<b>3</b>
I.1.1	Avantages et inconvénients des biopesticides.....	3
I.1.2	Classification des biopesticides.....	4
I.1.2.1	Produits biochimiques.....	4
I.1.2.2	Produits sémiocchimiques.....	4
I.1.2.3	Produits microbiens.....	5
<b>I.2</b>	<b>GENERALITES SUR METHARIZIUM ANISOPILAE.....</b>	<b>5</b>
I.2.1	Classification et taxonomie de <i>Metarhizium</i> .....	6
I.2.2	Associations d'habitats et aire de répartition de <i>Metarhizium</i> .....	8
I.2.3	Enzymes et toxines produites par <i>Metarhizium</i> .....	8
I.2.4	Biotechnologies et développement de Biopesticides à base de <i>Metarhizium anisopliae</i> .....	10
<b>I.3</b>	<b>BIOSECURITE DE <i>METARHIZIUM ANISOPLIAE</i> CHEZ LES MAMMIFERES.....</b>	<b>11</b>
I.3.1	Revue de la littérature, test de toxicité de <i>Metarhizium</i> sur des modèles animaux.....	11
I.3.2	Revue de la littérature, cas cliniques infection humaines dues au <i>Metarhizium</i> .....	12
I.3.3	L'immunotoxicité de <i>Metarhizium anisopliae</i> chez les mammifères.....	13
<b>I.4</b>	<b>Néphrotoxicité et Hépatotoxicité.....</b>	<b>14</b>
I.4.1	Le rein :.....	15
I.4.2	La néphrotoxicité :.....	15
I.4.2.1	Les paramètres relatifs à la néphrotoxicité.....	16
I.4.3	Le foie :.....	17
I.4.4	L'hépatotoxicité :.....	18
I.4.4.1	Biomarqueurs d'hépatotoxicité :.....	18



## **CHAPITRE II : Matériel et méthodes**

<b>II. MATERIEL ET METHODES.....</b>	<b>21</b>
<b>II.1 Matériel .....</b>	<b>21</b>
II.1.1 Matériel biologique.....	21
II.1.1.1 Souche Fongique :.....	21
II.1.1.2 Rats Wistar femelles : .....	21
II.1.2 Matériel non biologique : .....	22
<b>II.2 METHODES : .....</b>	<b>22</b>
II.2.1 Test de toxicité subaiguë par voie orale .....	22
II.2.2 Préparation des formulations de traitement .....	23
II.2.2.1 Préparation de la formulation de traitement à base de spores issues de culture.....	23
II.2.2.2 Préparation de la formulation de traitement à base de prélevées de Novacrid® .....	26
II.2.3 Test de toxicité aigüe par injection intradermique .....	27
II.2.3.1 Préparation de la solution de spores issues de culture et Novacrid®.....	27
II.2.4 Traitement des données .....	28
II.2.4.1 Suivis des rats.....	28
II.2.4.2 Sacrifice des animaux et prélèvement des échantillons .....	28
II.2.5 Etude histopathologique et morphométrique.....	29
II.2.5.1 La technique histologique .....	29
II.2.5.2 Etude morphométrique.....	31
<b>II.3 Analyse statistique des résultats.....</b>	<b>32</b>

## **CHAPITRE III : Résultat et Discussion**

<b>III. RESULTATS ET DISCUSSION .....</b>	<b>33</b>
<b>III.1 RESULTATS .....</b>	<b>33</b>
III.1.1 Effets des traitements sur le comportement des rattes Wistar .....	33
III.1.2 Effets des traitements sur les paramètres de poids.....	34
III.1.2.1 Effets des traitements sur l'évolution du poids corporel des rattes.....	34
III.1.2.2 Effets des traitements sur le poids relatif des organes étudiés .....	35
III.1.3 Effet des traitements par injection .....	39
III.1.4 Effet des traitements sur quelques paramètres sanguins.....	41
III.1.4.1 Effet de <i>Metarhizium acridum</i> sur quelques paramètres hématologiques .....	42
III.1.4.2 Effet de <i>Metarhizium acridum</i> sur quelques paramètres biochimiques .....	45
III.1.5 Etude histo-pathologique du parenchyme rénal.....	50
III.1.6 Etude histo-pathologique du parenchyme hépatique .....	59
III.1.7 Etude histo-morphométrique .....	67

III.1.7.1 Morphométrie du tissu hépatique.....	67
III.1.7.2 Morphométrie du tissu rénale.....	69
<b>III.2 Discussion.....</b>	<b>73</b>
<i>Conclusion.....</i>	<i>79</i>
<i>Référence bibliographique</i>	

## ***INTRODUCTION***

Les pesticides à usage agroalimentaire sont avérés nocifs pour la santé humaine, nuisent à l'environnement et à la biodiversité ; Et entraînent une accumulation rapide de résistance chez les ravageurs cibles tout en décimant les ennemis naturels de ces ravageurs, ce qui entraîne des éclosions de ravageurs secondaires (Akutse et al., 2020). L'introduction de nouveaux produits, pour une toxicité moindre que les pesticides conventionnels, est devenue très indispensable (Thakore, 2006). Les biopesticides peuvent offrir une alternative essentielle. Ils n'affectent souvent que le ravageur cible et ne présentent donc pas d'effets négatifs sur l'environnement. De plus, leur utilisation ne mène pas à une accumulation de résistance chez les ravageurs ciblés (Akutse et al., 2020). Les avancées biotechnologiques progressent l'utilisation des agents de lutte biologique. Le secteur des pesticides biologiques connaît une croissance significative et de nombreuses découvertes sont en développement ; ainsi de nouveaux biopesticides alimentent le marché mondial (Ruiu, 2018).

*Metarhizium anisopliae* var. *acidum* (IMI: 300189), dont le nom commercial est le GREEN MUSCLE®, s'est avéré le plus virulent comme agent biologique de la lutte antiacridienne (Zakaria et al., 2003). De nombreuses recherches sont menées pour optimiser la production et le stockage des conidies de *Metarhizium* spp (Moore et al., 1995; Leemon et Jonsson, 2008). Un nouveau produit, NOVACRID®, à base de d'une nouvelle souche de *Metarhizium acidum* (EVCH 077) est fabriqué par la société du groupe ELEPHANT VERT (Nodirbek, 2019).

L'utilisation de mycoïsecticides a augmenté ces dernières années, les biopesticides les plus commercialisés sont ceux à base de *Beauveria* spp. Et *Metarhizium* spp. (Thomas et Kaliamorthy, 2013). Plusieurs tests de biosécurité de ces produits tels que des tests de pathogénicité, de toxicité et d'allergénicité ont été largement réalisés sur des modèles animaux pour certaines souches de *Beauveria* et *Metarhizium* mettant en évidence leur faible impact sur la santé animale et humaine (Meyling et Eilenberg., 2007, Ansari et al. 2013). Les essais d'innocuité sur les mammifères effectués avec *M. anisopliae*, n'a pas mis en évidence des effets indésirables graves ou d'infections profondes chez les animaux, quelle que soit la voie

d'administration, Cependant, de rares réactions allergiques sont connues chez les humains sensibilisés (Roberts et Leger., 2004 ; Nourrisson et al., 2017).

En raison de l'utilisation accrue des champignons entomopathogènes comme agents de lutte biologique et de l'impact que cela peut avoir sur la santé humaine, il est important de considérer les cas cliniques dans lesquels ces champignons sont impliqués. D'après Brunner-Mendoza, et *al.*, (2022), une revue de la littérature sur un total de 30 articles publiés de 1984 à 2021 a été analysés, 17 cas cliniques de kératite et un cas clinique de sclérokératite étaient liés à une infection à *Beauveria*, tandis que *Metarhizium* était lié à 13 cas de kératite et deux cas cliniques de sclérokératite. L'examen des cas cliniques liés à *Beauveria* et *Metarhizium* suggère la nécessité de considérer les champignons entomopathogènes dans les pathologies oculaires et allergiques et le risque qu'impliquent le mauvais usage des lentilles de contact lors des activités agricoles / jardinières (Brunner-Mendoza, et *al.*, 2022).

Dans le cadre de l'étude de la biosécurité de *Metarhizium acridum*, nous nous sommes proposés de chercher les indices de l'inflammation rénale et hépatique et nous avons exploré l'œdème inflammatoire de la patte chez les rats Wistar femelles. Nous avons choisi de mettre en lumière, les altérations provoquées par les conidies conditionnées du champignon (le biopesticide Novacrid®) et les conidies fraîches de la même souche et qui sont récupérés après mise en culture.

Le présent travail comporte trois chapitres, dans le premier nous rapportons des rappels bibliographiques sur *Metarhizium* et sa biosécurité chez les mammifères. Le deuxième chapitre comporte le matériel et les techniques utilisés. Le dernier, comporte les résultats et discussions et on termine par une conclusion avec des perspectives qui apporteront un complément à notre travail.

**I.1 GENERALITES SUR BIOPESTICIDES**

Le terme biopesticide est utilisé pour désigner les préparations commerciales contenant des organismes vivants (bactéries, virus, eucaryotes unicellulaires, champignons et nématodes) et/ou des composés bioactifs (comme les métabolites). Ils sont produits pour contrôler les populations de ravageurs (Ghosh., 2000 ;Cappa et *al.*, 2022).

Les biopesticides sont utilisés depuis la fin du XIXe siècle ; Cependant, les avancées biotechnologiques, ont permis d'accroître l'utilisation des biopesticides. Cette dernière est encouragée par les organisations et institutions internationales avec une croissance de 10-15% par an, contre 1- 2% pour les pesticides synthétiques. Cette croissance consolide la position des biopesticides sur le marché mondial pour répondre à l'intérêt et à la demande croissante pour ces produits (Arthurs et Dara, 2019 ;Thakore,2006 ; Olson ,2015 ; Cappa et *al.*, 2022).

**I.1.1 Avantages et inconvénients des biopesticides**

L'intérêt apporté aux biopesticides est due à une large gamme de propriétés attrayantes qui en font de bons éléments de la lutte intégrée. la plupart sont sélectifs, produisent peu ou pas de résidus toxiques, et les coûts de développement sont nettement inférieurs à ceux des pesticides chimiques (Heap.,2010 ; Chandler et *al.*, 2011).

D'après Kumar et *al.* (2021), les biopesticides sont l'avenir de l'agriculture moderne saine et permettent la valorisation des bioressources. Plusieurs avantages de leur utilisation et leur mise sur le marché. Parmi les points positifs :

- Ils ne causent pas de dommages sur l'environnement.
- Utilisent des composés naturels dérivés d'organismes vivants pour la production.
- N'ont pas d'effet sur les organismes non ciblés.
- Économique et moins cher que les engrais chimiques.
- Les ravageurs ne développent pas de résistance.
- Ne peuvent contaminer les sources d'eau.
- Ne conduisent pas à la bioaccumulation.

L'utilisation des biopesticides n'a pas été aussi répandue que prévu. Il s'est avéré avoir des cotés qui ont freiné l'application des biopesticides au niveau mondial. Voici quelques points inhibiteurs d'après Kumar et *al.*, (2021) :

- Une conservation de courte durée des produits conditionnés.
- Une efficacité limitée due à sa sensibilité aux fluctuations de température et humidité.
- En raison de la grande spécificité des biopesticides, qui ne peut se focaliser sur plusieurs pathogènes et ravageurs à la fois, Il faut utiliser de multiples agents biologiques pour lutter contre différents pathogènes et ravageurs sur le terrain.
- Ces agents sont coûteux et encombrants, Ils ne sont pas rentables pour les agriculteurs.

### **I.1.2 Classification des biopesticides**

Selon Chandler (2011), les biopesticides se répartissent en trois types différents de produits en fonction de leurs substance active :

#### **I.1.2.1 Produits biochimiques**

Les pesticides biochimiques contiennent des substances d'origine naturelle qui luttent contre les parasites. Les substances qui contrôlent les maladies comprennent le bicarbonate de potassium, les acides phosphoriques, les extraits de plantes (Marrone, 2019) . Ces extraits produisent une large variété de métabolites secondaires tel que pyréthrine, qui sont des composés insecticides à action rapide (Chandler et *al.*, 2011).

#### **I.1.2.2 Produits sémi chimiques**

C'est un signal ou produit chimique émise par un organisme qui provoque un changement de comportement chez un individu de la même espèce ou d'une espèce différente. Ces produits sont subdivisés en substances allélochimiques et phéromones. Les phéromones sexuelles des insectes sont les plus utilisées pour la protection des cultures, dont certaines peuvent maintenant être synthétisées et sont utilisées pour la surveillance ou la lutte contre les ravageurs par le piégeage de masse. Dans le monde, la confusion sexuelle est utilisée sur plus de 660 000 ha et s'est avérée particulièrement utile dans les cultures fruitières (Reddy et *al.* ,2009; Witzgall et *al.*,2008; Chandler et *al.*, 2011).

**I.1.2.3 Produits microbiens**

Les pesticides microbiens contiennent des micro-organismes (bactéries, virus d'insectes, champignons, actinomycètes, protozoaires, etc.) qui fonctionnent comme des agents de lutte biologique (Marrone, 2019).

**➤ Les biopesticides fongiques**

D'après Meyling et Eilenberg, (2007), il est de plus en plus reconnu que la biodiversité des agroécosystèmes fournit des services écosystémiques importants à la production agricole, tels que la lutte biologique contre les ravageurs. Les champignons entomopathogènes, en particulier les taxons anamorphiques *Beauveria bassiana* et *Metarhizium anisopliae*, sont parmi les ennemis naturels des ravageurs dans les agroécosystèmes. Ces champignons sont presque omniprésents et sont responsables de la plupart des épizooties naturelles pour les arthropodes dans la nature. Ce qui offrent des candidat efficaces pour le développement de biopesticide et la gestion des insectes nuisibles (Lacey et al., 2017; Srinivasan et al., 2019).

**I.2 GENERALITES SUR METHARIZIUM ANISOPILAE**

*Metarhizium anisopliae* est un champignon entomopathogène largement utilisé comme agent de lutte biologique dans le monde entier pour réguler les populations d'insectes qui affectent les zones agricoles (Navarro-Barranco et al., 2019). Communément appelés « champignons muscardins verts » (Driver et al., 2000), selon la maladie induite après l'incrustation de cadavres d'insectes avec des conidies vertes (Roberts & St. Leger, 2004).

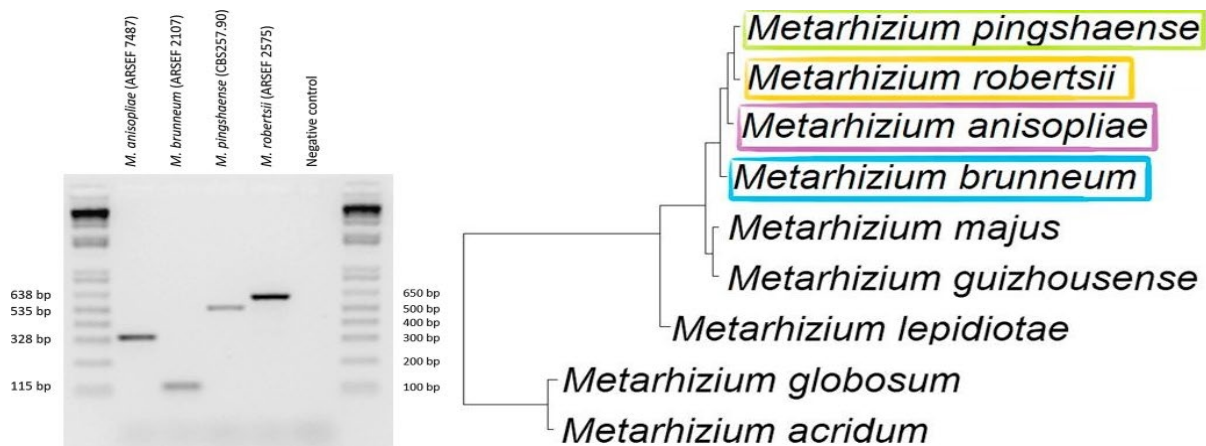
*Metarhizium anisopliae* permet de promouvoir la santé des plantes par la protection contre les insectes ravageurs et les pathogènes microbiens du sol, ainsi que la promotion de la croissance et de la productivité des plantes par le transfert des dérivé d'azote (Stone & Bidochka, 2020).

L'identification des espèces de *Metarhizium* et la diversité génétique permet de fournir une plateforme pour une approche plus stratégique et basée sur les connaissances pour la lutte biologique intégrée dans la région (Castro-Vásquez et al., 2020).

**I.2.1 Classification et taxonomie de *Metarhizium***

La première classification du *Metarhizium* étaient basées sur des caractéristiques morphologiques, notamment la taille et la forme des conidies. Initialement, trois principales espèces ont été distinguées : *M. album*, *M. anisopliae* et *M. flavoviride*, chacune avec des variétés correspondantes (Bidochka et al., 1994 ; Cobb & Clarkson, 1993 ; Curran et al., 1994 ; Fungaro et al., 1996). La prise en compte des données moléculaires (analyse des isoenzymes) l'analyse phylogénétique et des caractéristiques physiologiques et morphologiques a permis l'élucidation d'espèces ou de variétés différentes au sein du genre. Jusqu'à ce qu'une révision taxonomique de *Metarhizium anisopliae* ( Driver et al., 2000 ; Brunner-mendoza et al., 2019). Pour le gène *Metarhizium* on a pu distinguer 30 espèces, en plus des formes sexuelles et asexuées (Serna-Domínguez et al., 2019).

Une révision taxonomique récente basée sur des critères phylogénétiques moléculaires a révélé que *M. anisopliae* si englobe un clade d'au moins quatre sous espèces phylogénétiques cryptiques, qui comprend *M.pingshaense* , *M.anisopliae*, *M.robertsii* (Mayerhofer, et al., 2019) (Figure I.1)



**Figure I.1 :** Test d'amplicon PCR multiplexé spécifique à l'espèce pour faire la distinction entre *Metarhizium anisopliae*, *M. brunneum*, *M. pingshaense* et *M. Robertsii* (Mayerhofer, et al., 2019) (modifié).



La classification de *Metarhizium anisopliae* est la suivante selon Bidochka, et Small, (2005) :

Règne : *fungi*

Embranchement : *Dikarya*

Sous-embranchement : *Ascomycota*

Classe : *Pezizomycotina*,

Ordre : *Hypocreales*

Famille : *Clavicipitaceae*

Genre : *Metarhizium*

Espèce : *Metarhizium anisopliae*

### I.2.2 Morphologie de *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*

*Metarhizium anisopliae* se caractérise par un schéma de ramification des conidiophores, et un alignement de cellules conidiogènes. Les conidies verts ou spores (phialospores) sont produit à partir de cellule conidiogènes serrées et orientées parallèlement, nées sur une masse d'hyphes ressemblant à un sporodochium. Les conidies sont unicellulaires asexuée, cylindriques avec des extrémités arrondies (Krutmuang & Mekchay,2005) (Figure I.2).

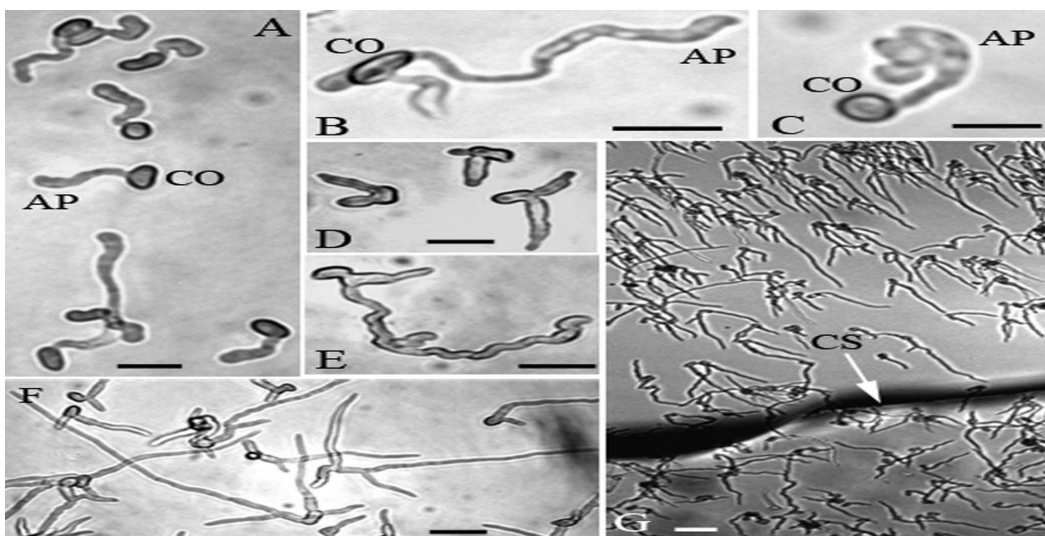


Figure I.2 : Micrographies de *M. anisopliae* var. *acridum* a germé sur du polystyrène pendant 24 h avec des extraits d'insectes (Wang et St. Leger, 2005).

(Jeunes pousses cultivées avec des extraits de dichlorométhane (A), ou de méthanol (B) de criquets présentant des gonflements terminaux des hyphes. (C), production d'appressoriums lobés lorsque l'extrait de méthanol a été combiné avec 0,0125 % d'extrait de levure. (D) et (E), ramification des germes dans la fraction hydrosoluble (1 mg/ml) de l'extrait méthanolique ; (F), croissance hyphale étendue à 4 mg/ml qui peut démontrer une croissance directionnelle vers la lamelle (G). Les panneaux A à F montrent une croissance sur la zone de la boîte de Pétri recouverte par la lamelle. CO, conidie ; AP, appressorium ; CS, lamelle. Barre 10µm).

### **I.2.2 Associations d'habitats et aire de répartition de *Metarhizium***

*Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin, est un champignon distribué dans le monde entier de l'Arctique aux tropiques et qui a été observé dans les sols agricoles et forestiers (Zimmermann, 2007 ; Kernasa et al., 2016). Et associé à plus de 200 espèces hôtes (Hajek et Leger, 1994 ; R. M. Castro-Vásquez et al., 2020).

*Metarhizium* est un champignon mésophile qui pousse à des températures comprises entre 10 et 40 °C, avec une température optimale pour la germination et la croissance entre 25 et 30 °C (Brunner-Mendoza et al., 2019). Sa diversité est liée à différents aspects tels que : habitat, changement climatique, plantes et/ou insectes, mais (Bidochka et al., 2001 ; Roberts & St. Leger., 2004) ont démontré que les groupes génétiques de *M. anisopliae* étaient associés au type d'habitat plutôt qu'aux insectes hôtes.

### **I.2.3 Enzymes et toxines produites par *Metarhizium***

Divers isolats de *Metarhizium* ont été rapportés pour produire de petites molécules, qui sont soit toxiques pour les insectes soit ont un usage potentiel médical anti-tumoral et antiviral (Roberts & St. Leger, 2004).

Afin de transposer la cuticule de l'hôte, les champignons entomopathogènes sécrètent des protéases, des chitinases et des lipases qui dégradent leurs principaux constituants (protéines, chitine et lipides) et permettent la pénétration des hyphes (Wang et al., 2002, Boldo et al., 2009) (**Figure I.3**).

D'après Roberts & St. Leger, (2004) , les champignons entomopathogènes produisent des métabolites toxiques qui permettent de créer une réaction immunitaire dans l'organisme infectée parmi ces métabolites les destruxins les swainsonine et les nouvelles métabolites.

### **A. Les destruxines**

Les destruxines sont les métabolites secondaires les plus répandus produits par *M. anisopliae* lors de la fermentation. Ce sont les toxines les plus étudiées des champignons entomopathogènes caractérisés comme d'importants facteurs de virulence accélérant la mort des insectes infectés (Schrank & Vainstein, 2010). Au moins vingt-six destruxines différentes ont été identifiées, parmi lesquelles les destruxines A, B et E prédominent (Wang et al., 2004).

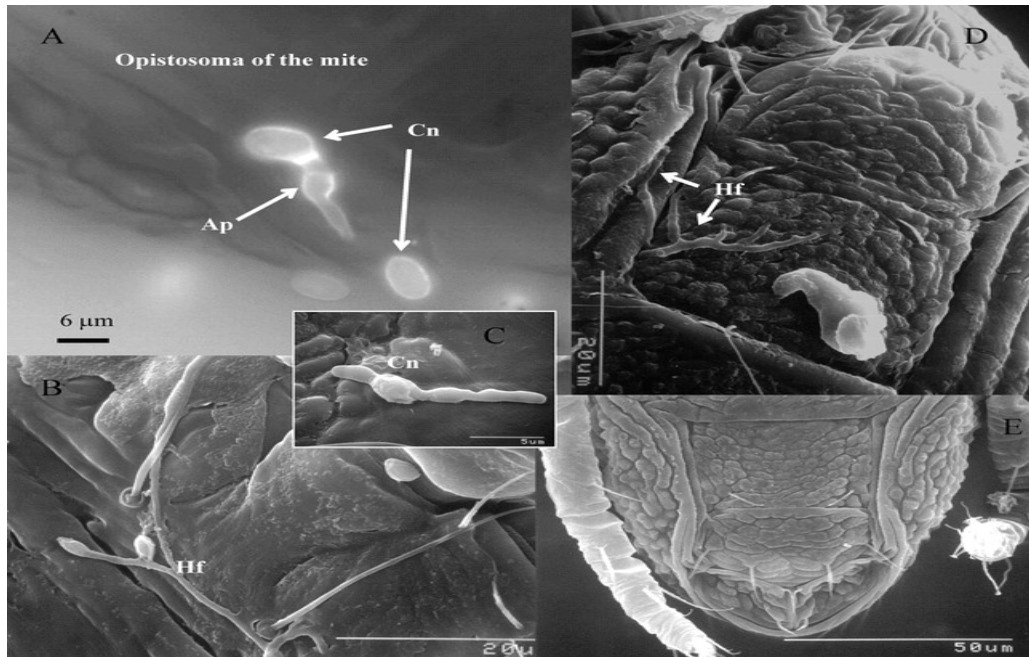
La destruxine A (DA), une mycotoxine ayant une bonne activité insecticide et immuno-inhibitrice chez la souris. C'est le principal facteur pathogène de *M. anisopliae* contre les insectes hôtes (Pedres et al., 2002 ; Yin et al., 2021).

### **B. Swainsonine**

Dans le processus de recherche de nouveaux types de substances immunoactives provenant de micro-organismes, il y a eu la découverte de la "swainsonine", métabolite isolée du champignon *Metarhizium sp.* Cette molécule présente une action compétitive contre les facteurs immunosuppresseurs produits dans le sérum de souris porteuses de tumeurs et a la capacité de restaurer la dépression des réponses mitogéniques des lymphocytes de la rate de la souris par un facteur immunosuppresseur (Hino et al., 1985).

### **C. Nouveaux métabolites à usages thérapeutique**

A partir de *Metarhizium sp* prélever du sol au japon, (Kuboki et al. 1999 ;Roberts & St. Leger, 2004) ont rapporté la découverte de la production d'une molécule 12-hydroxy-ovalicine. Cette molécule est nommé Mer-f3. Différents tests ont démontré sa ressemblance avec l'ovalicine, et indiquent que le Mer-f3 peut être un immunosuppresseur à faible toxicité pour les mammifères. Avec la capacité de Mer-f3 d'inhiber des cellules de leucémie de souris. L-1210, aussi une nouvelle substance immunosuppressive isolée de *Metarhizium*, retrouvé au japon , qui a été nommée métacytofiline (Iijima et al., 1992 ;Roberts & St. Leger, 2004).



**Figure I.3:** A) Microphotographie de *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* infectant *Brevipalpus phoenicis* 3 jours après inoculation, par microscopie à fluorescence. (B, C et D) SEM du processus d'infection et de colonisation. (E) témoin aspergé d'eau. (Cn = Conidie, Ap = Appressorium, Hf = Hyphe) (Magalhães et al., 2005).

#### **I.2.4 Biotechnologies et développement de Biopesticides à base de *Metarhizium anisopliae***

D'après Benjamin et *al.*, (2016), la manipulation génétique des champignons entomopathogènes peut améliorer leur efficacité dans la réduction de la compétence vectorielle. Comme preuve de principe, une souche de *M. anisopliae* a été génétiquement modifiée pour exprimer des transgènes qui inhibent le développement du parasite chez *An. Gambiae*. *Metarhizium anisopliae* a été manipulé pour produire du SM1 de la scorpine, ou d'un anticorps anti-*Plasmodium* sous le contrôle d'un promoteur exprimé au contact de l'hémolymphe du moustique. L'infection par ces champignons transgéniques réduit considérablement le nombre de sporozoïtes de *Plasmodium* dans la glande salivaire, réduisant efficacement la probabilité de transmission.

Plusieurs lignées de *M. anisopliae* transgéniques peuvent être créées pour produire différentes molécules effectrices afin de réduire l'évolution de la résistance. En outre, *M. anisopliae* pourrait être modifié pour produire des molécules effectrices antivirales afin

d'interrompre la transmission du virus de la dengue. En résumé, avec la génétique la manipulation des champignons entomopathogènes est une stratégie hautement réalisable pour diminuer la compétence des moustiques vecteurs pour les agents pathogènes.

### **I.3 BIOSECURITE DE *METARHIZIUM ANISOPLIAE* CHEZ LES MAMMIFERES**

Les tests toxicologiques effectués avec *Metarhizium anisopliae* sur les mammifères n'ont révélé aucun risque de complication infectieuse, car le champignon est incapable de se développer à la température du corps des mammifères (Lomer et al., 2001 ; Sudakin, 2003). Bien que des évaluations de la biosécurité à l'échelle du genre n'ont pas été largement effectuées, les tests de l'innocuité par *M. anisopliae* ont conclu que cette espèce présente un risque minimal pour l'environnement et la santé des humains et d'autres vertébrés (Stone & Bidochka, 2020) .

Il est rapporté que 16 pesticides de *M. anisopliae* sont enregistrés en Chine continentale (China Pesticide Information Network, 2021). Les infections humaines au *Metarhizium* se sont fait rares dans le début de leurs utilisations, mais un nombre croissant d'infection par celle-ci durant ces dernières années. De ce fait, l'utilisation généralisée des biopesticides à base de *Metarhizium anisopliae* peut accroître le risque chez les mammifères (Brunner-Mendoza, et al., 2022).

#### **I.3.1 Revue de la littérature, test de toxicité de *Metarhizium* sur des modèles animaux**

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 (Shaddock et al., 1982 ; El-Kadi et al., 1983 ; Siegel, 1997 ; Goettel et al. 2001 ; Vestergaard et al., 2003 ; Toriello et al., 2006 ; Zimmerman, 2007). Ces recherches sont faites sur des modèles de mammifères et de vertébrés, oiseaux, poissons, cobayes, souris, lapins, rats et reptiles, 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 acceptable dans l'environnement comme une alternative aux pesticides chimiques. *M. 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 (Zimmermann, 1993, 2007).

Des traitements oculaires sur lapins présentant des spores sèches et des suspensions de spores n'ont pas eu d'effets graves. Aussi des test sur l'effet par ingestion par l'alimentation des spores avec intubation chez les rats des conidies sèches n'ont pas non plus produit de symptômes chez les animaux (Roberts & St. Leger, 2004). Un cas d'infection chez les animaux a impliqué un chat atteint de rhinite envahissante (Muir et *al.*, 1998).

Des animaux traités avec *Metarhizium* avaient la rate et le foie dilatés, et de multiples lésions dans les cavités péritonéales (résumé par Goettel et Jaronski, 1997). Ils ont présumé que les lésions étaient dues à une réponse immunitaire accrue, et des tissus cicatriciels étaient présents lors de l'encapsulation des spores (Roberts & St. Leger, 2004).

### **I.3.2 Revue de la littérature, cas cliniques infection humaines dues au *Metarhizium***

D'après Roberts et St.Leger, (2004) *Metarhizium* est un champignon opportuniste infectants les personnes immunodéprimées comme ceux positive au VIH, transplantations d'organes, de la chimiothérapie contre le cancer, des traitements aux stéroïdes.. etc. Ces patients sont particulièrement vulnérables à l'infection par de nombreux champignons. Ils ont aussi démontré un effet cytotoxique de la souche fongique pour la lignée cellulaire humaine leucémique HL60. (Skrobek et Butt.,2005 ; Anand & Tiwary, 2010).

Quelques infections dues aux *M. anisopliae* sont rapportés chez les mammifères et les humains. Une fatalité d'un enfant immunodéprimée (Burgner et *al.*, 1998) et deux cas de sinusite (Revankar et *al.*, 1999). Pour la première fois *M. anisopliae* var. *anisopliae* est isolé à partir de l'œil d'un homme comme l'agent étiologique de la kérato-mycose (Cepero de Garcia et *al.*, 1997). Des lésions de la peau causée par *M. anisopliae* sont décrits chez un patient adulte avec une leucémie aiguë myéloïde (Osorio et *al.*, 2007). D'après Goettel et Jaronski (1997), la société Mycotech a observé une toxicité extrême chez la souris après une provocation pulmonaire (intranasale) par un isolat de *M. anisopliae* var. *anisopliae*.

En raison de l'utilisation généralisée de *M. anisopliae* au Brésil pour le contrôle biologique de différents ravageurs de canne à sucre, plusieurs personnes ont développé des symptômes asthmatiques (Barbieri et al., 2005).

Deux cas d'infection cornéenne humaine (kératite fongique) ont été signalés (DeGarcia et al., 1997; Jani et al., 2001). Et de nombreux champignons ont été impliqués dans la kératite mycotique (Roberts & St. Leger, 2004).

Chez les humains, 19 cas d'infection impliquant *Metarhizium* spp. ont été signalés entre 1997 et 2015 (Nourrisson et al., 2017) les différentes infections peuvent être oculaires ou réparties entre les lésions nasales /sinusales et cutanées (García et al.,1997 ; Burgner et al.,1998 ; Revankar et al.,1999 ; Osorio et al.,2007 ; Marsh et al.,2008 ; Dorin et al.,2015 ; Eguchi et al.,2015 ; Nourrisson et al., 2017).

### **I.3.3 L'immunotoxicité de *Metarhizium anisopliae* chez les mammifères**

Plusieurs tests ont démontré l'effet inflammatoire de ce champignon entomopathogène faisant agir les différents types d'immunité selon la voie de contact utilisée.

Des études ont été menées sur l'effet cytotoxique et la capacité inflammatoire du *Metarhizium anisopliae* par une dose de  $10^8$  conidies sur les souris par voie intrachéale, les résultats de ce test ont démontré une réaction pro-inflammatoire par une augmentation significative des cytokines TNF- $\alpha$ , IL-6 sachant que l'augmentation de cette dernière démontre la sensibilité à l'agent pathogène et la gravité des maladies associées, et IFN- $\gamma$  démontre la présence de pathologie aiguë suite à un choc septique fongique (Romanie. 2008 ; Anand & Tiwary,2010), on a démontré la production relativement plus faible de cytokines anti-inflammatoires, IL-4, IL-10 (Anand & Tiwary, 2010).

Des hypothèses ont été émises sur la relation des toxines comme les destruxins et protéase retrouvées dans l'espace fongique avec l'augmentation des cytokines pro-inflammatoires citées sachant que toutes les souris sont mortes à cause de l'infection dans les 60 heures qui ont suivi l'expérimentation (Anand & Tiwary, 2010).

D'autres essais ont été faits pour évaluer le potentiel allergique de différents facteurs de *M. anisopliae* (spore, mycélium ...) on a démontré la présence d'une réponse inflammatoire allergique par la présence des IgE et éosinophile (Ward et al., 2009).

Afin d'évaluer le potentiel allergique de *M. anisopliae*, des extraits antigéniques bruts des composants fongiques (mycélium, conidies et enzymes inductibles) ont été combinés en quantités égales de protéines (MACA) pour les expositions des animaux dans des études antérieures (Ward et al., 2009).

Des expositions multiples à l'un des extraits de composants de *M. anisopliae* ont induit des réponses de type allergique/asthmatique chez les souris BALB/c, mais l'ampleur de la réponse était différente pour chaque composant, et chacun semble contenir des protéines uniques réagissant aux IgE. Par conséquent, l'identification des dangers et/ou l'évaluation des risques liés aux moisissures doivent tester à la fois les mycéliums et les conidies (Ward et al., 2009). D'autres études ont démontré que *Metarhizium anisopliae* permet de déséquilibrer le système immunitaire des mammifères, ce qui entraîne des maladies telles que l'allergie (Halpin et al., 1994 ; Konstantinovas et al., 2017).

#### **I.4 Néphrotoxicité et Hépatotoxicité**

La néphrotoxicité, peut être définie comme l'effet indésirable des substances sur la fonction rénale, d'origine iatrogène ( Perazella, 2009 ; Barnett & Cummings, 2018). Elle survient lorsque la détoxification et l'excrétion propres aux reins ne fonctionnent pas correctement en raison de l'altération ou de la destruction de la fonction rénale par des substances toxiques exogènes ou endogènes (Kim & Moon 2012).

La défaillance du foie est appelée hépatotoxicité est principalement causée par des agents chimiques telles que les toxines environnementales (Zimmerman & Lewis, 1995 ; Sümera et al., 2019). Elle peut être aussi définie comme le pouvoir d'une substance de provoquer des dommages au niveau hépatique. Qui se manifeste sous forme d'inflammation (on parlera d'hépatite) ou encore de nécrose (mort des cellules du foie) (Therrien., 2009).

Les caractères général qui peuvent être des déterminants clés d'une hépatotoxicité et néphrotoxicité sont d'après Rusyn et al., (2021) :



- La mort (apoptose et/ou nécrose) des cellules (hépatiques, rénales).
- Affecte la prolifération des cellules hépatiques et/ou la régénération des tissus.
- Induit un stress oxydatif et active les voies de signalisation du stress.
- Déclenche des réponses à médiation immunitaire.
- Provoque un dysfonctionnement mitochondrial.
- Peut Provoquer une fibrose et Perturbation du métabolisme hépatique, y compris celui des lipides et des protéines.

#### **I.4.1 Le rein**

Le rein est constitué de nombreux types de cellules organisées fonctionnellement dans le néphron, qui est l'unité fonctionnelle de base du rein (Barnett & Cummings, 2018) ils a plusieurs fonction d'après (Sherwood, 2006).

- ❖ Permet l'excrétion des déchets du métabolique tels que l'urée, l'acide urique et la créatinine. Si ces déchets s'accumulaient, ils seraient toxiques notamment pour le système nerveux central.
- ❖ Excrétion de nombreuses substances étrangers telles que des médicaments, des additifs alimentaires, des pesticides...) ayant qu'il pénètre dans l'organisme.
- ❖ Sécrétion d'érythropoïétine, une hormone qui stimule la production des globules rouges.

Chaque rein contient environ un million de néphrons. Le néphron est l'unité fonctionnelle du rein. Chacun de ces néphrons est composé de 2 parties, le corpuscule de Malpighi et le tubule urinaire, qui vont assurer les opérations de filtration glomérulaires, de réabsorption tubulaire et de Sécrétion qui conduisent à la formation de l'urine définitive (Lacour, 2013).

#### **I.4.2 La néphrotoxicité**

les atteintes rénales peuvent être classées en fonction du type de structure touchée ou du mécanisme mis en œuvre, chaque molécule est susceptible d'induire une néphrotoxicité par un mécanisme qui lui est propre (Gueguen et al., 2012).

**I.4.2.1 Les paramètres relatifs à la néphrotoxicité****A. Les Biomarqueurs de néphrotoxicité**

Un biomarqueur est une substance trouvée dans le sang, les sécrétions ou les tissus et qui fournit une mesure de l'état biologique normal, pathologique ou d'une réponse à une autre substance étrangère. Il existe un vaste choix de biomarqueurs comprenant des ARN messagers, des protéines, des peptides et des molécules lipidiques (Gueguen et al., 2012).

Ces biomarqueurs peuvent être classés selon leur fonction organique (marqueurs d'intégrité tissulaire). Ces derniers peuvent encore être subdivisés selon la structure touchée : on parlera de marqueurs glomérulaires et de marqueurs tubulaires (Gueguen et al., 2012). Voir le **(tableau I.2)** qui illustre la grande variabilité des substances néphrotoxiques ainsi que leur(s) cible(s) respective(s) (Annexe I).

- **Marqueurs classiques**

Les marqueurs traditionnels, de la néphrotoxicité et du dysfonctionnement rénal sont l'urée sanguine et la créatinine sérique. Ce dernier permet de déterminer le taux de filtration glomérulaire et la clairance rénale. Ces deux paramètres sont peu sensibles dans la détection des lésions rénales (Naimi et al., 2019). Leurs spécificités nécessitent une atteinte rénale avancée pour que leurs valeurs soient significativement modifiées (Gueguen et al., 2012).

- **Protéines de bas PM**

Les protéines de faible poids moléculaire produites dans d'autres organes. Permet d'indiquer un mauvais fonctionnement au niveau glomérulaire et dans le tube contourné proximal, sachant que ces protéines dans un état normal sont filtrées et réabsorbées dans le glomérule et ne sont pas libérées par le tubule proximal, donc l'augmentation des protéines de faible poids moléculaire filtrées indique que l'absorption dans le glomérule et le tubule proximal n'est pas adéquate, ce qui signifie que qu'il peut y avoir des lésions ou une surcharge cellulaire. Par conséquent, les lésions rénales dues à la toxicité peuvent être détectées plus tôt en utilisant les mesures des protéines dans l'urine. (Bernard et al., 1987 ; Kim & Moon, 2012).

Nous pouvons citer :  $\alpha$ 1-microglobuline,  $\beta$ 2-microglobuline, Cystatin C (Cys C), rétinol-binding protein, and kidney injury molecule-1 (KIM-1).

- **Enzymes**

Peuvent être utilisés comme marqueur prédictif et la détermination de la sévérité des dommages clinique ou expérimentalement, utiliser aussi comme un marqueur tubulaire. L'intérêt de ces marqueurs réside dans le fait qu'ils permettent la mise en évidence de dommages encore légers et réversibles (Gueguen et al., 2012).

Nous pouvons énumérer quelques enzymes : N-acétyl-b-glucosaminidase (NAG), phosphatase alcaline g-glutamyl transpeptidase Alanine aminopeptidase Glutathion-S-transférase (GST).

- **Marqueurs de l'inflammation**

Le recours aux biomarqueurs inflammatoires est largement utilisé dans les démarches diagnostiques pour des syndromes inflammatoires. Les réactions inflammatoires s'accompagnent avec sévérité de la maladie sous-jacente, (Monti, 2013) .

Nous pouvons énoncer quelques paramètres : NGAL : lipocaline associée à la gélatinase des polynucléaires neutrophiles ; cytokine exemple : IL-18, L-FABP : liver fatty-acid-binding protein, H-FABP : heart fatty-acid-binding.

- **NGAL** : La NGAL est une protéine de 25 kDa initialement identifiée dans les neutrophiles actives. Elle est produite à un très faible niveau par de nombreuses cellules de l'épithélium dont celui du tubule proximal rénal (Parikh et Devarajan, 2008 ; Gueguen et al., 2012) . L'expression de NGAL est augmentée dans les cellules des tubules proximaux par la néphrotoxicité ou l'ischémie induite. Elle est connue comme un biomarqueur sensible pour le diagnostic précoce des lésions rénales aiguës. La concentration de NGAL dans le sang augmente également en cas d'infection et d'inflammation (Xu et al., 1995 ; Ohlsson et al., 2003 ; Kim & Moon, 2012).

### **I.4.3 Le foie**

D'après Kalra et al, 2022, le foie joue un rôle critique, responsable d'une série de fonctions qui contribuent au métabolisme, à l'immunité, à la digestion, à la détoxification et au stockage des vitamines, Le foie est un organe unique en raison de sa double irrigation sanguine

par la veine porte (environ 75 %) et l'artère hépatique (environ 25 %). Il joue un rôle crucial dans la détoxification des substances qui sont nuisibles pour le corps, notamment l'alcool, les drogues, les solvants, les pesticides et les métaux lourds (Highleyman & Franciscus, 2004).

La description histologique classique du foie repose sur le concept d'un regroupement des hépatocytes au sein d'unités anatomiques qui sont les lobules hépatiques. Elles correspondent à l'unité structurelle du foie (Dadoune et al., 1990). Et qui a plusieurs cellules, parmi elle les hépatocytes représentent le centre fonctionnel du foie (Gebhardt, 1992). Les hépatocytes s'avèrent responsables de la biotransformation des composés potentiellement toxiques en composés non toxiques, excrétés dans les sécrétions biliaires et l'urine (Jones & Spring-Mills, 1984).

#### **I.4.4 L'hépatotoxicité**

##### **I.4.4.1 Biomarqueurs d'hépatotoxicité**

Un biomarqueur d'hépatotoxicité permet l'identification d'une lésion hépatique (Meunier & Larrey, 2018). En effet, la caractérisation de l'atteinte hépatique est basée essentiellement sur des critères biologiques, et cliniques quand ils sont présents.

### **A.Pratique clinique actuelle**

#### **A.1 Biomarqueur traditionnel**

Les biomarqueurs les plus courant dans la pratique clinique pour détecter les lésions hépatiques sont soit en mesurant :

- **L'altération de la fonction hépatique normale**

Telle que des différences dans les taux sériques de bilirubine totale (Tbil) et d'acides biliaires totaux, qui constitue un signe d'atteinte hépatique (Aubrecht et al., 2013). Utilisée comme un critère de gravité. Cependant elles fournissent une information limitée pour la détection précoce des lésions hépatiques, (Meunier & Larrey, 2019).

La bilirubine est assez spécifique des lésions hépatiques, mais n'est pas très sensible étant donné que les taux n'augmentent significativement qu'après que le foie a perdu environ la moitié de sa capacité d'excrétion.(Schnackenberg et al., 2012).

- **Les modifications de l'intégrité des tissus et des cellules**

Détectées par la fuite dans le sérum de composants spécifiques aux cellules, tels que l'alanine aminotransférase (ALAT), l'aspartate amino-transférase (ASAT) et la phosphatase alcaline (ALAP). (Aubrecht et al., 2013).

Ces biomarqueurs détectent les dommages après qu'ils se soit déclarée et ont donc une valeur pronostique limitée. il faut souvent une lésion hépatique grave avant qu'une augmentation significative soit observée.(Aubrecht et al., 2013).

### **A.2 Auto-anticorps spécifique**

D'après Larrey et al., (2017) ; Meunier & Larrey, (2018), l'hépatotoxicité de certain toxine ou médicaments est associée à la présence d'anticorps spécifique ayant une très bonne spécificité et sensibilité comme marqueur de diagnostic.

### **A.3 Nouveaux marqueurs sériques**

Il est nécessaire de disposer d'autres marqueurs sériques qui peuvent être mesurés seuls ou conjointement avec ALAT pour mieux évaluer les lésions hépatiques et la fonction hépatique.

Des études récentes ont suggéré que la mesure des isozymes ALAT c'est-à-dire l'ALAT1 et l'ALAT2, peut aider à différencier la source de la lésion. Ils ont constaté que l'ALAT1 est localisée dans les hépatocytes humains, les cellules épithéliales des tubules( Lindblomet al ., 2007 ; Schnackenberg et al., 2012).

Un autre exemple de biomarqueur sérique basé sur l'un des principaux mécanismes de toxicité est la formation de métabolites réactifs toxiques (Larrey et al., 2017). Le complexe métabolite réactif -protéine forme un adduit qui peut être détectable dans le sang .comme la détection d'un adduit du métabolite du paracétamol dans le sang (Meunier & Larrey, 2019).

## **B. Nouveaux biomarqueurs**

Pour combler les lacunes des biomarqueurs traditionnelle, plusieurs nouveaux biomarqueurs sont à l'étude qui pourront présenter une spécificité et une sensibilité suffisamment élevées pour surpasser et devenir des BM recommander. Cependant. Les différents biomarqueurs

candidats peuvent être classés en fonction de leur utilité (diagnostic ou pronostic), comme le montre le ( **tableau I.3** ) retrouvée dans l'annexe I .(Meunier & Larrey, 2019).

**II. Matériel et méthode****II.1 Matériel****II.1.1 Matériel biologique****II.1.1.1 Souche Fongique**

Le champignon entomopathogène utilisé dans notre expérimentation est *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* (EVCH 077). Cette souche fongique est développée en biopesticide dont le nom commercial est **NOVACRID®**. Le produit est sous forme de poudre sèche de spores de couleur vert militaire sans odeur particulière. Le biopesticide, conservé à 4°C, est fournis par l'Institut National de Protection des Végétaux « INPV » d'El Harrach - Alger.

Avant toute utilisation, un test de germination est réalisé sur un échantillon de spores conditionnées en biopesticide. Le test réalisé à l'INPV, révèle que la viabilité des spores prélevés du biopesticide Novacrid® est à environ 90 % (voir annexe II).

**II.1.1.2 Rats Wistar femelles**

Dans le cadre de l'étude de la biosécurité de *Metarhizium acridum* chez les mammifères, nous avons choisi, comme modèle animal, les rats femelles de souche *Rattus norvigicus* Wistar. Les animaux (n=15 individus) acquièrent auprès de l'institut Pasteur de Kouba- Alger. La salle d'élevage se trouve au niveau de la Station Expérimentale de la Faculté des Science de la Nature et de la Vie à l'Université de Blida 1. Dès leur arrivé à l'animalerie, les animaux sont soumis à une période d'acclimatation de 12 jours, à température ambiante réglée avec un bain d'huile thermostaté à 25°C ; Et soumis à une photopériode alternée naturellement d'environ 12 heures d'obscurité suivie de 12 heures de lumière. Les rats sont gardés dans des cages en plastique munis de biberon. La litière est changée tous les deux jours jusqu'à la fin de l'expérimentation.

Tous les animaux reçoivent de l'eau et de la nourriture « *ad-libitum* ». La nourriture est sous forme de bouchons alimentaires composée d'un concentré équilibré en protéines, glucides, lipides, vitamines et sels minéraux (voir annexe II).

**II.1.2 Matériel non biologique**

Le matériel utilisé dans cette étude comporte les équipements, les appareillages et réactifs (voir l'annexe II).

**II.2 METHODES**

Vu le manque des tests de toxicité chez les mammifères avec la souche EVCH 077 de *Metarhizium acridum*, nous avons établi, dans le présent travail, une étude comparative de l'effet des traitements avec deux formulations aqueuses titrées à la même concentration. La première est à base des spores conditionnées en biopesticide (conidies sèches prélevés de Novacrid®), la deuxième formulation est à base des spores nouvellement germées (conidies fraîches récupérée après mise en culture).

Nous avons choisi comme premier test, la toxicité orale subaiguë. L'étude cible de quelques aspects morphologiques et fonctionnels de la toxicité rénal et hépatique chez les rattes Wistar. D'autre part, nous avons exploité l'effet inflammatoire local par le test œdème de la pâte suite à une injection intradermique unique avec les deux formulations de spores du champignon entomopathogène.

Les différentes manipulations avec la souche *M. acridum* (mise en culture, sporulation, préparation des solutions de traitements ; observations microscopiques), sont faites au niveau du laboratoire de projets de fin d'étude (PFE) - Station expérimentale- FSNV.

La réalisation de la technique histologique est faite dans deux laboratoires : l'une est faite dans le service d'Anatomie Pathologique, Laboratoire de Cytologie, Hôpital Nafissa Hamoud - Hussein Dey -Alger. L'autre est faite dans l'Ecole Vétérinaire de Mostaganem.

La période expérimentale de notre travail a duré 4 mois de Mars à Juin 2022.

**II.2.1 Test de toxicité subaiguë par voie orale**

Les traitements par voie orale des rats avec les spores de *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* sont réalisés pendant 20 jours.



- L'administration quotidienne des spores est faite avec les deux formulations aqueuses titrées à la même concentration à savoir  **$6 \times 10^8$  spores /mL / 250 g de poids corporel** sous les mêmes conditions expérimentales pendant 20 jours.

Les rats femelles Wistar adultes sont réparties en 3 lots de 5 individus chacun. Les animaux ont une moyenne de poids corporel de 112.99 g  $\pm$  4,908 enregistrée le premier jour du traitement.

- **Lot 1 (témoin)** : les rattes (113,6 g  $\pm$  8,29) sont inoculées avec 1 mL d'eau distillée stérile.
- **Lot 2 (lot culture)** : les rattes (117,56 g  $\pm$  10,83) sont inoculées avec 1 mL de la solution de spores issues de culture (fraîches) à raison de ( **$6 \times 10^8$  Spores /mL / 250 g de poids corporel / jour**).
- **Lot 3 (lot biopesticide)** : les rattes (107,8 g  $\pm$  5,792) sont inoculées avec une solution de conidies récupérées de Novacrid® à raison de ( **$6 \times 10^8$  spores / mL / 250 g de poids corporel / jour**).

## II.2.2 Préparation des formulations de traitement

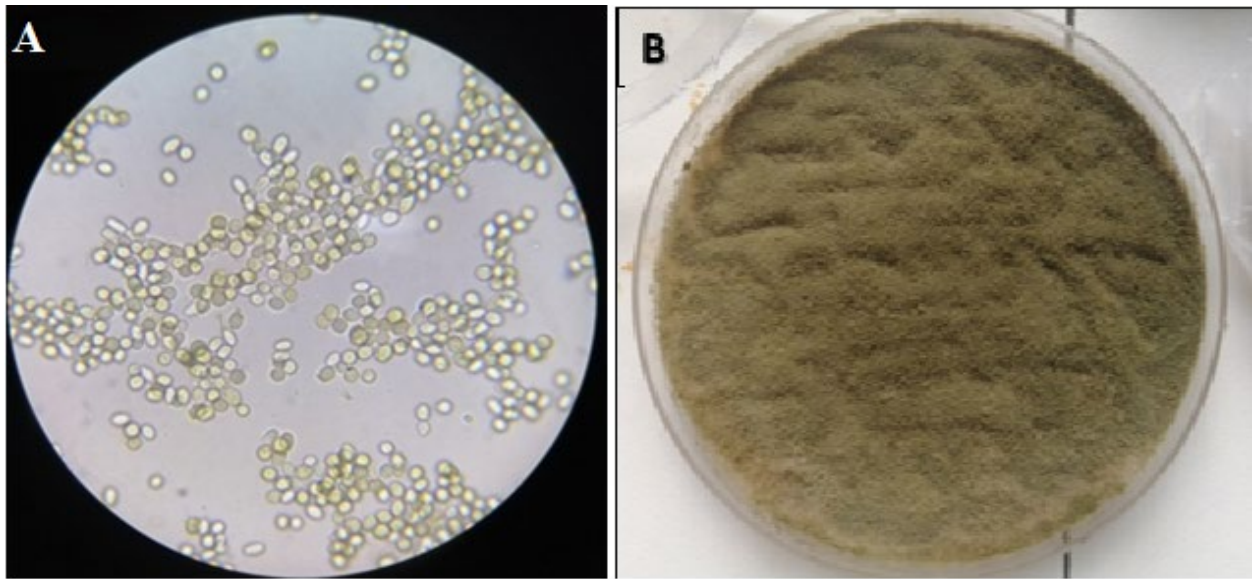
Le premier inoculum est à base de spores fraîches (100% viables) récupéré après germination et repiquage sur des milieux de culture. Les spores de la première culture sont originaires du biopesticide Novacrid® (la souche EVCH 077 de *Metarhizium acridum*).

Le deuxième inoculum est à base de spore sèches prêtes à l'emploi, prélevé directement à partir du produit Novacrid®.

### II.2.2.1 Préparation de la formulation de traitement à base de spores issues de culture

- **Mise en culture du champignon**
  - Nous avons prélevé 0,1 g de la poudre de spores à partir du produit Novacrid®. Cette quantité est diluée dans 100 mL de l'huile de gasoil. La solution mère est agitée pendant 10 min par le vortex pour une meilleure désagrégation des spores.

- Nous avons préparé les milieux de culture PDA et MALT (voir annexe 2). Les milieux sont stérilisés par autoclavage à 120°C. Les boîtes de pétri sont remplies à moitié et refroidies devant le bec de Bunsen jusqu'à ce que le milieu se solidifie.
- Dans un environnement stérile, nous avons ensemencé quelques gouttes de la suspension mère de spores par la méthode d'étalement sur l'ensemble des milieux par un étaloir stérile.
- Les boîtes sont fermées par le parafilm et incubées dans l'étuve réglée à 28°C.
- **Multiplication et purification de la souche fongique**
  - Le 4<sup>ème</sup> jour suivant l'ensemencement nous avons remarqué le début de la fructification du champignon et apparition d'une couche blanchâtre qui reflète la germination des spores et le développement du mycélium.
  - Au bout de 15 jours, la prolifération de *Metarhizium acridum* est bien développée sur l'ensemble de la culture.
  - Nous avons récupéré quelques colonies pures, et nous avons étalé sur une goutte d'eau distillée stérile entre lame et lamelle. L'observation au microscope optique nous a permis l'identification de notre souche fongique, les spores sont de forme ovoïde et de contours verdâtre (**Figure II.4- A**).
  - Nous avons réalisé plusieurs repiquages de colonies pures sur des milieux de culture frais à fin d'obtenir une sporulation importante de notre souche. Les boîtes fermées par le parafilm sont incubées à 28°C.



**Figure II.4 :** La souche EVCH 077 de *Metarhizium acridum*, **A** : aspect des spores sous microscope optique au grossissement 100 ; **B** : aspect des spores en culture âgée de 20 jours.

- **Récupération et dénombrement des spores**

- Sur des cultures âgées de 15 à 20 jours ayant bien fructifiées (**Figure II.4 B**), nous avons récupéré l'ensemble des spores par grattage de la surface via un étaloir stérile et avec l'ajout de quelques gouttes d'eau distillée stérile dans chaque boîte. Les manipulations sont faites dans un environnement stérile devant deux becs Bunsen.
- La solution mère est filtrée pour éliminer les débris de culture. Le filtrat, de volume 100 mL d'eau distillée stérile, est récupéré dans un flacon et il est conservée à 4°C.
- Nous avons procédé par la suite à la détermination de la concentration de la solution mère en nombre de spores /mL. Pour faciliter le dénombrement, nous avons préparé une dilution à 1/10 (1 mL de la solution mère pour 9 mL d'eau stérile)
- Après agitation pendant 10 minutes, pour une meilleure dispersion des spores, nous avons prélevé une fine goutte déposée sur la cellule de malassez. Cette dernière recouverte par une lamelle, peut prendre un volume de 1 $\mu$ L dans ses rectangles (voir annexe II).

- A l'aide du microscope optique au grossissement 40, nous avons dénombré les spores à partir de 3 prélèvements de la solution mère diluée, dont la moyenne est considérée (voir annexe II).

Pour le calcul des concentrations en spores, nous avons utilisé la formule décrite par Chaouch et al. (2009 ; 2015) :

$$\text{la concentration en } \frac{\text{spores}}{\mu\text{L}} = \frac{\text{moyenne des spores comptés par 10 rectangles} \times 100}{(2 \text{ mm} \times 2.5 \text{ mm} \times 0.2 \text{ mm}) = 1 \mu\text{L}} \quad (\text{Équation 1})$$

On peut utiliser la formule simplifiée suivante

$$100 \text{ spores} \rightarrow 10^6 \text{ spores/mL}$$

$$\text{nombre de spores comptés dans 10 rectangles} \times \text{facteur de dilution} \rightarrow \text{concentration en spores/ml}$$

(Équation 2)

### II.2.2.2 Préparation de la formulation de traitement à base de prélevées de Novacrid®

La concentration en spores conditionnées prêtes à l'emploi, prélevées directement à partir du biopesticide est choisie à **6 × 10<sup>8</sup> spores / mL**.

- **Calcul de la quantité à prélevé en spores sèches de Novacrid®**

Nous avons cherché le poids en spores correspondant à la dose **6 × 10<sup>8</sup> spores**

Selon la fiche technique du produit Novacrid® (voir annexe II) :

1 g de la poudre sèche de spores prélevées du biopesticide Novacrid® (N) correspond à environ 5x 10<sup>10</sup> spores : 1g = 5 x 10<sup>10</sup> spores

Ainsi le poids de spores correspondant à **6 × 10<sup>8</sup> = 0,012 g = 12 mg**.

- **Préparation de l'inoculum de traitement avec les spores conditionnées de Novacrid®**

Nous avons pesé avec la balance de précision 1,2 g de poudre du biopesticide. Cette quantité est mélangé dans 100 mL d'eau distillée stérile. Ainsi la formulation de traitement avec Novacrid® est concentrée à **6 × 10<sup>8</sup> spores /mL** et conservée à 4°C.

### **II.1.3. Expérimentation animale et réalisation des traitements par voie orale**

La dose de traitement des rats avec *M. acridum* est choisie à  $6 \times 10^8$  spores / mL /250 g de poids corporel par la méthode de gavage intragastrique (**Figure II.5 - A**). L'administration orale est faite entre 11h et 12h durant les 20 jours.

Le volume prélevé à partir des deux formulations de traitement est ajusté selon l'évolution du poids corporel. Ainsi les animaux sont pesés chaque 5 jours à compter du premier jour du traitement afin de recalculer le volume à prélevé de chaque inoculum et qui est adapté en fonction du poids corporels moyen des 5 rats de chaque lot.

Ce volume calculé est complété avec de l'eau distillée stérile jusqu'à 1 mL (le volume de gavage quotidien pour chaque rat) (voir tableaux + exemples dans annexe II).

### **II.2.3 Test de toxicité aigüe par injection intradermique**

#### **II.2.3.1 Préparation de la solution de spores issues de culture et du biopesticide**

Nous avons évalué l'importance de l'activité inflammatoire induite après injection unique intradermique des deux types de formulations de spores au niveau de la patte postérieure gauche de l'animal (**Figure II.5 - B**).

Nous avons appliqué le test de Levy cité par Berkan *et al.* (1991) et par Halouane (2008) Pour les animaux témoins, au temps  $T_0$  une injection intradermique d'un volume **25 $\mu$ L** d'eau physiologique stérile est appliquée au niveau de la patte gauche de chacun des 5 rats.

- Pour les animaux traités avec les spores de culture, au temps  $T_0$ , une injection intradermique d'un volume de **0,025 mL** d'une solution en spores de *Metarhizium acridum* à raison de **1.3 x  $10^6$  spores /mL** est appliquée au niveau de la patte gauche.
- Pour les animaux traités avec les spores du biopesticide, au temps  $T_0$ , une injection intradermique d'un volume de **0,025 mL** d'une solution en spores de *Metarhizium acridum* à raison de **1.3 x  $10^6$  spores /mL** est appliquée au niveau de la patte gauche.

La préparation des solutions de traitement à base de spores fraîches (nouvellement germées et dénombrés) et à base des spores sèche (conditionnées, prélevés du biopesticide) est réalisé comme décrit précédemment dans de l'eau physiologique stérile (annexe II).

Les solutions de traitement sont administrées à tous les rats expérimentés, à raison du même volume, par injection sous l'aponévrose plantaire de la patte arrière gauche (**Figure II.5 - B**).



**Figure II.5 :** Méthodes de traitements des rats Wistar avec *Metarhizium acridum*  
A : gavage intragastrique ; B : injection intradermique.

## II.2.4 Traitement des données

### II.2.4.1 Suivis des rats

Les rats Wistar ont été surveillés durant la période de l'expérimentation dans le but de noter tous changements de comportement ou symptômes cliniques suite aux différents traitements avec le champignon entomopathogène.

### II.2.4.2 Sacrifice des animaux et prélèvement des échantillons

- A la fin de l'expérimentation **J 21**, les animaux sont pesés. Après une légère anesthésie au chloroforme, les rats sont sacrifiés par une décapitation rapide de la tête.
- Le sang a été prélevé dans des tubes de prélèvement avec anticoagulant (**EDTA et hépariné**), pour dosage de certains paramètres : la formule de numération sanguine (FNS), urémie, créatinémie, phosphatase alcaline et les transaminases (l'alanine aminotransférase ou ALAT et l'aspartate aminotransférase ou ASAT)

- Au temps  $T_0 + 4h$  les animaux sont sacrifiés, les pattes postérieures sont coupées au niveau de l'articulation et pesées sur une balance de précision. Pour chaque animal, l'augmentation du poids de la patte gauche traitée au *Metarhizium acridum* par rapport à la patte droite correspond à l'intensité de l'inflammation ou l'œdème.
- Par dissection des animaux, nous avons prélevé le foie et les reins. Sur un lit de glace, nous avons éliminé soigneusement le tissu adipeux adhérent. Les organes sont pesés avec précision ; puis immédiatement immergé dans des flacons étiquetés contenant le formol dilué à 10 %.

Nous avons calculé l'augmentation relatives du poids corporel ainsi que le poids relatif des organes avec les formules suivantes :

$$\text{augmentation relative du PC} = \frac{pc \text{ fin de l'exp}(g) \times 100}{pc \text{ au debut de l'exp}} - 100 \text{ (Équation 3)}$$

$$\text{poids relatifs \%} = \frac{\text{poids absolu de l'organe}(g) \times 100}{\text{poids final du rats } (g)} \text{ (Équation 4)}$$

## II.2.5 Etude histopathologique et morphométrique

La confection des coupes histologiques du tissu rénal et hépatique est réalisé selon des étapes successives selon Martoja & Martoja (1967) et Gabe (1968).

### II.2.5.1 La technique histologique

- **Fixation et rinçage**

La fixation permet de maintenir la structure aussi proche que possible de son état vivant et d'arrêter toute activité mitotique et enzymatique. Et durcissement des pièces anatomiques. Le liquide utilisé est le formol. Les organes sont coupés longitudinalement en deux fragment,

Placée dans des cassettes étiquetées et déposer dans l'eau pendant 24 à 48h, dans le but de rincer et d'enlever l'excès du formol.

- **Déshydratation et Imprégnation**

Le but de cette étape est d'éliminer l'eau intracellulaire, pour pouvoir réaliser une coupe fine par la suite sans perdre la structure cellulaire initiale au moment de la rupture de la membrane plasmique (sortie d'eau brutale).

Par passage dans un automate composé de plusieurs bacs ; par des bains successifs d'alcools de concentration croissante 70°C, 90°C, 100°C. Temps respectives de 10 min, 45 min, 1h30 cela permet de déshydrater l'organe sachant que la paraffine est très hydrophobe.

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). Puis l'imprégnation dans un bain de (xylène-paraffine).

- **Inclusion et mise en bloc**

L'inclusion a pour but de permettre la réalisation de coupes fines (d'une épaisseur de 2 à 5 µm) et régulières. Le milieu d'inclusion utilisé est la paraffine (résine blanche opaque). Le prélèvement baigne dans de la paraffine fondue (chauffée à 56°C pendant 4h dans une étuve) qui permet d'infiltrer toutes les cellules.

La mise en bloc par écoulement de la paraffine dans des moules métalliques, puis l'orientation des fragments dans la paraffine, placement des cassettes, les blocs obtenus sont refroidis rapidement sur une plaque métallique réfrigérée pendant environ 15 min.

- **Confection des coupes histologiques**

Le passage du bloc de paraffine dans un microtome permet de réaliser des sections de (5 µm) disposées en séries régulières sous forme d'un ruban, les coupes sont étalées après passage au microtome dans un bain d'eau thermo statée (37°C) récupérées et coller sur les lames gélatinées et identifiés selon la nature de l'échantillon grâce à un crayon a visse, les lames sont ensuite séchées dans une étuve au moins 24h avant la coloration.



- **Déparaffinage et réhydratation**

Le Déparaffinage par un bain de xylène pendant 10 min. puis la réhydratation qui permet l'élimination de la paraffine intracellulaire, en immergeant les lames dans des bains d'alcool de degrés décroissant d'éthanol (96°C, 70°C) par un automate ou en mode manuel 5 min chacune.

- **Coloration**

Le but de la coloration est d'accentué les contrastes afin de différencier les différents constituants tissulaires (noyau, membrane plasmique et cytoplasme). Colorant utilisée est HE (hématoxyline éosine) permet de déterminer la répartition et structure de notre organe.

On commence par un bain d'hématoxyline éosine 25 min. Puis dans l'eau 10 min ensuite dans un bain d'éosine 10 min.

- **Montage & Observation microscopique**

Les coupes colorées sont montées entre lame et lamelle avec un fixateur, tout en nettoyant leurs faces par xylène. Prêtent à être observées au microscope optique à différents grossissement ( $G \times 40$ ,  $G \times 400$ ,  $G \times 100$ ,  $G \times 1000$ ).

Les photos des images histologiques sont prises à l'aide d'un photomicroscope OPTIKA.

### **II.2.5.2 Etude morphométrique**

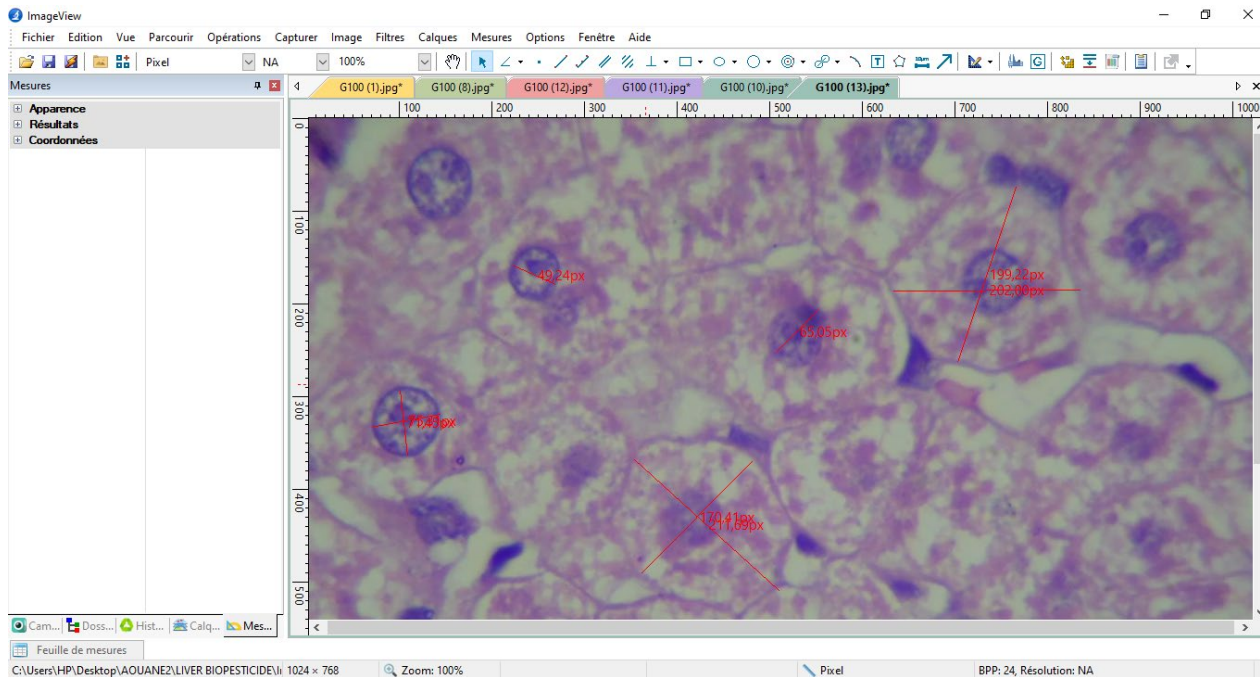
À fin d'estimer l'état physiologique des cellules rénales et hépatiques (hypertrophie vs hypotrophie) en comparaison avec le lots témoin et entre les lots traités, nous avons conçu des paramètres morphométriques évalués grâce à un logiciel d'analyse et de traitement d'images ImageView et SXView OPTIKA (**Figure II.6**).

Ce système d'analyse d'image est étalonné à l'aide d'une lame micrométrique graduée au micromètre à fin d'obtenir des micromesures concernant :

- Le glomérule (contour cellulaire du peloton, diamètre glomérulaire, chambre glomérulaire).

- Le tissu hépatique (dénombrement des hépatocytes dans une superficie bien déterminée, hauteur cellulaire, diamètre du noyau, rapport nucléocytoplasmique).

$$\text{Rapport nucléocytoplasmique} = \frac{\text{Volume du noyau}}{V \text{ du cytoplasme} - V \text{ du noyau}} \quad (\text{Équation 5})$$



**Figure II.6 :** Photo d'un écran ordinateur montrant un exemple de mesures morphométriques réalisées par le logiciel de traitement d'image ImageView.

### II.3 Analyse statistique des résultats

Les résultats sont représentés sous forme de moyennes avec écart-type (Moyenne  $\pm$  SEM). L'analyse des données a été effectuée par le test de l'ANOVA, à un facteur et qui est basé sur la comparaison des différences entre les groupes expérimentaux (comparaison des moyennes inter et intra groupes).

Les différences sont considérées comme :

- Significatives : lorsque (P <0,05).
- Hautement significatives : lorsque (P <0,01).
- Très hautement significatives : lorsque (P <0,001).

**III. Résultat et discussion**

Notre travail vise à la recherche d'éventuels indices de l'inflammation chez les rattes Wistar traitées avec deux formulations aqueuses préparées à la même concentration de *Metarhizium acridum* (**6 x 10<sup>8</sup> spores /mL /250g de poids corporel /jours pendant 20 jours**) à savoir l'inoculum de spores germées (de culture), et l'inoculum à base de conidies conditionnées en biopesticide (Novacrid®).

Nous allons explorer les effets des traitements, par voie orale pendant 20 jours, au niveau des reins et du foie. Les indices de l'inflammation sont recherchés sur le plan tissulaire (étude histopathologique et morphométrique), sur le plan systémique (dosage de quelques paramètres rénaux, hépatiques et hématologiques). Nous avons cherché l'effet des traitements sur les poids absolus et relatifs des organes étudiés ainsi que sur l'évolution du poids corporel des animaux traités en comparaison avec les individus témoins.

Un autre test par injection intradermique unique est réalisé au niveau de la patte à fin d'estimer l'importance de l'œdème inflammatoire induit par les deux types de formulation en spores concentré à **1.3 x 10<sup>6</sup> spores /mL**.

**III.1 RESULTATS****III.1.1 Effets des traitements sur le comportement des rattes Wistar**

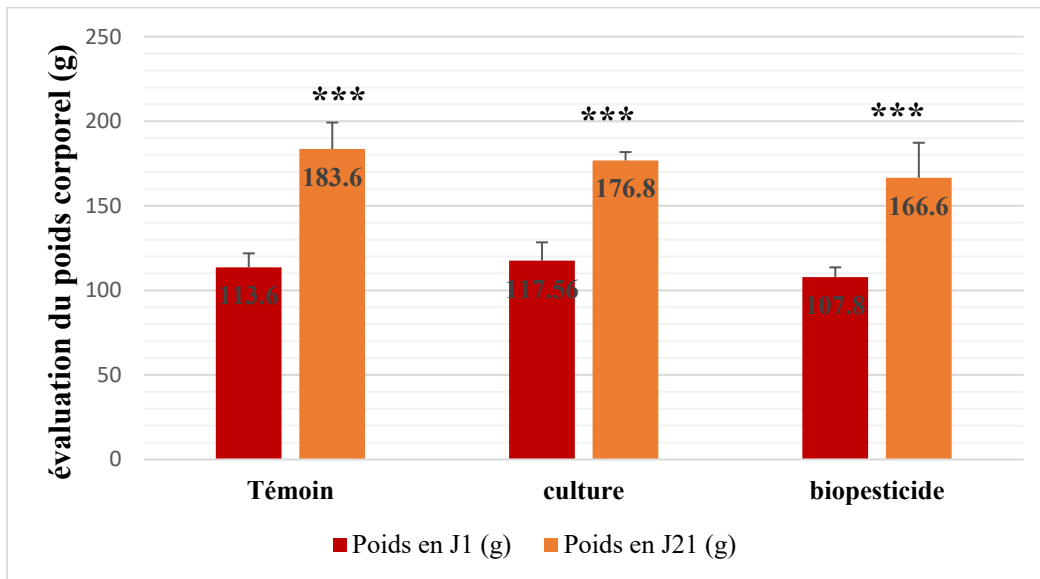
Durant notre expérimentation, les rattes sont minutieusement observées de manière à déceler toutes les manifestations éventuelles de toxicité ou d'allergie consécutives à l'accumulation de spores dans l'organisme de ces rongeurs.

Les traitements à base de *Metarhizium acridum* n'ont pas altéré la prise d'aliment des rattes. Leurs comportements sont le même par rapport aux individus non traités (lot témoin) sans changement avant et après le gavage.

**III.1.2 Effets des traitements sur les paramètres de poids**

**III.1.2.1 Effets des traitements sur l'évolution du poids corporel des rattes**

Les résultats relatifs aux variations de la croissance pondérale des rats femelles entre le début et la fin de l'expérimentation sont illustrés sur les (Figures III.8 et III.7). Les significations statistiques des résultats sont présentées est détaillées sur (les tableaux III.16, et III.17) de l'annexe III.



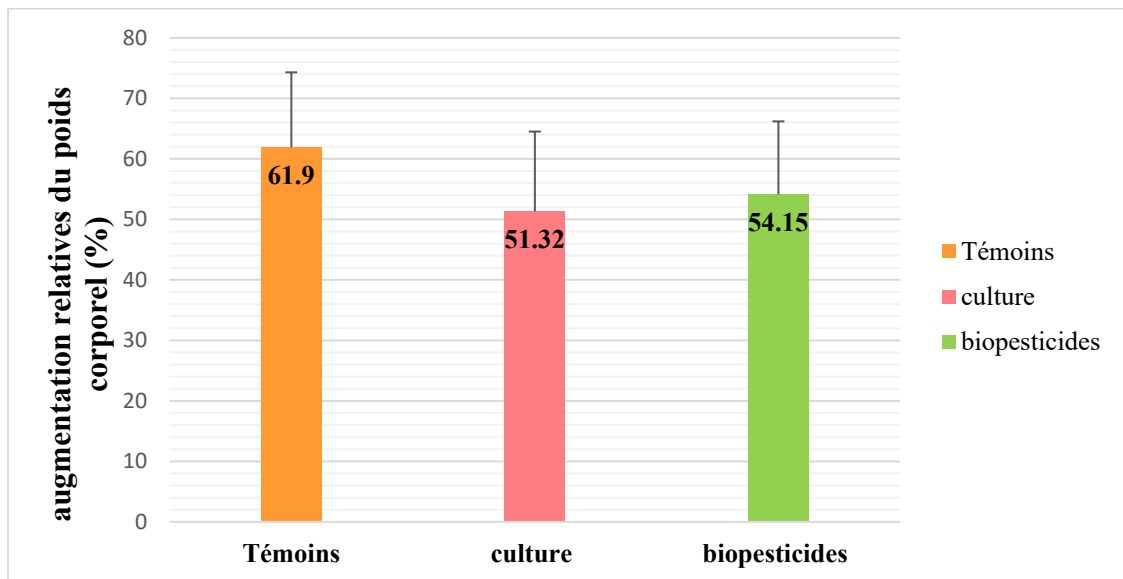
**Figure III. 7 :** Evolution du poids corporel au cours de l'expérimentation chez les rattes Wistar témoins et traités avec *Metarhizium acridum*.

Non significatives (). Significatives (\*) : lorsque (P <0,05). Hautement significatives (\*\*) : lorsque (P <0,01). Très hautement significatives (\*\*\*) : lorsque (P <0,001).

D'après les résultats obtenus (Figure III.7), tous les animaux ont gagné du poids durant la période de traitement. L'évolution du poids corporel entre le premier jour du traitement (J1) et le jour du sacrifice (J21) est jugé statistiquement très hautement significatives (P< 0,001) pour les trois lots.

Les variations des gains relatifs en poids corporel entre le début et la fin de l'expérimentation (Figure III.8) révèlent que la meilleure croissance est notée chez les individus témoins de l'ordre de (61,9 % ± 12,408). Suivis par celle enregistré chez les rattes traitées avec la

formulation en spores conditionnées (54,15 % ± 12,052). La croissance la plus faible est enregistrée chez les individus traités par les spores issues de culture (51,32 % ± 13,198). Cependant en comparaison avec le lot témoin, les variations de l'augmentation relative de poids corporel sont statistiquement non significatives ( $P > 0,05$ ). Ces résultats suggèrent que les rattes traitées avec les deux formulations de *Metarhizium acridum*, à raison de ( $6 \times 10^8$  spores /mL /250 g de PC par jr pendant 20 jours), ont préservé leurs poids et ont montré une croissance normale.



**Figure III.8 :** Variations de l'augmentation relative du poids corporel (%) chez les rats Wistar témoins et traitées avec *Metarhizium acridum*.

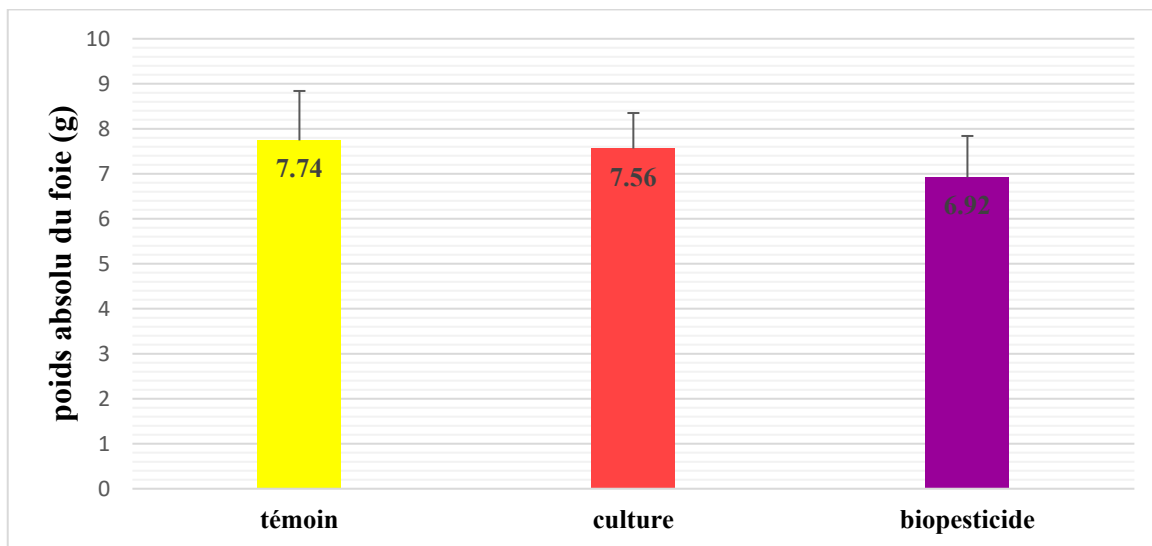
Non significatives (). Significatives (\*) : lorsque ( $P < 0,05$ ). Hautement significatives (\*\*) : lorsque ( $P < 0,01$ ). Très hautement significatives (\*\*\*) : lorsque ( $P < 0,001$ ).

### III.1.2.2 Effets des traitements sur le poids relatif des organes étudiés

Les résultats sur les variations des poids absolus et relatif des foie et reins, sont illustrés sur la (Figure III.9. Figure III.10, Figure III.11) Les détail avec les significations statistiques sont reportés sur les tableaux III.18, III.19, III.20, de l'annexe III.

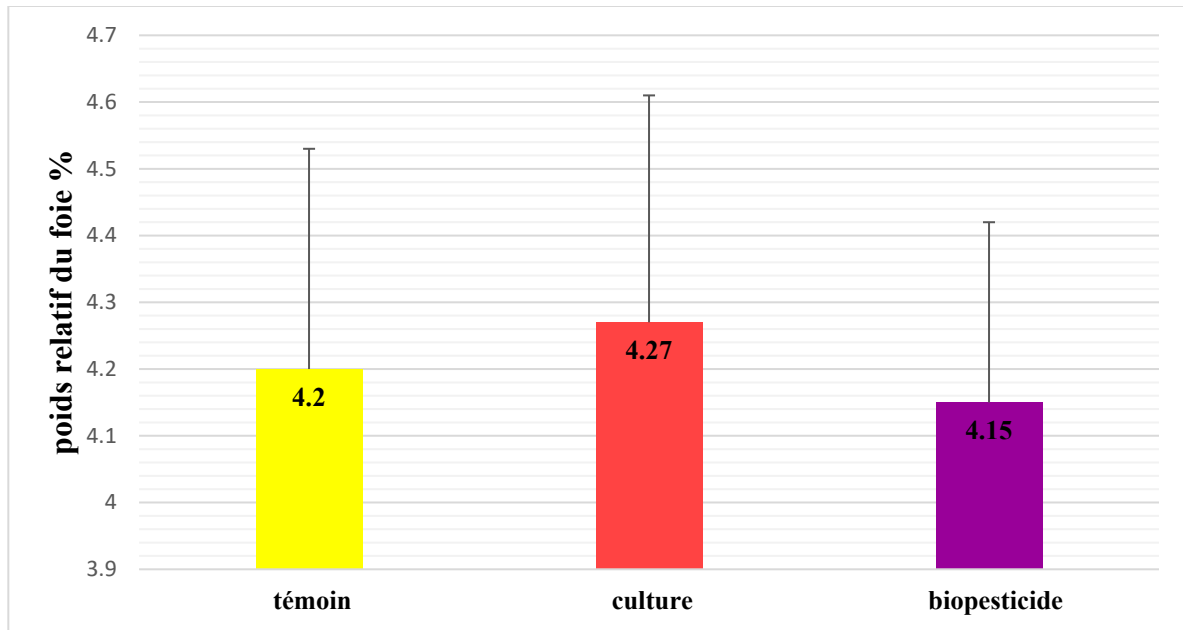
**III.1.2.2.1 Effets des traitements sur le poids relatif du foie**

Le poids relatifs moyen du foie des rattes traitées avec les spores de culture ( $4,273 \pm 0,347$ ) comparé avec celui des rattes témoins ( $4,206 \pm 0,338$ ) montre une très légère augmentation statiquement non significative ( $P = 0,767$ )  $> 0,05$ . Concernant le lot biopesticide ( $4,157 \pm 0,270$ ) montre une très légère diminution comparée au lot témoin avec ( $P = 0,803$ ). La différence en poids relatifs moyens de foie entre les deux lots traités est jugée non significative ( $P = 0,572$ ) (**FigureIII.10**). Cela indique que l'administration, pendant 20 jours, des formulations de traitement à bases des conidies germées et conditionnées de *M. anisopliae* n'a pas interagit avec le poids absolus et relatif du foie.



**Figure III.9 :** Variations du poids absolu moyens du foie chez les rattes Wistar témoins et traités avec *Metarhizium anisopliae*.

Non significatives (). Significatives (\*) : lorsque ( $P < 0,05$ ). Hautement significatives (\*\*) : lorsque ( $P < 0,01$ ). Très hautement significatives (\*\*\*) : lorsque ( $P < 0,001$ ).



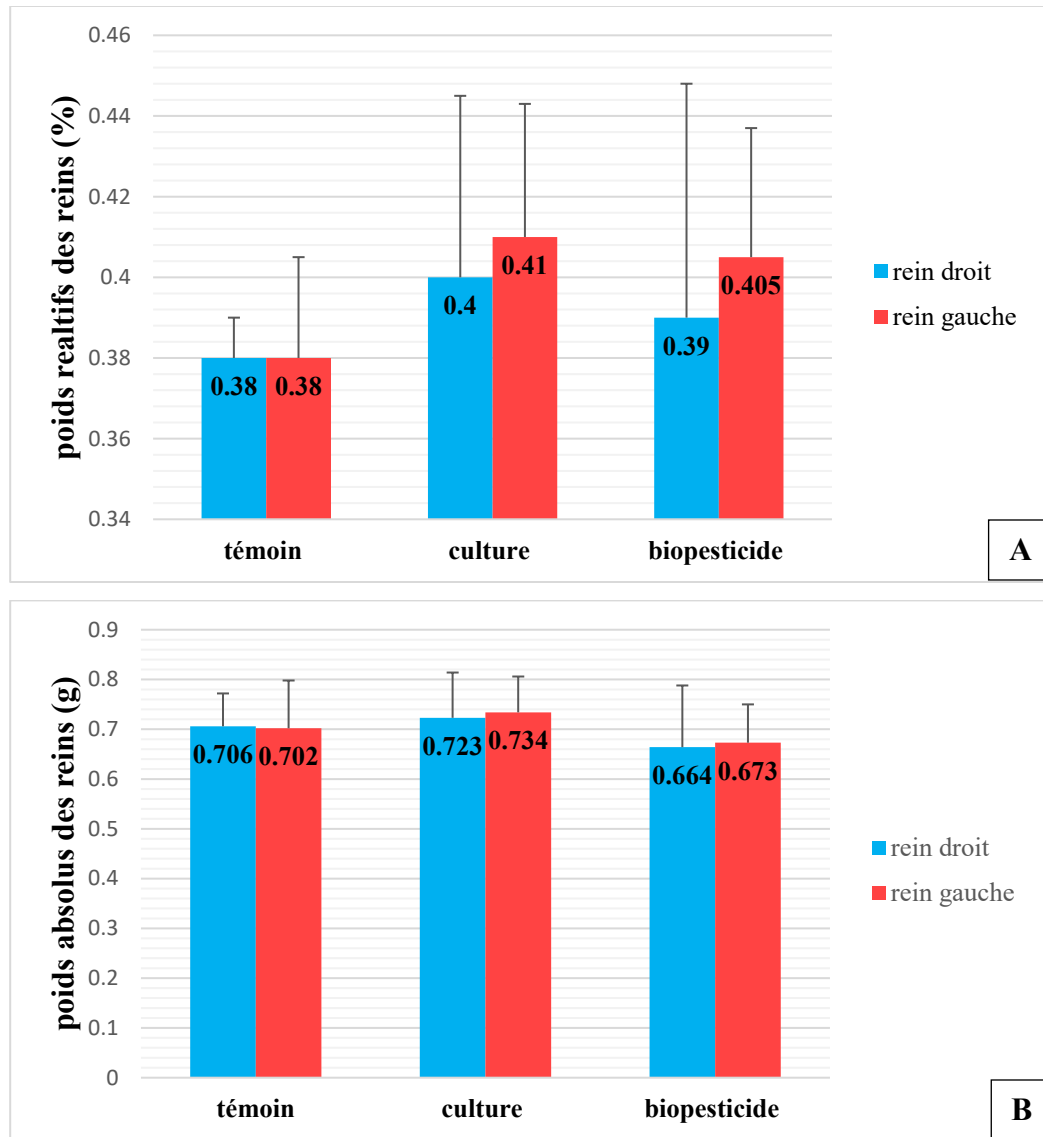
**Figure III.10 :** Variations du poids relatif du foie chez les rattes Wistar témoins et traités avec *Metarhizium anisopliae*.

Non significatives (). Significatives (\*) : lorsque ( $P < 0,05$ ). Hautement significatives (\*\*) : lorsque ( $P < 0,01$ ). Très hautement significatives (\*\*\*) : lorsque ( $P < 0,001$ ).

#### III.1.2.2.2 Effets des traitements sur le poids relatif des reins

Les calculs des poids relatifs des reins droits et gauches pour les individus du même lot montrent des variations individuelles chez tous les animaux expérimentés.

En comparaison avec les individus témoins, nos résultats révèlent une légère augmentation des poids relatifs moyens des reins droits et gauches des deux lots traités par *M. acridum* à raison de  $6 \times 10^8$  spores /mL /250g de poids corporel /jours pendant 20 jours. L'augmentation du poids relatif rénal la plus importante est notée chez les individus traitées avec les spores de culture. Cependant, les différences des moyennes en poids relatif rénal (droit et gauche) révèlent des différences statistiquement non significatives pour les trois lots ( $P > 0,05$ ) (Figure III.11 A et B).



**Figure III. 11 :** Variations du poids moyens des reins chez les rattes Wistar témoins et traités avec *Metarhizium anisopliae*. **A :** le poids absolu du rein. **B :** le poids relatif du rein.

Non significatives (). Significatives (\*) : lorsque ( $P < 0,05$ ). Hautement significatives (\*\*): lorsque ( $P < 0,01$ ). Très hautement significatives (\*\*\*) : lorsque ( $P < 0,001$ ).

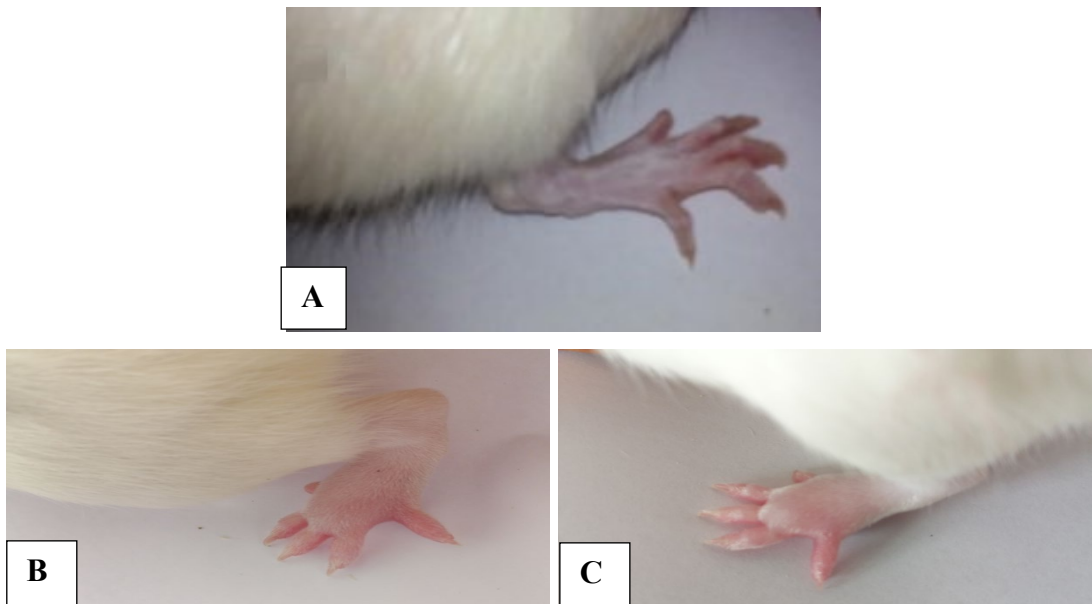
Les résultats illustrés ci-dessus suggèrent que les traitements par gavage pendant 20 jours avec les deux formulations en spores du champignon entomopathogène n'ont pas d'effet significatives sur les variations moyennes des poids absolus et relatifs des reins.



**III.1.3 Effet des traitements par injection**

Nous avons cherché l'importance de l'œdème inflammatoire, induit par les spores de culture et les spores de biopesticide de *Metarhizium acridum*, suite à une injection intradermique  $1.3 \times 10^6$  spores /mL sur la surface plantaire de la patte arrière gauche des rattes. Les individus témoins ont reçu le même volume (0.25uL) d'eau physiologique stérile.

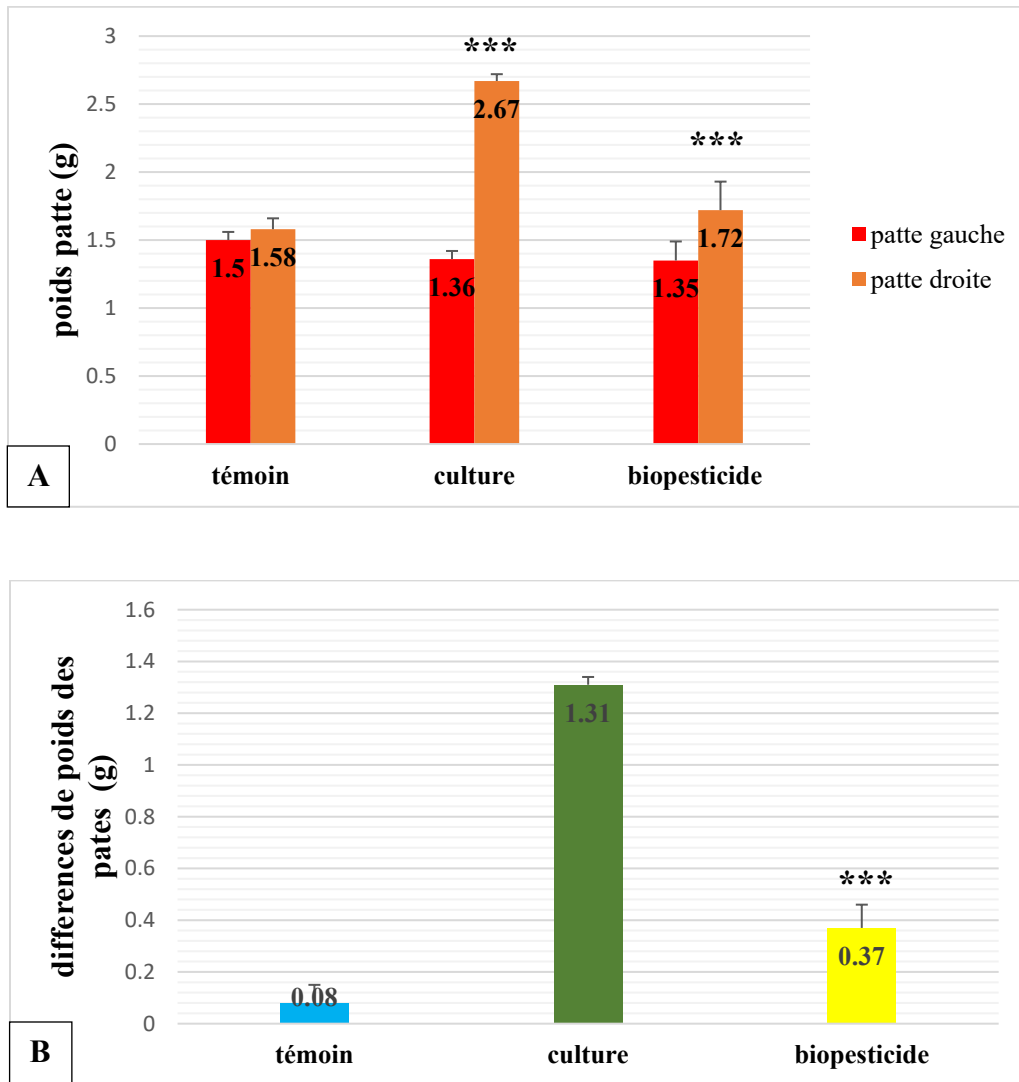
Quatre heures après l'application de ce test de toxicité aigüe, nous avons remarqué, chez les individus traités avec le champignon, que l'intensité de l'œdème inflammatoire est évidente par l'observation macroscopique des pattes. L'animal présente des difficultés de marche et ne peut pas déposer sa patte gauche enflammée sur le sol (**Figure III.12 -B, C**).



**Figure III.12 :** Aspect macroscopique des pattes gauches 4h après le traitement par injection de *Metarhizium acridum* ; (A) : Patte normale d'un rat témoin. (B) et (C) : Patte enflammée des rats traité avec les spores issues de leurs mises en culture.

Cependant l'aspect des deux pattes est le même chez les rattes témoins, traduit par la régression rapide de l'œdème induit au moment de l'injection ; L'eau physiologique n'a entraîné aucun signe inflammatoire (**Figure III.12–A**).

La différence en poids entre la patte droite et gauche pour chaque animal reflète l'intensité de l'activité inflammatoire. Les résultats sont rapportés sur la (Figure III.13 A et B) et dans les tableaux III.21, III.22, III.23.III.24 de l'annexe III.



**Figure III.13 :** Evaluation de l'activité inflammatoire de *Metarhizium acridum* : (A) : les variations de poids moyen des pattes gauches et droites ; (B) : la différence relative entre le poids des pattes.

Non significatives (). Significatives (\*) : lorsque ( $P < 0,05$ ). Hautement significatives (\*\*) : lorsque ( $P < 0,01$ ). Très hautement significatives (\*\*\*) : lorsque ( $P < 0,001$ ).

Nous avons comparé dans le même lot la différence moyenne en poids des pattes droites et gauches (**Figure III.13 -A**). Pour le lot témoin la différence en poids entre la patte gauche (1,585 g  $\pm$  0,08) injectée par l'eau physiologique stérile et la patte droite non traitée (1,504 g  $\pm$  0,06), est statistiquement non significative ( $P = 0,178$ )  $> \alpha$ .

Toutes les rattes du lot culture montre l'apparition d'œdème inflammatoire au niveau de la patte gauche (2,670 g  $\pm$  0,05) comparé avec la patte droite (1,36 g  $\pm$  0,06). La comparaison des moyennes est jugée statistiquement très hautement significatives ( $P = 4,29E-10$ ).

Par ailleurs, le lot traité avec la souche sa forme conditionnée montre une réaction inflammatoire traduite par l'apparition d'œdème et l'élévation du poids de la patte gauche. La comparaison des moyennes des pattes gauches (1,724 g  $\pm$  0,21) avec les pattes droites (1,352 g  $\pm$  0,14) est considérée comme une différence significative ( $P = 0,012$ ).

Pour faire ressortir l'influence des traitements par *Metarhizium acridum*, sur le poids de la patte gauche (traitée par injection) comparativement au poids de la patte droite (non traitée) nous avons fait appel à l'analyse de la variance à un critère de classification (**Figure III.13- B**).

L'analyse de variance à un facteur dévoile que la moyenne des différences en poids des pattes pour le lot culture (1,31 g  $\pm$  0,03) montre une augmentation du poids de la patte gauche Très hautement significatives ( $P = 5,25E-10$ ) comparé avec le lot témoin (0,081 g  $\pm$  0,07). De même nous avons noté une différence très hautement significative ( $P=0,0005$ ) pour le lot biopesticide (0,37 g  $\pm$  0,09) comparé avec le lot témoin.

Nous avons comparé l'importance de l'effet inflammatoire induit par injection à raison de la même concentration en spores pour les lots culture et biopesticides. Les différences de moyenne sont jugées statistiquement très hautement significatives ( $P = 2,76702E-08$ ).

Nous résultats sont en faveur d'un effet inflammatoire (œdème de la patte) plus important lorsque la formulation de traitement est à bases de spores fraîches (germées par mise en culture), comparé avec la formulation à base des spores prélevé directement de Novacrid®.

### III.1.4 Effet des traitements sur quelques paramètres sanguins

**III.1.4.1 Effet de *Metarhizium acridum* sur quelques paramètres hématologiques**

Les résultats des variations des paramètres de la formule de numération sanguine (FNS) chez les rats femelles témoins et traités avec le champignon sont illustrés sur le **tableau III.1 et la Figure III.14**. Les résultats sont détaillés avec leurs significations statistiques et rassemblés dans les tableaux III.26, III.25 de l'annexe III.

En comparaison avec le témoin, nous remarquons une augmentation significative ( $P = 0,0109$ ) en nombre de leucocytes chez les rattes provenant du lot culture. De même le lot biopesticide, une augmentation significative ( $P = 0,012$ ) en nombre de globules blancs est notée. La comparaison entre les moyennes des leucocytes des deux lots traités révèle une différence statistiquement non significative ( $P = 0,324$ ).

Concernant le nombre des globules rouges, et en comparaison avec les individus témoins, il semble que l'administration répétée de *M. acridum* a entraîné chez le lot culture une diminution jugée statistiquement comme non significatives ( $P = 0,0586$ ). Egalement le lot biopesticide enregistre une légère diminution considérée statistiquement comme non significatives ( $P = 0,2956$ ). La comparaison entre les deux lots traités illustre une différence non significatives ( $P = 0,443$ ).

Les traitements à raison de  $6 \times 10^8$  spores /mL /250g de poids corporel /jours pendant **20 jours**. On induit des régressions en taux d'hématocrite et en concentration d'hémoglobine. Ces régressions sont considérées non significatives pour le lot biopesticide ( $P > 0,05$ ) et significative pour le lot culture ( $P < 0,05$ ).

En comparaison avec le témoin, le taux de plaquettes montre une faible augmentation non significative chez les rattes traitées avec Novacrid® ( $P = 0,8848$ ). Et nous avons noté une régression significative en nombre de thrombocytes ( $P = 0,0326$ ) chez les individus traités avec la formulation à base des spores de culture.

Les comparaisons des moyennes entre les deux lots traités à raison de la même concentration en spores dévoilent des différences jugées statistiquement comme non

significatives pour le nombre de plaquettes ( $P = 0,392$ ). Des différences non significatives pour le taux de l'hématocrite ( $P = 0,4849$ ). Et pour la concentration de l'hémoglobine ( $P = 0,4905$ )

**Tableau III.1 :** Effet de *Metarhizium anisopliae* sur quelques paramètres hématologiques.

<i>Paramètres hématologiques</i>	<i>Témoin</i>	<i>Culture</i>	<i>Biopesticide</i>
Globules Blancs $10^3/\text{ul}$	8,1 $\pm$ 0,74	10, 733 $\pm$ 3,32 (*)	9,8 $\pm$ 0,45(*)
Globules rouges $10^6/\text{ul}$	7,102 $\pm$ 0,41	5,68 $\pm$ 1,32	6,51 $\pm$ 1,06
Plaquettes $10^3/\text{ul}$	704,4 $\pm$ 127,41	490,66 $\pm$ 34,23 (*)	734,66 $\pm$ 439,754
Hématocrite %	42,46 $\pm$ 0,610	33,8 $\pm$ 8,118 (*)	38,63 $\pm$ 7,261
Hémoglobine g/dl	14,34 $\pm$ 0,531	11,6 $\pm$ 2,193 (*)	12,866 $\pm$ 1,887

- Valeurs en moyennes  $\pm$  écart type.

Non significatives () \Significatives (\*): lorsque ( $P < 0,05$ ) \. Hautement significatives (\*\*): lorsque ( $P < 0,01$ ). Très hautement significatives (\*\*\*) : lorsque ( $P < 0,001$ ).

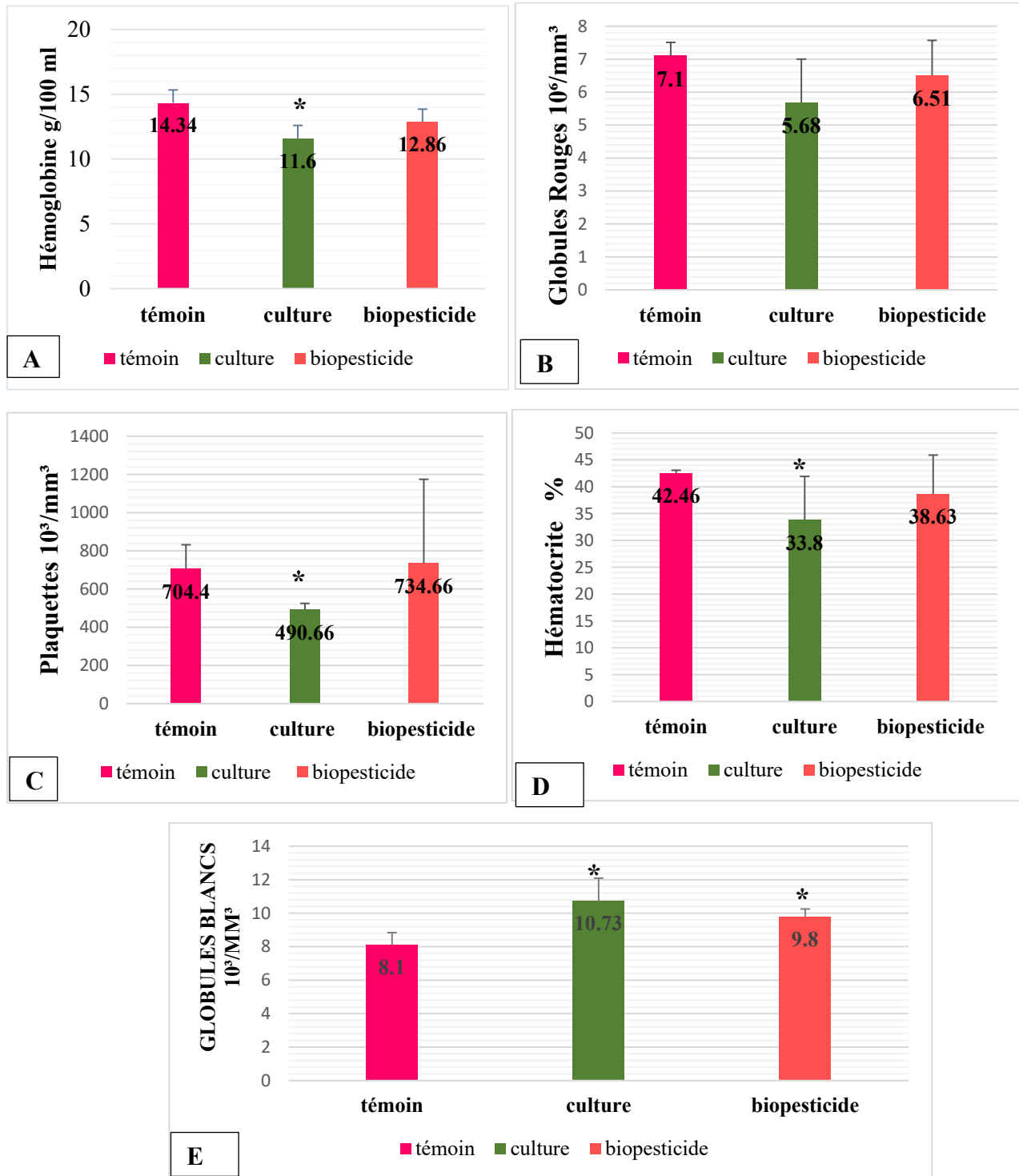


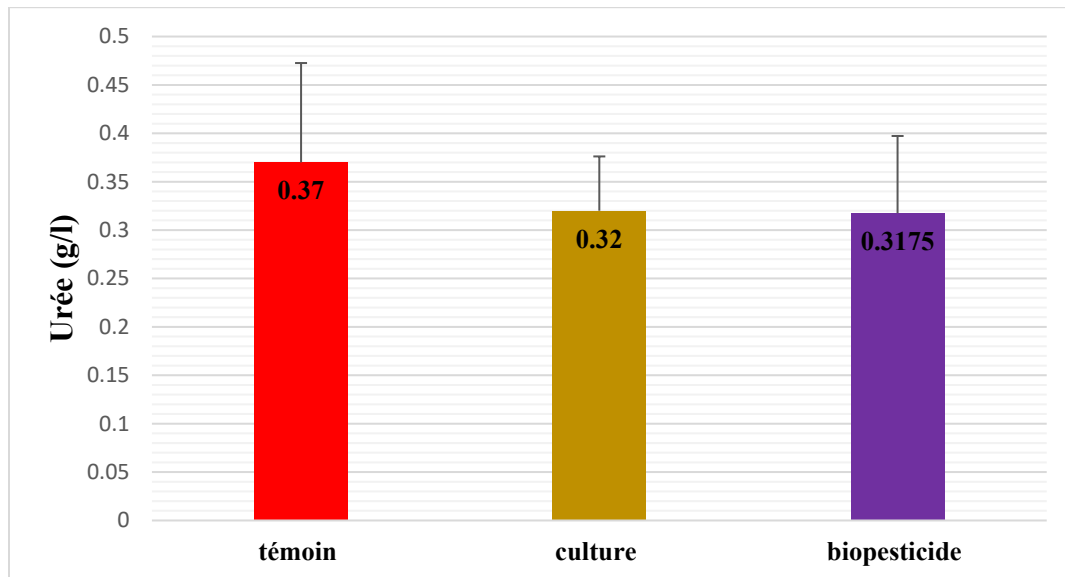
Figure III.14: Effets du *Metarhizium anisopliae* sur les paramètres hématologiques :(A) Hb ; (B) GR ; (C) PLQ ; (D) Ht ;(E) GB chez les rats Wistar.

Non significatives ( ) \Significatives (\*): lorsque ( $P < 0,05$ ) \. Hautement significatives (\*\*): lorsque ( $P < 0,01$ ). Très hautement significatives (\*\*\*) : lorsque ( $P < 0,001$ ).

**III.1.4.2 Effet de *Metarhizium acridum* sur quelques paramètres biochimiques****III.1.4.2.1 Effet de *Metarhizium acridum* sur des paramètres rénaux chez les rats Wistar**

Les résultats des variations, l'urémie et de la créatinine chez les rats femelles traitées au *M. acridum* et témoins sont illustrées sur les figures III.15 et III.16 et leur signification statistique sont rassemblés sur les tableaux III.27, III.29 et III.30 de l'annexe III.

- **L'urée plasmatique**



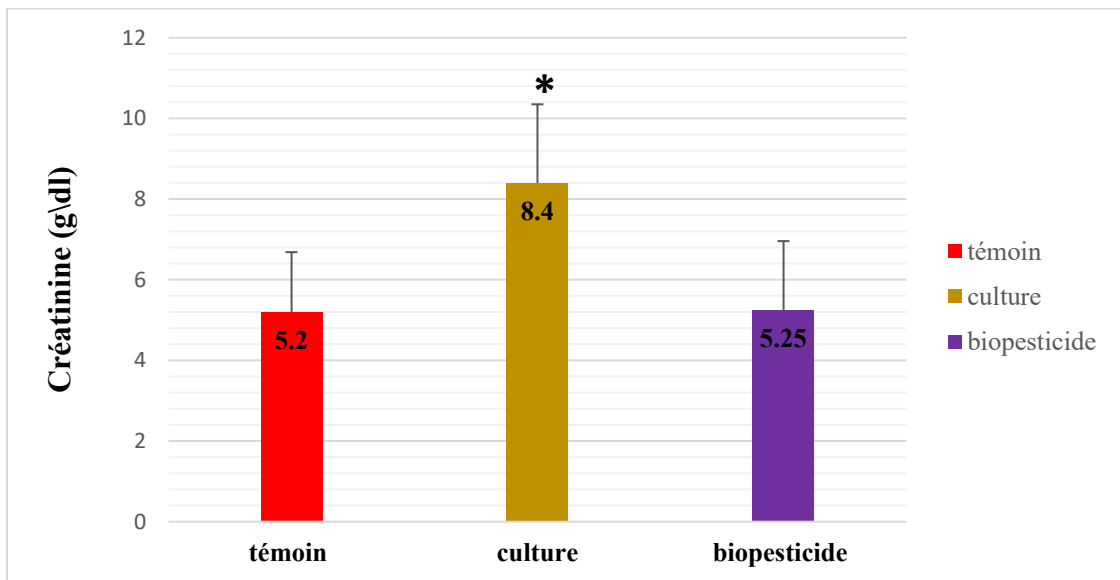
**Figure III.15 :** Variations des taux moyens de l'urémie chez les rats Wistar témoins et traités avec les formulations germinative et conditionnée de *Metarhizium acridum*

Non significatives ( ) \ Significatives (\*): lorsque ( $P < 0,05$ ) \. Hautement significatives (\*\*): lorsque ( $P < 0,01$ ). Très hautement significatives (\*\*\*) : lorsque ( $P < 0,001$ ).

La comparaison avec la valeur moyenne de l'urée plasmatique du lot témoins ( $0,37 \pm 0,10$ ), montre une faible diminution de l'urémie chez les rats des deux lots traités avec les formulations germinative ( $0,32 \pm 0,05$ ) et conditionnée ( $0,31 \pm 0,07$ ), du champignon. Cette régression est considérée comme non significative ( $P > 0,05$ ) par rapport au lot témoin.

- **La créatinine plasmatique**

Selon les résultats obtenus par comparaison avec le lots témoin ( $5,2 \pm 1,48$ ) avec le lot la souche mis en culture ( $8,4 \pm 1,94$ ) une augmentation considérée comme significatives ( $P = 0,019$ ). Contrairement au lot traité avec la forme conditionnée de la souche fongique ( $5,25 \pm 1,70$ ) une très légère augmentation considérée comme non significatives ( $P = 0,963$ ). La comparaison entre les deux lots traités illustre une différence significatives ( $P = 0,0387$ ).



**Figure III.16 :** Variations des taux moyens de la créatinine chez les rats Wistar témoins et traitées avec les formulations germinative et conditionnée de *Metarhizium acridum*

Non significatives ( ) \Significatives (\*): lorsque ( $P < 0,05$ ) \. Hautement significatives (\*\*): lorsque ( $P < 0,01$ ). Très hautement significatives (\*\*\*) : lorsque ( $P < 0,001$ ).

Ces résultats suggèrent que la fonction rénale est bien conservée chez les rattes Wistar traitées avec du *Metarhizium anisopliae* avec ses deux formes de formulations sporales à raison de  $6 \times 10^8$  spores /mL /250g de poids corporel /jours pendant 20 jours.



**III.1.4.2.2 Effet de *Metarhizium acridum* sur des paramètres hépatiques chez les rats**

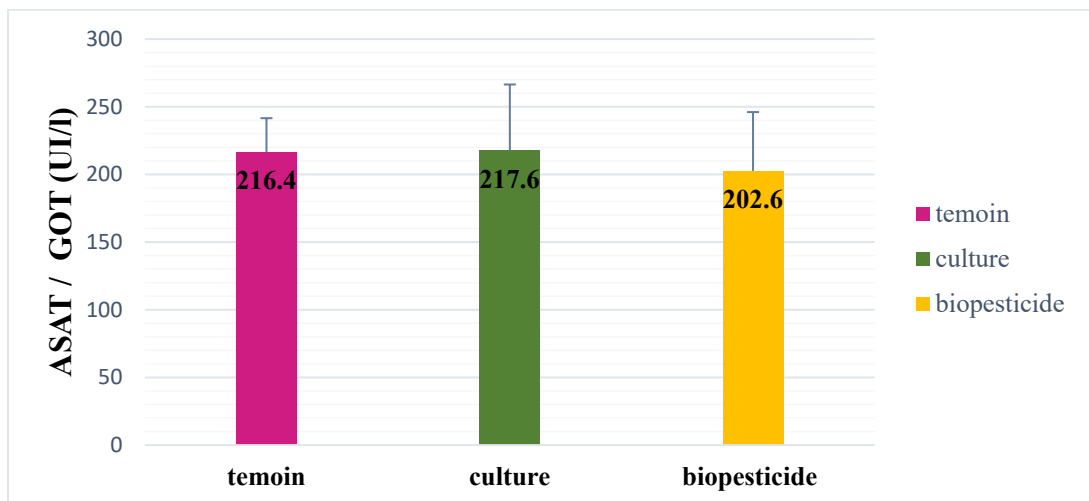
Les résultats des variations des taux plasmatiques des transaminases et de la phosphatase alcaline chez les rats femelles témoins et traitées au *M. acridum* sont illustrées sur les figures III.17, III.18, III.19. Le détail des résultats avec leurs significations statistiques sont rassemblés sur les tableaux III.28, III.29, III.30 de l'annexe III.

- **Les transaminases plasmatiques**

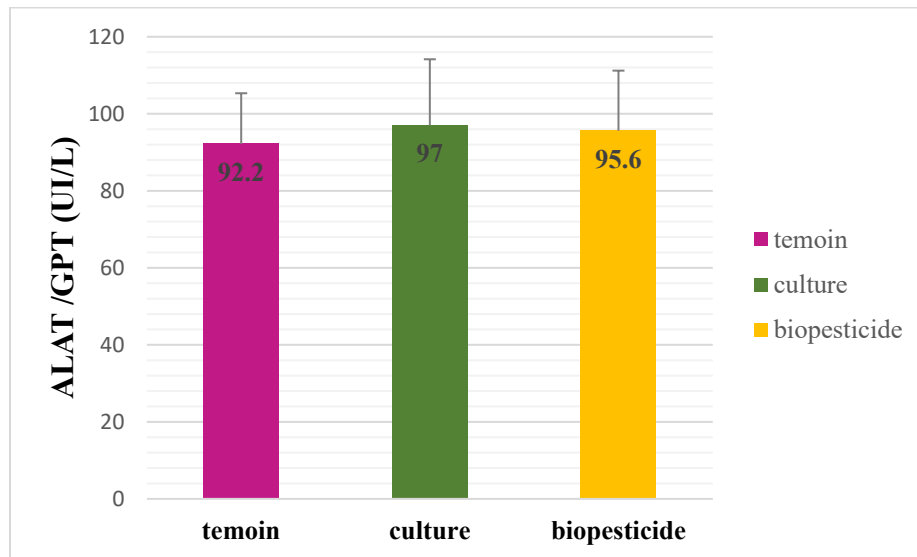
Par comparaison avec la valeur plasmatique moyenne de l'Aspartate Amino Transférase enregistrée chez les individus témoins ( $216,4 \pm 25,19$ ). Les taux plasmatiques révèlent une faible augmentation non considérable pour le lot culture ( $217,6 \pm 48,87$ ) considéré comme non significative ( $P = 0,962$ ).

Par rapport au lot traité avec la souche fongique sous sa forme conditionnée on remarque une légère diminution ( $202,6 \pm 43,49$ ) considérée comme non significatives ( $P = 0,556$ ).

Les variations moyennes des taux plasmatiques des transaminases de type Alanine amino transférase révèlent de faibles augmentations chez les individus traités avec les spores conditionnées ( $95,6 \pm 15,61$ ) et chez les individus traités avec les spores de culture ( $97 \pm 17,16$ ). Les différences sont jugées non significatives par rapport au témoin ( $92,2 \pm 13,14$ ) ( $P > 0,05$ ).



**Figure III.17 :** Variations des taux moyens de l'Aspartate aminotransférase chez les rats Wistar témoins et traitées avec les formulations germinative et conditionnée de *Metarhizium acridum*.

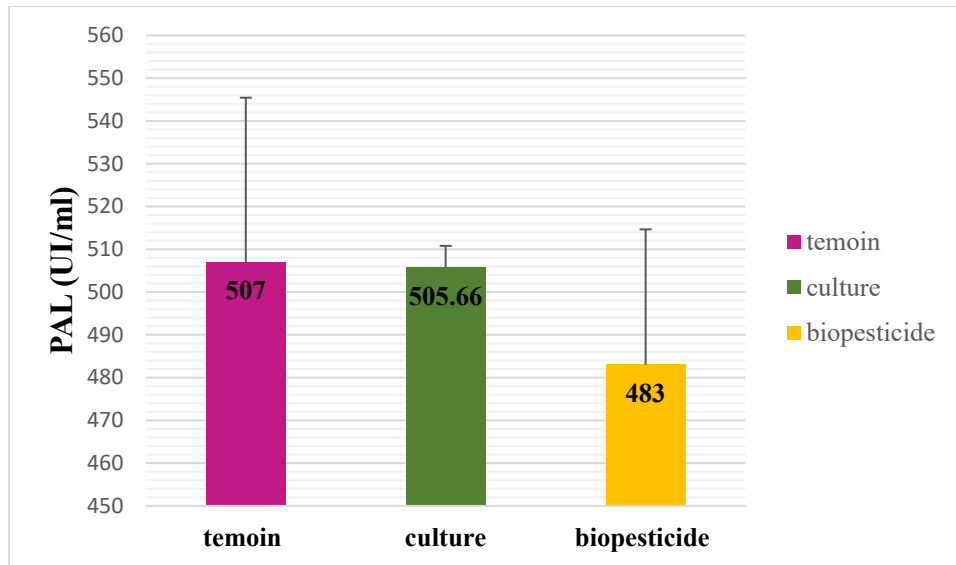


**Figure III.18 :** Variations des taux moyens de l'Alanine-Amino-Transférase chez les rats Wistar témoins et traités avec les formulations germinative et conditionnée de *Metarhizium acridum*.

Non significatives ( ) \Significatives (\*): lorsque ( $P < 0,05$ ) \. Hautement significatives (\*\*): lorsque ( $P < 0,01$ ). Très hautement significatives (\*\*\*) : lorsque ( $P < 0,001$ ).

- **La phosphatase alcaline plasmatique**

Les variations du taux enzymatique de ce paramètre hépatique sont jugées non significatives par rapport au témoin ( $507 \pm 38,43$ ) pour les deux lots traités avec le *Metarhizium anisopliae* à savoir le lot culture ( $505,66 \pm 5,131$ ) et le lot biopesticide ( $483 \pm 31,65$ ) avec  $P > 0.05$ .



**Figure III.19 :** Variations des taux moyens de la phosphatase alcaline chez les rats Wistar témoins et traités avec les formulations germinative et conditionnée de *Metarhizium acridum*.

Non significatives ( ) \Significatives (\*): lorsque ( $P < 0,05$ ) \. Hautement significatives (\*\*): lorsque ( $P < 0,01$ ). Très hautement significatives (\*\*\*) : lorsque ( $P < 0,001$ ).

Ces résultats suggèrent que la fonction hépatique des rats Wistar femelles n'est pas altérée suite aux traitements avec du *Metarhizium anisopliae* avec ses deux formes de formulations sporales à raison de  $6 \times 10^8$  spores /mL /250g de poids corporel /jours pendant 20 jours.

**III.1.5 Etude histo-pathologique du parenchyme rénal****➤ Chez les rats témoins**

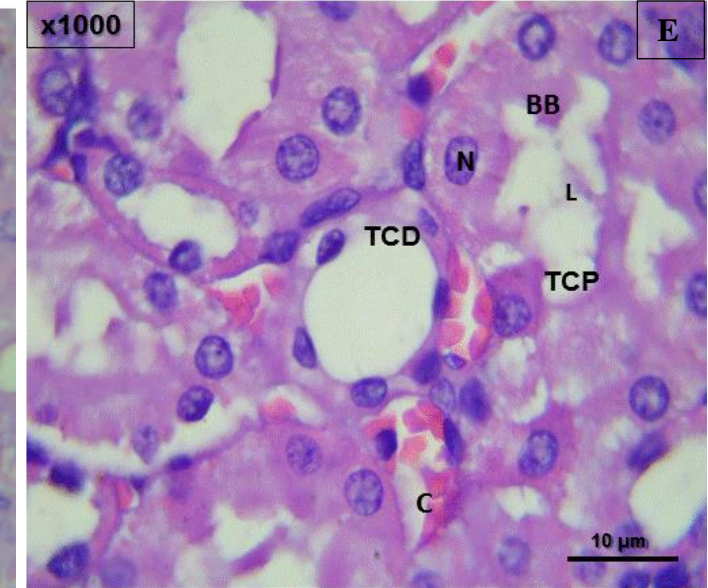
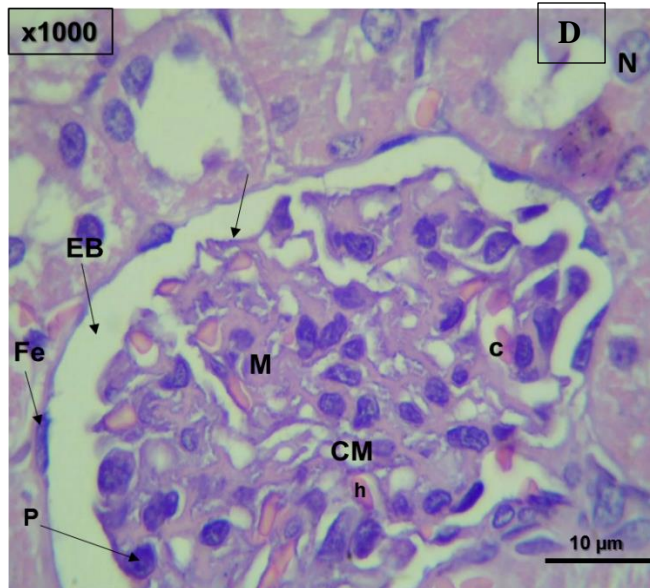
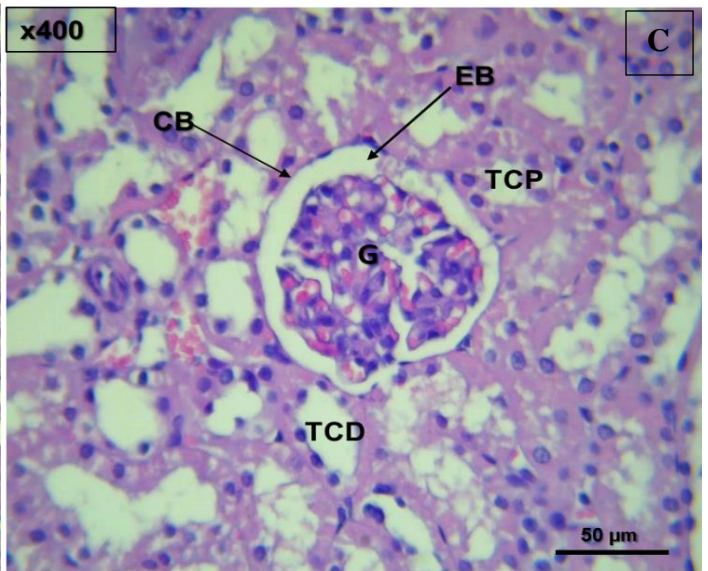
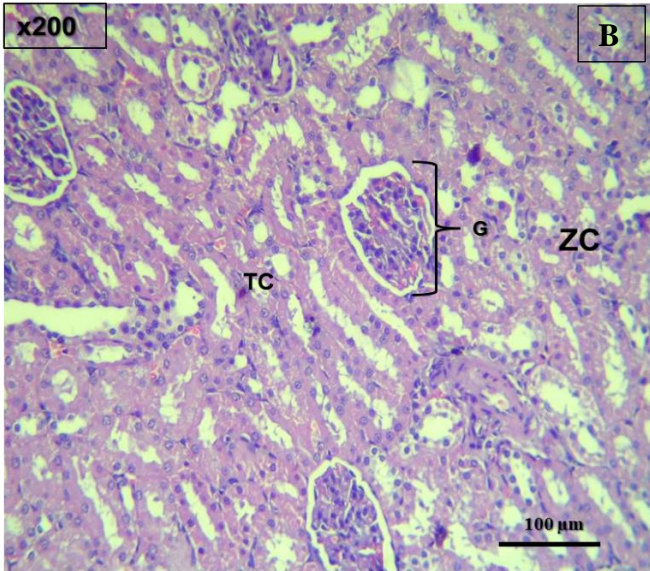
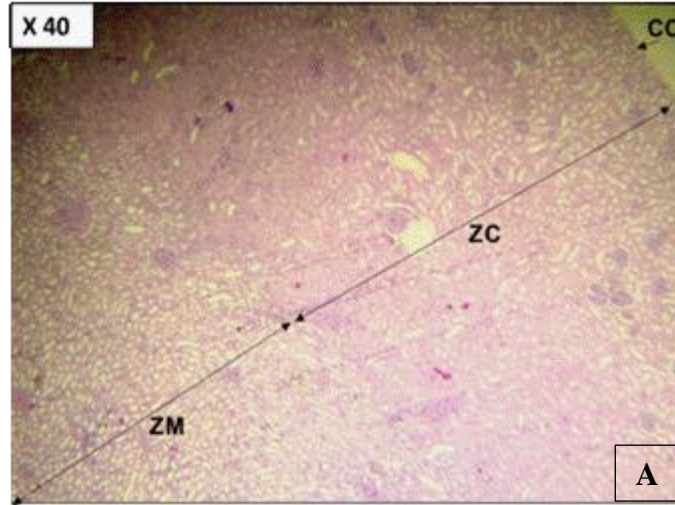
La microscopie optique du parenchyme rénal des rats témoins révèle une architecture normale, Le rein est enveloppé d'une fine capsule conjonctive externe au-dessus d'un cortex dense et une médullaire centrale plus claire (**Figure III.20 -A**).

Le cortex rénal est composé de plusieurs formes glomérulaires et tubulaires. Les glomérules sont entourés par des coupes transversales de tubes contournés proximaux et de tubes contournés distaux (**Figure III.20 -B, C, D et E**).

- Les glomérules rénaux sont denses et arrondis. Ils sont entourés par la capsule de Bowman, formé de deux feuillets, le feuillet interne ou viscérale et feuillet externe ou pariétale. Le pelotonne est inclus dans une chambre glomérulaire ou espace de Bowman, il est formé de tissus conjonctif, le mésangium et de podocyte, de cellule mésangiale, de fin sinusoides (**Figure III.20 - C et D**).
- Les tubes contournés proximaux sont plus denses, plus haut et plus nombreux que les distaux  
Les proximaux présente un épithélium haut à bordure en brosse, les distaux montrent un épithélium cubique avec une lumière régulière (**Figure III.20- D et E**).

La médulla présente une structure tubulaire nette. Les principaux tubules observés sont les tubes collecteurs et l'anse de Henlé disposés d'une manière radiaire (**Figure III.20- F, G**).

- Les tubes collecteurs sont reconnaissables par leurs cellules cubiques et leur diamètre important avec un cytoplasme moins dense. Les tubes de l'anse de Henlé ont un diamètre réduit et possèdent un épithélium pavimenteux (**Figure III.20 - G**).
- Les vaisseaux droits se trouvent entre les différentes structures tubulaires et sont identifiables grâce à la présence du sang dans leur lumière (**Figure III.20 - G**).



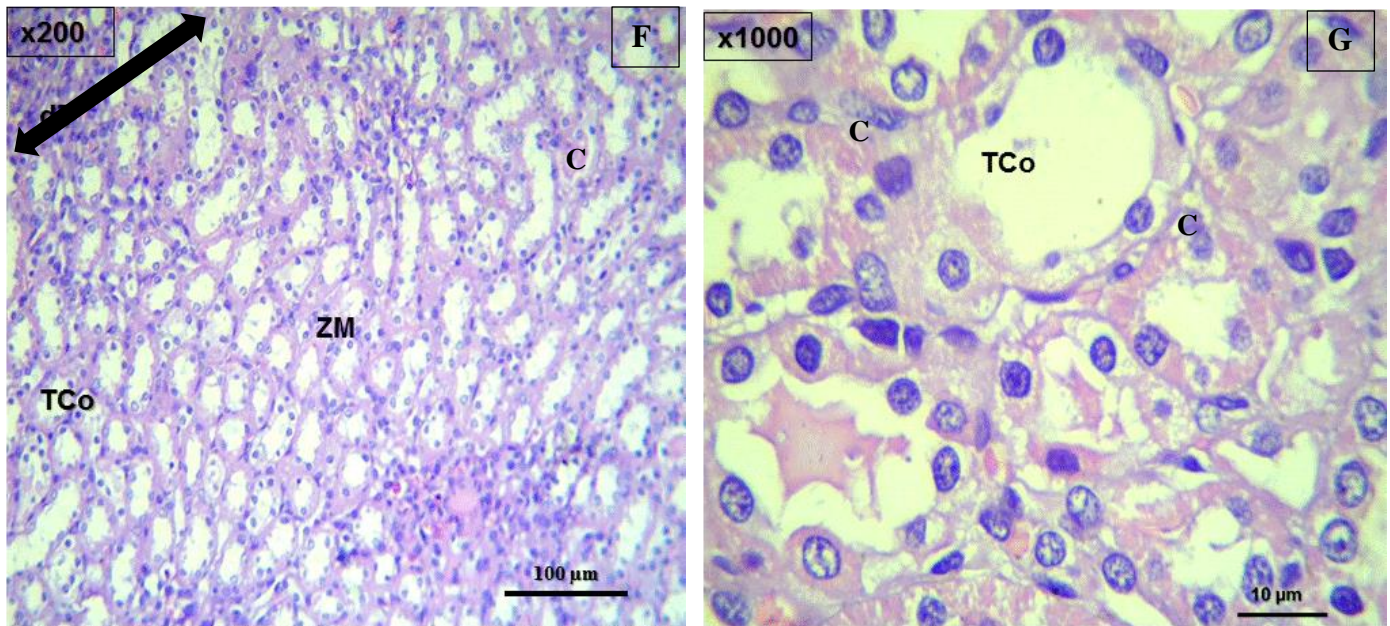


Figure III.20: Photomicrographie du parenchyme rénal chez les rats Wistar témoins.

**G**: glomérule ; **TCD** : tube contourné distal ; **TCP** : tube contourné proximal ; **ZM**: Zone medulaire ; **EB** : espace de Bowman ; **TCo** : tube collecteur ; **ZC** : zone corticale ; **CC** : Capsule conjonctive; **CB**: corpuscule glomérulaire (Bowman) ; **P** : podocyte ; **M** : mésangium ; **CM** : cellule mésangiale ; **h** : hématie ; **Fe** : feuillet externe ; **L** : Lumière ; **BB** : Bordure en brosse ; **N** : Noyaux ; **C** : capillaires.

➤ **Chez les rattes traitées par les spores conditionnées de *M. anisopliae***

Nous avons étudié la structure du parenchyme rénale chez les individus traités par les spores de *M. anisopliae* var. acridum, prélevées directement à partir de Novacrid®, à raison de  $6 \times 10^6$  spores /mL /250 g de poids corporel pendant 20 jours.

En comparaison avec les coupes histologiques provenant des rats témoins, l'observation au microscope photonique du tissu rénal des rattes traitées avec le biopesticide montre une structure conservée en générale (**Figure III.21- A à G**).

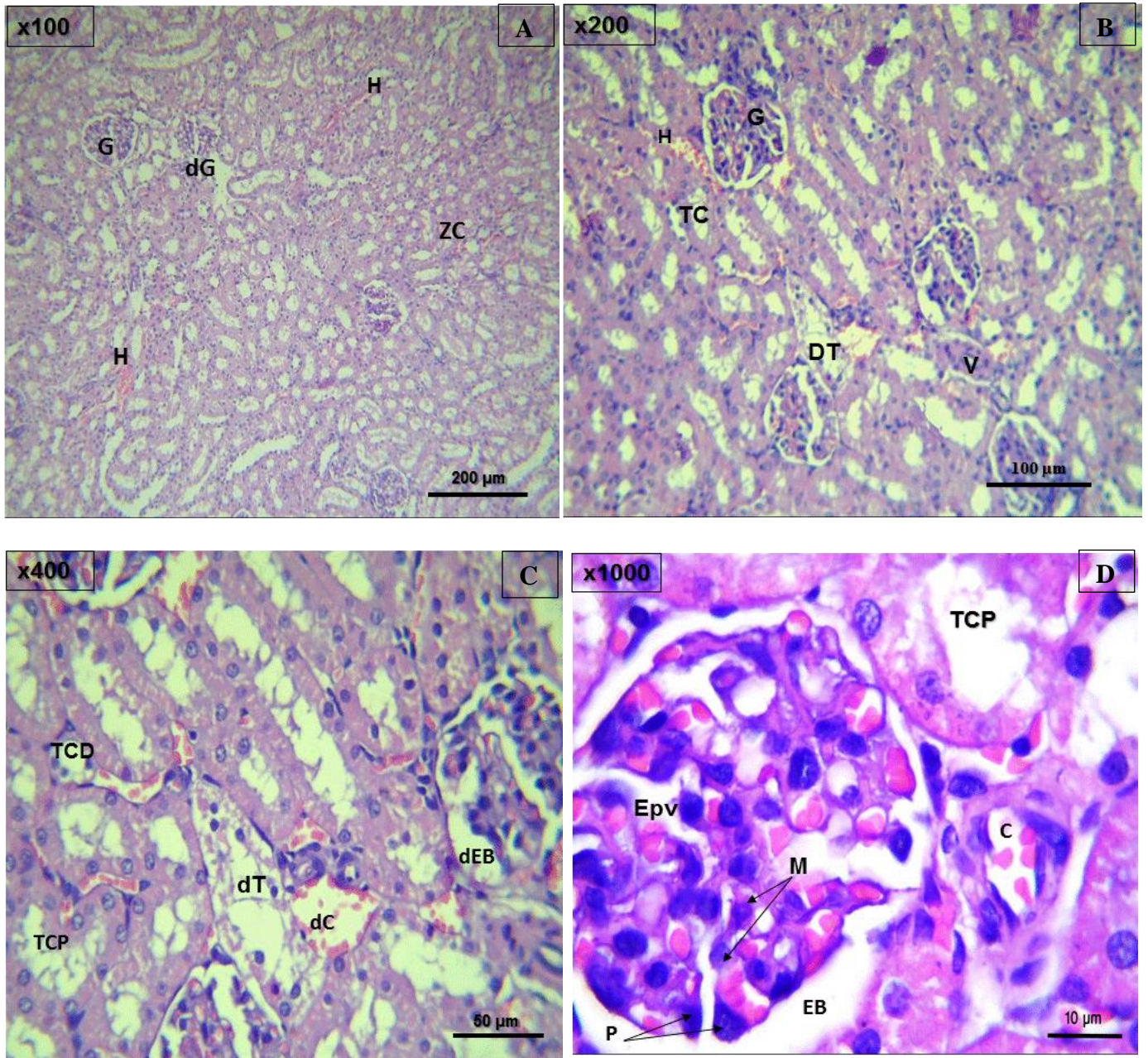
Les principales lésions tissulaires, observées par endroits, sont illustrées comme suit :

**✚ Au niveau de la zone corticale**

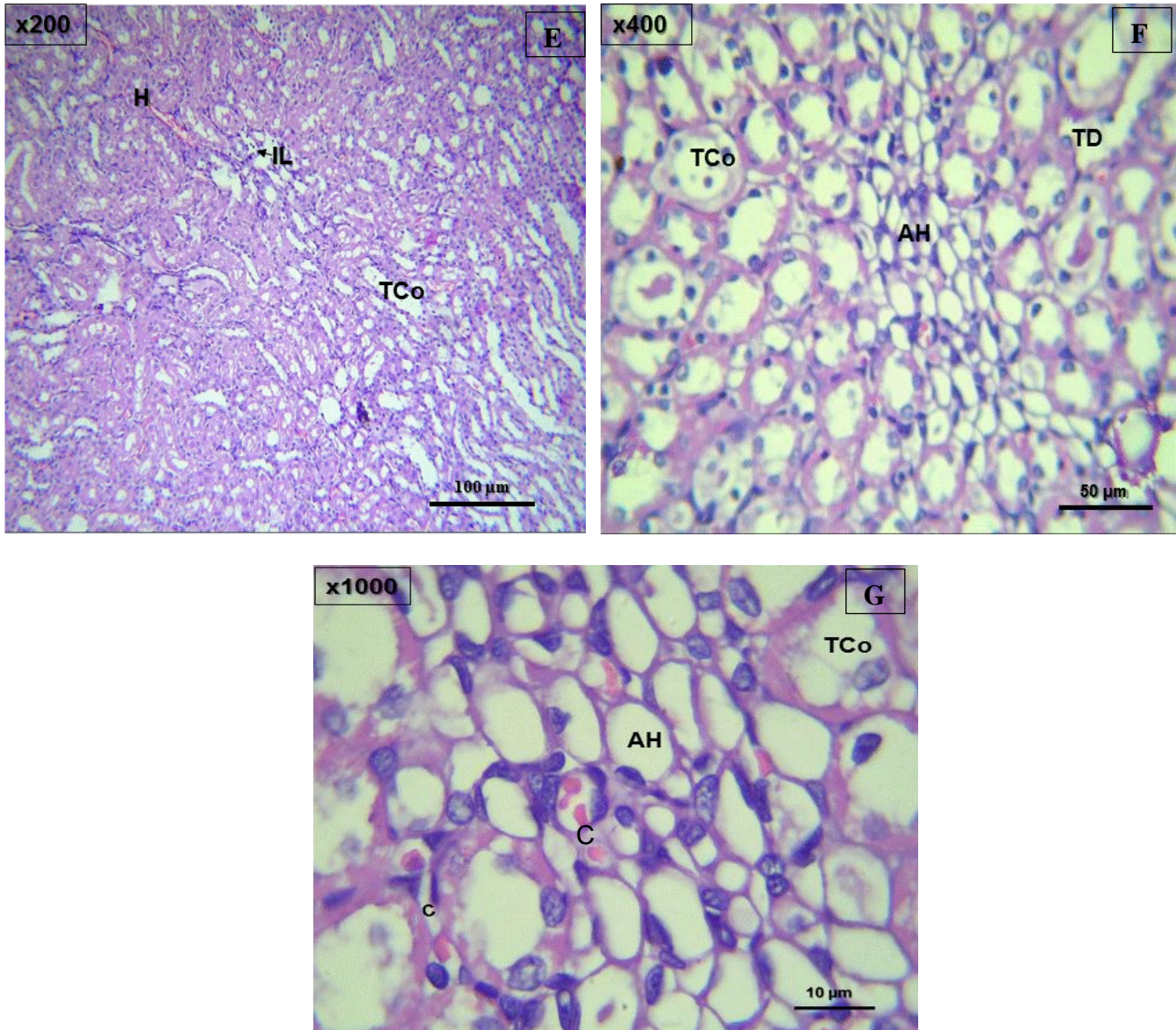
- Altération de l'assise épithéliale de quelques tubes contournés proximaux et des tubes contournés distales (**Figure III.21 – A, B et C**).
- La dégénérescence et l'atrophie et de quelques glomérules qui montrent une chambre glomérulaire plus large (**Figure III.21 – A, B, C et D**).
- Congestions sanguines modérées à proximité des tubules endommagés (**Figure III.21–B, C et D**).
- Dilatation des capillaires glomérulaires et inter-tubulaires avec infiltration cellulaire (**Figure III.21–C et D**).

**✚ Au niveau de la zone médullaire :**

- Nous notons l'altération de l'épithélium de quelques tubules médullaires droits et hémorragie modérée avec infiltration leucocytaire locale (**Figure III.21 E**).
- Les tubes collecteurs et l'anse de Henlé montrent une architecture plus au moins conservée (**Figure III.21 F et G**).







**Figure III.21 :** Photomicrographie du parenchyme rénal chez les rats traités avec les spores du biopesticide à raison de  $6 \times 10^8$  spores /ml /250g de poids corporel

**G:** glomérule ; **TCD:** tube contourné distal ; **TCP:** tube contourné proximal ; **ZM:** Zone medulaire ; **EB :** espace de Bowman ; **TCo :** tube collecteur ; **ZC:** zone cortical ; **TD:** Tube médullaire droit **CB:** corpuscule glomérulaire ; **P:** podocyte ; **IF :** Infiltration leucocytaire ; **dC:** dilatation des capillaires ; **V :** vacuolisation cellulaire ; **M :** mésangium ; **CM :** cellule mésangiale ; **H :** hématie ; **H :** hémorragie. **FI :** feuillet interne ; **Fe :** feuillet externe ; **L :** Lumière ; **BB :** Bordure en brosse ; **EPV :** espaces périvasculaire ; **N :** Noyaux ; **Deb :** dilatation de l'espace de bowman ; **dG:** dégénéresance glomérulaire ; **Deb :** Dilatation de l'espace de bowman ; **(dT,DT):**dilatation tubulaire ; **dc :** dilatation des capillaire ; **TC :** tube contourné ; **AH :** Anse de Henlé .

➤ **Chez les rats traités par les spores germées de *M. anisopliae***

Le parenchyme rénal chez les rattes traitées avec des spores germées, à raison de  $6 \times 10^8$  spores /ml /250 g de poids corporel pendant 20 jours, présente une structure générale plus au moins conservée. Cependant, nous notons quelques désorganisations de l'architecture tissulaire au niveau cortical et médullaire, dont le degré varie d'un animal à l'autre.

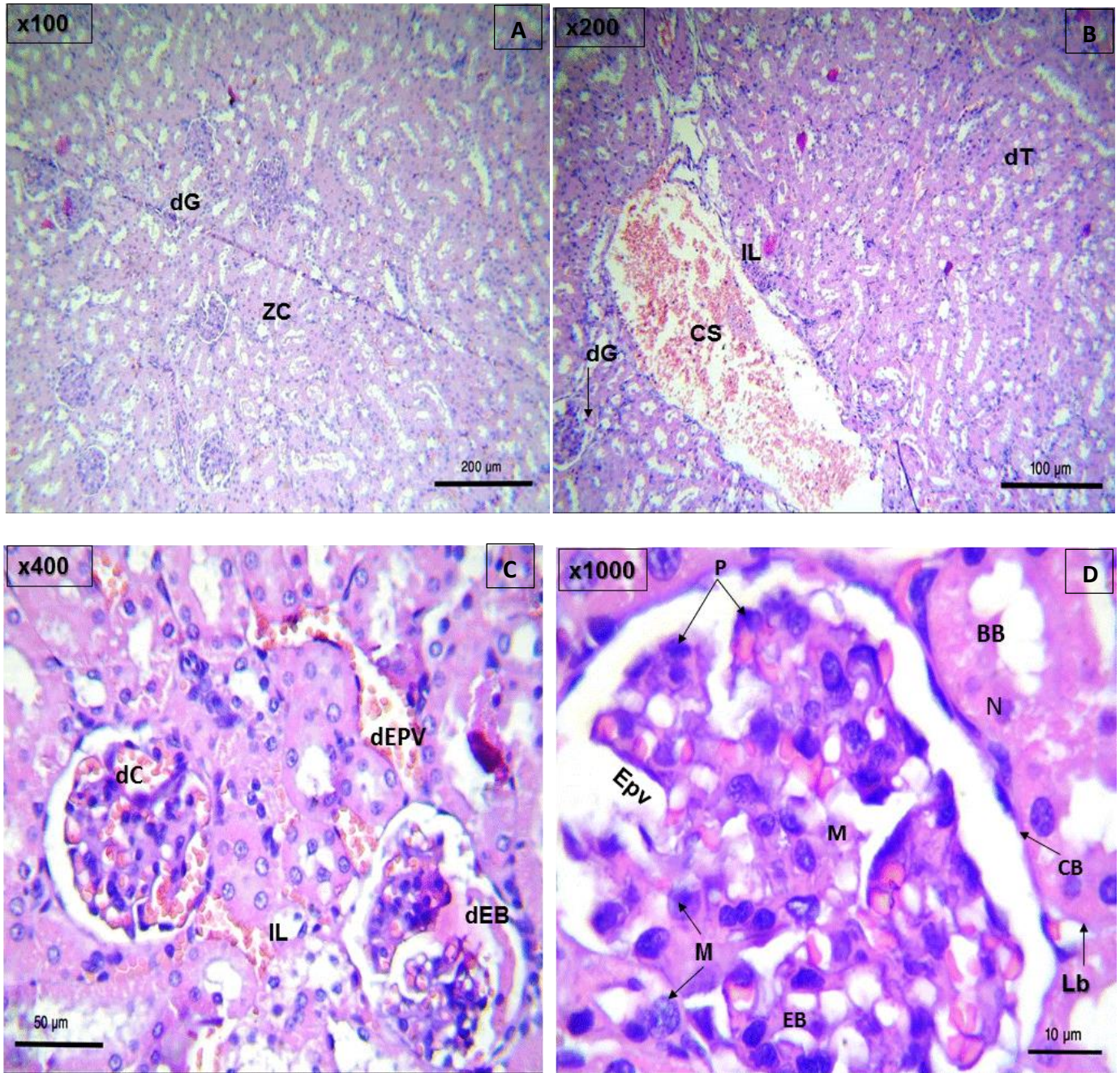
En général, l'aspect cyto-architectural du tissu rénal est plus altéré par rapport à celui observé sur les coupes rénales provenant des rats traités avec la formulation de spores conditionnées.

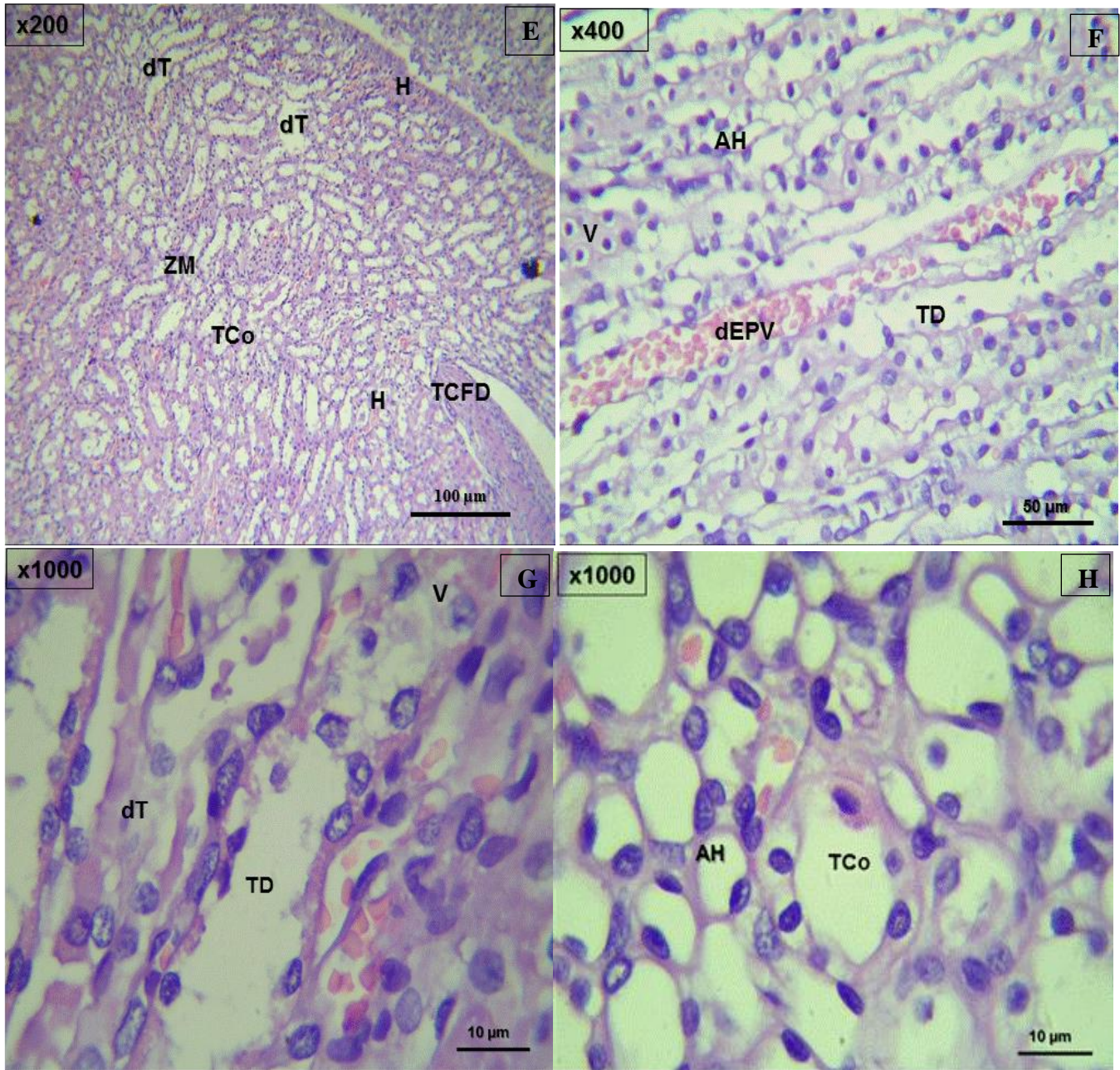
✚ **Les altérations corticales sont illustrées comme suit :**

- Dégénérescence de l'épithélium tubulaire et glomérulaire, signes des débuts de nécrose (**Figure III.22-B, C**).
- Dilatation de la chambre glomérulaire et des espaces périvasculaires (**Figure III.22-B, C et D**).
- Des congestions sanguines par endroits accompagnées d'infiltrats inflammatoires (**Figure III.22 -B et C**).
- Dilatation des capillaires inter-tubulaires et intra glomérulaire et hémorragies modérées (**Figure III.22-B, C et D**).

✚ **Au niveau de la médulla, nous notons :**

- La formation de tissus conjonctif fibreux, signe de régénération cellulaire (**Figure III.22-E**).
- La dilatation des capillaires inter-tubulaires et des espaces périvasculaires (**Figure III.22-F et G**).
- Lésions de l'épithélium tubulaire, quelques cellules montrent un aspect vacuolisé à noyaux pycnotiques, signe de nécrose (**Figure III.22-G et H**).





**Figure III.22:** Photomicrographie du parenchyme rénal chez les rats traités avec les spores de culture à raison de  $6 \times 10^8$  spores /mL /250g de poids corporel

**G**: glomérule ; **TCD**: tube contourné distal ; **TCP** : tube contourné proximal ; **ZM**: Zone médullaire ; **EB** : espace de Bowman **TCo** : tube collecteur ; **ZC**: zone cortical ; **TD**: Tube médullaire droit ; **CB**: corpuscule glomérulaire ; **P**: podocyte ; **IF** : Infiltration leucocytaire ; **Dc** : dilatation des capillaires CS : congestion sanguine ; **V** : vacuolisation cellulaire ; **M** : mésangium ; **CM** : cellule mésangiale ; **TCFD** : Tissus conjonctif fibreux diffus ; **h** : hématie ; **H** : hémorragie. **FI** : feuillet interne ; **Fe** : feuillet externe ; **L** : Lumière ; **BB** : Bordure en brosse ; **dEPV** : dilatation des espaces périvasculaire ; **N** : Noyaux.

### **III.1.6 Etude histo-pathologique du parenchyme hépatique**

#### **➤ Chez les rats témoins**

Les observations microscopiques des coupes histologiques du parenchyme hépatique des rats témoins présentent une organisation structurale normale (**Figure III.23-A, B, C et D**).

Sur le plan structurel, le parenchyme hépatique est constitué de lobules, ces derniers sont centrés par une veine centrolobulaire (**Figure III.23-A, B, C et D**).

- Les lobules contiennent des travées d'hépatocytes bien agencées autour de la veine centrolobulaire. Nous observons des artères et des canal biliaire (**Figure III.23 A**).

- Les travées sont séparées par des sinusoides bordés par des cellules endothéliales et les cellules de kupffer (**Figure III.23 B, C et D**).

- Les hépatocytes sont des cellules volumineuses granulaires, avec un noyau rond clair et parfois avec deux noyaux (**Figure III.23-B, C et D**).

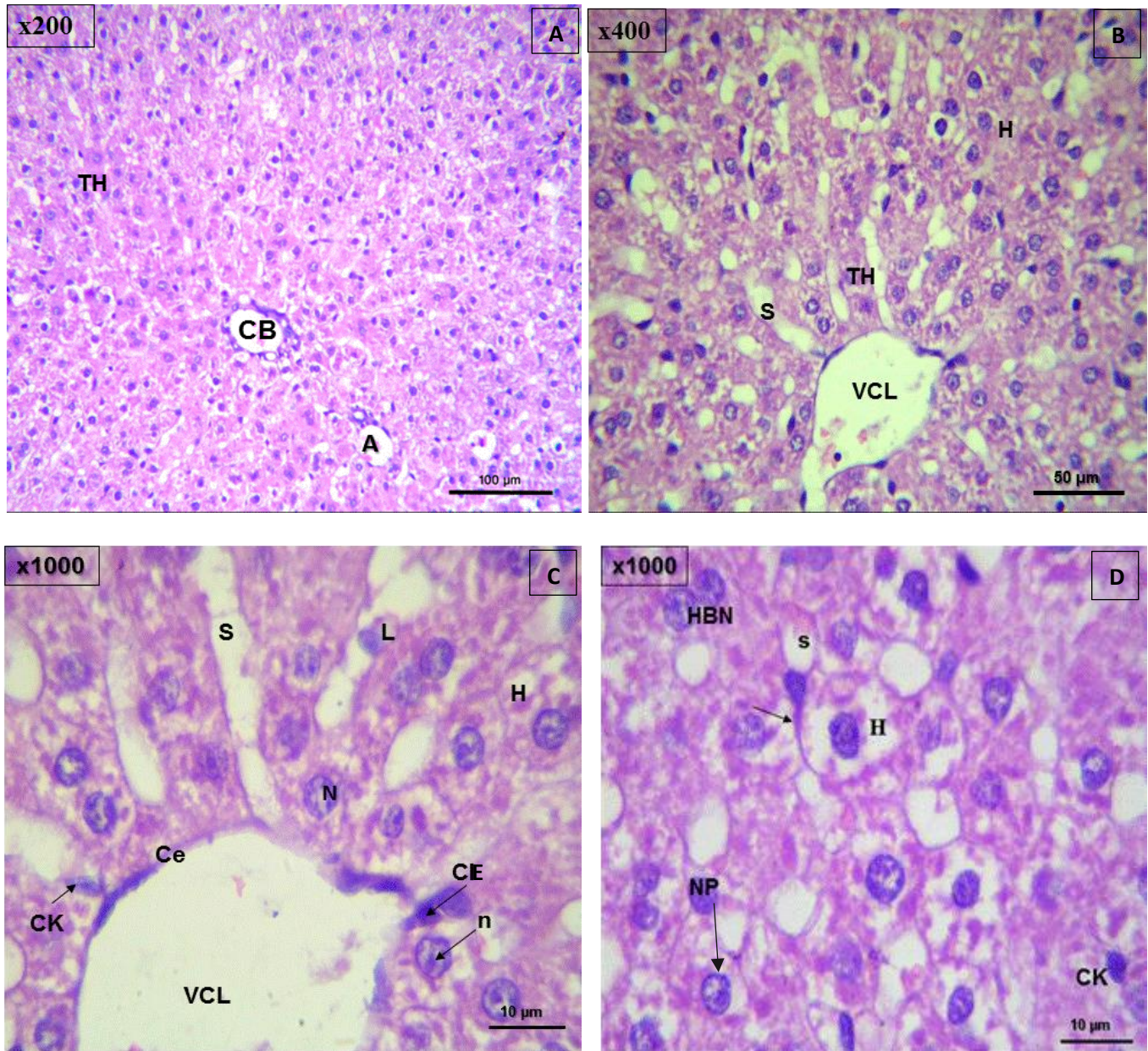


Figure III.23: Photomicrographie du parenchyme hépatique chez les rats témoins.

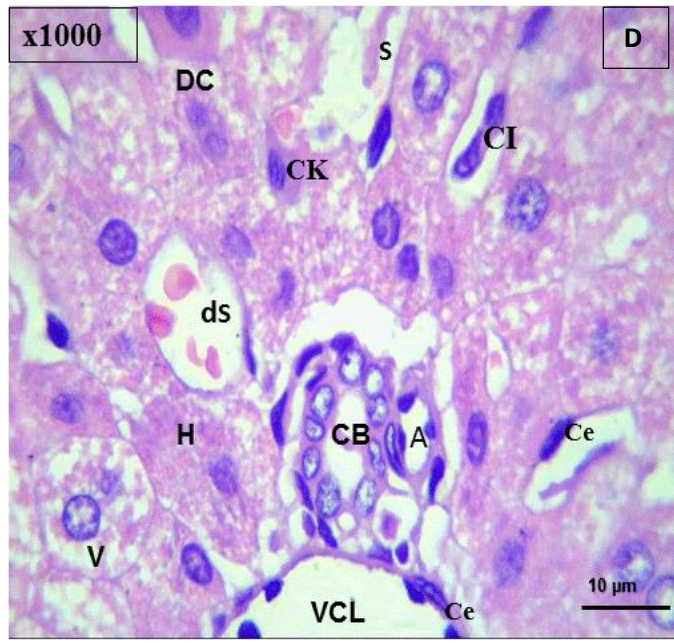
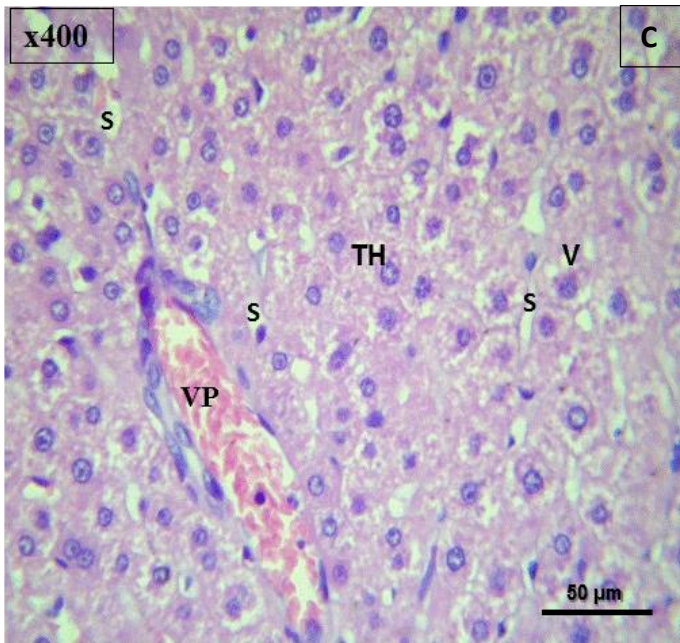
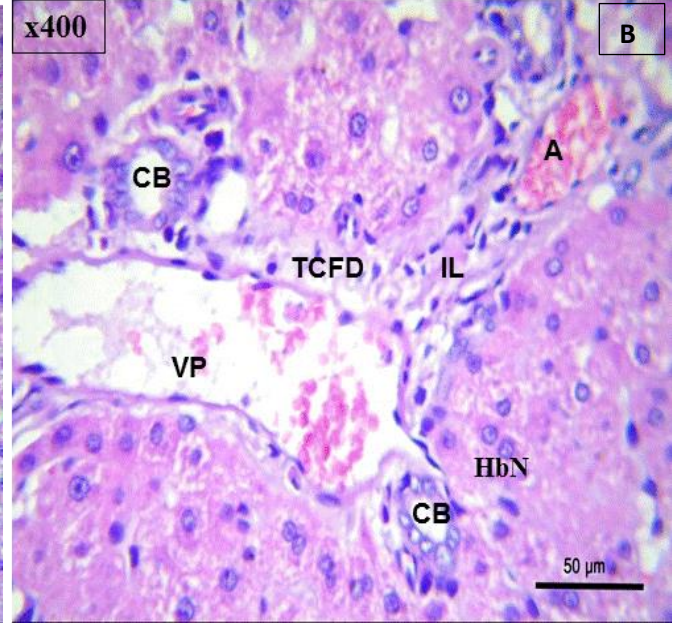
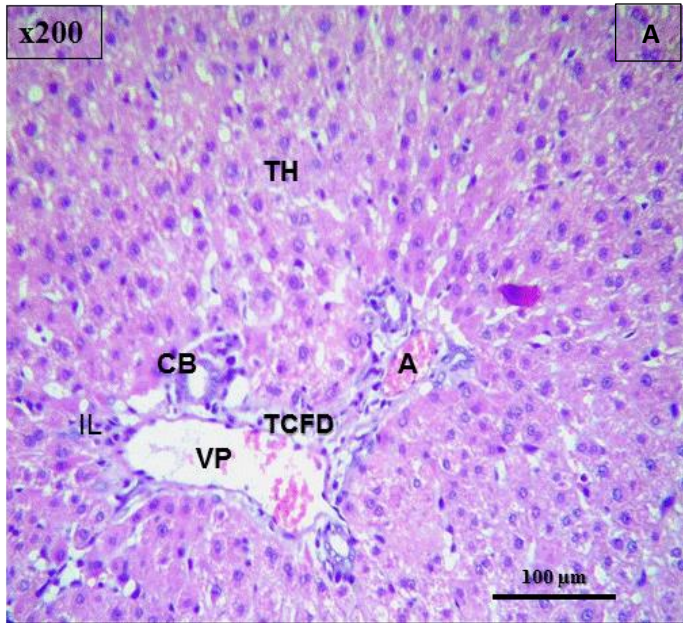
**H** : Hépatocyte ; **S** : sinusoïde ; **Vp** : veine porte ; **VLC** : veine Centrolobulaire ; **HbN** : hépatocyte binucléé ; **dS** : dilatation des sinusoides ; **CS** : congestion sanguine ; **IL** : infiltration leucocytaire ; **CK** : cellule de Kupfer ; **Ce**: cellule endothéliale ; **CE**: cellule de Eto ; **CB**: canal biliaire ; **A**: artère/ artériole ; **TH**: travée hépatocyttaire ; **V** : vacuolisation cytoplasmique ; **DC**: division cellulaire ; **PN**: polynucléaire ; **L**: lymphocyte ; **n**: Nucléole ; **N**: Noyau, **h**: hématie ; **Flèche** : canalicule biliaire ; **NP** : noyau pycnotique

➤ **Chez les rats traités par les spores conditionnées de *M. anisopliae***

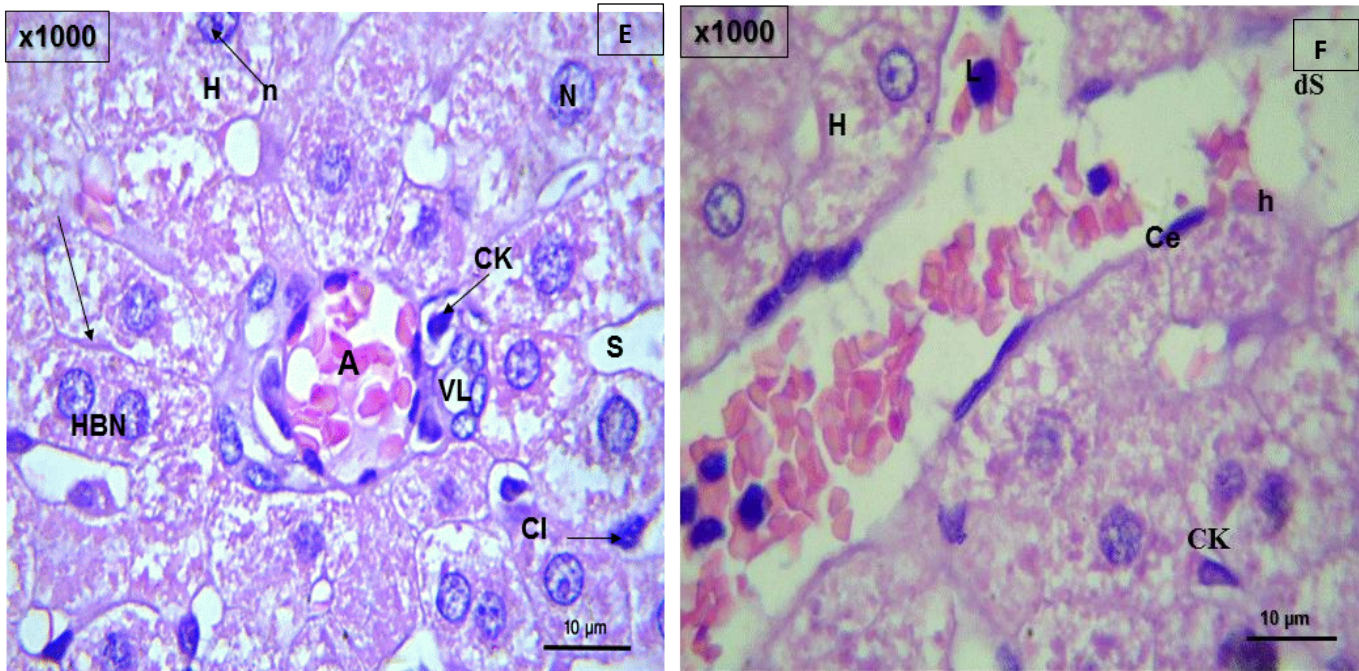
Les coupes du foie chez les rattes traitées avec des spores de *M. acridum* récupérées de Novacrid®, à raison de  $6 \times 10^6$  spores /mL /250 g de poids corporel pendant 20 jours, présente une organisation cyto-architecturale conservée en comparaison avec le témoin.

Quelques anomalies structurales sont observées par endroits et illustrées comme suit :

- Nous observons le développement de tissu conjonctif fibreux diffus au tour des veines et qui est riche en capillaires dilatés (**Figure III.24 C, D et E**).
- Quelques infiltrations leucocytaires sont observées, par endroits au niveau des dilatations sinusoïdales développés à proximité des veines Centro-lobulaires et des veines portes (**Figure III.24 A, B et C**).
- Vacuolisations cytoplasmiques de quelques hépatocytes, signe d'hypertrophie tissulaire (**Figure III.24 E et F**).
- Dilatation des capillaires sinusoïdes qui sont riche en leucocytes et en cellules de Kupfer (**Figure III.24 D, E et F**).







**Figure III.24:** Photomicrographie du parenchyme hépatique chez les rats traités avec les spores du biopesticide à raison de  $6 \times 10^8$  spores /ml /250g de poids corporel pendant 20 jrs.

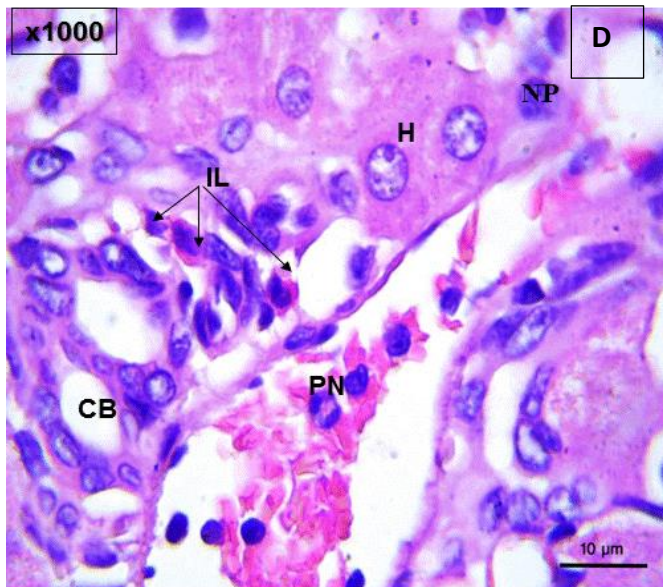
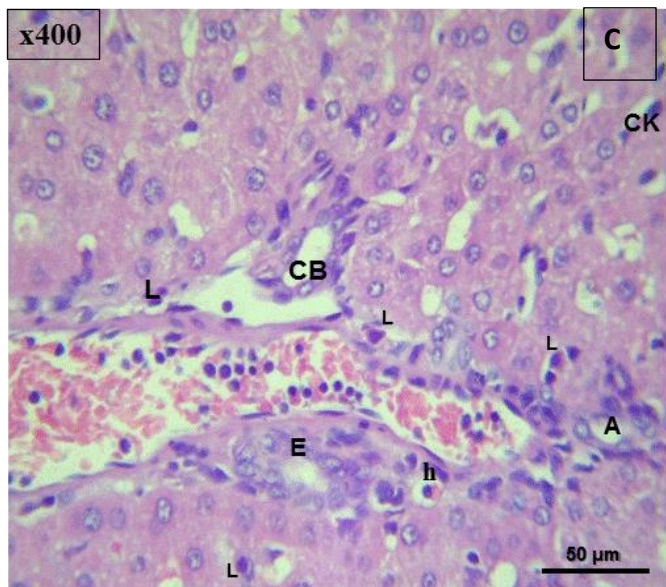
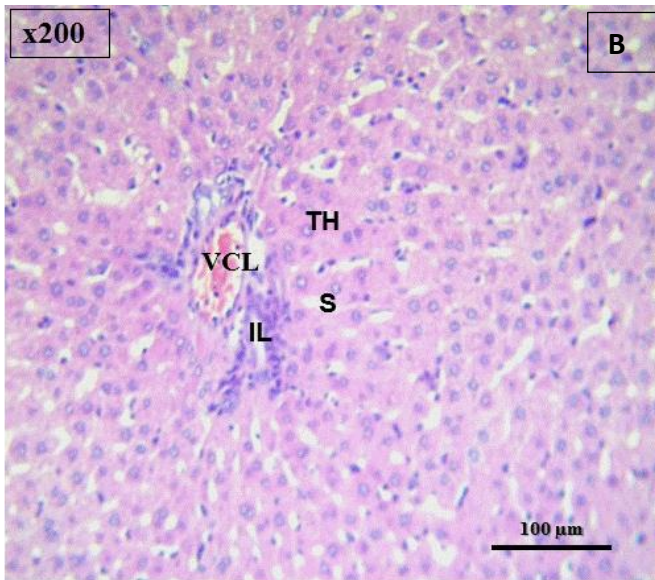
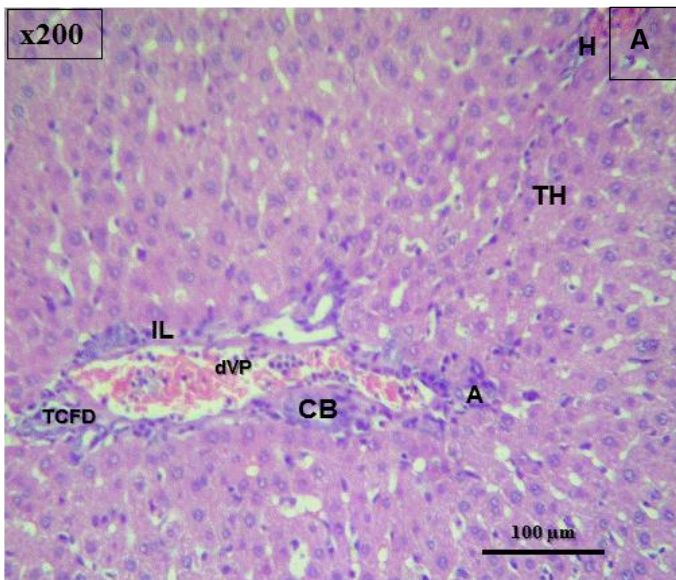
**H :** Hépatocyte ; **S :** sinusoides ; **Vp :** veine porte ; **VLC :** veine centrolobulaire ; **HbN :** hépatocyte binuclée ; **dS :** dilatation des sinusoids ; **CS :** congestion sanguine ; **IL :** infiltration leucocytaire ; **CK:** cellule de Kupfer ; **Ce:** cellule endothéliale ; **CI:** cellule de Eto ; **TCFD:** Tissu conjonctif fibreux diffus ; **CB:** canal biliaire ; **A:** artère/ artériole ; **TH:** travée hépatocytaire, **V :** vacuolisation cytoplasmique ; **DC:** division cellulaire. **PN:** polynucléaire, **L:** lymphocyte ; **n:** Nucléole, **N:** Noyau, **h:** hématie, **Flèche :** canalicule biliaire ; **VL:** vacuolisation.

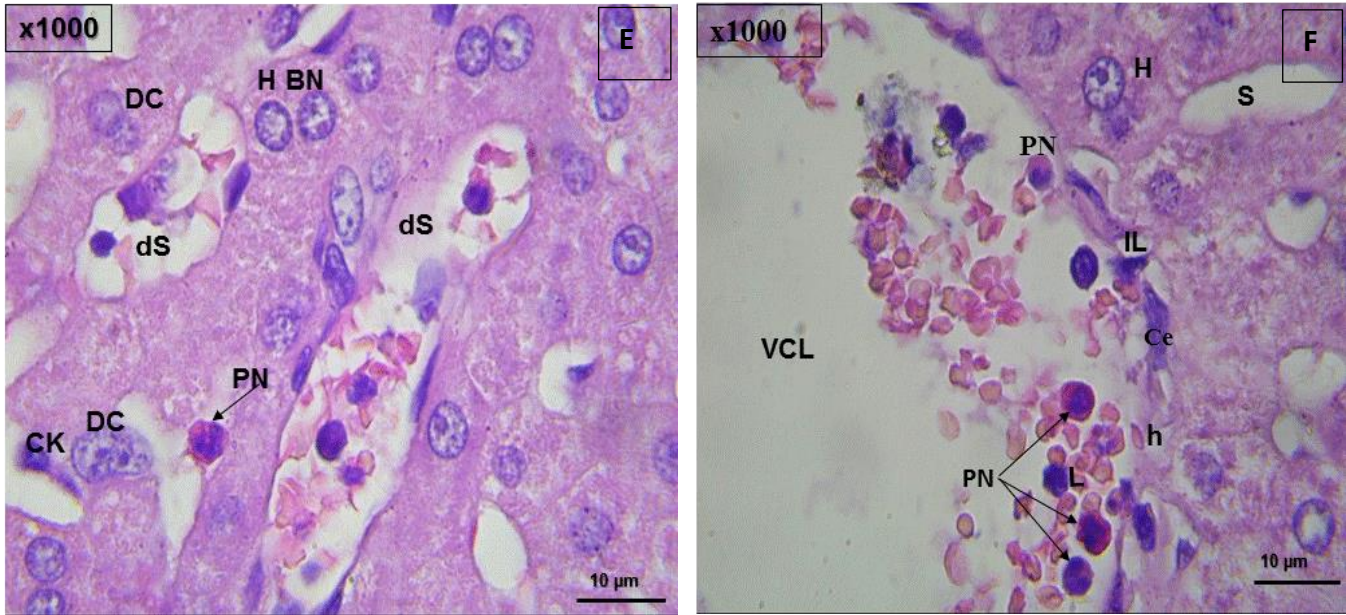
➤ **Chez Les rats Wistar femelles traitées par les spores fraîches de *M acridum***

Les observations microscopiques des coupes hépatiques provenant des rattes traitées avec les spores de culture révèlent un aspect structurel du parenchyme comparable à celui des individus traités par le biopesticide.

Quelques altérations structurales s'accroissent, illustrées comme suit :

- Les espaces portes, situés aux angles du lobule, sont normaux et présentent des infiltrations inflammatoires (**Figure III.25 -A, C et D**).
- Dilatation sinusoidales à proximité du tissu conjonctif fibreux diffus développé autour des veines Centro-lobulaires et des veines portes (**Figure III.25-A, C et D**).
- Vacuolisation cellulaire des hépatocytes à noyaux volumineux, signe d'hypertrophie tissulaire (**Figure III.25 -A, C et D**).
- Dilatation importante des capillaires sinusoides riche en cellules phagocytaires, polynucléaire neutrophile et cellule de Kupfer (**Figure III.25 -C et D**).
- Margination remarquable des polynucléaires, lymphocytes et macrophage au niveau des veines Centro-lobulaire accompagné de diapédèse leucocytaire, signe d'inflammation tissulaire (**Figure 25 -D, E et F**).





**Figure III.25:** Photomicrographie du parenchyme hépatique chez les rats traités avec les spores issus de culture à raison de  $6 \times 10^8$  spores /ml /250g de PC pendant 20 jours

**H** : Hépatocyte ; **S** : sinusoire; **Vp** : veine porte ; **VLC** : veine centrolobulaire; **HbN** : hépatocyte binuclée ; **dS** : dilatation des sinusoids ; **CS** : congestion sanguine ; **IL** : infiltration leucocytaire; **CK**: cellule de Kupfer; **Ce**: cellule endothéliale ; **CI**: cellule de Eto; **TCFD**: Tissu conjonctif fibreux diffus; **CB**: canal biliaire ; **A**: artère/ artériole; **TH**: travée hépatocytaire, **V** : vacuolisation cytoplasmique; **DC**: division cellulaire ; **PN**: polynucléaire, **L**: lymphocyte; **n**: Nucléole, **N**: Noyau, **h**: hématie, **Flèche** : canalicule biliaire

### III.1.7 Etude histo-morphométrique

Nous avons réalisé une analyse histo-morphométrique au niveau du foie et des reins. L'étude a pour objectif la détermination de l'état physiologique des cellules hépatiques et glomérulaires rénales, et d'estimer quantitativement une éventuelle hypertrophie des tissus chez les animaux traités en comparaison avec les témoins.

L'analyse morphométrique concerne les trois lots (5 animaux par catégorie). Les mesures sont réalisées sur des coupes histologiques des animaux expérimentés, grâce à un logiciel d'analyse et de traitement d'image SXView et le logiciel ImageView.

#### III.1.7.1 Morphométrie du tissu hépatique

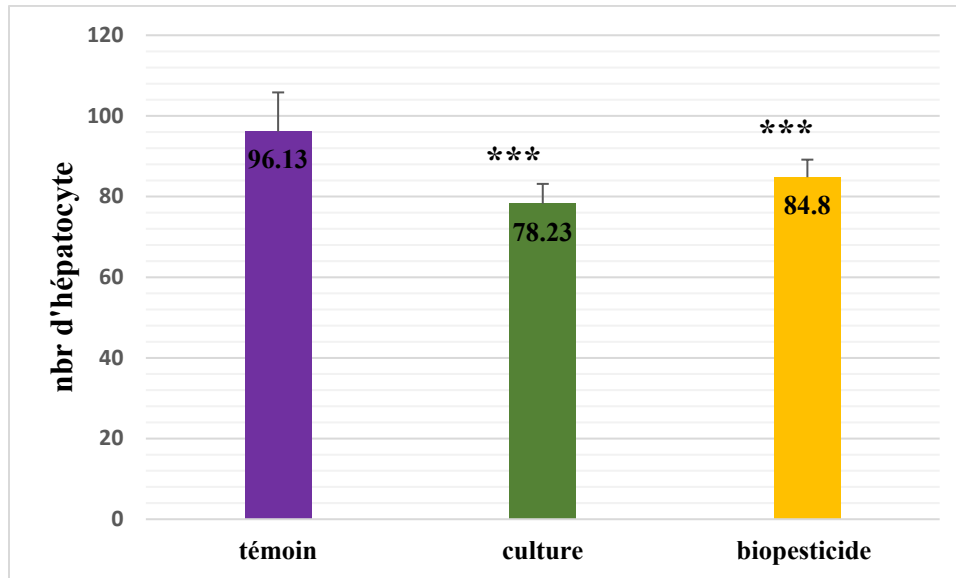
Au niveau du foie, nous avons choisi deux paramètres morphométriques, à savoir le dénombrement des hépatocytes et le rapport nucléocytoplasmique

- **Dénombrement des hépatocytes**

Nous avons compté le nombre des hépatocytes mononuclés présentes dans des rectangles à superficies égales ( $800 \times 540 \mu m$ ) pour toutes les coupes étudiées. Les dénombrements sont faits sur un effectif de 20 images obtenues à partir des lames histologiques au grossissement  $\times 400$ . Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  écart type. (**Figure III.26**). Le détail des avec les significations statistiques, voir les tableaux III.31, III.32 -Annexe III.

En comparaison avec le lot témoin ( $96,13 \pm 9,70$ ), nous constatons la diminution du nombre des hépatocytes au niveau des coupes du foie provenant des individus du lot culture ( $78,23 \pm 4,92$ ) et du lot biopesticide ( $84,8 \pm 4,36$ ). Ces diminutions sont considérées statistiquement très hautement significatives, ( $P = 1,27045E-12$ ) ( $P = 2,54724E-07$ )  $< 0,001$  respectivement.

Nos résultats révèlent que le nombre d'hépatocytes sur les coupes du foie des rats traités avec les spores germées est plus faible que celui des rats traités avec Novacrid®. La différence entre les moyennes pour les deux lots traités est statistiquement très hautement significative ( $P = 1,01938E-06$ )  $< 0,05$ .



**Figure III.26 :** Nombre moyen des hépatocytes sur les coupes du parenchyme hépatique des individus témoins et traités avec *M. acridum*.

- **Rapport nucléocytoplasmique des hépatocytes**

Le rapport noyau - cytoplasme (NC) se définit par le rapport entre le volume du noyau et celui de la cellule. C'est un paramètre qui permet d'évaluer l'état physiologique de la cellule et d'estimer l'hypertrophie tissulaire sur le plan quantitatif.

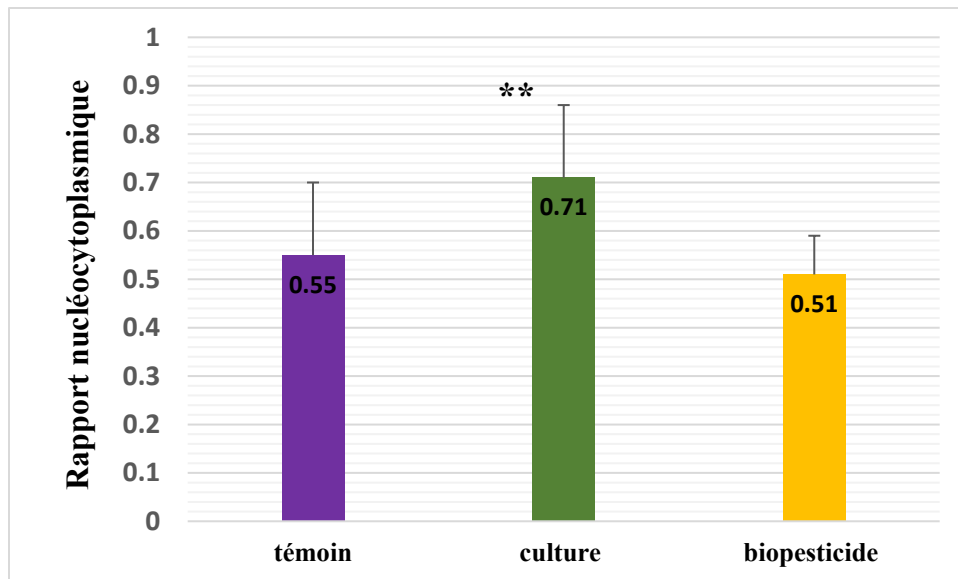
Ce paramètre est étudié sur les coupes hépatiques contenues dans des rectangles de superficie égale. Deux mesures de diamètre pour le noyau et pour la cellule entière sont faites pour chaque hépatocyte mononuclé. Nous avons utilisé le logiciel de traitement ImageView, calibré par l'échelle de l'image observé au grossissement 1000 (scale bar = 10µm), pour obtenir les mesures en micromètres (**Figure II.6**).

Les résultats sont exprimés en moyenne ± écart type. (**Figure III.27**). Le détail des significations statistiques sont illustrés sur les tableaux III.32, III.37, III.38, III.39, III.40-Annexe III.

En comparaison avec le lot témoin ( $0,55\mu\text{m}\pm 0,15$ ), nous notons une augmentation du rapport nucléocytoplasmique du lots culture ( $0,71\mu\text{m}\pm 0,15$ ) considérée comme hautement significatives ( $P = 0,0025 < 0,05$ ).

Le lot biopesticide ( $0,51 \mu\text{m} \pm 0,08$ ) montre une diminution non significative comparé au témoin ( $0,55 \mu\text{m} \pm 0,15$ ) ( $P = 0,29$ )  $> 0,05$

Le rapport nucléocytoplasmique du lots culture ( $0,71 \mu\text{m} \pm 0,15$ ) montre une différence très hautement significative comparée au lot biopesticide ( $0,51 \mu\text{m} \pm 0,08$ ) ( $P = 1,40337\text{E-}05$ )  $< 0,001$ .



**Figure III.27 :** Rapport nucléo-cytoplasmique des hépatocytes chez les rats témoins et traités avec les spores de *M. acridum* issus de culture et du biopesticide.

Hautement significatives (\*\*): lorsque ( $P < 0,01$ ).

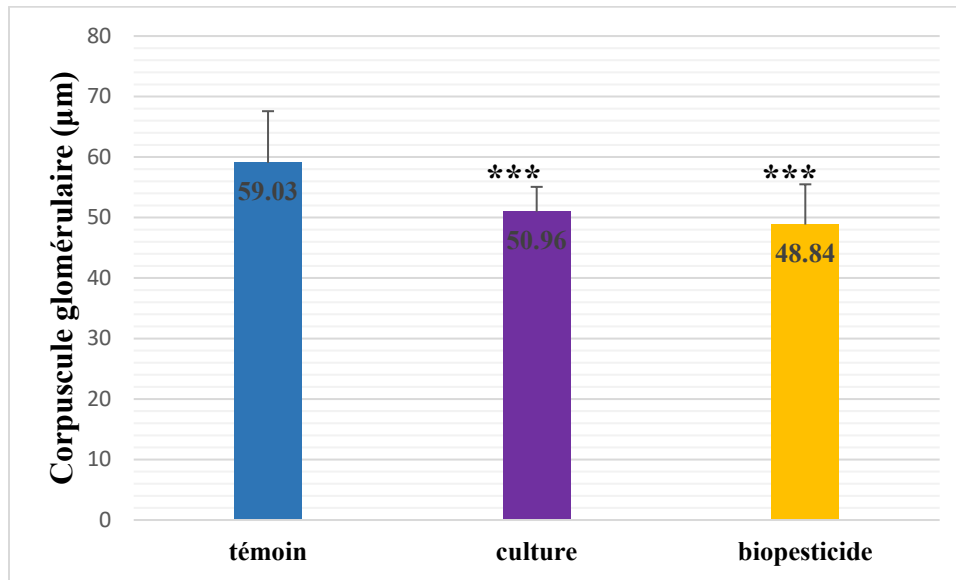
### III.1.7.2 Morphométrie du tissu rénale

Pour estimer l'état physiologique des cellules rénales, nous avons opter pour la mesure de paramètres concernant les différents compartiments du glomérule à savoir, le glomérule, le peloton et la chambre glomérulaire. Pour chaque paramètre nous avons pris la moyenne de deux mesures en diagonale observées sur des coupes rénales au grossissement x 400 voir figure III.41 annexe III

Le détail des calculs est illustré sur les tableaux III.33, III,34, III.36, III.36 de l'annexe III.

- **Diamètre du corpuscule glomérulaire**

Les mesures du diamètre glomérulaire sont illustrées sur la **figure III.28** et les tableaux III.33, III.34, III.35, III.36 de l'annexe III.



**Figure III.28 :** Diamètre du corpuscule glomérulaire chez les rats témoins et traitées avec les spores de *M. acridum* issus de culture et du biopesticide.

Hautement significatives (\*\*): lorsque ( $P < 0,01$ ).

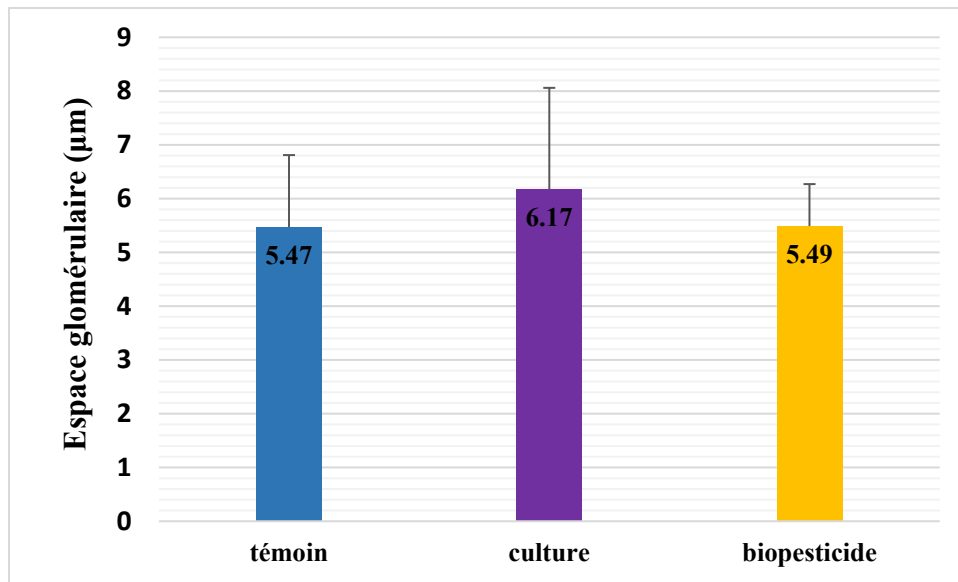
En comparaison avec le lot témoin ( $59,03 \mu m \pm 8,55$ ), le lot culture ( $50,96 \mu m \pm 4,11$ ) et le lot biopesticide ( $48,84 \mu m \pm 6,65$ ) montrent des diminutions du diamètres des corpuscules glomérulaires. Les différences sont très hautement significatives ( $P < 0,001$ ).

La comparaison du lot biopesticide ( $48,84 \mu m \pm 6,65$ ) avec le lot culture ( $50,96 \mu m \pm 4,11$ ), montre une diminution non significatives ( $P = 0,23$ ).

- **Diamètre de l'espace glomérulaire**

Sur la **figure III.29** et les tableaux III.33, III.34, III.35, III.36 de l'annexe III sont mentionnées les mesures du diamètre de l'espace de Bowman.





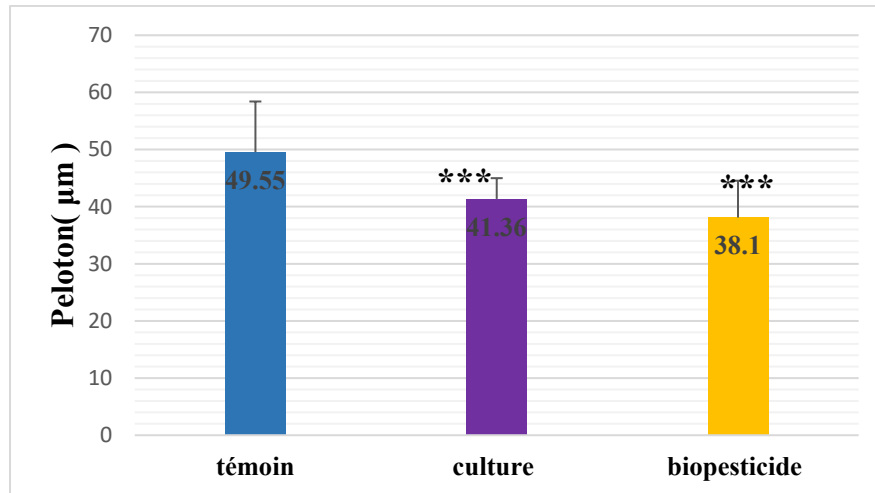
**Figure III.29** : Diamètre de l'espace glomérulaire chez les rats témoins et traités avec les spores de *M. acridum* issus de culture et du biopesticide.

Nous avons enregistré une augmentation non significative ( $P = 0,183$ ) de l'espace de Bowman pour le lot culture ( $6,17 \mu m \pm 1,89$ ) comparé au lot témoin ( $5,47 \mu m \pm 1,34$ ). De même pour le lot biopesticide ( $5,49 \mu m \pm 0,78$ ). Aucune différence significative entre les deux lots traités ( $P = 0,143$ ).

- **Diamètre du peloton**

Les mesures du diamètre du peloton sont illustrées sur la **figure III.30** et des tableaux III.33, III.34, III.35, III.36 dans l'annexe III.

En comparaison avec le lot témoin ( $49,55 \mu m \pm 8,86$ ), Le diamètre moyen des pelotons sur les coupes rénales chez le lot culture ( $41,36 \mu m \pm 3,63$ ) et chez le lot biopesticide ( $38,1 \mu m \pm 6,44$ ) montrent des différences statistiquement très hautement significative ( $P < 0,001$ ). Aucune différence significative entre les deux lots traités ( $P = 0,055$ ).



**Figure III.30** :Diamètre du peloton chez les rats témoins et traités avec les spores de *M. acridum* issus de culture et du biopesticide.

**III.2 Discussion**

Notre étude vise à étudier la biosécurité de la souche *Metarhizium anisopliae var acridum* par l'administration oral subaiguë des deux forme (germer et conditionner) des rats Wistar femelles.

Tout d'abord, nous avons observé que cette souche fongique n'a affecter en aucun cas un changement comportemental, ceci concorde avec les résultats de Arkam, (2019) ; Toriello et al, (2009), et de Mier et al, (2005) des souris traitées avec *Paecilomyces fumosoroseus*. Contrairement à Shaddock et al, (1982) les souris sont exposées à 1 g de poussière de spores de *Metarhizium anisopliae* introduite chaque jour, et ont montré des signes de détresse, tels que courir et grimper sur le toit des cages et grillages. De même le travail de Zulfiana, (2014) les souris sont traitées avec le biolarvicide *Metarhizium anisopliae* à la dose maximal (5000mg/ kg PC) présente des symptômes cliniques d'hyper-lacrimation, d'hypersalivation, faiblesse et perte de poils.

De plus, cette souche n'a eu aucun effet sur la variation de la croissance pondérale relative des rats wistar ; avec une augmentation considérée révéler hautement significative ( $P < 0.01$ ) pour les 3 lots. Ce qui confirme les résultats de Arkam, (2019) suite aux traitements des rattes Wistar avec le biopesticide Green muscle® (*M. anisopliae var acridum*). Les mêmes résultats sont retrouvés dans le travail de Mier et al,( 2005 ) par le traitement des souris mâles et femelles avec *Paecilomyces fumosoroseus* inoculé avec  $10^8$  conidie/animal avec des conidies viables et non viables montre aussi une augmentation progressive du poids corporel.

Des résultats similaires d'augmentation du poids est rapportés par d'autre travaux ; nous citons Toriello et al, (2009) par l'inoculation intragastrique de 72 souris avec des spores viables et 24 avec des spores non viables à raison de  $10^8$  conidies par animal testés ; nous rajoutons le travail de Khaldoun et al ,(2014) des rats males traités avec Emamectin benzoate (Proclaim®) qui est un pesticide biologique produit par fermentation dans le sol est produit à partir de *Streptomyces avermitilis* (Roberts et Hutson 1999 ; Temiz, 2020). Une augmentation de poids a été enregistrer pour le lot traité avec une faible dose.

Cette augmentation peut être attribuée à l'enrichissement de leur régime alimentaire durant l'expérimentation et l'accès *ad libitum* à la nourriture et à l'eau.

Sachant que la diminution de poids est considérée comme un signe de toxicité et de détérioration de l'état général des souris traitées (Suriyavadhana et Tpakutharivu., 2011).

Concernant le poids relatif et absolu du foie et rein prélevé à la fin des deux différents traitements leurs variations sont considérées statistiquement comme non significatives ( $P > 0,05$ ) pour les 2 lots.

Le travail de Farag et al, (2022) et Sayed Ali et al, (2022) démontre une très légère augmentation non significative du poids (%) du foie et aucun changement du poids des reins des rats male albinos et femelles respectivement, traitées avec *Beauveria bassiana* à raison de la même concentration de  $1,1 \times 10^{10}$  conidie /100g de poids corporels .

Par ailleurs, dans le cadre de l'étude de la toxicité aigüe par injection intradermique en spores de *Metarhizium acridum* à raison de  $1.3 \times 10^6$  spores /mL. Les résultats obtenus sont en faveur de formation d'œdèmes inflammatoires au niveau de la patte gauche très hautement significative des rats traités avec la souche mise en culture et sous sa forme conditionnée comparer au témoin. Cependant nous observons un œdème plus important dans le cas du lot culture.

L'effet par injection, permet d'éviter le processus d'absorption présent dans d'autres voies, ce qui permet à l'ensemble du produit administré d'atteindre la circulation systémique, créant ainsi les conditions idéales pour que le micro-organisme infecte certains organes et y induise des altérations pathogènes Mancebo et al, (2009).

Dans la littérature, aucune étude approfondie n'a été faite sur le sujet, à par le travail de (halouane,2008) qui a démontré l'apparition d'œdèmes de la patte gauche traitées avec la souche *Beauveria bassiana* issus d'une réaction inflammatoire. Cet œdème est défini par un gonflement de volume des tissus mous dû à une augmentation du liquide interstitiel constitué d'eau et de protéines plasmatiques. L'apparition d'œdèmes peut résulter d'une augmentation de la pression hydrostatique, due à la vasodilatation et surtout d'une augmentation de la perméabilité de la paroi des petits vaisseaux sous l'effet de médiateurs chimiques (immunoglobulines, facteurs de la coagulation) et d'une diapédèse leucocytaire au niveau de la patte. On peut rajouter à cet explication la limitation du foyer inflammatoire par une barrière de fibrine (provenant du

fibrinogène plasmatique), ce qui évite la diffusion de micro-organismes infectieux qui est un moyen de défense.

A la différence, des tests de toxicité cutanée (dermique). Nous avons le travail de Zulfiana, (2014) qui a utilisé une dose maximale de 2000 mg/kg de *Metarhizium anisopliae* chez les Rats blanc. Et l'étude de Acosta-Quintero et al., (2011) qui a travaillé sur des rats traitées avec une dose  $10^9$  conidie/mL de *Beauveria bassiana*, ces doses ont été appliquées au niveau dorsal des cobayes. Aucun décès et absence d'altération ou réaction inflammatoire n'a été observées pour les deux études.

Sur le plan hématologique, les numérations-Formules-sanguines (hémoglobine, globules rouges, hématocrite, et plaquette) n'ont pas révélé de modifications significatives entre le groupe témoin et lot biopesticide, ces résultats sont en accord avec ceux de Arkam (2019) chez les rats traités à faible dose.

Cependant on enregistre chez le lot culture et biopesticide une augmentation leucocytaire significatives qui est en faveur d'une activation des mécanismes de défense du système immunitaire de l'animal, ainsi qu'une mobilisation du système immunitaire et/ou un transfert du pool leucocytaire de la rate vers le sang périphérique ( Lamfon ,2013; Farag et al., 2022). qui est similaires à l'étude de Sayed et al., (2022) et Farag et al., (2022) qui on montrée une augmentation significative des valeurs de leucocyte chez les animaux traités avec *Beauveria bassiana*.

On observe une diminution significative de (hémoglobine, hématocrite, et plaquette). La réduction de la teneur en hémoglobine peut être liée à la diminution de la taille des globules rouges, (El-gendy et al., 2015), la diminution en GR peut être signe d'anémie et d'une mauvaise distribution de l'oxygène. Des résultats différents sont observés dans l'étude de Sayed et al, (2022) en montrent une augmentation des GR et aucun changement significatif pour les autres.

La fonction rénale est appréciée par le dosage de ces paramètres rénaux l'urée et créatinines, le dosage de l'urée montre une diminution non significative pour les 2 lots traitées comparés au témoin, cela corrobore avec le travail de Khaldoun-oularbi et al, (2014), Le traitement par l'EMB qui n'a pas eu d'incidence sur l'urée plasmatique, à l'opposé des résultats de Arkam (2019);

révèlent une augmentation non significatives, le travail d'El-gendy et al, (2015) révèle une augmentation significatives de l'urée .

Le dosage de la créatinines montre une augmentation non significative pour le lot biopesticide comparer au témoin, nos résultats correspondent aux résultats de Arkam 2019 ; et de Farag et al., (2022) des rats mâles traités avec *Beauveria bassiana* n'étaient pas significatives.

Le lot culture montre une augmentation significative comparer au témoin qui est en accord avec les résultats de Sayed et al, (2022), Khaldoun-oularbi et al, (2014),El-gendy et al, (2015).

Il en résulte de cette étude que l'augmentation de la créatinine peut être attribuer à la détérioration de la fonction rénale au niveau de la filtration glomérulaire.

L'étude hépatique est effectuée par le dosage de quelques paramètres (ASAT ; ALAT ; PAL). Nos résultats révèlent une différence non significative de ces paramètres pour les deux lots traités avec le *Metarhizium anisopliae* comparer au témoin, qui corrobore avec les résultats de Arkam (2019). Ces résultats sont donc en faveur d'une fonction hépatique normal.

Contrairement, l'étude de Sayed et al, (2022) montre une diminution significatives de ASAT, ALAT, et PAL plus une augmentation du ratio ASAT/ALAT des rats femelles traitées avec *Beauveria bassiana*. Ces résultats concordent avec les résultats de El-gendy et al, (2015), Larki et al, (2019).

L'étude histologique permet d'étudier la structure des tissus et dépister toute anomalie structurale au niveau de l'organe ou du tissu.

Nous avons noté la présence d'altérations structurels, d'atrophie, et diapédèse leucocytaire, des congestions sanguines, dans les deux organe (rein et foie).et nous pouvons apprécier la présence d'une dilation sinusoïdale hépatique, et une dilation des TCD et TCP au niveau du rein. On remarque aussi une altération plus élevée du parenchyme rénal et hépatique du lot culture par rapport au lot biopesticide.

Nos résultats rejoignent ceux de Arkam (2019), au niveau des altérations rénales et hépatiques avec la même souche, ainsi que pour l'étude de Larki et al, (2019) des rats traitées

avec *Bacillus thuringiensis*. et Lemos et al, (2013) rats enceinte avec *Bacillus thuringiensis subsp. Aizawai*.

L'analyse des paramètres de la morphométrie du tissu hépatique, à savoir le dénombrement des hépatocytes révèlent des différences très hautement significatives pour les deux lots traités en comparaison avec le lot témoin. Le rapport nucléo-cytoplasmique montre une régression hautement significative chez les rattes traitées avec les spores de culture et non significative pour le biopesticide. Les résultats de l'étude histopathologique et morphométrique sont en faveur de l'hypertrophie du parenchyme, observées sur les coupes hépatiques, avec augmentation du volume des hépatocytes et dilatations des capillaires sinusoides, considérés comme signes de l'inflammation.

L'hypertrophie hépatique est plus marquée chez les individus traités avec les spores de culture, ce qui accentue les indices de l'inflammation observée précédemment sur les coupes histologiques.

Le rapport noyau-cytoplasme définit la proportionnalité plus ou moins constante entre le volume du noyau et le cytoplasme caractéristique d'un type de cellule donné dans un état physiologique normal. La taille relative du noyau par rapport au cytoplasme, est un bon prédicateur de l'activité cellulaire, le rapport tend à augmenter par la hausse du volume cytoplasmique dus à la vacuolisation des hépatocytes.

Le rapport nucléocytoplasmique entre le volume du noyau et celui de la cellule tend à augmenter par hypertrophie nucléaire, cela suggère que l'activité de division cellulaire puisse remplacer les cellules altérées ou bien ce rapport devient un indicateur d'une activité mitotique de cellules tumorales. L'étude de Fabre & Patriarche., (1995) homologue notre interprétation dans le sens où cette étude démontre que plus l'apport nucléocytoplasmique est élevé plus il se rapporte à une lésion précancéreuse.

En comparaison avec le témoin, la morphométrie des glomérules rénaux chez les rattes traitées avec les deux formulations à bases de spores du champignon révèle le rétrécissement très hautement significatif des glomérules conduisant ainsi à la régression du diamètre du peloton

glomérulaire avec une légère augmentation non significative de l'espace de Bowman. Cela suggère l'inflammation rénale.

Nous constatons que les spores fraîches sont plus susceptibles d'induire l'inflammation tissulaire révélé qualitativement et quantitativement au niveau du foie et des reins.



## ***Conclusion et perspectives***

Notre étude contribue partiellement à un projet de recherche sur la biosécurité de *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* chez les mammifères. Nous avons cherché la toxicité subaiguë de cette souche par l'inoculation orale des rats femelles Wistar, et la toxicité aiguë par l'injection intradermique de la patte gauche.

Au terme des résultats portant sur les traitements à base de spores germées et conditionnées à raison de  $6 \times 10^8$  spores/ml / 250 g de poids corporel nous pouvons conclure que :

- √ Aucun effet significatif sur l'augmentation relative du poids corporel, et sur le poids absolu et relatif des organes (foie et rein) pour les deux lots traités
- √ Perturbation des paramètres hématologiques (FNS) par augmentation de leucocytes pour les deux lots traités, et diminution des autres paramètres sanguins pour le lot de culture, et différence non significatives pour le lot du biopesticide (forme conditionnée).
- √ La fonction du foie n'est pas altérée suite aux différents traitements, révélé par la non-signification des variations biochimiques hépatiques (ASAT, ALAT, PAL).
- √ Une discrète augmentation de la créatinine des rats traités jugée significative pour le lot de culture.
- √ Des altérations cyto- architecturales du parenchyme hépatique, dilatation sinusoidales, infiltrats inflammatoires, vacuolisation cytoplasmique, hémorragies diffuses.
- √ Le nombre des hépatocytes sur les coupes du foie des rats traités avec les spores germées est plus faible que celui des rats traités avec Novacrid®. Avec augmentation significative du rapport noyau-cytoplasme chez le lot de culture. Donc l'hypertrophie hépatique est plus marquée chez les individus traités avec les spores fraîches.
- √ Le parenchyme rénal révèle des congestions sanguines modérées, lésions de quelques tubes corticaux et médullaires et infiltration leucocytaire.
- √ L'histo-morphométrie des glomérules rénaux chez les rats traités révèle la désorganisation de l'architecture avec le rétrécissement très hautement significatif des glomérules conduisant ainsi à la régression du diamètre du peloton glomérulaire.

L'effet par injection intradermique de  $1.3 \times 10^6$  spores /mL /individu, montre que les pattes gauches sont très significativement enflammées comparées aux pattes droites. L'œdème inflammatoire est très hautement significatif comparé au témoin.

L'analyse combinée des résultats obtenus suggèrent l'absence d'effet toxique de Novacrid® et l'installation de désordres inflammatoires sur le plans systémiques et tissulaires suites aux différents traitements avec *M. acridum*. L'histo-morphométrie confirme qualitativement et quantitativement les signes inflammatoires au niveau du parenchyme rénal et hépatique, dont les effets sont plus remarquables chez les individus traités avec les spores issues de culture (viabiles à 100%).

En perspective, de ce travail nous recommandons les études suivantes :

- Prolonger la durée du traitement, et tester d'autres doses avec un effectif plus important.
- Etablir d'autres études dans la recherche de la toxicité aux niveaux des différents organes en particulier l'appareil reproducteur, les ganglions lymphatiques et la rate.
- Approfondir les recherches, dans le but d'identifier l'origine de l'altération rénal et hépatique par l'identification des biomarqueurs spécifiques.
- Déterminer quelles sont les métabolites de *Metharizium acridum* responsables de ces désordres inflammatoires et caractériser la réponse immunitaire conséquente.
- Confirmer les altérations tissulaires par les paramètres du stress oxydatif et par l'immunohistochimie en utilisant des marqueurs de l'inflammation comme le COX-2 de fibrose, le cytochrome C de l'apoptose, des cytokines: IL-18, L-FABP.

## Référence Bibliographique

### A

- Akutse, K. S., Subramanian, S., Khamis, F. M., Ekesi, S., & Mohamed, S. A. (2020).** Entomopathogenic fungus isolates for adult *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) management and their compatibility with *Tuta* pheromone. *Journal of Applied Entomology*, 144(9), 777-787.
- Abdelfattah, A.; Malacrinò, A.; Wisniewski, M.; Cacciola, SO; Schena, L.** Metabarcoding : un outil puissant pour étudier les communautés microbiennes et façonner les futures stratégies de protection des plantes. *Biol. Contrôle* 2018 , 120 , 1–10.
- Acosta-Quintero, M. E., Cazorla-Perfetti, D. J., Eduarte-Pereira, G., & Morales-Moreno, P. (2011).** Patogenicidad dermica de un aislamiento autoctono del hongo entomopatogeno *Beauveria bassiana* en ratones. *Revista Científica*, 21(6), 477-483.
- Amiri-Besheli, B., Khambay, B., Cameron, S., Deadman, M. L., & Butt, T. M. (2000).** Inter- and intra-specific variation in destruxin production by insect pathogenic *Metarhizium* spp., and its significance to pathogenesis. *Mycological research*, 104(4), 447-452.
- American Society of Anesthesiologists (2013).** "Anesthesiology: An Overview." URL: <https://www.asahq.org/WhenSecondsCount/overview.aspx>.
- Anand, R., & Tiwary, B. N. (2010).** Cytokine profile and cytotoxicity in response to acute intratracheal dose of *Metarhizium anisopliae* in BALB/c mice. *Medical Mycology*, 48(8), 1039–1048. <https://doi.org/10.3109/13693786.2010.494254>
- Ariarajah, N., Gerstel, E., Ponte, B., Martin, P. (2011),** Biomarqueurs dans l'insuffisance rénale aiguë, *Rev Med Suisse*, -3, no. 284, 490-494.
- Arkam, (2019)-** Evaluation de la toxicité de l'imidaclopride (insecticide chimique néonicotinoïde) et *metarhizium anisopliae* (bioinsecticide entomopathogène) sur terrain et en conditions contrôlées. *Thèse Doctorat en Biologie. Université de Blida 1, 270p.*
- Atheimine M., Ely S., Mohamed S., Barry, A. et Mounsif B. (2014)** Simulation de traitement en barrière avec *Metarhizium acridum* (green muscle®) contre des larves grégaires du criquet pelerin, *schistocerca gregaria afpp* *Dixième conférence internationale sur les ravageurs en agriculture. Montpellier – 22 et 23 Octobre 2014.*
- Aubrecht, J., Schomaker, S. J., & Amacher, D. E. (2013).** *Emerging hepatotoxicity biomarkers and their potential to improve understanding and management of drug-induced liver injury.* *Genome Medicine*, 5(9), 1. <https://doi.org/10.1186/gm489>
- Augusto Schrank, Marilene Henning Vainstein,** *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins, *Toxicon, Volume 56, Issue 7, 2010, Pages 1267-1274.*
- Ansari, Z., Miller, D., & Galor, A. (2013).** Current thoughts in fungal keratitis: diagnosis and treatment. *Current fungal infection reports*, 7(3), 209-218.

## B

- Barbieri R. T., Croce J., Gandra R. F., Gagete E., Paula C. R., & Gambale W. (2005)** Allergenic extracts from *Metarhizium anisopliae* obtainment and characterization, *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*, 15 (2): 131–139.
- Barnett, L. M. A., & Cummings, B. S. (2018).** Nephrotoxicity and Renal Pathophysiology : A Contemporary Perspective. 164(2), 379–390. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfy159>.
- Benjamin J. Blumberg, Sarah M. Short, George Dimopoulos, (2016) Chapter 15 -** Employing the Mosquito Microflora for Disease Control, Editor(s): Zach N. Adelman, Genetic Control of Malaria and Dengue, *Academic Press, 2016, Pages 335-362*.
- Bennett, AE ; Orrell, P.; Malacrinò, A.; Pozo, MJ** Interactions aériennes-souterraines à médiation fongique: l'approche communautaire, la stabilité, l'évolution, les mécanismes et les applications. Dans l'écologie communautaire aérienne-souterraine. Etudes Ecologiques (Analyse et Synthèse) ; *Ohgushi, T., Wurst, S., Johnson, S., Eds.; Springer : Cham, Suisse, 2018 ; Volume 234, p. 85–116*.
- Benzar A.B. 1999** – Pour comprendre l'immunologie. *Ed. Dés Iris. Paris. 192p*.
- Berkan, T., Üstünes, L., Lermioglu, F., & Özer, A. (1991).** Antiinflammatory, analgesic, and antipyretic effects of an aqueous extract of *Erythraea centaurium*. *Planta medica*, 57(01), 34-37.
- Bidochka, M. J., & Small, C. L. (2005) -** Phylogeography of *Metarhizium*, an insect pathogenic fungus. Insect–fungal associations: ecology and evolution. *Oxford University Press, Oxford, 28-50*.
- Bonifácio P. Magalhães B.P ; Rodrigues J.V . ; Boucias D. ; Childers C.** 2005 Pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* var. *acidum* to the false spider mite *Brevipalpus phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae) *Florida Entomologist* 88(2) 195-198.
- Brunner-Mendoza, C., Guerrero-Guerra, C., Villagómez-Figueroa, O., Navarro-Barranco, H., Pérez-Mejía, A., & Toriello, C. (2022).** A review of described cases of mycotic keratitis and sclerokeratitis related to entomopathogenic fungi from 1984 to 2021. *Journal of Medical Mycology*, 101249.
- Brunner-mendoza, C., Navarro-barranco, H., León, B., Pérez-torres, A., Toriello, C., Navarro-barranco, H., León-, B., Pe, A., & Toriello, C. (2016).** Biosafety of an entomopathogenic fungus *Isaria fumosorosea* in an acute dermal test in rabbits Biosafety of an entomopathogenic fungus *Isaria fumosorosea* in an acute dermal test in rabbits. 9527(July). <https://doi.org/10.3109/15569527.2016.1156122>
- Benserradj.O., (2014) -** Evaluation de *Metarhizium anisopliae* à titre d'agent de lutte biologique contre les larves de moustiques, *Thèse de doctorat, université de Constantine 1, 5p*.
- Brunner-mendoza, C., Reyes-montes, M. R., Bidochka, M. J., & Toriello, C. (2019).** A review on the genus *Metarhizium* as an entomopathogenic microbial biocontrol agent with

emphasis on its use and utility in Mexico microbial biocontrol agent with emphasis on its use and utility. 3157. <https://doi.org/10.1080/09583157.2018.1531111>

**Burgner D., Eagles G., Burgess M., Procopis P., Rogers M., Muir D., Pritchard R., Hocking A. et Priest M., (1998)** Disseminated invasive infection due to *Metarhizium anisopliae* in an immunocompromised child. *J. Clin. Microbiol.* 36: 1146–1150.

**Boldo, J. T., Junges, A., Do Amaral, K. B., Staats, C. C., Vainstein, M. H., & Schrank, A. (2009).** Endochitinase CHI2 of the biocontrol fungus *Metarhizium anisopliae* affects its virulence toward the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus*. *Current Genetics*, 55(5), 551-560.

## C

**Cappa, F., Baracchi, D., & Cervo, R. (2022).** Biopesticides and insect pollinators: Detrimental effects, outdated guidelines, and future directions. *Science of The Total Environment*, 837, 155714. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.155714>.

**Casas, S. (2005).** Modélisation de la bioaccumulation de métaux traces (Hg, Cd, Pb, Cu et Zn) chez la moule, *Mytilus Galloprovincialis*, en milieu méditerranéen. *Thèse : Océanologie biologique, Environnement marin : université du sud Toulon Var*, 363 p.

**Chaouch, A., (2009)** “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 biophysiques”, Thèse Magistère, Ecol. Nat. Sup. Agro, El-Harrach., 107p.

**Chaouch A., (2015)** “Bioécologie du criquet marocain *Dociostaurus maroccanus*, (Thunberg, 1815) (Acrididae, Gomphocerinae) dans la phase grégaire en Algérie et perspectives de lutte biologique”, Thèse Doctorat, Ecol. Nat. Sup. Agro., El-Harrach-Alger, 174 p

**Castro-Vásquez, R. M., Hernández-Villalobos, S., Montero-Astúa, M., Vargas-Martínez, A., González-Herrera, A., & Molina-Bravo, R. (2020).** Identification and molecular characterisation of fifteen tropical isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium*. *Biocontrol Science and Technology*, 30(5), 490–498. <https://doi.org/10.1080/09583157.2020.1732296>

**Cepero de Garcia M.C., Arboleda M.L., Barraquer F. & Grose E. (1997)** Fungal keratitis caused by *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. *J. Med. Vet. Mycol.* 35: 361–363.

**Chandler, D., Bailey, A. S., Mark Tatchell, G., Davidson, G., Greaves, J., & Grant, W. P. (2011).** The development, regulation and use of biopesticides for integrated pest management. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 366(1573), 1987–1998. <https://doi.org/10.1098/rstb.2010.0390>

## D

**Dadoune J-P (1990).** Histologie. Flammarion.

**Driver, F., Milner, R. J., & Trueman, W. H. (2000).** A Taxonomic revision of *Metarhizium* based on sequence analysis of ribosomal DNA. *Mycological Research*, 104(2), 134–150.

**Dominique B. Victor O. and Roy R., 2005.** Use of toxicogenomics for identifying genetic markers of pulmonary oedema- *Toxicology and applied pharmacology*. 204: 101- 108.

**Dgigal, D. (2003).** Interaction entre la communauté microbienne du sol (bactéries et champignons mycorhiziens) et les nématodes bactérivores; effet sur la nutrition minérale et la croissance de différentes plantes. *thèse doctorant . Université Cheikh Anta De Dakar*.

## E

**El-Demerdash FM, Yousef MI, Kedwany FS and Baghdadi HH (2004).** Role of a-tocopherol and b-carotene in ameliorating the fenvalerate-induced changes in oxidative stress, hemato- biochemical parameters and semen quality of male rats. *Journal of Environmental Science and Health B39: 443–459*.

**El-gendy, K. S., Aly, N. M., Mahmoud, F. H., Allah, D. M. A., & El-, A. K. H. (2015).** Hepatotoxicity and Nephrotoxicity in Mice Induced by Abamectin and Ameliorating Effect of Quercetin. *03(06)*, 651–666.

**El-Kadi MK, Xara' LS, De Matos PF, Da Rocha JVN, De Oliveira DP.(1983)** Effects of the entomopathogen *Metarhizium anisopliae* on guinea pigs and mice. *Env Entomol ; 12 : 37 – 42*.

**Engin Sümera, Gözde Erkanli Senturkb, Özlem Unay Demirelc , Erdem Yesiladad ,(2019)** Comparative biochemical and histopathological evaluations proved that receptacle is the most effective part of *Cynara scolymus* against liver and kidney damages. *Journal of Ethnopharmacology*.

## F

**Farag, A. A. G., Ali, S. S., Ibrahim, A. A., & El-Saadany, H. M. (2022).** Acute Oral Toxicity of two Products from a Microbial Pest Control Agent (*Beauveria bassiana*) on Physiological Status Aspects of Male Albino Rats. *Egyptian Journal of Hospital Medicine*, 86(1), 943–951. <https://doi.org/10.21608/EJHM.2022.219968>

**Femenia F., Fontaine J.J., Lair- Fulleringer S., Berkova N., Huet D., Towanou N., Radotovao F., Huet D., Towanou N., Radotovao F., Granet O.I., Loc'h G.L., Arne P. and Guillot J., (2007).** Clinical, mycological and pathological findings in turkeys experimentally infected by *Aspergillus fumigates*. *Avian pathology*. 36(3): 213-9.

**Fleisher L.A., (2012)** – Anesthesia and uncommon Diseases. Sixth edition. *Elsevier Health Science Pp.168*

**Francis P, Navarro VJ.** Drug Induced Hepatotoxicity. [Updated 2022 Mar 18]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557535/>

**Fungaro, M., Vieira, M., Pizzirani-Kleiner, A. and de Azevedo, J. (1996),** Diversity among soil and insect isolates of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* detected by RAPD. *Letters in Applied Microbiology*, 22: 389-392. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.1996.tb01186.x>

**Farag, A. (2022).** Biosafety evaluation of two *Beauveria bassiana* products on female albino rats using acute oral test. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 29(6), 103293. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2022.103293>

**Fabre, M., & Patriarche, C. (1995).** Ponction à l'aiguille fine d'un nodule isolé sur foie cirrhotique. *Revue Francaise des Laboratoires*, 1995(274), 27-31.

## G

**Gabe M. (1968)** Techniques histologiques. *E. Masson, Paris, 1113p.*

**Gebhardt R. (1992)** Metabolic zonation of the liver: regulation and implications for the liver function. *Pharmacol Ther.*; 53:275-354

**Giurfa, M. (2018).** dans un cerveau.

**Goettel M.S., Hajek A.E., Siegel J.P. & Evans H.C. (2001)** Safety of fungal biocontrol agents. In: Butt, T.M., Jackson, C., Magan, N. (Eds.), *Fungi as Biocontrol Agents. CAB International*, pp. 347–375.

**Goettel, M.S., Jaronski, S.T., 1997.** 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. 171: 83–99.*

**Greg S. W., Shih-Wen H. et Nemat D.K. 2005.** Allergens of the entomopathogenic fungus *Beauveria Bassiana*. *Clinical and molecular allergy. Vol 3.*

**Gueguen, Y., Rouas, C., & Leblond, A. (2012).** Les biomarqueurs d'atteinte de Kidney injury biomarkers. 8, 146–155. <https://doi.org/10.1016/j.nephro.2012.02.004>

## H

**Halouane F. (2008)** Recherche fondamentale sur l'entomopathogène *Beauveria bassiana* (Ascomycota : Hypocreales): Bioécologie, production et application sur *Schistocerca gregaria* (Forsk., 1775) et *Locusta migratoria* (Linné, 1758) (Orthoptera, Acrididae). *Thèse Doc, Sci. Agro. Ecol. Nat. Sup. Agro. El-Harrach 190p.*

**Hadj Rabia-Haddaj F. (2014)** Influence de certains paramètres sur la viabilité et le développement de deux champignons entomopathogènes *Beauveria Bassiana* et *Metarhizium anisopliae* var. *acidum*: Effet sur un aspect physiologique de *Schistocerca gregaria*. *Thèse Doc, Sci. Agro., Ecol. Nat. Sup. Agro. El-Harrach 117p.*

**Highleyman L et franciscus A. (2004).** Introduction au foie. *HCSP publications version P: 145-148.*

**HINO, M., NAKAYAMA, O., TSURUMI, Y., ADACHI, K., SHIBATA, T., TERANO, H. & IMANAKA, H. (1985).** Studies of an immunomodulator, swainsonine I. Enhancement of immune response by swainsonine in vitro. *The journal of Antibiotics*, 38(7), 926-935.

**Hokkanen HMT, Hajek AE, editors. 2003** .Environmental impacts of microbial insecticides. *Dordrecht, NL: Kluwer Academic Publishers. pp 35-62.*

## I

**Instanes C., Ward M. D. W. and Hetland G (2006)** The fungal biopesticide *Metarhizium anisopliae* has an adjuvant effect on the allergic response to ovalbumin in mice. *Toxicology Letters. 161 (3): 219–225*

## J

**Jani, B. R., Rinaldi, M. G., & Reinhart, W. J. (2001).** An unusual case of fungal keratitis: *Metarhizium anisopliae*. *Cornea, 20(7), 765-768.*

**J.FARGUES (1), E., & VEY (2), P. H. R. & A. (1985).** *Metarhizium anisopliae*. 30(4), 353–364.

**Jeuge-Maynard I., Karoubi L., Haboury F., Maire P., Houssemaine-Florent H., Ouvrard C., Klinkenberg J. M., Knecht P., Bédard J., Auger P., Boulanger J. C., Faye S., Durand B., ReinNikolaev N., Tamine M., Delacroix F., Charrier A., La Cotardière P., Margotin M., Giraud M., Girerd L., Baladier C., Bardintzeff J. M., Barthélemy G., Cheruette P., Collet J., Costaz G., Eudes M. T., Fortier D., Geoffroy E., Géré F., Grenié M., Laupies F., Lecomte N., Lemaire V., Margotin P., Mathivet E., Morvan P., Mouglin P., Perrichet C., Poirier A., Saffar D., Sanfourche J. P., Watin-Augouard M., Zalkind S., Grosse F., Vaugeois D., Deschenes S., Charniot J. N., Chiesa P., Cuq M. L., Florent J., Grisat C., Olivaux T., Tamisier J. C., Jaspars W., Maljael S., Mouchot M., Pagès C., Biaujeaud M., Goldszal H., Meindl U, (2010)- *Le petit Larousse illustré. Ed., Larousse, Paris, 1782p.***

**Johanna Mayerhofer, Andy Lutz, Francesca Dennert, Stephen A. Rehner, Ryan M. Kepler, Franco Widmer, Jürg Enkerli, (2019)** A species-specific multiplexed PCR amplicon assay for distinguishing between *Metarhizium anisopliae*, *M. brunneum*, *M. pingshaense* and *M. robertsii*, *Journal of Invertebrate Pathology, Volume 161, Pages 23-28.*

**Jones A. L, Spring-Mills.E, (1984)** . «The liver and gallbladder». In *Modern Concepts of Gastrointestinal Histology*, Weiss L.p. 706-748. New York: Elsevier.

**JT Boldo, A. Junges, KB Amaral, CC Staats, MH Vainstein,A.Schrank.(2009).** L'endochitinase CHI2 du champignon de lutte biologique *Metarhizium anisopliae* affecte sa virulence envers la punaise du cotonnier *Dysdercus peruvianus*. *Courant. Genet., 55 (5), p. 551 – 560.*



## K

- Kaya, HK ; Vega, (2012)** portée FE et principes de base de la pathologie des insectes. In *Insect Pathology, 2e éd.; Vega, F., Kaya, H., Eds. ; Academic Press : Londres, Royaume-Uni, ; p. 1–12.*
- Kalra, A., Yetiskul, E., Wehrle, C. J., & Tuma, F. (2018).** Physiology, liver.
- Kernasa, N., Uraichuen, S., & Kamata, N. (2016).** Phylogenetic variation of the green muscadine fungus, *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin, and its virulence to larvae of the sugarcane longhorn stem borer, *Dorystenes buqueti* Guerin (Coleoptera: Cerambycidae). *Agriculture and Natural Resources, 50(6), 427–431.* <https://doi.org/10.1016/j.anres.2016.07.001>.
- Khaldoun-oularbi, H., Allorge, D., Richeval, C., Lhermitte, M., & Djenas, N. (2014).** Emamectin benzoate ( Proclaim ® ) mediates biochemical changes and histopathological damage in the kidney of male Wistar rats ( *Rattus norvegicus* ). *Toxicologie Analytique & Clinique.* <https://doi.org/10.1016/j.toxac.2014.11.002>.
- Kim, S. Y., & Moon, A. (2012).** Drug-Induced Nephrotoxicity and Its Biomarkers. *20(3), 268–272.*
- Kouassi, É., Revillard, J., Fournier, M., Ayotte, P., Roy, R., Brousseau, P., Hadji, L., Kouassi, É., J-p, R., Fournier, M., Ayotte, P., Roy, R., Brousseau, P., Hadji, L., Dewailly, É., Tec, E., Paris, A. V., Kouassi, É., Revillard, J., & Fournier, M. (2003).** Système immunitaire Système immunitaire (pp. 687–698).
- Konstantinovas, C., de Oliveira Mendes, T. A., Vannier-Santos, M. A., & Lima-Santos, J. (2017).** Modulation of human immune response by fungal biocontrol agents. *Frontiers in Microbiology, 8, 39.*
- Krutmuang, P., & Mekchay, S. (2005).** Pathogenicity of entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* against termites. In *Conference on International Agricultural Research for Development. Stuttgart-Hohenheim (pp. 1-4).*
- Kumar, J., Ramlal, A., Mallick, D., & Mishra, V. (2021).** An overview of some biopesticides and their importance in plant protection for commercial acceptance. *Plants, 10(6), 1–15.* <https://doi.org/10.3390/plants10061185>.
- Kumar S. (2004)** - Occupational exposure associated with reproductive dysfunction. *J. Occup. Health. 46 (1) : 1-19.*

## L

- Lacour B. 2013.** Physiologie du rein et bases physiopathologiques des maladies rénales. *Revue Francophone Des Laboratoires (451) : 25–37.*

**Larki, R. A., Zayerzadeh, E., Harzandi, N., & Anissian, A. (2019).** Toxicological examinations following oral administration of bacillus thuringiensis var kurstaki biological insecticide in wistar rats. *Journal of Applied Biotechnology Reports*, 6(1), 34–39. <https://doi.org/10.29252/JABR.06.01.06>.

**Larrey, D., Ursic-Bedoya, J., & Meunier, L. (2017).** Drug-induced hepatotoxicity. *Schiff's Diseases of the Liver*, 740-773.

**Lemos, A. J. J. M., Siqueira, H. A. A., Wanderley-Teixeira, V., Maia, F. C. L., Teixeira, Á. A. C., Silva, E. J., & Oliveira, J. V. (2013).** Effect of sub-lethal doses of Bacillus thuringiensis subsp. Aizawai and deltamethrin with regard to fertility and organ toxicity in pregnant albino rats. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 65(5), 489–495. <https://doi.org/10.1016/j.etp.2012.02.004>

**Liu BL, Tzeng YM,** Développement et applications des destruxines : *Une revue. Biotechnol. Adv.* 2012 ; 30 :1242–1254. doi : 10.1016/j.biotechadv.2011.10.006.

**Lucy Meunier, Dominique Larrey, (2018)** -Nouveautés dans les biomarqueurs de l'hépatotoxicité des médicaments et des plantes médicinales. *HEPATO \_ GASTRO et Oncologie digestive*, (25), 570-579.

## M

**Malacrinò, A.; Campolo, O.; Médine, RF ; Palmeri, V.** Différenciation associée au stade et à l'hôte des communautés bactériennes chez la mouche méditerranéenne des fruits *Ceratitis capitata*. *PLoS ONE* 2018 , 13 , e0194131.

**Mancebo, A., González, F., Aldana, L., González, Y., & Lugo, S. (2009).** Toxicological & Environmental Chemistry Pathogenicity of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* 9205 in rats using different routes of exposition. *January 2015*, 37–41. <https://doi.org/10.1080/02772240802010524>

**Marrone, P. G. (2019).** Pesticidal natural products – status and future potential. *Pest Management Science*, 75(9), 2325–2340. <https://doi.org/10.1002/ps.5433>

**Mayerhofer, J., Lutz, A., Dennert, F., Rehner, S. A., Kepler, R. M., Widmer, F., & Enkerli, J. (2019).** A species-specific multiplexed PCR amplicon assay for distinguishing between *Metarhizium anisopliae*, *M. brunneum*, *M. pingshaense* and *M. robertsii*. *Journal of invertebrate pathology*, 161, 23-28.

**Magalhães, B. P., Rodrigues, J. C., Boucias, D. G., & Childers, C. C. (2005).** Pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* to the false spider mite *Brevipalpus phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae). *Florida Entomologist*, 88(2), 195-198.

**Martoja R. & M. Martoja,(1967).** Initiation aux Techniques de l'Histologie animale. 345p. Paris: Masson.

**Meunier, L., & Larrey, D. (2018).** Advances in biomarkers of hepatotoxicity of drugs and herbal medicines. *Hepato-Gastro et Oncologie Digestive*, 25(6), 570–579. <https://doi.org/10.1684/hpg.2018.1630>.

- Meunier, L., & Larrey, D. (2019).** Drug-induced liver injury: Biomarkers, requirements, candidates, and validation. *Frontiers in Pharmacology*, *10*(December), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01482>.
- Meyling, N. V., & Eilenberg, J. (2007).** Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: Potential for conservation biological control. *Biological Control*, *43*, 145–155. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2007.07.007>.
- Monti, M. (2013).** Vieux et nouveaux biomarqueurs inflammatoires : quelle utilité pour. *Med Suisse*, *1*(404), 2008–2011.
- Muir D, Martin P, Kendall K, Malik R.(1998)** Invasive hyphomycotic rhinitis in a cat due to *Metarhizium anisopliae* . *Med Mycol* 1998; 36 : 51 – 54.
- Musser, FR; Nyrop, JP; Shelton, (2006)** *AM Intégration des contrôles biologiques et chimiques dans la prise de décision : contrôle de la pyrale du maïs européen (Lepidoptera : Crambidae) dans le maïs doux, par exemple. J. Econ. Entomol., 99 , 1538–1549.*
- Mier, T., Olivares-Redonda, G., Navarro-Barranco, H., Pérez-Mejía, A., Lorenzana, M., Pérez-Torres, A., & Toriello, C. (2005).** Acute oral intragastric pathogenicity and toxicity in mice of *Paecilomyces fumosoroseus* isolated from whiteflies. *Antonie Van Leeuwenhoek*, *88*(2), 103-111.

## N

- Naimi, M. S. Al, Rasheed, H. A., & Hussien, N. R. (2019).** Nephrotoxicity : Role and significance of renal biomarkers in the early detection of acute renal injury. 95–99. <https://doi.org/10.4103/japtr.JAPTR>
- Navarro-Barranco, H., Brunner-Mendoza, C., Del Rocío Reyes-Montes, M., Duarte-Escalante, E., & Toriello, C. (2019).** Phenotypic and molecular analysis of Mexican *Metarhizium anisopliae* strains. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, *90*, 9. <https://doi.org/10.22201/ib.20078706e.2019.90.2643>
- Newland N. and Richter A. 2008** – Agents associated with lung inflammation induces similar responses in NCI-H292 lung epithelial cells . *Toxicology in vitro* *22* (7), 1782-1788.
- Nicolai V. Meyling, Jørgen Eilenberg,** Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: Potential for conservation biological control, *Biological Control*, *Volume 43*, *Issue 2*, 2007, *Pages 145-155*.
- Nodirbek, 2019**-Novacrid TC (*Metarhizium acridum* EVCH 077) against harmful locusts in pastures of the Republic of Uzbekistan. Locust and grasshopper management and control *13th international congress of arthropology Agadir Morocco 24-28 Mars 2019 Abstract book pp98-99*.
- Nourrisson, C., Dupont, D., Lavergne, R. A., Dorin, J., Forouzanfar, F., Denis, J., Weeks, K., Joubert, R., Chiambaretta, F., Bourcier, T., Roux, S., Sénéchal, A., Benaïm, G., Wallon, M., Candolfi, E., Letscher-Bru, V., Poirier, P., & Sabou, M. (2017).** Species of

*Metarhizium anisopliae* complex implicated in human infections: retrospective sequencing study. *Clinical Microbiology and Infection*, 23(12), 994–999. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.05.001>.

## O

**Oltmanns U., Chung K.F. Walters M., John M. and Michell J.A. (2005)** - Cigarette smoke induces IL-8 but inhibits eotaxin and RANTES release from airway smooth muscle. *Respiratory Research* 6: 74.

**Osorio S, de la Camara R, Monteserin MC. (2007)** Recurrent disseminated skin lesions due to *Metarhizium anisopliae* in an adult patient with acute myelogenous leukemia. *J Clin Microbiol* ; 45 : 651 – 655.

## P

**Pelley, J. W. (2011)**. Elsevier's Integrated Review Biochemistry E-Book: With STUDENT, CONSULT Online Access.

**Pflanz, S., Hibbert, L., Mattson, J., Rosales, R., Vaisberg, E., Bazan, J. F., Phillips, J. H., McClanahan, T. K., de Waal Malefyt, R., and Kastelein, R. A. (2004)** WSX-1 and glycoprotein 130 constitute a signal-transducing receptor for IL-27. *J Immunol* 172, 2225-2231.

**Pedras MSC, Zaharia LI, Ward DE.** Les destruxines : synthèse, biosynthèse, biotransformation et activité biologique. *Phytochimie*. (2002) ; 59 : 579–596. doi : 10.1016/S0031-9422(02)00016-X

## R

**Rachel.T. Pharmacist, Bpharm, Msc Unité Hospitalière De Recherche Et D'enseignement VIH/Sida Centre Hospitalier De l'Université De Montréal. (2009).**

**Radhika P. and Kaliwal BB., (2001)** - Monocrotophos induced dysfunction on estrous cycle and follicular development in mice. *Ind. Health* 40: 237- 244.

**Rajesh A. et Bhupendra N. T (2010)** , Cytokine profile and cytotoxicity in response to acute intratracheal dose of *Metarhizium anisopliae* in BALB/c mice 48, 1039–1048.

**Revankar S.G., Sutton D.A., Sanche S.E., Rao J., Zervos M., Dashti F. & Rinald M.G. (1999)** *Metarhizium anisopliae* as a cause of sinusitis in immunocompetent hosts. *J. Clin. Microbiol.* 37:195–198.

**RM Castro-Vásquez, S Hernández-Villalobos, M Montero-Astúa, A Vargas-Martínez, A González-Herrera, R Molina-Bravo.(2000)**. Identification and molecular characterisation of fifteen tropical isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium*. *Biocontrol science and technology* 30 (5), 490-498.

**Roberts, D. W., & St. Leger, R. J. (2004)**. *Metarhizium* spp., cosmopolitan insect-pathogenic fungi: Mycological aspects. *Advances in Applied Microbiology*, 54, 1–70. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(04\)54001-7](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(04)54001-7).

**Rusyn, I., Arzuaga, X., Cattley, R. C., Corton, J. C., Ferguson, S. S., Godoy, P., Guyton, K. Z., Kaplowitz, N., Khetani, S. R., Roberts, R. A., Roth, R. A., & Smith, M. T. (2021).** Key Characteristics of Human Hepatotoxicants as a Basis for Identification and Characterization of the Causes of Liver Toxicity. *In Hepatology (Vol. 74, Issue 6, pp. 3486–3496)*. <https://doi.org/10.1002/hep.31999>.

**Ruiu, L. (2018).** *Microbial biopesticides in agroecosystems. Agronomy*, 8(11), 235.

## S

**Samuel Robin. (2006)** . De l'épizootie à la zoonose : l'angoisse de la transmission des maladies animales contagieuses à l'homme, *Annales de Bretagne et des Pays de l'Ouest*.113-1.

**Sayed, S., El-saadany, H. M., Kotb, G. A. M., Elshaer, N., Melebary, S. J., Soliman, S. M., & Gh, A. A. (2022).** *Saudi Journal of Biological Sciences Biosafety evaluation of two Beauveria bassiana products on female albino rats using acute oral test. Saudi Journal of Biological Sciences*, 29(6), 103293. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2022.103293>

**Serna-Domínguez, M. G., Andrade-Michel, G. Y., Rosas-Valdez, R., Castro-Félix, P., Arredondo-Bernal, H. C., & Gallou, A. (2019).** Genetic diversity of the *Metarhizium anisopliae* complex in Colima, Mexico, using microsatellites. *Fungal biology*, vol123 no(12), p 855-863.

**Suriyavadhana M et Tpakutharivu P (2011).** Evaluation of Acute and Sub-Acute Toxicity of Ethanol Extracts of *Entada pursaetha*, *Toddalia aculeata*, and *Ziziphus mauritiana*. *World J Life Sci. and Medical Research*, 1(2): 43-47.

**Schnackenberg, L., Yang, X., & Salminen. (2012).** Current and emerging biomarkers of hepatotoxicity. *Current Biomarker Findings*, 43. <https://doi.org/10.2147/cbf.s27901>.

**Shadduck J.A., Roberts D.W., Lause S. (1982)** Mammalian safety tests of *Metarhizium anisopliae*: preliminary results. *Environ. Entomol.* 80: 189–192.

**Sherwood ; (2006),** *physiologie humaine 2ème édition ; De Boeck et Larcier, s.a ; p 406-430.*

**Siegel J.P. (1997)** Testing the pathogenicity and infectivity of entomopathogens to mammals. In: Lacey, L.A. (Ed.), *Manual of Techniques in Insect Pathology. Academic Press, San Diego. pp. 325–336.*

**Srinivasan, R., Sevgan, S., Ekesi, S., & Tamò, M. (2019).** Biopesticide based sustainable pest management for safer production of vegetable legumes and brassicas in Asia and Africa. *Pest Management Science*, 75(9), 2446–2454. <https://doi.org/10.1002/ps.5480>.

**Stone, L. B., & Bidochka, M. J. (2020).** The multifunctional lifestyles of *Metarhizium*: evolution and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(23), 9935–9945. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10968-3>.

**Sudakin DL.** *Biopesticides. Toxicol Rev.* 2003; 22(2):83-90.

**Schrank, A., & Vainstein, M. H. (2010).** *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins. *Toxicon*, 56(7), 1267-1274.

**Sümera E, Gözde Erkanli Senturkb, Özlem Unay Demirelc , Erdem Yesiladad ,(2019) -** Comparative biochemical and histopathological evaluations proved that receptacle is the most effective part of *Cynara scolymus* against liver and kidney damages. *Journal of Ethnopharmacology*.

## T

**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., 2008** Particulate matter exposure induces persistent inflammation and endothelial dysfunction. *Am. J. Physiol. Lung cell Mol Physiol.* 295: L79- L85.

**Tanwar, R. S., Dureja, P., & Rathore, H. S. (2012).** Biopesticides. In *Pesticides: Evaluation of Environmental Pollution (Vol. 22, Issue 2, pp. 587–603)*. <https://doi.org/10.1201/b11864>

**Thomas, PA . Kaliamurthy, J. (2013)** Mycotic keratitis: epidemiology, diagnosis and management, *Clinical Microbiology and Infection, Volume 19, Issue 3, 2013, Pages 210-220*.

**Toriello C., Perez-Torres A., Burciaga-Diaz A., Navarro-Barranco H., Perez-Mejia A., Lorenzana-Jimenez M. & Mier T. (2006)** Lack of acute pathogenicity and toxicity in mice of an isolate of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* from spittlebugs. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* 65:278-287.

**Thakore, Y. (2006).** The biopesticide market for global agricultural use. *Industrial Biotechnology*, 2(3), 194-208.

**Temiz, Ö. (2020).** Biopesticide emamectin benzoate in the liver of male mice: evaluation of oxidative toxicity with stress protein, DNA oxidation, and apoptosis biomarkers. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(18), 23199-23205.

**Therrien R.,(2009).**Hépatotoxicité/ tibotec, une division de janssen-ortho Inc.

## V

**Vestergaard S , Cherry A ,Keller S& Goettel M ,(2003).**Safety of hyphomycete fungi as microbial control agents. *Environmental impacts of microbial insecticides*, 35-62.

## W

**Ward M.D.W., Chung Y. J., Copeland L.B. and Doerfler D.L. (2011)** Allergic Responses Induced by a Fungal Biopesticide *Metarhizium anisopliae* and House DustMite Are Compared in a Mouse Model.

**Ward, M. D. W., Chung, Y. J., Haykal-Coates, N., & Copeland, L. B. (2009).** Differential allergy responses to *Metarhizium anisopliae* fungal component extracts in BALB/c mice Allergy-like responses to fungal components. *Journal of Immunotoxicology*, 6(1), 62–73.

**Wirth, S. J and Wolf, G.A. (1990):** Dye-labelled substrates for the assay detection of chitinase and lysosyme activity *Journal of Microbiol Methods* 12: 197 – 205.

**Ward MDW., Madison SL., Sailstad DM., Gavett SH. & Selgrade MJK. (2000)** Allergen-triggered airway hyperresponsiveness and lung pathology in mice sensitized with the biopesticide *Metarhizium anisopliae*. *Toxicology*. 143:141-154.

**Wang, C., & St. Leger, R. J. (2005).** Developmental and transcriptional responses to host and nonhost cuticles by the specific locust pathogen *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. *Journal Eukaryotic Cell*, 4(5), 937-947.

**Wang, C., Skrobek, A., & Butt, T. M. (2004).** Investigations on the destruxin production of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Journal of invertebrate pathology*, 85(3), 168–174. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2004.02.008>.

## Y

**Yin, F., Xiao, M., Berestetskiy, A. et Hu, Q. (2021).** La toxine de *Metarhizium anisopliae* , la destruxine A, interagit avec les protéines SEC23A et TEME214 de *Bombyx mori* . *Journal des champignons (Bâle, Suisse)*, 7 (6), 460.

**Yousef M.I. (2004)** Aluminium-induced changes in hemato-biochemical parameters, lipid peroxidation and enzyme activities of male rabbits: protective role of ascorbic acid. *Toxicology*. 199: 47-57.

## Z

**Zakaria O. et Sagnia S.B. (2003)** Lutte intégrée contre les sauteriaux et les locustes: importance du biopesticide Green Muscle. *Bulletin trimestriel d'information du Centre Régional AGRHYMET, Niamey, Niger*, 5 (3), 16p.

**Zimmermann, G. (1993).** The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and its potential as a biocontrol agent. *Pesticide Science*, 37(4), 375–379. <https://doi.org/10.1002/ps.2780370410>.

**Zimmerman,H.J.,& Lewis,J.H.(1995).** Chemical-and toxin-induced hepatotoxicity. *Gastroenterology Clinics of North America*, 24(4), 1027-1045.

**Zimmermann G. (2007)** *Review on Safety of the Entomopathogenic Fungus Metarhizium anisopliae. Biocontrol Science and Technology 17: 879\_920.*

**Zulia, U., Eugenia, M., José, D., & Científica, R. (2011).** DEL HONGO ENTOMOPATÓGENO *Beauveria bassiana* EN RATONES Dermal Pathogenicity of an Autochthonous Isolate of Entomopathogenic.

**Zulfiana, D. (2014).** Pengujian toksisitas akut oral dan dermal pada biolarvasida *Metarhizium anisopliae* terhadap tikus putih *Sprague Dawley*. *Al-Kauniyah, 7(1), 1-8.*

**Site :**

**À ce jour, 16 pesticides de *M. anisopliae* sont enregistrés en Chine continentale** (China Pesticide Information Network. *Disponible en ligne : <http://www.chinapesticide.org.cn/hysj/index.jhtml>, consulté le 7 avril 2021*),



## Annexe I

**Tableau I.1 :** liste de quelque marqueur de néphrotoxicité selon leur structure rénale cible (Kim & Moon, 2012)(modifié).

Segment du néphron	Biomarqueur
<i>Glomérule</i>	Protéinurie Albumine, Transferrine, Immunoglobuline G, $\beta$ 2- microglobulin, $\alpha$ 1 -microglobulin, Cystatin C, Rétinol binding protein Cytokines Interférons, Interleukine, TNF, CSFs Type IV collagène
<i>Tube proximal</i>	Urinary proteins with enzymatic activity $\alpha$ - GST, N-Acetyl-D-Glucosaminidase, Protéinurie Albumine, Transferrine, Immunoglobuline G, $\beta$ 2-microglobulin, $\alpha$ 1 -microglobulin, Cystatin C Rétinol binding protein Cytokines Interférons, Interleukine, TNF, CSFs KIM-1, NGAL, Clusterin, Osteopontin
<i>Tube distal</i>	NGAL, Clusterin, Osteopontin

# Annexe I

**Tableau I. 2 :** Objectifs et limites des nouveaux biomarqueurs( Teschke et al ., 2017 ; Meunier & Larrey, 2018).

Objectif du biomarqueur	Biomarqueurs	Détection	Limites du biomarqueur
Détection précoce	Cytokératine 18 Micro-ARN 122 Total HMGB1 GLDH	Nécrose hépatocytaire	– Manque d'information concernant la spécificité et la sensibilité pour les hépatites idiosyncrasiques – Non hépato-spécifique sauf micro-ARN 122
	Cytokératine 18	Apoptose	– Non hépato-spécifique – Avantage non démontré
	Micro-ARN 122 Micro-ARN 192 HMGB1 MCSFR1	Lésion hépatique non spécifique Activation système immunitaire	– Micro-ARN 192 – Non spécifique de la lésion hépatique – Nécessite une spectroscopie de masse
Pronostic/progression	HMGB1 MCSFR1 Ostéopontine Cytokératine 18 Acides biliaires	Risque de progression	– Avantage indéterminé comparé à ALT et bilirubinémie totale pour hépatite grave
Hépatite toxicité directe	Cytokératine 18, HMGB1, Toxicité hépatique directe Micro-ARN 122, GLDH		– Les hépatites de mécanisme de toxicité directe sont souvent détectées au cours de la phase préclinique et donc rares dans les essais cliniques

## Annexe II

La composition des milieux de cultures :

### *1. 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.

### *2. Milieu MALT :*

- 20 g d'extrait de MALT
- 20 g de gélose
- 1000 ml d'eau distillé.

**Tableau II. 2** : les différents matériel utilise lors de notre expérimentation

réactifs	Appareillages	Autre matériel
- Colorants,	- Etuve	- Sonde de gavage
- Eau distille stérile	- Balance électronique	- Biberons / Porte lame
- Eau physiologique,	- Centrifugeuse	- Cages en plastiques
- Alcool	- Balance de précision	- Lame lamelle
- Chloroforme	- Microtome	- Boite de petrie
- Xylène, éosine,	- Microscope photonique	- parafilm/ Micropipette
- Agar agar,	- Bain marie	- Verreries de
- PDA,	- Platine de refroidissement	laboratoire (bécher,
- Malt,	- Plaque chauffante	éprouvette gradue, cuillère
- Gasoil	- Autoclave	entonnoir passoire...)
- HE	- Agitateur magnétique	- Moules en métal
- Formol	- Microtome	- Portes lames cassettes
		- Tube héparines et EDTA
		- Parafilm / cassette
		- Seringues / Flacons
		- Trousse de dissection

## Annexe II



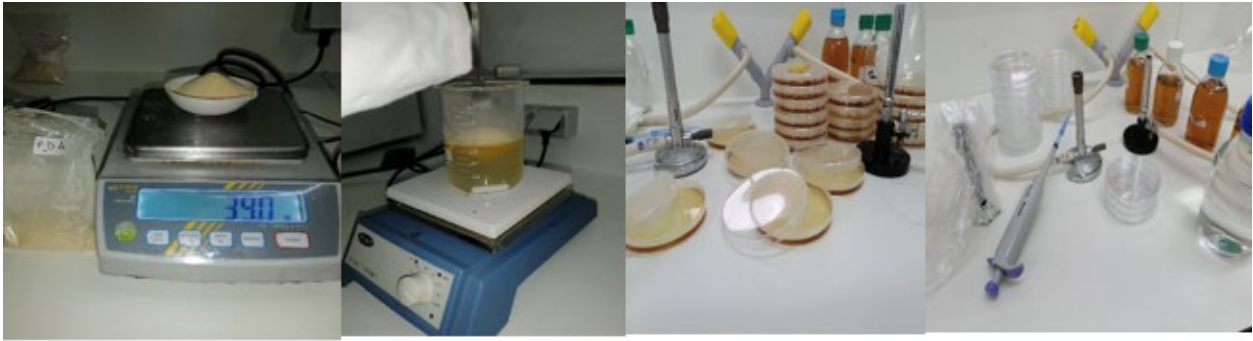
**Figure II.31** : quelques matériel utilisée lors de notre expérimentation.(original)

(1) Poudre agar agar, (2) auto-clave, (3) microscope optique, (4) poudre PDA, (5) cage, (6) sonde de gavage.

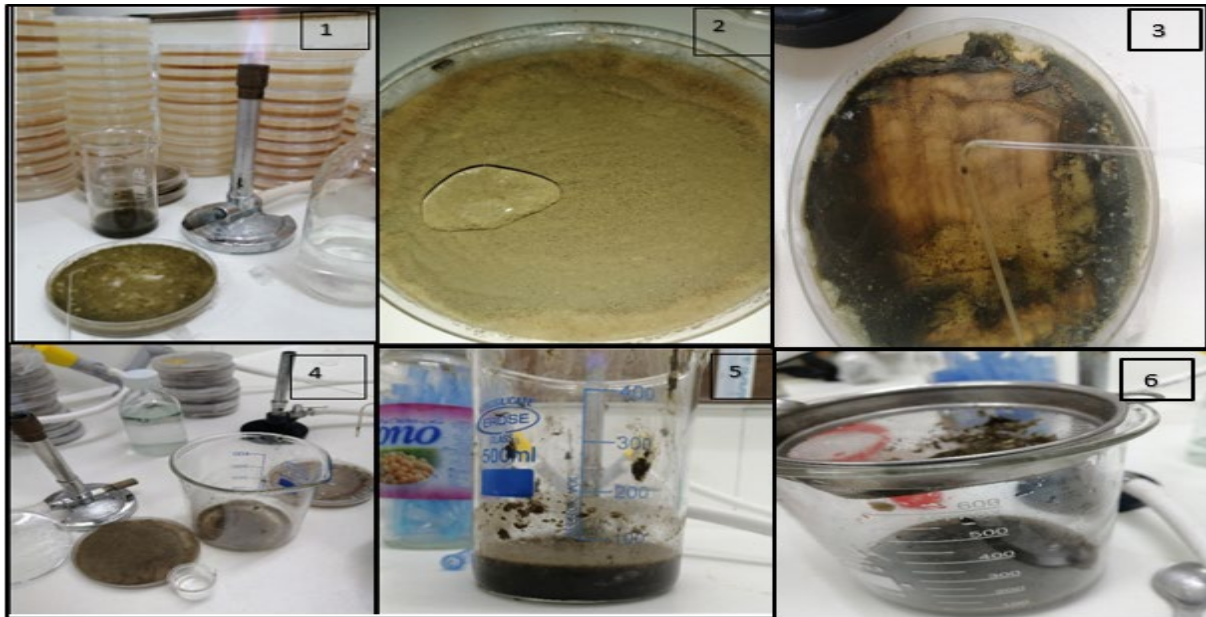


**Figure II.32** : les différent étapes de préparation de notre solution à partir de poudre du biopesticide

## Annexe II



**Figure II.33** : les étapes de préparation de milieu de culture.



**Figure II.34** : les différentes étapes de récupération de spores à partir des souches incubées.



**Figure III.35** : les différentes étapes de réalisation des coupes histologiques du foie et du rein.

## Annexe II



**Figure II.36:** répartition des 3 lots de rats Wistar

### Composition du bouchon alimentaire :

**Tableau II. 3 :** composition du bouchon alimentaire

Constituant	Quantité
Vitamine A	1000 u/kg
Vitamine E	6 mg/kg
Vitamine D3	120,0 u/kg
Protéines brutes	15,00%
Matière grasse brute	2,5%
Cendres brute	10%
Cellulose brutes	12%
Humidité	14%



**Figure II. 37 :** information sur le bouchon alimentaire (original).

## Annexe II

### ➤ Description de cellule de *malassez* :

#### a) Définition :

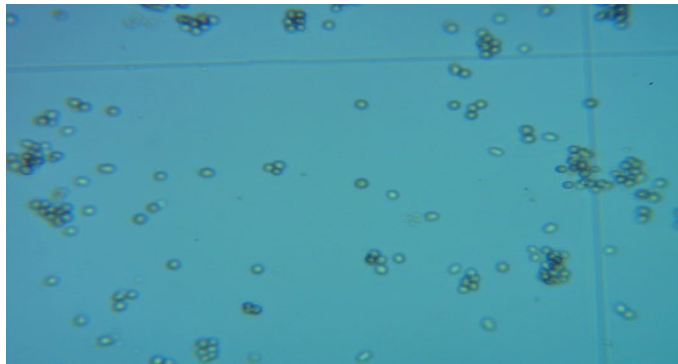
Les cellules de Malassez et de Thoma sont des lames de verre présentant un quadrillage permettant le comptage de cellules vivantes en suspension dans une solution à forte densité cellulaire.

#### b) Principe:

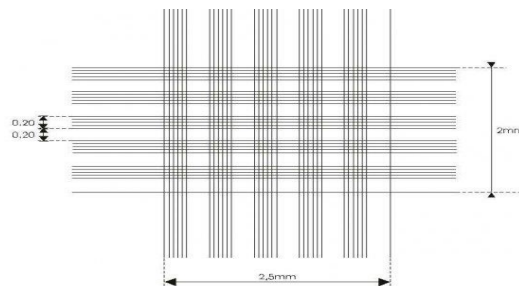
On dépose, entre la cellule et lamelle, une goutte de l'échantillon, dilué ou non, puis on compte dans le quadrillage (volume précis) les éléments voulus.

#### c) Description:

- Le quadrillage total a un volume de 1  $\mu\text{l}$ .
- Dimensions : L : 2,5 mm, l : 2 mm, H (ou profondeur) : 0,20 mm.
- Constitué de 100 rectangles d'égales surfaces.



**Figure II. 38** : l'aspect microscopique des spores sur la cellule de malassez ( $G \times 100$ ) (avec zoom)(original).



**Schéma de la cellule de malassez**

## Annexe II

**Tableau II. 4 :** Dénombrement des spores de *M. anisopliae* pour la détermination de la concentration de la solution mère

Sporulation	1 <sup>ER</sup> Prélèvement	2 <sup>ème</sup> Prélèvement
1	149	191
2	162	152
3	145	158
4	150	171
5	135	142
6	131	155
7	152	166
8	121	163
9	142	156
10	144	146



## Annexe II

**Tableau II.5 :** Dénombrement des spores de *M. anisopliae* pour la détermination de la concentration de la solution mère de l'effet par injection.

Sporulation	Prélèvement 1	Prélèvement 2	Prélèvement 3	Prélèvement 4	Prélèvement 5	Prélèvement 6
1	149	191	125	125	114	137
2	162	152	131	132	120	162
3	145	158	120	147	126	137
4	150	171	132	144	145	131
5	135	142	139	133	113	128
6	131	155	129	131	129	134
7	152	166	129	140	114	140
8	121	163	122	143	106	149
9	142	156	131	138	105	130
10	144	146	125	134	119	133

### Exemple méthode de calcul des concentrations :

Soit la moyenne du poids corporel de 5 rats mis dans une même cage (lot 2 traité avec le champignon mis en culture) est égale 108,46 g.

**1 ml de solution mère  $\rightarrow 6 \times 10^8$  de spores**

On ajuste notre volume à prélever selon la moyenne des poids corporelles des rattes traitées

**1ml de solution mère  $\rightarrow 250g$  de poid corporelle**

**... .. ml  $\rightarrow 118, 46$  g**

**Le volume prélevé de la solution de traitement = 0, 47 mL de solution mère**

On complète ce volume avec de l'eau distillée stérile (+0, 53) jusqu'à 1 mL. Cela pour un rat

Pour préparer une solution de traitement suffisantes pour les 5 rats (de 10 ml : en excès) :

$$0,47 \times 10 = 4,7 \text{ mL}$$

On prélève 4.7 ml de la solution mère, ce volume est à compléter jusqu'à 10 ml avec de l'eau distillée stérile.

Nous avons préparé les solutions de gavage à un volume suffisant pour une durée de 5 jours

## Annexe II

$$4, \times 5 = 23, 5 \text{ mL}$$

On prélève **23,5 mL** de solution mère de spores germée, ce volume est à compléter jusqu'à **50 mL** avec de l'eau distillée stérile. La solution de traitement est conservée à 4°C

**Tableau II. 6 :** les doses requise pour l'inoculation orale des rats.

Pour une concentration de $6 \times 10^8$ /ml / 250g de poids corporel	DOSE 1	DOSE2	Dose 3
<i>Culture</i>	4.7 mL de solution mère pour 10 mL	5.44 mL de solution mère pour 10mL	6 ml de solution mère pour 10 mL
<i>Biopesticide</i>	0.52 g pour 100 mL	0.61 g pour 100 mL	0.68 pour 100 mL

### Fiche technique du test de germination :

- Peser 0,2g des spores en poussière de Novacrid® 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 mLde 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. 2×2cm), le placer sur une lame, ajouter une goutte d'huile d'immersion et poser une lamelle.

## Annexe II

- 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 :

$$TG = \frac{a \times 100}{(a+b)} \quad \text{(Équation 6)}$$

**a** : nombre de spores ayant germé

**b** : nombre de spores n'ayant pas germée

### FICHE TECHNIQUE NOVACRID® :

- Produit à utiliser NOVACRID® ( $5 \times 10^{10}$  conidies/g), une poudre fine de couleur verte marine sans odeur particulière, la durée de stockage est >5 ans à 4°C, il est incompatible avec la plupart des fongicides.



*Metarhizium acridum* (souche EVCH077)

AGENT BIOLOGIQUE CONTRE LES CRIQUETS

#### **1 Information Générale :**

- **Nom et adresse du fabricant:** Eléphant Vert Maroc SA, Agropolis GI5-GI6

## Annexe II

- **Commune rurale :** de Mejjate, 50122 Meknès, Maroc.
- **Nom commercial du produit:** NOVACRID®
- **No. CIPAC:** Pas encore attribué
- **Catégorie d'usage:** Biopesticide (acridicide)
- **Ravageurs cibles:** Les criquets de l'infraordre Acrididea (Orthoptera)
- **Cultures:** Toutes cultures attaquées par les criquets
- **Type de formulation:** TC
- **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).

### **2 Formulation et matière active**

- **Matière active : Matériel biologique**

Essai avec le biopesticide NOVACRIDE® *Metarhizium anisopliae* var. *acidum* (souche EVCH077)

- **Nom scientifique :** *Metarhizium acidum* souche EVCH077 (Ascomycota : Hypocreales : Clavicipitaceae)
- **Stade de développement :** Conidies (spores).
- **Provenance :** Le Bénin
- **Nature de l'organisme :** L'organisme est 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. acidum* a développé une autre stratégie pour tuer son hôte et dans le processus a perdu les gènes pour la synthèse de toxines.
- **Apparence :** Poudre à couleur vert marin.

### **3 Méthode d'analyse :**

- Culture sur milieu artificiel et examen des structures sporogènes afin de vérifier l'identité du champignon.
- Analyse d'ADN et/ou d'isozymes afin de vérifier la souche (marqueur disponible)

## Annexe II

- Contenu en matière active :  $5 \times 10^{10}$  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  $\mu$ m
- **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.
- 2.10. Compatibilité avec d'autres pesticides : Matière active est tuée
- Par la plupart des fongicides mais elle est compatible avec certains pesticides utilisés dans la lutte antiacridienne, par ex. les pyréthrinoïdes.
- **Stabilité en stockage** : Des données expérimentales montrent que des conidies sèches ( $\leq 5\%$  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, basés sur des données expérimentales extensives (Hong et al., 1998, Annals of Botany, 81: 625-630), 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 peuvent être attendue à des températures de nuit/jour de  $20 - 30^\circ\text{C}$  et approximativement 6 mois sous un régime de  $30 - 40^\circ\text{C}$ .
- **Formulation** : Le produit n'est pas formulé (TC) donc doit être mélangé avec de l'huile avant épandage.

## Annexe II



**Figure II.39** : dissection du rats wistar

### Dosage biochimique :

**Tableau II.7** : Les réactifs du dosage de l'urée

Réactif	composition
<b>R1</b>	- Uréase 30000 U/L -Tampon phosphates pH 6,7 50 mmol/L -EDTA 2mmol/L
<b>R2</b>	- Salicylate de sodium 400 mmol/L -Nitroprusiate de sodium 10 mmol/L -Hypochlorite de sodium 7 mmol/L -Hydroxyde de sodium 62 mmol/L
<b>Étalon</b>	- Patron Primaire de détection d'urée 50 mg/dl

**Tableau II .8** : Les réactifs du dosage de la créatinine

Réactif	composition
<b>R1</b>	- Acide picrique 38,2 mmol/L -Tampon non réactif
<b>R2</b>	- Hydroxyde de potassium 900 mmol/L -Phosphate 135 mmol/L -Conservateur -Stabilisateur
<b>Étalon</b>	Créatinine aqueuse 20mg/L

## Annexe II

**Tableau II.9 :** Les réactifs du dosage de l'aspartate amino- transférase (A.S.A.T)

Réactifs	Composition
<b>R1</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- TRIS Ph 7,880 mmol/l</li> <li>- L-aspartate 200 mmol/l</li> </ul>
<b>R2</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- NADH 0,18 mmol/l</li> <li>- Lactate déshydrogénase (LDH) 800 UI/L</li> <li>- Malate déshydrogénase (MD 600 UI/L)</li> <li>- <math>\alpha</math>-Cetoglutarate 12 mmol/l</li> </ul>

**Tableau II.10 :** Les réactifs du dosage de l'alanine amino-transférase (A.L.A.T.)

Réactifs	Composition
<b>R1</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- TRIS Ph 7,8100 mmol/l</li> <li>- L-alanine 500 mmol/l</li> </ul>
<b>R2</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- NADH 0,18 mmol/l</li> <li>- Lactate déshydrogénase (LDH) 1200 U/l</li> <li>- <math>\alpha</math>-Ceyoglutarate 15 mmol/l</li> </ul>

**Tableau II.11 :** Les réactifs du dosage de la Phosphatase alcaline

<b>Réactif : Tampon</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <b>Diéthanolamine (DEA) Ph 10,4</b></li> <li>- <b>Chlorure de Magnésium</b></li> </ul>	<p>1 mmol/L</p> <p>0,5 mmol/L</p>
<b>Réactif : Substrat</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- P-Nitrophénylphosphate (pnPP)</li> </ul>	

**Bilan hématologique :**

**Formule Numération Sanguine(FNS) :**

## **Annexe II**

L'hémogramme a été réalisé par un automate, C'est un appareil qui permet la numération des éléments figurés du sang par impédance, la mesure du taux d'hémoglobine par spectrophotométrie et le calcul des constantes Erythrocytaires.

Hématocrite=volume globulaire moyen x nombre de globules rouges



### Annexe III

**Tableau II.12** : l'évolution du poids corporel par intervalle de 5 jours chez les rats *wistar* femelles.

	Rat 1	Rat 2	Rat 3	Rat 4	Rat 5	Total\5
<b>20/03/2022</b>						
Lot témoin	122,2 g	116,2 g	110,7 g	117,7 g	100,7 g	113,5 g
Lot culture	132 g	119,7g	103,7	121,7	110,7 g	118,46 g
Lot biopesticide	104,2 g	115,7 g	107,7 g	100,7 g	110,7 g	107,8 g
<b>26/03/2022</b>						
Lot témoin	141 g	136 g	119 g	128 g	122 g	129,2 g
Lot culture	131 g	137 g	141 g	150 g	121 g	136 g
Lot biopesticide	134 g	116 g	138 g	126 g	126 g	128 g
<b>31/03/2022</b>						
Lot Témoin	140 g	146 g	159 g	139 g	161 g	149 g
Lot culture	152 g	163 g	152 g	144 g	140 g	150,2 g
Lot biopesticide	135 g	124 g	150 g	136 g	158 g	140,2 g
<b>12/04/2022</b>						
Lot témoin	205 g	172 g	195 g	177 g	169 g	183,6 g
Lot culture	175 g	180 g	176 g	183 g	170 g	176,8g
Lot biopesticide	159 g	196 g	175 g	140 g	163 g	166,6g

### Annexe III

**Tableau III.13** : la différence de poids corporel ,organe(foie ,rein)et pattes représenter sous forme de moyenne± écart type.

	<b>Poids</b>	<b>Témoin</b>	<b>culture</b>	<b>biopesticide</b>
<b>Corporel</b>	Début expérimentation (g)	113,6± 8,294	117,56 ±10,832	107,8± 5,792
	Fin expérimentation (g)	183,6 ± 15,646	176,8± 4,969	166,6± 20,695
	Augmentation Relative (%)	61,9 ± 12,408	51,32 ± 13,198	54,15±12,052
<b>Foie</b>	Poids (g)	7,745± 1,109	7,566± 0,797	6,921± 0,928
	Poids relatif (%)	4,206± 0,338	4,273± 0,347	4,157 ± 0,270
<b>Reins droit</b>	Poids (g)	0,706±0,066	0,723± 0,091	0,664 ±0,124
	Poids relatif (%)	0,384± 0,010	0,408± 0,045	0,398± 0,058
<b>Reins gauche</b>	Poids (g)	0,702±0,096	0,734±0,072	0,673±0,077
	Poids relatif (%)	0,381±0,025	0,414±0,033	0,405±0,032

### Annexe III

<b>Patte droit</b>	Poids (g)	1,507 ± 0,0905	1,36±0,061	1,352±0,1479
	Poids relatifs (%)	0,824 ± 0,065	0,769±0,036	0,814 ± 0,0543
<b>Patte gauche</b>	Poids (g)	1,581 ± 0,112	2,670 ± 0,055	1,724 ± 0,213
	Poids relatifs (%)	0,863 ± 0,043	1,511 ± 0,057	1,035 ± 0,030

**Tableau III.14** : résultats d'analyse de variance (ANOVA) de différence du poids corporels dans le même lot.

	<b>TÉMOINJ1J20</b>	<b>CULTUREJ1J20</b>	<b>BIOPESTICIDEJ1J20</b>
<b><i>P</i></b>	2,116E-05	3,83704E-06	0,00028378
<b><i>Résultat</i></b>	$P < \alpha$ Très hautement significative	$P < \alpha$ Très hautement significative	$P < \alpha$ Très hautement significative

### Annexe III

**Tableau III.15 :** résultats d'analyse de variance a un facteur des différences relatives du poids corporels entre les 3 diffèrent lots ( $\alpha = 0,05$ ).

	Témoïn\Culture	Témoïn\Biopesticide	Culture\Biopesticide
<i>P</i>	0,227912383	0,345774772	0,732541552
<i>Résultat</i>	$P(0,227) > \alpha$ Non significative	$P(0,345) > \alpha$ Non significative	$P(0,732) > \alpha$ Non significative

**Tableau III.16 :** résultats d'analyse de variance (ANOVA) sur la différence de poids absolu du foie entre les 3 diffèrent lots .

	Témoïn\Culture	Témoïn\Biopesticide	Biopesticide\Culture
<i>P</i>	0,77701759	0,23854913	0,27256468
<i>Résultat</i>	$P(0,777) > \alpha$ Non significative	$P(0,238) > \alpha$ Non significative	$P(0,272) > \alpha$ Non significative

**Tableau III.17 :** résultats d'analyse de variance (ANOVA) sur la différence de poids relatifs du foie entre les 3 diffèrent lots ( $\alpha = 0,05$ ).

	Témoïn\Culture	Témoïn\Biopesticide	Biopesticide\Culture
<i>P</i>	0,7671893	0,8039793	0,572328
<i>Résultat</i>	$P(0,767) > \alpha$ Non significative	$P(0,803) > \alpha$ Non significative	$P(0,572) > \alpha$ Non significative

### Annexe III

**Tableau III.18** : résultats d'analyse de variance (ANOVA) sur la différence du poids relatifs du rein droit et rein gauche entre les 3 différents lots .

Variable	Comparaison	P	Signification de la différence
Rein droit	<i>Témoin \ Culture</i>	0,28101485	Non significatives
	<i>Témoin \ Biopesticide</i>	0,604339	Non significatives
	<i>Culture \ Biopesticide</i>	0,7750982	Non significatives
Rein gauche	<i>Témoin \ Culture</i>	0,1120401	Non significatives
	<i>Témoin \ Biopesticide</i>	0,2271009	Non significatives
	<i>Culture \ Biopesticide</i>	0,6615042	Non significatives

**Tableau III.19** : résultats de différences relatives entre la patte gauche et droite des rats wistar femelles .

Différence relatives G -D	Rat 1	Rat 2	Rat3	Rat4	Rat5	Moyenne	Ecart- types
Lot témoin(g)	0,071	0,106	0,192	0,02	0,017	0,0812	0,072
Lot culture(g)	1,294	1,275	1,31	1,31	1,363	1,310	0,032
Lot biopesticide(g)	0,31	0,527	0,344	0,29	0,388	0,3718	0,094

### Annexe III

**Tableau III.20** : résultats analyse de variance (ANOVA) sur la différence de poids des patte gauche et droite dans le même lots.

	<b>Témoin P(GD)</b>	<b>Culture P(GD)</b>	<b>Biopesticide P(GD)</b>
<b><i>p</i></b>	0,1784651	4,29E-10	0,01265971
<b>Signification</b>	Non significatives	Très hautement significatives	significatives

**Tableau III.21** : résultats analyse de variance (ANOVA) sur la différence relatives de poids des patte gauche et droite dans le même lots.

	<b>Témoin / Biopesticide</b>	<b>Témoin/Culture</b>	<b>Culture /Biopesticide</b>
<b><i>p</i></b>	0,00059	5,25E-10	2,76702E-08
<b>Signification</b>	Très hautement significatives	Très hautement significatives	Très hautement significatives

**Tableau III.22** : Valeurs des poids de patte gauche et droite et leurs différences.

	<b>Poids patte droit</b>	<b>Poids patte gauche</b>	<b>différence de poids</b>
<b>Témoin(g)</b>	1,553	1,624	0,071
	1,382	1,488	0,106
	1,519	1,711	0,192
	1,532	1,552	0,02
	1,534	1,551	0,017
<b><i>moyenne</i></b>	<b>1,504</b>	<b>1,5852</b>	<b>0,0812</b>
<b><i>écart type</i></b>	<b>0,0692</b>	<b>0,0852</b>	<b>0,0722</b>
<b>Culture (g)</b>	1,353	2,647	1,294
	1,46	2,735	1,275
	1,294	2,604	1,31
	1,336	2,646	1,31
	1,357	2,72	1,363
<b><i>moyenne</i></b>	<b>1,36</b>	<b>2,6704</b>	<b>1,3104</b>
<b><i>écart type</i></b>	<b>0,0612</b>	<b>0,0551</b>	<b>0,0327</b>
<b>Biopesticide (g)</b>	1,366	1,676	0,31
	1,504	2,031	0,527
	1,49	1,834	0,344

### Annexe III

	1,191	1,481	0,29
	1,213	1,601	0,388
<b>moyenne</b>	<b>1,3528</b>	<b>1,7246</b>	<b>0,3718</b>
<b>écart type</b>	<b>0,1479</b>	<b>0,2137</b>	<b>0,0943</b>

**Tableau III.23** : valeurs du dosage hématologiques chez les rattes traitées.

	<i>Témoin</i>	<i>Culture</i>	<i>Biopesticide</i>
<b>Globules Blancs 10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup></b>	9,2	9,8	9,7
	7,2	10,1	9,4
	8,2	12,3	10,3
	8,2	/	/
	7,7	/	/
<b>moyenne</b>	8,1	10,73	9,8
<b>écart type</b>	0,741	1,36	0,45
	<i>Témoin</i>	<i>Culture</i>	<i>Biopesticide</i>
<b>Plaquettes 10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup></b>	840	/	/
	614	459	/
	846	/	998
	590	527	979
	632	486	227
<b>moyenne</b>	704,4	490,666	734,666
<b>écart type</b>	127,415	34,239	439,754
	<i>Témoin</i>	<i>Culture</i>	<i>Biopesticide</i>
<b>Hématocrite %</b>	41,5	/	/
	42,8	27,3	/
	42,3	/	43,6
	42,6	31,2	42

### Annexe III

	43,1	42,9	30,3
<b>moyenne</b>	42,46	33,8	38,63
<b>écart type</b>	0,610	8,118	7,261
	<b><i>Témoin</i></b>	<b><i>Culture</i></b>	<b><i>Biopesticide</i></b>
<b>Hémoglobine g/100 ml</b>	13,6	/	/
	14,3	9,7	/
	14,3	/	14,5
	15,1	11,1	13,3
	14,4	14	10,8
<b>moyenne</b>	14,34	11,6	12,866
<b>Écart type</b>			
	0,531	2,193	1,887
	<b><i>Témoin</i></b>	<b><i>Culture</i></b>	<b><i>Biopesticide</i></b>
<b>Globules Rouges 10<sup>6</sup>/mm<sup>3</sup></b>	7,05	/	/
	7,35	4,62	/
	6,4	/	7,37
	7,44	5,26	6,85
	7,27	7,16	5,32
<b>moyenne</b>	7,102	5,68	6,51
<b>Écart type</b>	0,41	1,32	1,06



### Annexe III

**Tableau III.24** : résultats d'analyse de variance (ANOVA) sur la différence du bilan hématologiques chez les rats Wistar femelles.

Variable	Comparaison	P	Signification de la différence
<b>Hématocrite %</b>	Témoin / culture	0,04555071	Significatives
	Témoin / biopesticide	0,26086758	Non significatives
	Culture/biopesticide	0,48499323	Non significatives
<b>Globules Blancs 10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup></b>	Témoin / culture	0,010990371	Significatives
	Témoin / biopesticide	0,012477765	Significatives
	Culture/ biopesticide	0,324396296	Non significatives
<b>Plaquettes 10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup></b>	Témoin / culture	0,03269304	Significatives
	Témoin / biopesticide	0,88488906	Non significatives
	Culture/biopesticide	0,39225222	Non significatives
<b>Hémoglobine g/100 ml</b>	Témoin / culture	0,03105181	Significatives
	Témoin / biopesticide	0,13630356	Non significatives
	Culture/biopesticide	0,49055765	Non significatives
<b>Globules Rouges 10<sup>6</sup>/mm<sup>3</sup></b>	Témoin / culture	0,058632489	Significatives
	Témoin / biopesticide	0,295609594	Non significatives
	Culture/biopesticide	0,443014341	Non significatives

**Tableau III.25** : résultat des analyses biochimiques rénaux des rattes traitées.

Paramètres	Témoin	Culture	Biopesticide
<b>Urée (g/l)</b>	0,36	0,29	0,23
	0,21	0,38	

### Annexe III

	0,43	0,24	0,39
	0,4	0,36	0,27
	0,48	0,33	0,38
<b>Moyenne</b>	0,376	0,32	0,317
<b>Ecart type</b>	0,102	0,056	0,079
<b>Créatinine (mg/l)</b>	5	10	3
	3	9	
	5	5	5
	6	9	6
	7	9	7
<b>Moyenne</b>	5,2	8,4	5,25
<b>Ecart type</b>	1,483	1,949	1,707

**Tableau III.26** : valeurs du dosage hépatique des rattes traitées.

<b>Paramètres</b>	<b><i>Témoin</i></b>	<b><i>Culture</i></b>	<b><i>Biopesticide</i></b>
<b>ASAT / GOT (UI/l)</b>	180	250	201
	210	250	234
	222	198	138
	250	250	250
	220	140	190
<b>Moyenne</b>	216,4	217,6	202,6
<b>Ecart type</b>	25,195	48,875	43,494
<b>ALAT /GPT (UI/l)</b>	107	103	98
	77	83	83
	105	78	77
	86	121	105

### Annexe III

	86	100	115
<b>Moyenne</b>	92,2	97	95,6
<b>Ecart type</b>	13,141	17,161	15,614
<b>PAL (UI/ml)</b>	490	510	481
	480		508
	551	507	504
	/		/
	/	500	439
<b>Moyenne</b>	507	505,666	483
<b>Ecart type</b>	38,431	5,131	31,654

**Tableau III.27** : Effet du Novacrid® sur quelques paramètres biochimiques rénaux et hépatiques chez les rats Wistar femelles.

<b>Paramètres</b>	<i><b>Témoin</b></i>	<i><b>Culture</b></i>	<i><b>Biopesticide</b></i>
<i><b>Urée (g/l)</b></i>	0,376 ± 0,102	0,32 ± 0,056	0,3175 ± 0,079
<i><b>Créatinine (mg/l)</b></i>	5,2 ± 1,483	8,4 ± 1,949	5,25 ± 1,707
<i><b>ASAT / GOT (UI/l)</b></i>	216,4 ± 25,195	217,6 ± 48,875	202,6 ± 43,494
<i><b>ALAT / GPT (UI)</b></i>	92,2 ± 13,145	97 ± 17,161	95,6 ± 15,614
<i><b>moyenne PAL (UI/ml)</b></i>	507 ± 38,431	505,667 ± 5,131	483 ± 31,654

### Annexe III

**Tableau III.28** : résultats d'analyse de la variance (ANOVA) des 3 lots pour le bilan rénal et hépatique chez les rats Wistar femelles.

<b>Variable</b>	<b>Comparaison</b>	<b>P</b>	<b>Signification de la différence</b>
<b>Urée (g/l)</b>	Témoin /culture	0,315580132	Non significatives
	Témoin /biopesticide	0,382021	Non significatives
	Culture/biopesticide	0,95736643	Non significatives
<b>Créatinine (mg/l)</b>	Témoin / culture	0,01925624	significatives
	Témoin / biopesticide	0,96376969	Non significatives
	Culture/ biopesticide	0,03874107	significatives
<b>ASAT / GOT (UI/l)</b>	Témoin /culture	0,96227639	Non significatives
	Témoin /biopesticide	0,5563329	Non significatives
	Culture/biopesticide	0,62204492	Non significatives
<b>ALAT / GPT (UI/l)</b>	Témoin / culture	0,63285232	Non significatives
	Témoin /biopesticide	0,71917704	Non significatives
	Culture/biopesticide	0,89600212	Non significatives
<b>moyenne PAL (UI/ml)</b>	Témoin /culture	0,95536123	Non significatives

### Annexe III

	Témoin /biopesticide	0,40448113	Non significatives
	Culture/biopesticide	0,28392351	Non significatives

### Annexe III

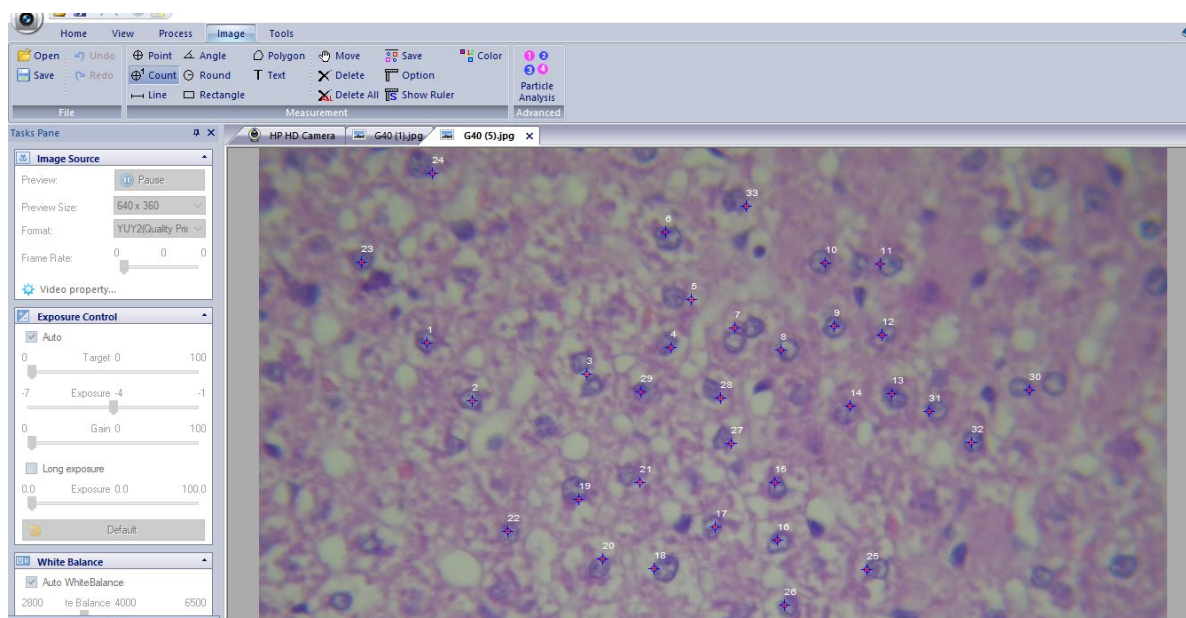
Tableau III.29 : nombre des hépatocytes pour les 3 lots.

	témoin	culture	biopesticide
1	101	77	81
2	89	76	75
3	99	83	85
4	85	78	81
5	88	70	83
6	91	77	85
7	101	73	82
8	89	74	80
9	87	73	83
10	81	76	81
11	81	71	89
12	94	71	82
13	93	73	90
14	86	79	86
15	91	75	87
16	87	79	89
17	99	83	85
18	92	78	81
19	94	90	90
20	115	85	93
21	109	77	89
22	99	75	82
23	107	87	80
24	101	81	90
25	107	79	90
26	122	83	80
27	94	80	82
28	105	81	83
29	97	78	90
30	100	85	90
<b>moyenne</b>	<b>96,133333</b>	<b>78,233333</b>	<b>84,8</b>
<b>écart type</b>	<b>9,7015226</b>	<b>4,9248374</b>	<b>4,36601</b>

## Annexe III

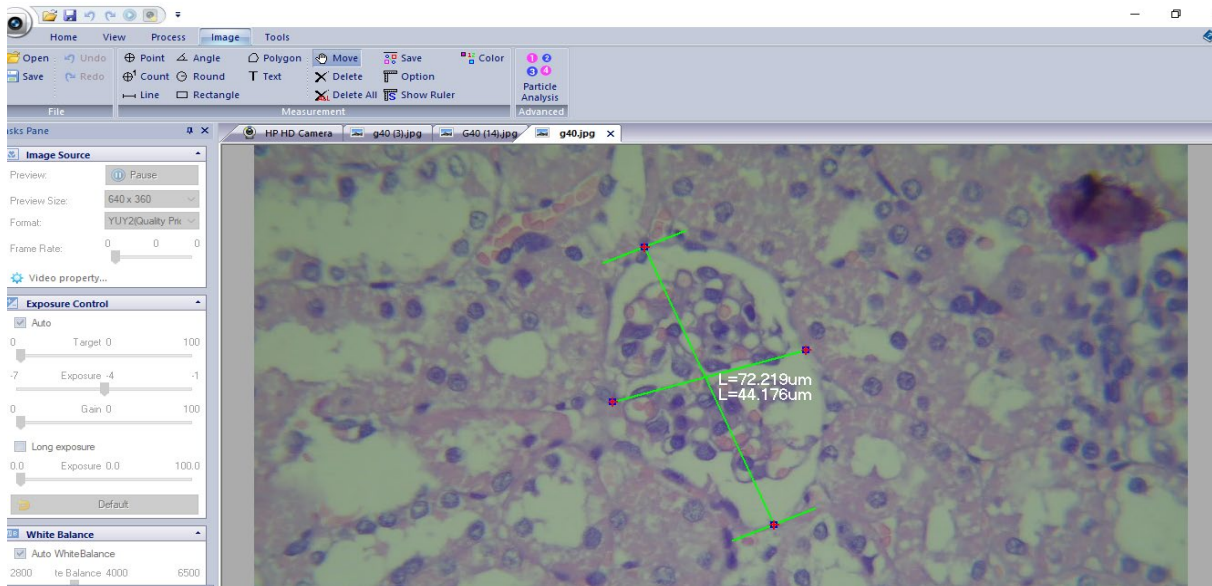
**Tableau III.30** : résultat d'analyse de variance (ANOVA) sur la différences de nombre d'hépatocyte dans chaque lots

	Témoin /culture	Témoin/Biopesticide	Culture /Biopesticide
<i>P</i>	1,2704E-12	2,5472E-07	1,0194E-06
Résultat	Très hautement significatives	Très hautement significatives	Très hautement significatives



**Figure III.40** : Photo d'un écran ordinateur montrant un exemple dénombrement des hépatocytes par logiciel SXVIEW (OPTIKA )

## Annexe III



**Figure III.41 :** Photo d'un écran ordinateur montrant un exemple de mesures morphométriques réalisées par le logiciel de traitement d'image logiciel SXVIEW (OPTIKA).

**Tableau III.31 :** résultat d'analyse de variance ANOVA sur l'étude morphométrique du rein pour les 2 lots.

Variable	Comparaison	<i>P</i>	Signification de la différence
<b>Corpuscule glomérulaire</b> ( $\mu\text{m}$ ).	Témoin /culture	0,00050656	Très hautement Significatives
	Témoin /biopesticide	0,0001518	Très hautement Significatives
	Culture/biopesticide	0,231225	Non significatives
<b>l'espace glomérulaire</b> ( $\mu\text{m}$ )	Témoin / culture	0,18309774	Non significatives
	Témoin / biopesticide	0,95250879	Non significatives
	Culture/ biopesticide	0,14367516	Non significatives
<b>peloton</b> ( $\mu\text{m}$ )	Témoin /culture	0,0004783	Très hautement significatives
	Témoin /biopesticide	3,6501E-05	Très hautement significatives
	Culture/biopesticide	0,05565686	Non significatives



### Annexe III

**Tableau III.32** : mesure morphométrique du glomérule chez le lot témoin.

	Corpuscule glomérulaire.( $\mu m$ )			Espace de Bowman ( $\mu m$ )			Peloton ( $\mu m$ )		
	L1	L1	T/2	L1	L1	T/2	L1	L2	T/2
1	81,05	60,11	<b>70,58</b>	8,141	3,88	<b>6,01</b>	73,93	49,98	<b>61,95</b>
2	79,28	71,28	<b>75,28</b>	7,72	4,12	<b>5,92</b>	70,13	63,30	<b>66,72</b>
3	73,13	58,94	<b>66,03</b>	6,684	2,4	<b>4,54</b>	66,86	51,36	<b>59,11</b>
4	81,84	52,35	<b>67,10</b>	5,441	2	<b>3,72</b>	72,28	44,97	<b>58,63</b>
5	84,68	58,45	<b>71,57</b>	7,4	3,39	<b>5,39</b>	47,6	47,071	<b>47,33</b>
6	78,97	69,16	<b>74,06</b>	6,512	3,00	<b>4,75</b>	71,419	64,61	<b>68,01</b>
7	63,86	47,72	<b>55,79</b>	7,214	4,32	<b>5,77</b>	52,179	41,677	<b>46,92</b>
8	50,8	48,23	<b>49,51</b>	10,44	4,808	<b>7,62</b>	43,204	32,216	<b>37,71</b>
9	57,53	59,96	<b>58,75</b>	7,94	4,41	<b>6,17</b>	53,886	45,91	<b>49,90</b>
10	51,14	54,64	<b>52,89</b>	5,404	2,8	<b>4,10</b>	50,35	47,07	<b>48,71</b>
11	50,07	47,92	<b>48,99</b>	5,814	2,6	<b>4,20</b>	43,136	42,32	<b>42,73</b>
12	59,82	47,48	<b>53,65</b>	6,2	3,16	<b>4,68</b>	53,97	48,72	<b>51,34</b>
13	63,52	51,80	<b>57,66</b>	6,2	3,25	<b>4,72</b>	50,48	42,32	<b>46,40</b>
14	65,86	50,62	<b>58,24</b>	6,986	4	<b>5,49</b>	52,31	40,99	<b>46,65</b>
15	52,66	49,14	<b>50,90</b>	4,441	2,56	<b>3,50</b>	51,94	43,63	<b>47,78</b>
16	55,31	53,82	<b>54,572</b>	12,322	5,38	<b>8,85</b>	41,11	38,60	<b>39,85</b>
17	62,01	48,30	<b>55,16</b>	8,421	2,68	<b>5,55</b>	52,79	38,48	<b>45,63</b>
18	58,39	41,52	<b>49,95</b>	6,905	2,43	<b>4,66</b>	47,78	31,49	<b>39,64</b>
19	59,95	46,04	<b>53,001</b>	11,628	2	<b>6,81</b>	41,53	39,53	<b>40,53</b>
20	58,01	55,87	<b>56,94</b>	9,89	3,88	<b>6,88</b>	49,82	41,07	<b>45,45</b>
<b>moyenne</b>	<b>64,39</b>	<b>53,67</b>	<b>59,03</b>	<b>7,58</b>	<b>3,35</b>	<b>5,47</b>	<b>49,82</b>	<b>41,07</b>	<b>49,55</b>
<b>Écart-type</b>	<b>11,38</b>	<b>7,58</b>	<b>8,55</b>	<b>2,08</b>	<b>0,95</b>	<b>1,34</b>	<b>10,63</b>	<b>8,34</b>	<b>8,86</b>

### Annexe III

**Tableau III.33** : mesure morphométrique du glomérule chez le lot culture.

	Corpuscule glomérulaire ( $\mu m$ )			Espace de Bowman ( $\mu m$ )			Peloton ( $\mu m$ )		
	L1	L1	T/2	L1	L1	T/2	L1	L2	T/2
1	57,105	46,171	<b>51,638</b>	6,26	3,40	<b>4,833</b>	47,289	42,66	<b>44,97</b>
2	50,385	45,71	<b>48,04</b>	4,75	2,56	<b>3,657</b>	41,512	41,48	<b>41,49</b>
3	61,114	41,114	<b>51,11</b>	9,67	3,04	<b>6,3605</b>	50,806	26,22	<b>38,51</b>
4	66,20	47,815	<b>57</b>	18,42	4	<b>11,211</b>	55,801	28,84	<b>42,32</b>
5	65,98	41,2	<b>53,59</b>	11,36	2,91	<b>7,13</b>	52,002	25,03	<b>38,52</b>
6	56,54	58,832	<b>57,687</b>	7,443	3,60	<b>5,52</b>	48,778	46,05	<b>47,41</b>
7	50,731	43,23	<b>46,98</b>	13,6	2,56	<b>8,08</b>	41,694	34,79	<b>38,24</b>
8	40,804	48,2	<b>44,50</b>	9,202	3	<b>6,10</b>	39,401	36,00	<b>37,70</b>
9	54,6	48,79	<b>51,69</b>	8,693	5,4	<b>7,04</b>	46,169	40,23	<b>43,20</b>
10	68,23	41,73	<b>54,98</b>	11,73	3,84	<b>7,79</b>	52,602	35,24	<b>43,92</b>
11	47,61	46,69	<b>47,15</b>	7,532	2,84	<b>5,18</b>	41,268	37,19	<b>39,23</b>
12	59,908	44,903	<b>52,40</b>	14,93	4,56	<b>9,74</b>	43,423	29,41	<b>36,42</b>
13	63,611	45,6	<b>54,60</b>	9,091	4,02	<b>6,55</b>	51,257	36,39	<b>43,82</b>
14	48,041	43,041	<b>45,54</b>	6,515	2,80	<b>4,661</b>	36,383	34,60	<b>35,49</b>
15	57,447	58,363	<b>57,90</b>	7,2	2,4	<b>4,8</b>	50,729	45,64	<b>48,18</b>
16	59,264	45,609	<b>52,43</b>	6,325	2,4	<b>4,3625</b>	48,261	45,25	<b>46,76</b>
17	46,495	46,689	<b>46,59</b>	7,225	2,26	<b>4,744</b>	41,932	36,70	<b>39,318</b>
18	56,57	42,312	<b>49,44</b>	7,803	2,53	<b>5,166</b>	48,261	33,46	<b>40,862</b>
19	62,393	35,038	<b>48,71</b>	8,32	3,23	<b>5,77</b>	50,27	31,48	<b>40,87</b>
20	47,97	46,67	<b>47,32</b>	7	2,56	<b>4,78</b>	42,57	37,48	<b>40,029</b>
<b>moyenn</b> <b>e</b>	<b>56,03</b>	<b>45,88</b>	<b>50,96</b>	<b>9,155</b>	<b>3,19</b> <b>7</b>	<b>6,17</b>	<b>46,52</b>	<b>36,2125</b>	<b>41,366</b>
<b>Écart-</b> <b>type</b>	<b>7,57</b>	<b>5,38</b>	<b>4,11</b>	<b>3,35</b>	<b>0,83</b> <b>7</b>	<b>1,89</b>	<b>5,19</b>	<b>6,14</b>	<b>3,63</b>

**Tableau III.34** : mesure morphométrique du glomérule pour le lot biopesticide

	Corpuscule glomérulaire. ( $\mu m$ )			Espace de Bowman ( $\mu m$ )			Peloton ( $\mu m$ )		
	L1	L1	T/2	L1	L1	T/2	L1	L2	T/2
1	48,37	46,533	<b>47,45</b>	5,441	2,417	<b>3,929</b>	41,44	39,93	<b>40,686</b>
2	51,35	49,94	<b>50,64</b>	7,79	2,403	<b>5,0965</b>	40,6	40,41	<b>40,507</b>

### Annexe III

3	44,21	39,844	<b>42,03</b>	12,259	2,561	<b>7,41</b>	30,43	23,62	<b>27,0265</b>
4	58,535	45,115	<b>51,825</b>	9,097	3,4	<b>6,2485</b>	48,48	31,98	<b>40,231</b>
5	61,241	56,88	<b>59,06</b>	8,881	2,608	<b>5,74</b>	49,32	48,43	<b>48,87</b>
6	62,93	58,175	<b>60,55</b>	3,945	7,992	<b>5,9685</b>	50,19	45,26	<b>47,730</b>
7	47,868	47,476	<b>47,672</b>	7,077	2,163	<b>4,62</b>	43,84	36,92	<b>40,382</b>
8	38,006	35,706	<b>36,856</b>	11,044	2,126	<b>6,585</b>	25,91	24,13	<b>25,023</b>
9	54,035	49,01	<b>51,52</b>	6,515	5,016	<b>5,765</b>	41,28	38,79	<b>40,038</b>
10	62,365	52,083	<b>57,224</b>	7,411	3,105	<b>5,258</b>	52,21	37,75	<b>44,984</b>
11	39,746	36,805	<b>38,27</b>	6,657	3,394	<b>5,0255</b>	27,72	26,02	<b>26,871</b>
12	54,855	40	<b>47,42</b>	6,8	3,677	<b>5,2385</b>	45,45	27,69	<b>36,57</b>
13	51,6	41,723	<b>46,66</b>	8,287	2,884	<b>5,5855</b>	47,68	32,45	<b>40,06</b>
14	53,961	57,838	<b>55,89</b>	7,424	3,225	<b>5,3245</b>	48,11	28,12	<b>38,11</b>
15	57,005	47,823	<b>52,414</b>	6,119	2,72	<b>4,4195</b>	49,63	34,26	<b>41,952</b>
16	47,369	41,257	<b>44,313</b>	7,871	2,973	<b>5,422</b>	37,00	31,80	<b>34,405</b>
17	52,228	50,294	<b>51,261</b>	9,069	3,027	<b>6,048</b>	43,36	39,44	<b>41,404</b>
18	47,153	32,737	<b>39,945</b>	6,768	2,8	<b>4,784</b>	41,404	27,377	<b>34,3905</b>
19	52,492	35,815	<b>44,153</b>	8,955	2,561	<b>5,758</b>	41,71	24,59	<b>33,157</b>
20	55,517	47,737	<b>51,627</b>	7,211	3,985	<b>5,598</b>	45,73	33,46	<b>39,596</b>
<b>moyenn e</b>	<b>55,517</b>	<b>45,639</b>	<b>48,841</b>	<b>7,7310</b>	<b>3,2518</b>	<b>5,49</b>	<b>42,57</b>	<b>33,62</b>	<b>38,10</b>
<b>Écart- type</b>	<b>6,84</b>	<b>7,53</b>	<b>6,65</b>	<b>1,86</b>	<b>1,30</b>	<b>0,78</b>	<b>7,413</b>	<b>7,147</b>	<b>6,44</b>

**Tableau III.35** : diamètre des hépatocytes du lot biopesticide.

	Hépatocyte.( $\mu m$ )			Noyau ( $\mu m$ )			Rapport nucléocytoplasmiq ue ( $\mu m$ )
	L1	L2	T/2	L1	L2	T/2	
1	20,999	19,4	<b>20,199</b>	5,324	5,991	<b>5,6575</b>	0,38904552
2	20,319	21,042	<b>20,680</b>	6,236	6,847	<b>6,5415</b>	0,46265648
3	18,919	15,254	<b>17,086</b>	7,506	7,102	<b>7,304</b>	0,74663941
4	14,705	15,587	<b>15,146</b>	5,701	6,09	<b>5,8955</b>	0,6373169
5	18,006	20,508	<b>19,257</b>	6,201	6,021	<b>6,111</b>	0,46485623
6	18,837	24,123	<b>21,48</b>	7,134	7,068	<b>7,101</b>	0,49384519
7	18,45	15,451	<b>16,950</b>	6,981	6,22	<b>6,6005</b>	0,63772947
8	17,103	13,528	<b>15,315</b>	5,771	4,245	<b>5,008</b>	0,48585981
9	19,785	15,726	<b>17,755</b>	5,438	5,243	<b>5,3405</b>	0,43016512
10	18,423	17,019	<b>17,721</b>	5,8	6,325	<b>6,0625</b>	0,52000686

### Annexe III

11	18,523	13,577	<b>16,05</b>	6,294	5,155	<b>5,7245</b>	0,55440415
12	24,042	19,389	<b>21,715</b>	7,785	7,729	<b>7,757</b>	0,55571874
13	23,427	16,115	<b>19,771</b>	7,122	6,378	<b>6,75</b>	0,51839336
14	18,484	21,581	<b>20,032</b>	6,45	6,201	<b>6,3255</b>	0,46147954
15	21,473	16,669	<b>19,071</b>	5,501	4,876	<b>5,1885</b>	0,37374392
16	23,093	22,459	<b>22,776</b>	6,701	6,903	<b>6,802</b>	0,42581695
17	17,053	17,651	<b>17,352</b>	6,022	6,011	<b>6,0165</b>	0,53076618
18	18,4	14,227	<b>16,313 5</b>	6,351	5,646	<b>5,9985</b>	0,58153175
19	19,9	21,208	<b>20,554</b>	7,006	6,912	<b>6,959</b>	0,51187937
20	16,026	13,983	<b>15,004 5</b>	5,59	4,808	<b>5,199</b>	0,53021264
<b>Moyenn e</b>	<b>19,29835</b>	<b>17,72485</b>	<b>18,511 6</b>	<b>6,3457</b>	<b>6,0885 5</b>	<b>6,21712 5</b>	0,51560338
<b>Écart type</b>	<b>2,4111768 5</b>	<b>3,242657 0</b>	<b>2,3563 6</b>	<b>0,7238497 3</b>	<b>6,0885 5</b>	<b>0,75678 4</b>	0,08950763

**Tableau III.36 : diamètre des hépatocytes pour le lot témoin.**

	Hepatocyte.( $\mu m$ )			Noyau( $\mu m$ )			Rapport nucléocytoplasmique( $\mu m$ )
	L1	L2	T/2	L1	L2	T/2	
1	15,86	18,508	<b>17,184</b>	3,873	4,958	<b>4,4155</b>	0,34581196
2	16,64	17,66	<b>17,15</b>	5,869	4,115	<b>4,992</b>	0,41059385
3	23,297	13,453	<b>18,375</b>	7,184	5,826	<b>6,505</b>	0,54802022
4	19,437	14,666	<b>17,0515</b>	7,14	5,404	<b>6,272</b>	0,58184517
5	18,104	17,998	<b>18,051</b>	5,025	5,772	<b>5,3985</b>	0,42667457
6	23,003	18,617	<b>20,81</b>	7,503	5,772	<b>6,6375</b>	0,46833657
7	16,198	13,665	<b>14,9315</b>	7,503	7,1	<b>7,3015</b>	0,95694626
8	20,69	16,447	<b>18,5685</b>	6,21	5,508	<b>5,859</b>	0,46099374

### Annexe III

9	13,609	12,402	<b>13,0055</b>	6,675	5,413	<b>6,044</b>	0,86820369
10	14,517	13,171	<b>13,844</b>	4,61	6,403	<b>5,5065</b>	0,66044978
11	16,672	13,799	<b>15,2355</b>	5,661	6,001	<b>5,831</b>	0,62002233
12	15,815	12,108	<b>13,9615</b>	5,692	5,188	<b>5,44</b>	0,63838526
13	20,609	16,73	<b>18,6695</b>	6,794	5,58	<b>6,187</b>	0,49565392
14	16,623	16,302	<b>16,4625</b>	5,334	5,148	<b>5,241</b>	0,46704986
15	16,858	19,526	<b>18,192</b>	4,909	5,869	<b>5,389</b>	0,42091697
16	16,967	14,311	<b>15,639</b>	6,218	5,917	<b>6,0675</b>	0,63391318
17	18,45	14,004	<b>16,227</b>	6,021	3,873	<b>4,947</b>	0,43856383
18	14,318	16,378	<b>15,348</b>	6,631	5,636	<b>6,1335</b>	0,66563568
19	16,317	15,192	<b>15,7545</b>	4,904	5,571	<b>5,2375</b>	0,49800323
20	19,144	12,945	<b>16,0445</b>	6,237	5,014	<b>5,6255</b>	0,53992706
<b>Moyenne</b>			<b>16,5252</b>			<b>5,75152</b>	
	17,6564	15,3941	<b>5</b>	5,99965	5,5034	<b>5</b>	0,55729736
<b>Écart type</b>							
	2,68171 566	2,26443 974	<b>1,92222</b> <b>433</b>	1,00840 626	0,70910 696	<b>0,66994</b> <b>747</b>	0,15300257

**Tableau III.37** : diamètre des hépatocytes pour le lot culture.

	Hepatocyte.( $\mu m$ )			Noyau( $\mu m$ )			rapport nucléocytoplasmique
	<b>L1</b>	<b>L2</b>	<b>T/2</b>	<b>L1</b>	<b>L2</b>	<b>T/2</b>	
1	21,857	19,164	<b>20,5105</b>	6,185	6,213	<b>6,199</b>	0,43314817
2	18,028	14,14	<b>16,084</b>	8,653	8,106	<b>8,3795</b>	1,08761114
3	18,758	17,297	<b>18,0275</b>	7,801	7,452	<b>7,6265</b>	0,7332468
4	20,393	14,674	<b>17,5335</b>	8,324	7,117	<b>7,7205</b>	0,78676246
5	18,36	17,532	<b>17,946</b>	7,971	8,86	<b>8,4155</b>	0,88300719
6	18,565	13,097	<b>15,831</b>	7,28	6,621	<b>6,9505</b>	0,78266989

### Annexe III

7	17,89	16,568	17,229	7,92	7,734	7,827	0,83248245
8	17,477	18,413	17,945	7,151	7,965	7,558	0,72764032
9	20,702	17,614	19,158	6,325	6,107	6,216	0,48029671
10	18,629	15,601	17,115	7,084	6,586	6,835	0,66488327
11	19,734	15,232	17,483	7,829	7,783	7,806	0,80665496
12	19,437	15,255	17,346	7,845	7,415	7,63	0,78530259
13	20,288	18,031	19,1595	7,849	7,355	7,602	0,6577547
14	21,035	18,114	19,5745	7,732	7,12	7,426	0,61126888
15	18,081	14,94	16,5105	7,425	7,286	7,3555	0,80344074
16	20,154	12,93	16,542	7,81	6,801	7,3055	0,79093813
17	19,176	11,462	15,319	6,5	6,3	6,4	0,71756923
18	17,004	13,706	15,355	6,378	5,315	5,8465	0,6148709
19	18,469	22,805	20,637	8	7,636	7,818	0,60987597
20	19,658	16,722	18,19	5,243	6,389	5,816	0,47001778
<b>Moyenne</b>	<b>19,18475</b>	<b>16,16485</b>	<b>17,6748</b>	<b>7,36525</b>	<b>6,389</b>	<b>7,23665</b>	<b>0,71397211</b>
<b>Écart type</b>	<b>1,27825</b>	<b>2,60590</b>	<b>1,5482</b>	<b>0,84898</b>	<b>0,827912</b>	<b>0,7797136</b>	<b>0,15392658</b>

**Tableau III.38** : analyse de Variance ANOVA sur le rapport nucléocytoplasmique des hépatocyte des 2 lot traitées.

	<b>Témoin /culture</b>	<b>Témoin/Biopesticide</b>	<b>Culture /Biopesticide</b>
<b><i>P</i></b>	0,002566522	0,299487663	1,40337E-05
<b>Résultat</b>	Hautement significatives	Non significatives	Très hautement significatives