

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieure et de la Recherche Scientifique
Université de Blida 1



Faculté de Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie et Physiologie Cellulaire

Mémoire de fin d'études

En vue d'obtention du diplôme de Master en Science de la Nature et de la Vie
Filière Sciences Biologiques
Option : **BIOCHIMIE**

THEME

Principales lésions tissulaires et l'effet sur la mortalité chez les larves de *Locusta migratoria* (Linnée, 1758) traités avec un champignon entomopathogène.

Date de soutenance : 14/07/2021

Présenté par :

NYAHORA FORTUNE

RABAHI INCHIRAH

Devant le jury :

Mme BENHOUNA

Maître de Conférence B, UB1

Présidente

Mme ABDUL HUSSAIN

Maître de Conférence A, UB1

Examinatrice

Mme ARKAM F

Maître Assistante B, UB1

Promotrice

Année Universitaire 2020/2021

DEDICACES

A la mémoire de mon père et de ma grand-mère Gogo Sofia Goromonzi.

A ma très chère mère pour ses sacrifices, sa motivation, ses mots d'encouragement et ses prières dans ma vie et durant mes études.

Mes très chers frères et sœurs et tous les autres membres de ma famille surtout mon oncle James Goromonzi, pour leurs supports éternels.

Enfin à tous mes amies (à mentionner Clement et Moreblessing), mes collègues et compatriotes en Algérie et toutes les personnes qui me connaissent de près ou de loin.

Je dédie ce travail.

FORTUNE

Dédicaces

En premier je remercie Allah le tout puissant et généreux de m'accorder la volonté, la patience, qui m'a guidé sur le droit chemin et de m'avoir donné le courage et la santé pour effectuer ce modeste travail

Je tiens à dédier ce mémoire particulièrement

À ma très chère mère que j'aime et qui m'a toujours encouragée et soulagée avec ses sincères prières et qui m'a donnée tous ce que j'avais besoin afin de parvenir à ce stade-là

*À l'âme précieuse de mon père, décédé trop tôt, tant qu'il voulait assister à ce moment avec impatience, qui m'a toujours poussé et motivé dans mes études
J'espère que, du monde qui est sien maintenant, il apprécie cet humble geste comme preuve de reconnaissance de la part d'une fille qui toujours prie pour son âme*

À mes 3 sœurs adorées : Haïfa Nour el houda ; Hadil et Rahil Noursine

Qui m'ont beaucoup aidées tout au long de mes études que dieu les protège

À mon tendre frère : Imad Eddine pour ces conseils et son encouragement que dieu le libère

*Ainsi à toute la famille **RABAH***

*À mes adorables amies **Chaïma** et **Dania***

*À mon Binôme **Fortune** qui a fait preuve d'une Incroyable Compréhension et pour son soutien moral, tout au long de ce projet et que je souhaite à lui*

Toute la réussite dans sa vie

Et à toutes les personnes qui me connaissent de près ou de loin . . .

Inchirah

REMERCIEMENTS

Louange à dieu tout puissant de nous avoir accordé la force, la patience et le sacrifice pour accomplir ce modeste travail.

Il nous est très agréable d'exprimer notre profonde gratitude et nos plus vifs remerciements respectueux à toutes les personnes qui de près ou de loin nous 'ont témoigné leur aide moralement, et techniquement tout au long de la réalisation de ce travail :

À Madame ; Arkam Fatima épouse Kessaci ; maître assistante B à l'université de Blida 1, d'avoir bien voulu diriger ce travail et pour tous ses efforts consentis.

Je remercie également Madame Benhoua ; maître de conférence B à l'université de Blida 1 qui m'a fait l'honneur d'assurer la présidence du jury de ma thèse. J'exprime mon respect le plus profond et ma gratitude à Madame Abdul Hussain ; maître de conférence A à l'université de Blida 1 et d'avoir accepté d'examiner ce travail. Un grand merci à Monsieur Benjoudi Djamel, Professeur à l'université de Blida 1, pour ses directives, ses conseils.

Nous adressons nos remerciements à tous les enseignants qui ont donné les bases de la science tout au long de nos cursus

TABLEAU DE MATIERES

DEDICACES.....	i
REMERCIEMENTS.....	iii
LISTE DE FIGURES.....	vi
LISTE DE TABLEAUX.....	viii
LISTE DES ABBREVIATIONS.....	ix
GLOSSAIRE.....	x

RESUME.....	1
INTRODUCTION.....	3

CHAPITRE I : RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

I.1. GENERALITES SUR LE CRIQUET MIGRATEUR.....	5
I.1.1. Identification.....	5
I.1.2. Taxonomie.....	5
I.1.3. Le cycle biologique.....	5
I.1.4. Le tégument des criquets.....	7
I.1.5. L'appareil digestif chez les criquets.....	9
I.2. GENERALITES SUR LES BIOPESTICIDES.....	11
I.2.1. Définition.....	11
I.2.2. Classification.....	11
I.3. GENERALITES SUR LE <i>METARHIZIUM ANISOPLIAE</i>	13
I.3.1. Identification.....	13
I.3.2. Taxonomie.....	13
I.3.3. Morphologie.....	13
I.3.4. Mode d'infection.....	14
I.3.5. Le processus d'infection.....	14
I.3.6. Production des toxines et effet biocide.....	16
I.3.7. La maladie de la muscardine verte et propagation de l'infection.....	17

CHAPITRE II : METHODES ET MATERIELS

II.1. PRESENTATION DU MATERIEL UTILISES.....	18
II.2. METHODES.....	19
II.2.1. Elevage de criquet migrateur.....	19
II.2.2. Le test de mortalité des larves traitées avec <i>M. anisopliae</i>	20
II.2.3. Evaluation des taux de mortalité des larves traitées avec le <i>M. anisopliae</i>	24
II.2.4. Calcul de la dose létale 50 (DL50) et le temps létal 50 (TL50).....	25

II.2.5. Test avec <i>M. anisopliae</i> pour la recherche de l'effet histopathologique	26
II.2.6. L'étude histologique.....	27

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

III.1. RESULTATS.....	31
III.1.1. Effet de <i>Metarhizium</i> sur la mortalité des larves de <i>L. migratoria</i>	31
III.1.1.1. Evaluation des taux de mortalité cumulé	31
III.1.1.2. Calcul de TL50	33
III.1.1.3. Calcul de la DL50	36
III.1.2. Effet histo-pathologique de <i>M. anisopliae</i> sur les larves de <i>Locusta migratoria</i>	39
III.1.2.1. Effet de <i>M. anisopliae</i> sur l'histologie du tégument.....	39
III.1.2.2. Effet de <i>M. anisopliae</i> sur l'histologie du tube digestif	42
III.2. DISCUSSION	46
CONCLUSION	50
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	51
ANNEXES.....	57

LISTE DE FIGURES

Figure 1 : Cycle biologique de <i>Locusta migratoria</i>	6
Figure 2: A. Criquet migrateur dans la cage de l'élevage	6
Figure 3: Structure chimique de la chitine.	8
Figure 4 : Principales couches du tégument chez les insectes	9
Figure 5: Anatomie du tube digestif de <i>S. gregaria</i>	10
Figure 6: <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acidum</i>	14
Figure 7: Processus d'infection de l'insecte lépidoptère par <i>Metarhizium anisopliae</i>	15
Figure 8 : Les structures infectieuses de <i>Metarhizium anisopliae</i>	16
Figure 9: images d'acridiens infectés par <i>M. anisopliae</i>	17
Figure 10: les conditions d'élevage en cage de <i>L. migratoria</i>	20
Figure 11 : Morphologie de <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acidum</i>	22
Figure 12: Diagramme récapitulatif des tests de mortalité avec <i>Metarhizium anisopliae</i> sur les larves de <i>L. migratoria</i> (L3 L4 et L5) en deux répétition (R1 et R2).....	24
Figure 13 : Dissection des L5 de criquet migrateur et prélèvement des tissus étudiés.	27
Figure 14 : Confection des blocs de paraffine	29
Figure 15 : Préparation des coupes histologiques a. confection des coupes au microtome ; b. collage des coupes sur les lames	30
Figure 16: Evolution des taux de mortalité cumulée (%) chez les larves du 3 ^{ème} stade de criquet migrateur traitées au <i>Metarhizium anisopliae</i> (08 individus par lot).	31
Figure 17: Evolution des taux de mortalité cumulée (%) chez les larves du 4 ^e stade de criquet migrateur traitées au <i>Metarhizium anisopliae</i> (08 individus par lot).	31
Figure 18: Evolution des taux de mortalité cumulée (%) chez les larves du 5 ^{ème} stade de criquet migrateur traitées au <i>Metarhizium anisopliae</i> (08 individus par lot).	32
Figure 19: Efficacité de <i>M. anisopliae</i> en fonction du temps vis-à-vis des L3 de <i>L. migratoria</i> traitées aux doses D1 = $2,3 \times 10^4$ spores/ml ; D2 = $2,3 \times 10^6$ spores/ml et D3 = $2,3 \times 10^8$ spores/ml.	34
Figure 20: Efficacité de <i>M. anisopliae</i> en fonction du temps vis-à-vis des L4 de <i>L. migratoria</i> traitées aux doses D1 = $2,3 \times 10^4$ spores/ml ; D2 = $2,3 \times 10^6$ spores/ml et D3 = $2,3 \times 10^8$ spores/ml.	35

Figure 21: Efficacité de <i>M. anisopliae</i> en fonction du temps vis-à-vis des L5 de <i>L. migratoria</i> traitées aux doses D1 = $2,3 \times 10^4$ spores/ml ; D2 = $2,3 \times 10^6$ spores/ml et D3 = $2,3 \times 10^8$ spores/ml.	36
Figure 22: Droites de régression logistique exprimant les probits des taux de mortalité chez les L3, L4 et L5 traitées avec <i>M. anisopliae</i> en fonction des Logarithmes des doses.....	37
Figure 23 : Structure du tégument de larves de <i>L. migratoria</i> témoins	39
Figure 24: Lésions de la cuticule et de l'épiderme chez les L5 de <i>L. migratoria</i> traitées au <i>M. anisopliae</i> et pénétration des spores dans la cuticule.	41
Figure 25 : Coupe longitudinale au niveau de stomodeum (Jabot) chez <i>L. migratoria</i>	43
Figure 26 : Coupe longitudinale au niveau de cæca gastrique chez les L5 de <i>L. migratoria</i> témoins (A et B) et traité au <i>Metarhizium</i> (C et D).....	43
Figure 27: Coupes longitudinales au niveau de mésentéron chez les L5 de <i>L. migratoria</i> . Témoin (A) et traités (B et C)	45
Figure 28: Coupes longitudinales au niveau du proctodeum chez les L5 de <i>L. migratoria</i> . Témoin (A et B) et traités au <i>M. anisopliae</i> (C et D)	45

LISTE DE TABLEAUX

Tableau 1 : Equations des droites de régression, coefficients de corrélation et les valeurs des TL50 des larves L3 de <i>L. migratoria</i> traitées au <i>Metarhizium anisopliae</i>	34
Tableau 2 : Equations des droites de régression, coefficients de corrélation et les valeurs des TL50 des larves L4 de <i>L. migratoria</i> traitées au <i>Metarhizium anisopliae</i>	35
Tableau 3 : Equations des droites de régression, coefficients de corrélation et les valeurs des TL50 des larves L5 de <i>L. migratoria</i> traitées au <i>Metarhizium anisopliae</i>	36
Tableau 4 : Equations des droites de régression, coefficients de corrélation et les valeurs des DL50 des larves L3, L4 et L5 de <i>L. migratoria</i> traitées au <i>Metarhizium anisopliae</i>	38
Tableau 5 : Liste des principaux matériaux et appareillages utilisés.....	57
Tableau 6 : Les mortalités cumulées (Nb d'individus morts) et les taux de mortalité cumulée (%) après traitement au <i>M. anisopliae</i> . J : jour de traitement.....	66
Tableau 7 : Les mortalités cumulées (Nb d'individus morts) et les taux de mortalité cumulée (%) après traitement au <i>M. anisopliae</i> . J : jour de traitement.....	66
Tableau 8 : Les mortalités cumulées (Nb d'individus morts) et les taux de mortalité cumulée (%) après traitement au <i>M. anisopliae</i> . J : jour de traitement.....	67
Tableau 9 : Logarithmes décimaux des temps et probits des pourcentages de mortalité cumulée (MC) chez les L3, L4 et L5 de <i>L. migratoria</i>	68

LISTE DES ABBREVIATIONS

FAO	F ood and A griculture O rganisation of the United Nations / O rganisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture
INPV	I nstitut N ational de la P rotection des V égétaux
LUBILOSA	L utte B iologique contre les L Ocustes et les S auteriaux
GM	G reen M uscle
IGRs	I nsect G rowth R egulators / Régulateurs de croissance des insectes
UBV	U ltra- B as V olume (application)
D	D ose
DL50	D ose L étale 50
TL50	T emps L étale 50
<i>M. a</i>	<i>Metarhizium anisopliae</i>
<i>L. m</i>	<i>Locusta migratoria</i>
L3	Larve de troisième stade.
L4	Larve de quatrième stade.
L5	Larve de cinquième stade

GLOSSAIRE

Espèce hygrophile : est un organisme vivant qui nécessite un lieu rempli d'humidité pour pouvoir survivre et poursuivre sa croissance.

Biomagnification d'un insecticide: est le transfert de substances chimiques via des réseaux trophiques passant à différents niveaux trophiques entraînant à des concentrations de plus en plus élevées avec des niveaux trophiques croissants dans la chaîne alimentaire (Franke et *al.*, 1994).

Bioaccumulation d'un insecticide: Phénomène par lequel un organisme absorbe des substances chimiques du milieu environnant via toutes les voies d'exposition y compris l'alimentation (Franke et *al.*, 1994).

Mucilage hygroscopique : Substance végétale qui gonfle en contact avec l'eau et produit une substance visqueuse semblable à la gélatine et qui a tendance à absorber l'humidité de l'air (Jeuge-Maynard et *al.*, 2010).

Dextruxines : sont des composés toxiques non-enzymatiques produit par *Metarhizium anisopliae* qui lui permettent de surmonter les mécanismes de défense de l'hôte et de proliférer (BENSERRADJ, 2014).

RESUME

Locusta migratoria est l'un des ravageurs agricoles les plus redoutables en Algérie. Notre étude porte sur la recherche des effets acaricides et histopathologiques de *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. Les tests sont portés sur les L3, L4 et L5 de criquet migrateur traités par contact à raison de $2,3 \times 10^4$; $2,3 \times 10^6$ et $2,3 \times 10^8$ spores/ml. Les taux de mortalité évoluent en fonction du temps et s'accroissent avec l'augmentation de la dose administrée. Les valeurs des DL50 et TL50 obtenues augmentent en fonction de l'avancement des stades larvaires. Au niveau du tégument des L5 traitées avec la moyenne dose, les coupes histologiques révèlent la destruction de la cuticule, en particulier l'épicuticule, et de l'assise épidermique. En comparaison avec le témoin, l'entomopathogène affecte la structure caractéristique des trois parties intestinales. Nous notons la destruction des épithéliums et l'altération des muscles. Le mésentéron et les cæca gastriques sont les plus endommagés et ne peuvent plus assurer leurs rôles en termes d'efficacité digestive ce qui causent probablement la mort de l'insecte.

Mots Clés : *Locusta migratoria*, *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*, Mortalité, Effet histopathologique, Tégument, Tube digestif.

ABSTRACT

Locusta migratoria is one of the most agricultural pests in Algeria. Our study investigates the acaricidal and histopathological effects of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. The tests were carried out on contact-treated migratory locust L3, L4 and L5 at a rate of 2.3×10^4 ; 2.3×10^6 and 2.3×10^8 spores/ml. Mortality rates change over time and accelerate with increasing dose. The LD50 and LT50 values obtained increase with the progress of the larval stages. At the level of the integument of the L5 treated with the medium dose, histological sections reveal the destruction of the cuticle, in particular the epicuticle, and the epidermal base. In comparison with the control, the entomopathogen affects the characteristic structure of the three intestinal parts. We note the destruction of epitheliums and impairment of muscles. The mesenteron and the gastric caecae are the most damaged and can no longer ensure their roles in terms of digestive efficiency, which probably cause the death of the insect.

Key Words: *Locusta migratoria*, *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*, Mortality, Histopathological effect, Integument, Digestive tract.

المخلص

الجراد المهاجر هو احد الآفات الحرجة الفتاكة بالنباتات في الجزائر. تعتمد دراستنا على البحث حول التأثير المميت للجراد وكذا التغيرات النسيجية المرضية للفطر *Metarhizium anisopliae var. acridum*. أجرينا عدة اختبارات على الحوريات الجراد المهاجر للأطوار التالية (طور 3 و4 و5) المعالج بمختلف الجرعات (2.3×10^4 ؛ 2.3×10^6 و 10×2.3 جراثيم/مل). تتغير نسبة الوفيات بمرور الوقت وتتسارع مع زيادة الجرعة. بحيث تزداد قيم DL50 و TL50 التي تم الحصول عليها مع تقدم مراحل اليرقات. على مستوى إهاب حوريات طور الخامس. تكشف المقاطع النسيجية مدى تلف القشرة وخاصة القشرة السطحية (épicuticule)، وطبقة البشرة. بالمقارنة مع الحوريات الشاهدة يؤثر الفطر الممرض للحشرات على البنية المميزة للأجزاء المعوية الثلاثة. نلاحظ أيضا تدمير الظهارة و تلف العضلات. بحيث تشير الدراسة بأن المعوي المتوسط (mésentéron) والأعور المعوي (caeca gastrique) من الاجزاء المعوية الأكثر تضررا. والتي لم تعد قادرة على ضمان أدوارها من حيث كفاءة الجهاز الهضمي والتي قد تسبب وفاة الحشرة.

الكلمات المفتاحية:

Locusta migratoria ، *Metarhizium anisopliae var. acridum* ، الوفيات ، تأثيرات نسيجية مرضية ، إهاب ، جهاز الهضمي

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Les criquets et les sautereaux constituent une menace la plus dévastatrice pour l'agriculture dans le monde, affectant de vastes zones et des millions de personnes. Ce groupe d'insectes contient des centaines d'espèces de ravageurs responsables des dégâts massifs et une perte des rendements aggravent le problème de sécurité alimentaire (Klein et *al.*, 2021; Zhang et *al.*, 2019). Un essaim de criquets pèlerins couvrant une surface de 1km² peut consommer autant de nourriture que 35 000 humains par jour (Devi, 2020; Narayanamma et Krishnaiah, 2020).

A cause de sa situation géographique, l'Algérie fait partie des pays où les criquets ont une grande importance économique. Les espèces de criquets bien connus et étudiées en Algérie comprennent le criquet marocain *Docostaurus maroccanus* (Thunberg, 1815), le Criquet pèlerin *Schistocerca gregaria* (Forsk., 1775) et le Criquet migrateur *Locusta migratoria* (Linné, 1798) (Betina et *al.*, 2017).

Locusta migratoria est l'un des ravageurs critiques les plus importants en raison de sa propension à se développer en essaims massifs et à migrer sur de longues distances causant des dommages intensifs et graves aux cultures dans de grandes parties de l'Afrique et de l'Asie (Tu et *al.*, 2020). Le criquet migrateur est une espèce hygrophile montrant une augmentation de la taille de la population due à l'introduction de techniques d'irrigation pivotées à grande échelle sur les champs de céréales dans le sud de l'Algérie (Soudani & Moussi, 2020).

L'arsenal chimique utilisé en lutte antiacridienne est très diversifié et cause des problèmes complexes sur les espèces non cibles et sur les écosystèmes naturels. Car le plus souvent nous ne disposons qu'aucune connaissance concernant l'évolution d'un acridicide, son métabolisme, ses possibilités de bioaccumulation ou de bio-magnification et les phénomènes de synergie résultant de la présence simultanée d'autres substances ou des conditions du milieu aride (Ould El Hadj et *al.*, 2011).

Pour minimiser les répercussions négatives des insecticides chimiques, de nouvelles orientations sont considérées. La lutte biologique, précisément par l'utilisation de champignon entomopathogène est une alternative très prometteuse pour assurer une protection phytosanitaire performante (Arkam, 2019).

Les champignons entomopathogène attirent l'attention de plusieurs chercheurs pour leur compétence dans l'infection d'une large gamme d'insectes. Ces derniers sont soit des ravageurs de l'agriculture (pucerons, cicadelles, punaises, thrips) ou vecteurs de maladies (moustiques, punaises embrassâtes, mouches tsé-tsé) (Mannino et *al.*, 2019).

Le *Metarhizium anisopliae* var. *acidum* dont le nom commercial est le Green muscle® retrouvé sur *Ornithachris cavroisi* (Finot, 1907)(Orthoptera, Cyrtacanthacridinae) au Niger, s'est avéré le champignon entomopathogène le plus virulent (Arkam et *al.*, 2019). En Algérie, ce biopesticide a révélé des résultats encourageants comme a montré le test réalisé dans la région d'El-Oued conjointement par l'Institut National de la Protection des Végétaux (INPV) et l'Organisation Mondiale de l'Alimentation et de l'Agriculture (FAO) sur plus de 1400 hectares infestés de larves de criquet pèlerin (Kooyman et *al.*, 2005). Et le test de terrain sur les larves de criquet marocain au niveau de la wilaya de Sidi-Bel-Abbès, dont les résultats suggèrent que la mortalité est plus importante au jour où les larves ramassent une dose létale en spores (Arkam et *al.*, 2017a). La virulence du *M. anisopliae* dépend de la concentration en spores qui envahit l'hémolymphe et s'est montré efficace du moment que ce champignon entomopathogène a échappé à la barrière phagocytaire du système immunitaire des criquets traités sur terrain (ARKAM et *al.*, 2017b).

L'utilisation de *M. anisopliae* var. *acidum* (la souche IMI 330189 de Green muscle) est à la fois un moyen pour lutter contre les larves de criquets et un modèle important pour l'étude des interactions hôte – pathogène. C'est dans ce contexte que notre travail s'inscrit, nous avons choisis de mettre en lumière le test de mortalité chez les larves de criquet migrateur et de rechercher les lésions tissulaires au niveau de la cuticule et de l'intestin.

Le présent travail comporte trois chapitres, dans le premier nous rapportons des rappels bibliographiques. Le deuxième chapitre comporte le matériel et les techniques utilisés.

Les résultats obtenus sont rapportés et discutés dans le dernier chapitre.

CHAPITRE I

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

I.1. GENERALITES SUR LE CRIQUET MIGRATEUR

I.1.1. Identification

Le criquet migrateur, *Locusta migratoria* (Linnée, 1758), présente des antennes courtes et une grande taille. La longueur de la femelle est d'environ 54 à 72 mm et chez les mâles elle varie entre 42 à 55 mm (Lecoq, 1991).

I.1.2. Taxonomie

Les locustes font partie de la famille des Acrididae. L'organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et Agriculture (F.A.O, 2016) a définis la position systématique de l'espèce *Locusta migratoria* comme suivante :

Domaine	Eucaryota
Règne	Animalia
Embranchement	Arthropoda
Sous embranchement	Uniramia
Classe	Insecta
Ordre	Orthoptera
Famille	Acrididae
Sous famille	Acridinae
Genre	Locusta
Espèce	<i>Locusta migratoria</i>

I.1.3. Le cycle biologique

Le cycle de vie d'un criquet comprend une succession d'états biologiques : l'état embryonnaire (l'œuf), l'état larvaire (la larve) et l'état imaginal (l'ailé ou imago) (**Figure1**). En tous cinq stades larvaires se succèdent séparé à chaque fois par une mue (Arkam, 2019).

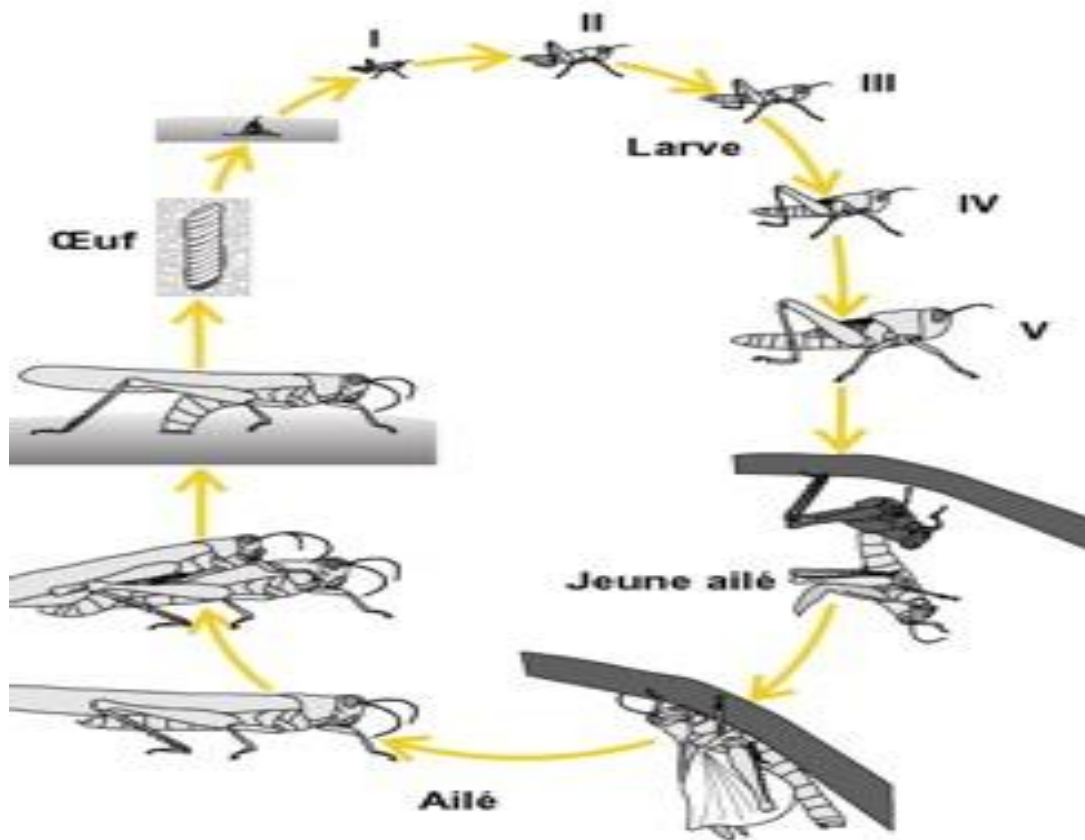


Figure 1 : Cycle biologique de *Locusta migratoria* (Dobson, 2001)

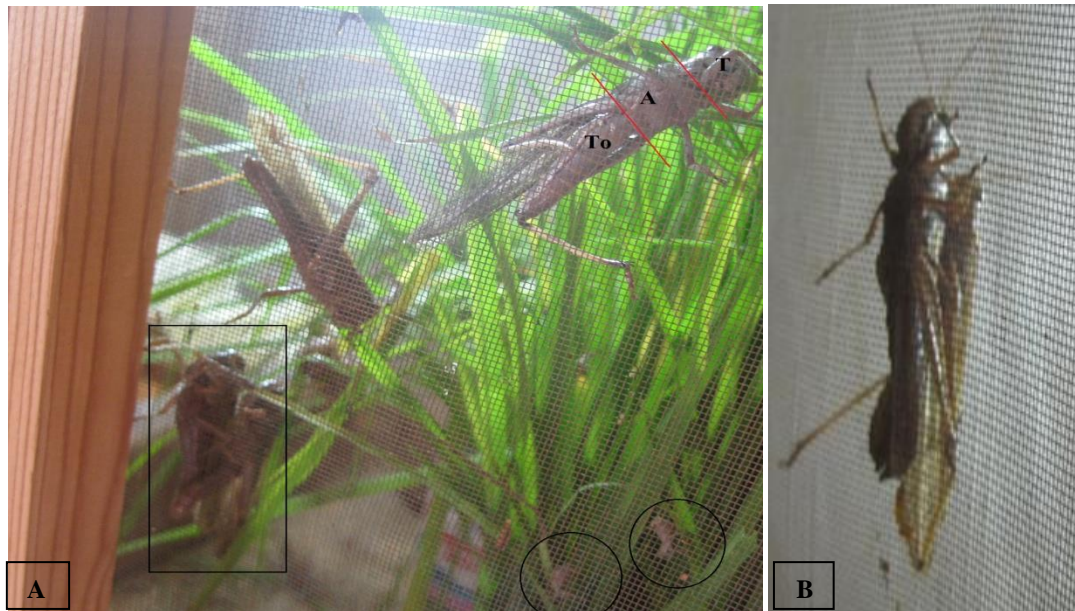


Figure 2: A. Criquet migrateur dans la cage de l'élevage (photos originales)

T : tête ; **A :** abdomen ; **To :** Thorax ; **cercle :** larves néonates ;
rectangle : accouplement des adultes. **B.** La mue imaginale

BELLMANN & LUQUET, (1995) ajoutent que l'imago est le dernier stade de développement du criquet, il ressemble alors à la larve excepté la présence d'ailes qui étaient sous forme d'ébauches. L'adulte est un imago sexuellement mûr.

Le stade adulte représente des individus matures capables de se reproduire et de pondre des œufs ; Les larves néonates sont de couleur blanchâtre (figure 2). L'état embryonnaire est généralement hypogé (sous la surface du sol), les deux autres épigées (au-dessus de la surface du sol) (Latchininsky, 2013).

I.1.4. Le tégument des criquets

Les criquets sont caractérisés par un revêtement externe appelé tégument, formé d'une surface interne ou lame basale et de cuticule. Cette dernière possède une structure protectrice à plusieurs couches flexibles et rigides (Arkam, 2019).

I.1.4.1. La membrane basale

La lame basale, 0,5 μm d'épaisseur. Elles servent de barrière et de transport épithélial. C'est l'épiderme qui fournit les composés et les enzymes nécessaires pour la dégradation de l'ancienne cuticule et la formation d'une nouvelle (Fan et *al.*, 2003).

I.1.4.2. La cuticule

La cuticule recouvre toute la surface externe des insectes et se poursuit à l'intérieur de l'intestin antérieur et postérieur, couvrant aussi le conduit des glandes dermiques et tout le système trachéen (Vincent, 2001). La cuticule possède des propriétés physicochimiques et mécaniques qui varient selon les parties du corps. C'est une structure acellulaire sécrétée par un épithélium formé de cellules épidermiques reposant sur une membrane basale (AGUIB, 2019).

❖ La chitine

Le terme chitine désigner l'organique obtenu en traitant une cuticule d'insecte par de la potasse (Jeuniaux, 1975). Donc, la cuticule est une matière composite de chitine et de protéine (Vincent, 2001). Il existe plusieurs types de liaisons covalentes possibles entre chitine et protéines au niveau du complexe chitinoprotéique (Brine, 1982).

La chitine est un copolymère constitué d'unités de répétition D-glucosamine et N-acétyl D-glucosamine liées β - (1 \rightarrow 4) (figure 3) (Annouar et *al.*, 2005).

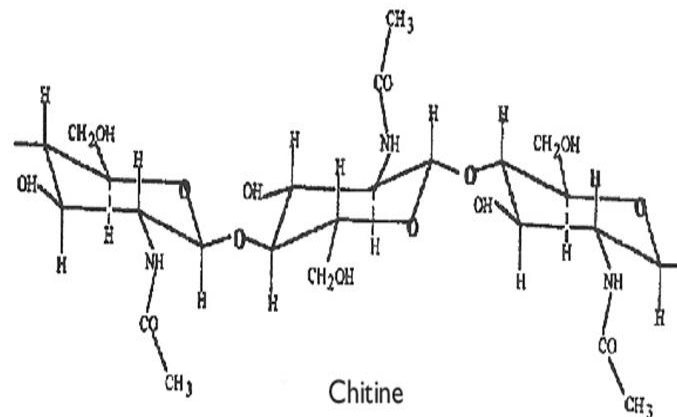


Figure 3: Structure chimique de la chitine (Annouar et *al.*, 2005).

D'après (Vincent, 2001) les couches de la cuticule sont les suivantes (figure 4):

➤ **L'épicuticule**

L'épicuticule est externe mince de 1 à 4 μ m d'épaisseur, non chitinisée, riche en lipides et protéines.

➤ **La procuticule**

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

➤ **L'exocuticule**

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

➤ **L'endocuticule**

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

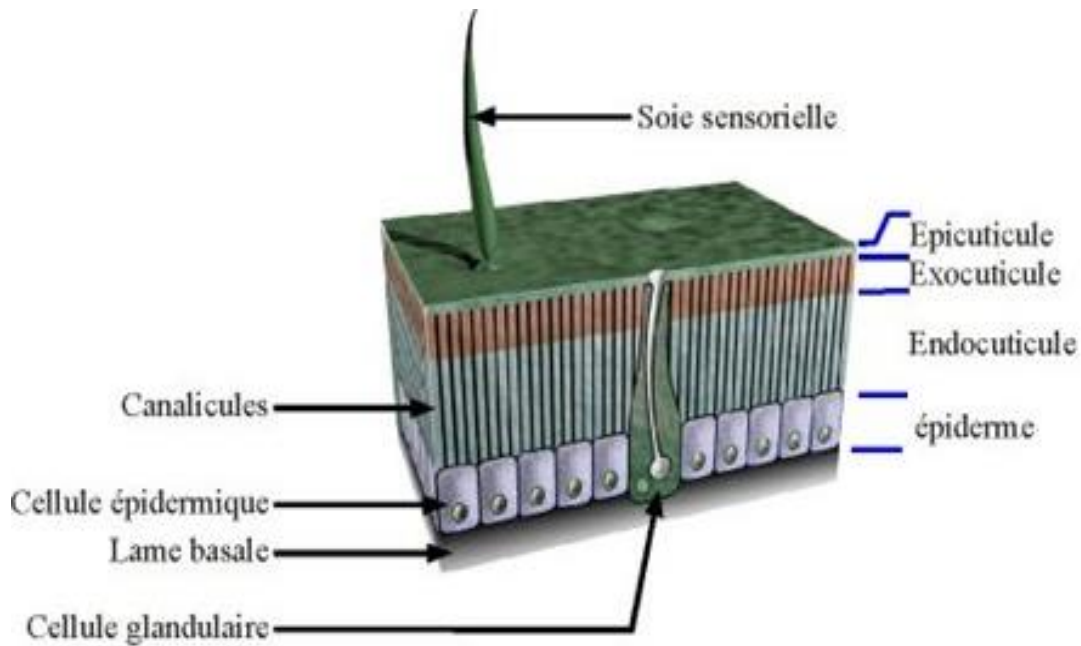


Figure 4 : Principales couches du tégument chez les insectes (Vincent, 2001 modifiée) (Les proportions ne sont pas respectées).

I.1.5. L'appareil digestif chez les criquets

Le tube digestif ou intestin est un conduit reliant la bouche à l'anus regroupée de l'avant vers l'arrière en trois parties intestinales, le stomodeum, le mésentéron et le proctodeum (**Figure 5**) (Arkam, 2019).

I.1.5.1. Stomodeum ou intestin antérieur

Le stomodeum s'étend de la bouche au métathorax, il comprend la cavité buccale, le pharynx, l'œsophage et deux poches qui sont le jabot, où sont stockés les aliments, et le gésier qui assure la trituration des aliments et le transit de la nourriture vers l'intestin moyen (CHARA, 1995).

I.1.5.2. Mésentéron ou intestin moyen

C'est la région de la digestion et de l'absorption. Le mésentéron comprend six cæcums gastriques qui augmentent la surface intestinale et va jusqu'au pylore qui le sépare de l'intestin postérieur (CHARA, 1995).

I.1.5.3. Proctodeum ou intestin postérieur

Elle se différencie à partir du pylore où s'insèrent les tubes de Malpighi qui forment l'appareil excréteur, assure la réabsorption d'eau et de certains ions (CHARA, 1995). D'avant en arrière, il se compose d'un iléon musculueux, un colon étroit et un rectum dilaté en poche. Une valvule rectale marque la limite entre colon et rectum. Le rectum se termine par un sphincter : l'anus (Doumandji & Doumandji-Mitiche, 1994).

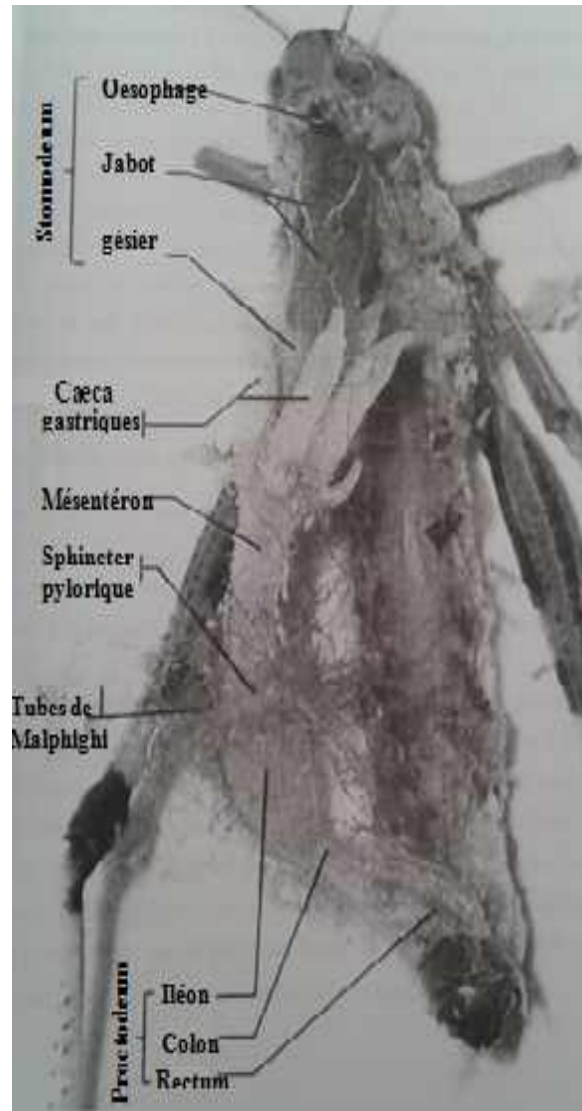


Figure 5: Anatomie du tube digestif de *S. gregaria* (Jankowiak, 2013,modifiée).

I.2.GENERALITES SUR LES BIOPESTICIDES

I.2.1. Définition

Les biopesticides sont à base d'organismes vivants ou de produits issus de ces organismes, ayant la particularité de tuer ou délimiter la densité des ravageurs de cultures (Deravel et *al.*, 2014). Les biopesticides sont efficaces en petites quantités et se décomposent rapidement sans engendrer des effets néfastes sur la santé humaine et sur l'environnement (Christos & Koutroubas, 2018).

I.2.2. Classification

Les biopesticides peuvent être classés en trois grandes catégories selon leur nature (Deravel et *al.*, 2014).

I.2.2.1. Biopesticides végétaux

Certaines plantes produisent des substances actives ayant des propriétés insecticides. Parmi ces plantes, le pyrèthre qui est un insecticide naturel dérivé des fleurs de *Tanacetum cinerariifolium* dont ses principes actifs sont les pyréthrinés. Ces derniers agissent en perturbant la conduction nerveuse chez l'insecte par un ralentissement de la fermeture des canaux Na⁺. En conséquence l'insecte subit l'hyperactivité suivie par la convulsion (Mengli et *al.*, 2018).

Parmi les biopesticides végétaux les plus utilisés, l'huile de neem qui est un insecticide extrait des graines d'*Azadirachta indica* (Deravel et *al.*, 2014). L'huile de neem est efficace sur un grand nombre d'insectes et sur les acariens. L'ingestion de cette huile provoque la paralysie du tube digestif de l'insecte entraînant sa mort. D'autre part, les larves n'arrivent plus à muer ce qui les empêche d'atteindre le stade adulte. Elles finissent elles aussi par mourir (Radhika et *al.*, 2018).

I.2.2.2. Biopesticides animaux

Les biopesticides d'origine animale sont des animaux comme les prédateurs ou les parasites, ou des molécules dérivées d'animaux, souvent d'invertébrés comme les venins d'araignées, des hormones d'insectes, des phéromones. Ce type de pesticides biologiques sont des signaux chimiques produits par un organisme et qui changent le comportement d'individus de la même espèce ou d'espèces différentes. En effet, ils ne provoquent pas la mort des

ravageurs, mais plutôt créer une confusion chez ces derniers. Cette confusion les empêchera de se propager dans la zone traitée (Deravel et *al.*, 2014).

I.2.2.3. Biopesticides microbiens

Cette catégorie de biopesticides comprend les microorganismes entomopathogènes y compris les bactéries, les champignons, les oomycètes, les virus et les protozoaires (Senthil-Nathan, 2015).

Parmi les microorganismes utilisés en lutte biologique, Il existe plus de 700 espèces de champignons entomopathogène ; Ils appartiennent au phylums suivants: Chytridiomycota, Zygomycota, Oomycota, Ascomycota et Deuteromycota (Murillo-Alonso et *al.*, 2019). Cependant, les genres *Metarhizium*, *Beauveria*, *Lecanicillium* et *Isaria* sont les plus utilisés et les plus commercialisés en raison de leur large éventail d'hôtes (Murillo-Alonso et *al.*, 2019)

❖ **Biopesticide à base de *Metarhizium anisopliae***

Metarhizium anisopliae est un champignon entomopathogène largement utilisé comme agent de lutte biologique dans le monde entier pour réguler les populations d'insectes affectant les zones agricoles (Navarro-Barranco et *al.*, 2019).

Le Green Muscle® est un biopesticide entomopathogène, correspond à l'isolat IMI 330139 de *Metarhizium acridum*. Le produit est efficace contre tous les stades, les nymphes et les adultes des sauterelles et des criquets (Arkam et *al.*, 2017; Zakaria & Sagnia, 2003). En 2000, l'Australie a été l'un des premiers pays à commercialiser ces pesticides à base de *Metarhizium* (Nourrisson et *al.*, 2017).

L'activité biologique de Green muscle a confirmé ses potentialités entomopathogène sur l'histologie intestinale des larves traitées en milieu naturel (Arkam et *al.*, 2019). Des altérations au niveau du tégument (Arkam et *al.*, 2017a) et de l'hémolymphe sont également enregistrées chez les larves de criquets marocain avec un effet cyto-pathologique sur les hémocytes (ARKAM et *al.*, 2017b).

I.3. GENERALITES SUR LE *METARHIZIUM ANISOPLIAE*

I.3.1. Identification

Metarhizium anisopliae comprend un grand nombre de souches différentes et d'isolats de diverses origines géographiques et de différents types d'hôtes. *Metarhizium spp* sont largement connus pour leur potentiel létal affectant plus de 200 espèces d'insectes et d'arthropodes pathogènes (Nourrisson et *al.*, 2017).

I.3.2. Taxonomie

La classification est basée sur les caractères morphologiques du mycélium et des conidies et comme ces caractéristiques sont assez limitées elles ont compliqué la taxonomie (Bidochka & Small, 2005). *Metarhizium anisopliae* présente selon (Bidochka & Small, 2005) la classification suivante :

Règne	Fungi
Embranchement	Dikarya
Sous-embranchement	Ascomycota
Classe	Pezizomycotina
Ordre	Hypocreales
Famille	Clavicipitaceae
Genre	<i>Metarhizium</i>
Espèce	<i>Metarhizium anisopliae</i>

I.3.3. Morphologie

Metarhizium anisopliae peut être aisément identifié par des conidiospores vertes, produites en chaînes irrégulièrement ramifiées ou non et arrangés en groupes compacts formant une masse de spores (Figure 7-A) (Bidochka & Small, 2005).

Il existe deux formes de *Metarhizium anisopliae* dont la différence se base sur la taille des conidies : (1) la forme *Metarhizium anisopliae var. anisopliae* à spores courtes, dont les conidies mesurent de 5 à 8 µm de longueur (figure 6-A) et (2) la forme *Metarhizium anisopliae var. majus* à spores longues, dont les conidies mesurent de 10 à 14 µm de longueur.

Metarhizium anisopliae présente un aspect blanchâtre avant la maturation des spores et il devient après vert foncé (figure 6-B) (Bischoff et al., 2009).

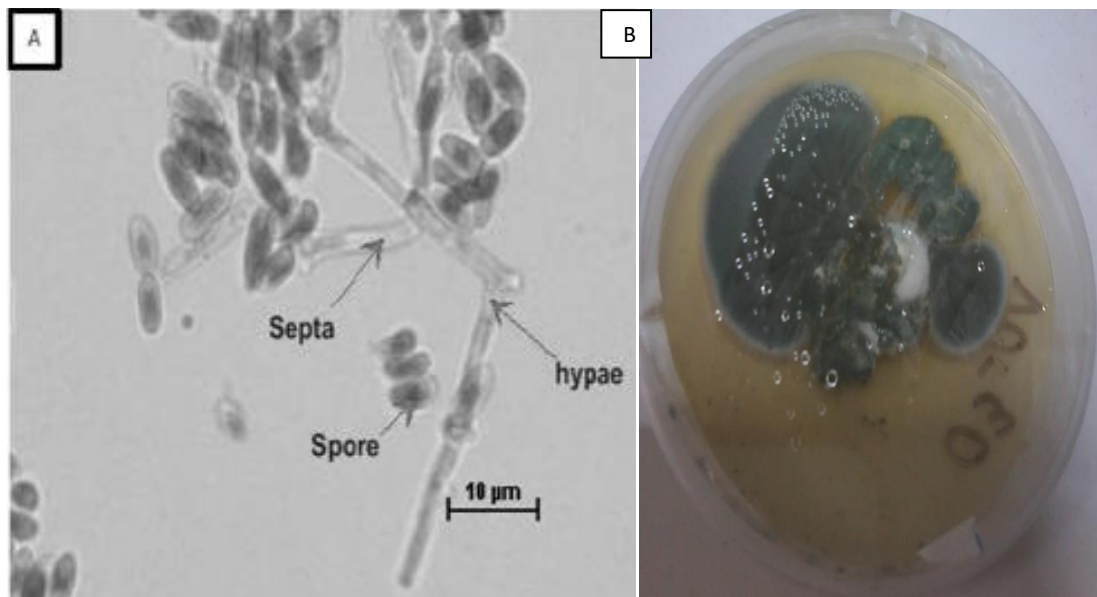


Figure 6: *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*.

A. Vue au microscopique photonique de la spore cylindrique de (G1000x) (Elham et al., 2018) B. Aspect culture en milieu PDA (Arkam, 2019).

I.3.4. Mode d'infection

Contrairement aux autres microorganismes entomopathogène, bactéries et virus qui doivent être ingérés pour provoquer des maladies, les champignons entomopathogène ont la capacité d'infecter leurs hôtes sans que la voie digestive ne soit nécessaire (Kiliç et al., 2019). L'entomopathogène *M. anisopliae* produit des spores fongiques ou des conidies responsables de l'infection. L'invasion du corps de l'insecte et du système circulatoire (hémolymphe) se produit une fois que le champignon a traversé la cuticule du squelette externe de l'insecte (Arkam, 2019; Shah & Pell, 2003). La contamination se fait également par contact, à travers les stigmates, ou par ingestion de la végétation traitée par le mycopesticide (Arkam, 2019; Kiliç et al., 2019).

I.3.5. Le processus d'infection

Le mode d'infection des champignon entomopathogène se divise en quatre étapes distinctes qui sont l'adhésion, la germination, la pénétration et la dissémination (Figure 7) (Bissaad et al., 2012; Brunner-Mendoza et al., 2019).

I.3.5.1. Phase d'adhésion

Elle est déclenchée par un mécanisme de reconnaissance et de compatibilité. L'attachement est réalisé via des mécanismes hydrophobes entre la conidie et la surface de la cuticule (Shah & Pell, 2003). Les principales protéines impliquées dans ce processus sont les adhésines spécifiques telles que Mad1. Une fois en contact avec la cuticule, les spores produisent activement un mucilage hygroscopique qui permet la modification de l'épicuticule de l'insecte facilitant la germination des spores et peut aussi créer un environnement favorable aux enzymes exo-cellulaires libérées par ces dernières (Brunner-Mendoza et al., 2019).

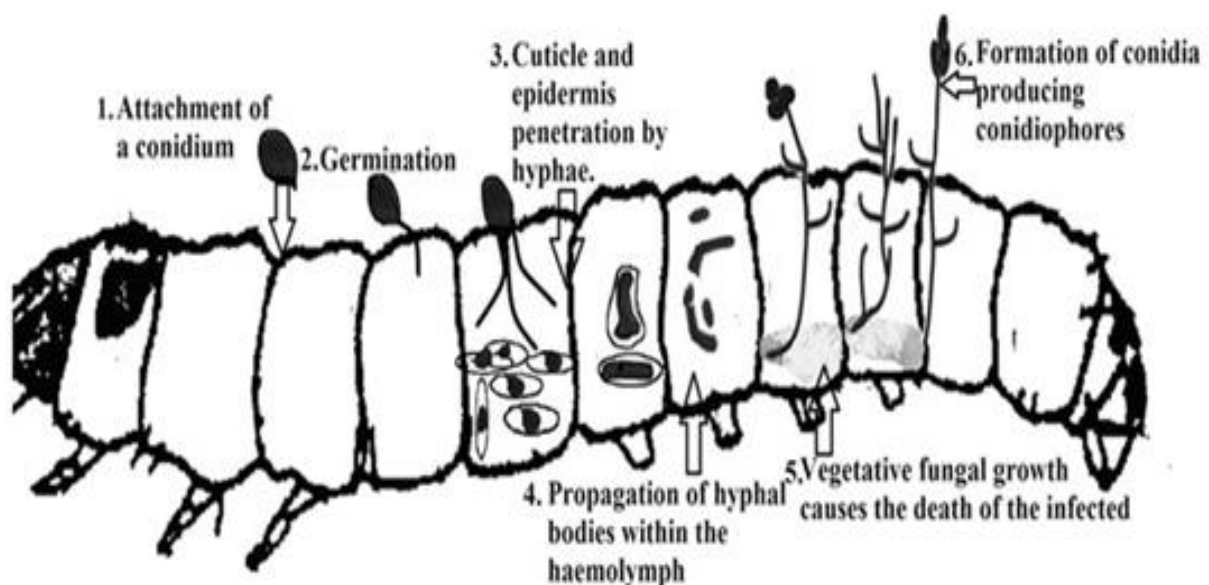


Figure 7: Processus d'infection de l'insecte lépidoptère par *Metarhizium anisopliae* (Senthil-Nathan, 2015).

I.3.5.2. Phase de germination

La germination des spores dépend de nombreux facteurs biotiques, tels que les hydrocarbures cuticulaires des insectes hôtes ainsi que des facteurs abiotiques (température, rayonnement solaire et humidité) (Brunner-Mendoza et al., 2019). Une fois fixées, les spores émettent un tube germinatif. Ce dernier s'allonge et forme un hyphe qui traverse les assises supérieures de la cuticule de criquet pour pénétrer à l'intérieur de celui-ci (Arkam et al., 2017a).

I.3.5.3. Phase de pénétration

Les hyphes sortants pénètrent dans la cuticule à l'aide des enzymes (protéases et chitinases) qui attaquent et dissolvent les composants de la cuticule. Le champignon forme

l'appressorium qui lui permet le prélèvement des substances nutritives nécessaires à son développement et à sa reproduction (figure 8) (Bissaad et al., 2012).

I.3.5.4. Phase de dissémination

Une fois le champignon perce l'épiderme, il rentre dans le système circulatoire ouvert de l'insecte, l'hémocœle. A ce niveau, le champignon utilise les nutriments disponibles pour sa croissance et sa reproduction (Vega et al., 2012). Au niveau de l'hémolymphe, les hyphes se développent en blastospores qui se multiplient et exercent un effet cyto-pathologique sur les hémocytes (figure 8) (ARKAM et al., 2017b).

Une fois dans l'hôte, le pathogène se multiplie en lui causant des altérations tissulaires. Arkam et al., 2017a;b ont reporté la présence des altérations au niveau de l'hémolymphe et du tégument chez les larves de criquets marocains traitées par Green muscle. La mort de l'insecte infecté par *M. anisopliae* var. *acridum* survient après envahissement du corps par les filaments mycéliens, causant des dommages par destruction des tissus (Arkam, 2019).

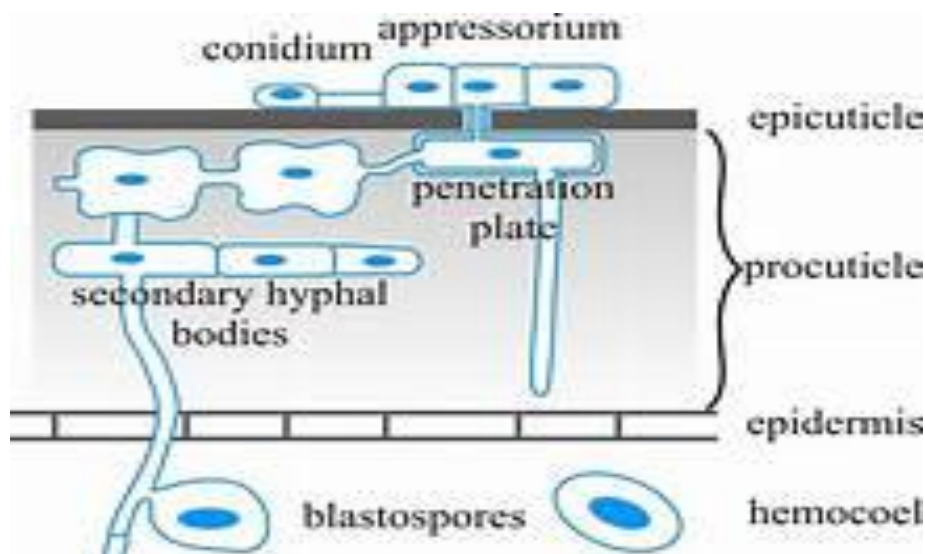


Figure 8 : Les structures infectieuses de *Metarhizium anisopliae* (Hajek & St Leger, 1994)

I.3.6. Production des toxines et effet biocide

L'aptitude du champignon à surmonter le système immunitaire de l'hôte peut être facilitée par une rapide reproduction et formation de mycéliums, ainsi qu'une forte production des métabolites secondaires ou de toxines dans l'hémocœle (BENSERRADJ, 2014; Brunner-Mendoza et al., 2019; Zimmermann, 2007).

L'espèce *Metarhizium anisopliae* produit les dextruxines et les cytochalasmes qui ont des effets toxiques sur différents tissus, et provoquent des perturbations de la physiologie de l'hôte. Ces composés toxiques sont caractérisés comme les facteurs les plus virulents accélérant la mort des insectes infectés (Schrank & Vainstein, 2010).

I.3.7. La maladie de la muscardine verte et propagation de l'infection

Quand l'insecte meurt, le champignon entre dans un stade hyphal et colonise les organes internes. Si les conditions de l'environnement sont favorables, du mycélium commence à sortir des articulations. Au bout d'un certain temps, le champignon fructifie à la surface de l'insecte mort et le cadavre devient vert, un phénomène appelé " la muscardine verte" (figure 4). Les spores se disséminent peu à peu dans le sol pour infecter d'autres criquets causant ainsi une épidémie (Arkam, 2019).



Figure 9: images d'acridiens infectés par *M. anisopliae*. **a** : adulte de *L. migratoria* (Bissaad et al., 2012); **b** : L4 de *L. migratoria* (Kleespies, 2000); **c** : L5 de *D. maroccanus*, **d** : tégument interne de *D. maroccanus*

CHAPITRE II
METHODES ET MATERIELS

Notre travail s'agit d'une étude rétrospective et analytique des résultats obtenus à partir des expérimentations conduites sur une population larvaire de *Locusta migratoria*.

Les individus de criquet migrateur sont originaires de la wilaya de "Adrar", au Sud-Ouest de l'Algérie, capturés par une équipe de l'Institut National de Protection des Végétaux (INPV) d'El-Harrach-Alger en mois de Juin 2017.

L'élevage des criquets et les différentes manipulations avec le champignon entomopathogène ont été réalisés au niveau du laboratoire acridologie au département de lutte antiacridienne à l'INPV, pendant 9 mois.

La préparation des coupes histologiques a été réalisée au niveau du laboratoire de cytologie au Centre Hospitalo-Universitaire N'Fissa Hamoud à Hussein Dey – Alger, pendant 2 mois.

Nous avons analysé les résultats concernant le test de mortalité des larves et nous avons étudié les coupes histologiques réalisées au niveau du tégument et du tube digestif des larves traitées par le biopesticide Green muscle à base de *M. anisopliae* var. *acidum*.

L'observation des coupes histologiques et la prise de photos sont réalisées au niveau de la station expérimentale de la faculté de Science de la Nature et de la Vie à Université de Blida1. Notre travail a duré quatre mois d'Avril au Juillet 2021.

II.1. PRESENTATION DU MATERIEL UTILISES

II.1.1. Matériel biologique

II.1.1.1. La souche fongique, *Metarhizium anisopliae* var. *acidum*

Le champignon entomopathogène utilisé lors des différents essais est le *Metarhizium anisopliae* var. *acidum* (l'isolat IMI 330139). Les spores de ce champignon sont conditionnées en biopesticide commercialisé sous le nom Green Muscle® (GM). Ce produit est fabriqué par la société LUBILOSA (Lutte biologique contre les Locustes et les Sautereaux) et est spécifique aux espèces de criquet à antennes courtes (*Acridoidea* : *Acrididae* et *Pyrgomorphidae*).

Le biopesticide est conditionné dans des sachets de 1kg (au minimum 5 x 10¹⁰ spores /g), sous forme de poudre sèche fine de spores en couleur verte marine (Figure 1- Annexe 1).

Le GM est fourni par l'INPV d'El-Harrach. Le produit est conservé à 4°C.

Le Green muscle est utilisé d'une part pour évaluer son effet insecticide sur les larves L3, L4 et L5 de criquet migrateur (le test de mortalité) et d'autre part pour évaluer son effet histo-pathologique au niveau de la cuticule et les trois parties intestinales des L5.

II.1.1.2. Criquet migrateur, *Locusta migratoria* (Linnée, 1758)

Notre étude repose sur une espèce de criquet ravageur les plus abondants et les plus redoutables précisément dans le sahel et le sud algérien. Il s'agit de criquet migrateur *Locusta migratoria* (Linnée, 1758).

La capture des individus de *L. migratoria*, dans le biotope, est réalisée par des filets de capture. Les criquets sont transportés dans des cages depuis la wilaya d'Adrar jusqu'à l'INPV d'Alger par transport aérien.

Les larves expérimentées sont issues d'un élevage en masse pour servir aux différents tests réalisés au laboratoire.

II.1.2. Matériel non biologique

Le matériel non biologique comprend les équipements, les appareillages et les milieux de culture utilisés pendant les expérimentations (Tableau 1-Aannexe 1).

II.2. METHODES

II.2.1. Elevage de criquet migrateur

Les individus de *L. migratoria* sont gardés sous des conditions expérimentales contrôlées pour obtenir une nouvelle génération sur laquelle les différents tests sont appliqués.

La salle d'élevage est munie d'un système de chauffage couplé à un thermostat permettant de maintenir une température constante de 28 à 30 °C. Une photopériode est assurée, de 12 h de lumière par jour, par des ampoules électriques de 60 watts couplées à une horloge. C'est pour servir le chauffage et l'éclairage à la salle afin que les criquets puissent trouver leurs conditions nécessaires pour muer et pondre (Figure 10).

L'élevage a été effectué dans des cages, grillagée en métal inoxydable et à mailles très fines sur les parois latérales. Les cages sont recouvertes d'une toile moustiquaire en aluminium pour l'infiltration de l'eau et l'aération. Cette dernière est nécessaire afin d'éviter la condensation de l'humidité apportée par la nourriture.

Les cages contiennent des pondoirs d'environ 15 cm de profondeur, contenant de sable fin stérilisé et humidifié. Les cages sont menées de deux vitres coulissantes pour faciliter leur nettoyage et la vérification des pondoirs, les éclosions des œufs ainsi que le renouvellement de la nourriture (Figure 10).

Les criquets se nourrissent de tous ce qui est vert comme les choux, gazon avec un complément de son de blé, fournis à volonté qui doivent être bien lavées afin d'éviter toute contamination par les phytoparasites (Figure 10).



Figure 10: les conditions d'élevage en cage de *L. migratoria* (Photos originales)

II.2.2. Le test de mortalité des larves traitées avec *M. anisopliae*

❖ Le test germinatif

Afin de vérifier la viabilité des spores conditionnées en biopesticide, un test germinatif est réalisé avant tout traitement des larves avec le GM.

D'après Arkam, (2019) on parle de spore germée, 24 h après mise en culture, lorsque le tube germinatif est plus ou moins long que largeur de cette spore.

Le test de germination a révélé un bon pouvoir germinatif, les spores conditionnées sont viables et le taux de germination est obtenu à 90 % (voir annexe 1).

II.2.2.1. Préparation du milieu de culture de *Metarhizium anisopliae*

La multiplication consiste à la germination des spores et à l'obtention de souche pure de notre champignon entomopathogène. La fructification de *Metarhizium* a été réalisé sur le milieu PDA (Potato Dextrose Agar), dont la composition est mentionnée dans l'annexe 1.

Les milieux préparés sont stérilisés par autoclavage à 120°C. Les boites remplies de moitié avec ce milieu, sont étiquetées clairement et sont fermées hermétiquement par du parafilm. Les cultures sont maintenues dans des étuves thermo-réglables stérilisées à 28°C.

Toutes les manipulations sont effectuées avec un matériel stérilisé, devant un bec benzène et sous une hotte stérilisée, via les rayons Ultra-Violet (UV), afin d'éviter toutes contaminations.

II.2.2.2. Ensemencement et mise en culture de *Metarhizium anisopliae*

La solution mère en spores de *Metarhizium anisopliae* est extraite du biopesticide, le Green muscle (IMI 330139). A cet effet, 0,8 g de spores sont mélangées avec 20 ml de l'huile de tournesol. Cette huile végétale est choisie comme solvant organique naturel. Car les conidies (spores sèches) de Green muscle ne sont pas miscibles avec de l'eau tandis qu'elles forment des solutions homogènes en formulation huileuse. La suspension est homogénéisée à l'aide d'un agitateur (Vortex) pendant 10 min.

Nous avons ensemencé trois gouttes de la suspension de spores sur le milieu de culture PDA en conditions aussi stériles que possible. Le cryptogame est repiqué plusieurs fois sur le milieu PDA pour une meilleure fructification du champignon (Figure 11a).

L'incubation des cultures ainsi préparées est maintenue dans une étuve à 25 °C. Au bout de quelques jours, la prolifération du champignon est observée sur le milieu de culture.

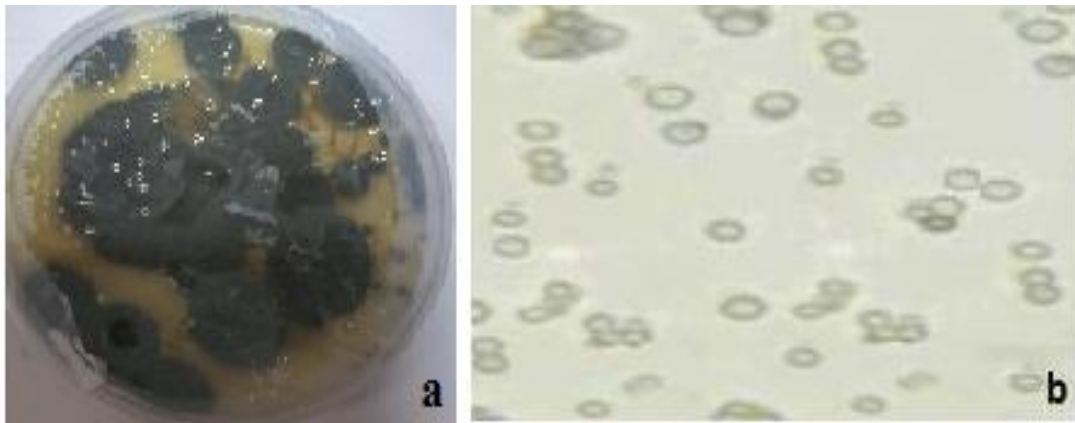


Figure 11 : Morphologie de *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*.

a: culture sur le milieu PDA; **b**: observation au microscopique des spores germées Gr. x 400
(Photos originales)

II.2.2.3. Récupération et dénombrement des spores germées

Sous la hotte, les spores germées sont récupérées à partir de plusieurs cultures âgées de 15 à 20 jours, ayant bien été sporulé. Ainsi, à l'aide d'une spatule stérile, le contenu de la culture est gratté et dilué dans 5 ml d'eau distillée stérile (rajouté dans la boîte de culture).

- L'ensemble des colonies fructifiées, ainsi récupérées des milieux de culture, sont introduites dans un Erlen Meyer. Le volume est complété à 50 ml de l'eau distillée stérile.
- La suspension en spores est bien agitée, pendant 15 mn sur un Vortex, pour désagréger les spores condensées et faciliter le dénombrement (Figure 11b)
- La concentration de la suspension mère de spores est déterminée en utilisant la cellule hématimétrique de Malassez sous microscope optique (grossissement x40 et x100) (voir annexe 1).

Pour le calcul de la concentration en spores nous avons utilisé la formule suivante décrite et utilisée par (Halouane, 2008; KARA_TOUMI, 2010):

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

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

On peut utiliser simplement la formule suivante, décrite et utilisée par (CHAOUCH, 2015).

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

Nombre de spores comptés dans 10 rectangles → Concentration en spores/ml

II.2.2.4. Préparation des formulations de traitement avec *Metarhizium anisopliae*

Pour obtenir des concentrations de traitement voulues, choisis selon la littérature, des dilutions successives de la solution mère sont réalisées.

Selon la loi d'équilibre, les doses recherchées sont calculées à partir de la solution mère de spores. $C1 \times V1 = C2 \times V2$

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

V1 : Le volume initial de la solution mère

C2 : la concentration à obtenir (voulue)

V2 : le volume de l'eau distillé correspond à la concentration C2.

$$V2 = (C1 \times V1) / C2.$$

Le volume d'eau à ajouter sera alors : $V = V2 - V1$

Les trois formulations de traitement au *Metarhizium* sont préparées aux doses suivantes :

$$D1 = 2,3 \times 10^4 \text{ spores/ml}$$

$$D2 = 2,3 \times 10^6 \text{ spores/ml}$$

$$D3 = 2,3 \times 10^8 \text{ spores/ml}$$

II.2.2.5. Echantillonnage des larves et réalisation de l'inoculation avec *M. anisopliae*

- ❖ A partir de l'élevage en masse, les larves L3, L4 et L5 sont sélectionnées puis réparties dans de petites cages de 8 individus chacun avec répétition. C'est-à-dire deux cages (n=8) pour chaque stade larvaire (Figure 12).

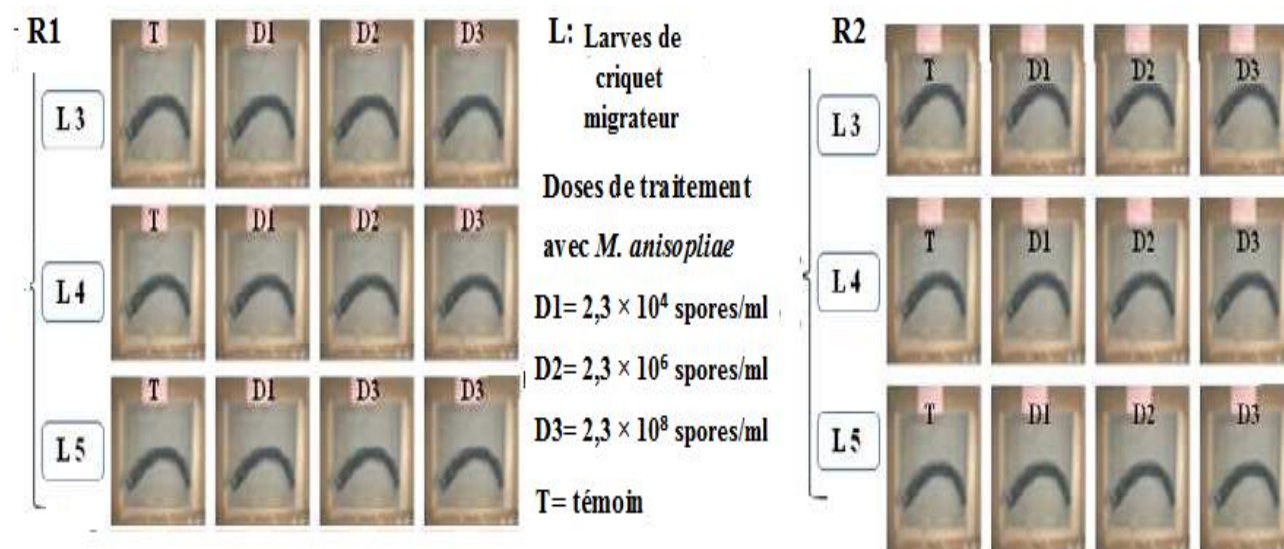


Figure 12: Diagramme récapitulatif des tests de mortalité avec *Metarhizium anisopliae* sur les larves de *L. migratoria* (L3 L4 et L5) en deux répétition (R1 et R2).

- ❖ Pour servir aux différents essais de mortalité Les L1 et L2 sont vulnérables et plus susceptibles de succomber rapidement aux traitements. De ce fait, les deux premiers stades larvaires ne sont pas testés.
- ❖ Chaque inoculum de traitement (D1, D2 et D3) est bien agité à l'aide d'un Vortex pour désagréger les spores avant application.
- ❖ Les larves de criquet migrateur de chaque stade (3e, 4e, et 5e stade) sont réparties en lots.
- ❖ Des lots témoins de chaque stade (L3, L4, et L5) sont également répartis en trois lots de 8 individus chacun.
- ❖ Des traitements par contact sont réalisés avec chaque inoculum aqueux à base de *M. anisopliae* (D1, D2 et D3). Et cela par une seule pulvérisation directe sur le corps de l'insecte.
- ❖ Les lots témoins reçoivent une seule pulvérisation avec de l'eau distillée stérile.

II.2.3. Evaluation des taux de mortalité des larves traitées avec le *M. anisopliae*

Des observations quotidiennes des larves témoins et traitées portent sur la présence de mortalité et des anomalies de comportement (nutrition, mouvement) et de morphologie. Les insectes morts sont éliminés de la cage pour éviter le cannibalisme.

Pour étudier l'effet du champignon sur la mortalité des individus, L3, L4 et L5, nous avons procédé à un comptage cumulé du nombre d'individus morts dans chaque lot jusqu'à l'épuisement de tous les individus traités ($n=8$). Le comptage est refait chaque 24 h à compter du jour de traitement (J0) à la même heure.

Le pourcentage de mortalité est calculé selon la formule suivante :

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

Le pourcentage de la mortalité observée est d'abord corrigé par rapport au témoin

Selon la formule d'Abbott, 1925 donnée comme suit :

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

Mc : Le pourcentage de mortalité corrigée

M 1 : Le pourcentage de mortalité chez les témoins

M 2 : Le pourcentage de mortalité chez les individus traités

II.2.4. Calcule de la dose létale 50 (DL50) et le temps léthal 50 (TL50)

II.2.4.1. La dose létale 50 (DL50)

La DL50 correspond à la dose létale nécessaire et suffisant pour tuer 50 % de la population traitée. Pour calculer la DL50, nous avons transformé les doses en logarithmes décimaux et les valeurs de pourcentages de mortalité corrigés en probits. Ces valeurs ont été calculées pour les trois stades larvaires étudiés (L3, L4, et L5).

Ces calculs nous permet d'obtenir des équations de droites de régression de type :

$$Y = ax + b$$

Y : probits de mortalité corrigée

x : logarithme décimal du temps

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

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

$$b = y' - ax' \quad (\text{Cavelier, 1976})$$

II.2.4.2. Le temps léthal 50 (TL50)

Le Temps létal 50 correspond au temps létale au bout duquel on obtient 50% de mortalité. Le TL50 est calculé à partir de la droite de régression des probits correspondants aux pourcentages des mortalités corrigées en fonction des logarithmes décimaux des temps après traitement (Cavelier, 1976).

A partir des équations de droite de régression de type :

$$y = ax + b$$

Nous pouvons calculer le TL50 et la DL50 en remplaçant Y par le probit de 50 qui égale à 5. Les TL50 et DL50 peuvent être déterminé graphiquement en recherchant l'abscisse du point correspondant au probit 5 sur le graphe (Cavelier, 1976).

Le traitement des données et le calcul de la DL50 et TL50 sont effectués à l'aide du logiciel EXCEL, qui nous a permis à réaliser les transformations et à tracer les droites de régressions.

La transformation en probits est effectuée en calculant la distribution cumulative normale inverse de la probabilité de mortalité.

Enfin nous avons obtenu des droites de régressions et ses équations ainsi que les coefficients de corrélation.

II.2.5. Test avec *M. anisopliae* pour la recherche de l'effet histopathologique

II.2.5.1. Le choix de la dose de traitement et des L5 pour le traitement avec *M. anisopliae*

Pour évaluer l'effet de *Metarhizium* sur l'histologie de l'intestin et de la cuticule, nous avons choisi la moyenne dose D2 ($2,3 \times 10^6$ spores /ml) et le 5^e stade larvaire de *L. migratoria* (les plus résistants au traitement par rapport au state 3 et 4).

- ❖ Des traitements par contact sont réalisés avec l'inoculum aqueux D2 à base de *M. anisopliae*. Et cela par une pulvérisation unique sur le corps de l'insecte.
- ❖ Les L5 témoins reçoivent une seule pulvérisation avec de l'eau distillée stérile.

II.2.5.2. Échantillonnage des L5 de *L. migratoria* et application du traitement

Le 5^e jour après traitement, des L5 vivantes, témoins et traitées avec D2 sont prélevé à partir des cages pour le la dissection.

II.2.5.3. Sacrifice des L5 et prélèvement du tégument et du tube digestif

Sous une loupe binoculaire, les larves sont disséquées par ouverture de l'abdomen après décapitation rapide de la tête. A l'aide des outils de la trousse de dissection, le tube digestif et quelques fragments de cuticules sont prélevés. Ces tissus sont destinés à l'étude histopathologique (Figure 13).



Figure 13 : Dissection des L5 de criquet migrateur et prélèvement des tissus étudiés.

II.2.6. L'étude histologique

L'étude est basé essentiellement sur la technique de Martoja & Martoja-Pierson, (1967) et (Gabe, 1968).

Afin d'obtenir des coupes histologiques colorées prêtes à l'observation microscopique, des fragments de l'intestin et de cuticule ont été imprégné dans plusieurs solutions suivant la technique adoptée par (Martoja & Martoja-Pierson, 1967) (Annexe1).

II.2.6.1. Fixation et rinçage des tissus

La fixation a pour but d'immobiliser les cellules tout en conservant la morphologie des tissus. Les fragments tissulaires ont été plongés rapidement dans le formol commercialisé dilué à 10% pendant 48 heures, puis rincés à l'eau courante écoulee pendant 24 heures.

Les fragments de tissus ont été mis dans des cassettes afin de permettre le passage des liquides au cours de la manipulation

II.2.6.2. Déshydratation, éclaircissement et imprégnation des tissus à la paraffine

Les cassettes ont été ensuite placées dans un automate à l'histologie (voir l'annexe 1) qui sert à assurer la déshydratation, l'éclaircissement des tissus et l'imprégnation à la paraffine. Cette matière est hydrophobe avec les solutions aqueuses alors qu'elle est miscible avec les solvants organiques comme le xylène.

Le but de la déshydratation est d'éliminer l'eau à partir du tissu pour permettre ensuite l'imprégnation à la paraffine et cela par le passage des échantillons dans différents bains d'alcool éthylique à concentration croissante afin d'éliminer l'eau des tissus. :

- Trois bains d'alcool 70°30 minutes chacun.
- Trois bains d'alcool 95°30 minutes chacun.
- Trois bains d'alcool 100°30 minutes chacun.

L'éclaircissement est effectué dans deux bains de xylène pendant 20 minutes chacun. Cette étape permet d'éliminer l'alcool à partir du tissu et le remplacer par le réactif de compensation (le xylène).

Ensuite, les cassettes ont été plongées dans deux bains successifs de xylène pendant 1 heure puis dans un bain de mélange xylène-paraffine 50% de chaque et ensuite dans un bain de paraffine pure. Cette matière assure une certaine rigidité au tissu pour faciliter la coupure.

II.2.6.3. Inclusion à la paraffine et mise en bloc

L'inclusion est réalisée dans des cassettes en plastique selon les étapes suivantes (Figure 14) :

- Écoulement de la paraffine dans des moules métalliques.
- Inclusion et orientation des fragments dans la paraffine.
- Placement des cassettes, sur lesquelles sont inscrits des informations sur l'échantillon.
- Refroidissement des blocs de paraffine sur une plaque métallique réfrigérée environ 10 minutes.
- Puis démoulage des blocs prêt pour la coupure au microtome.

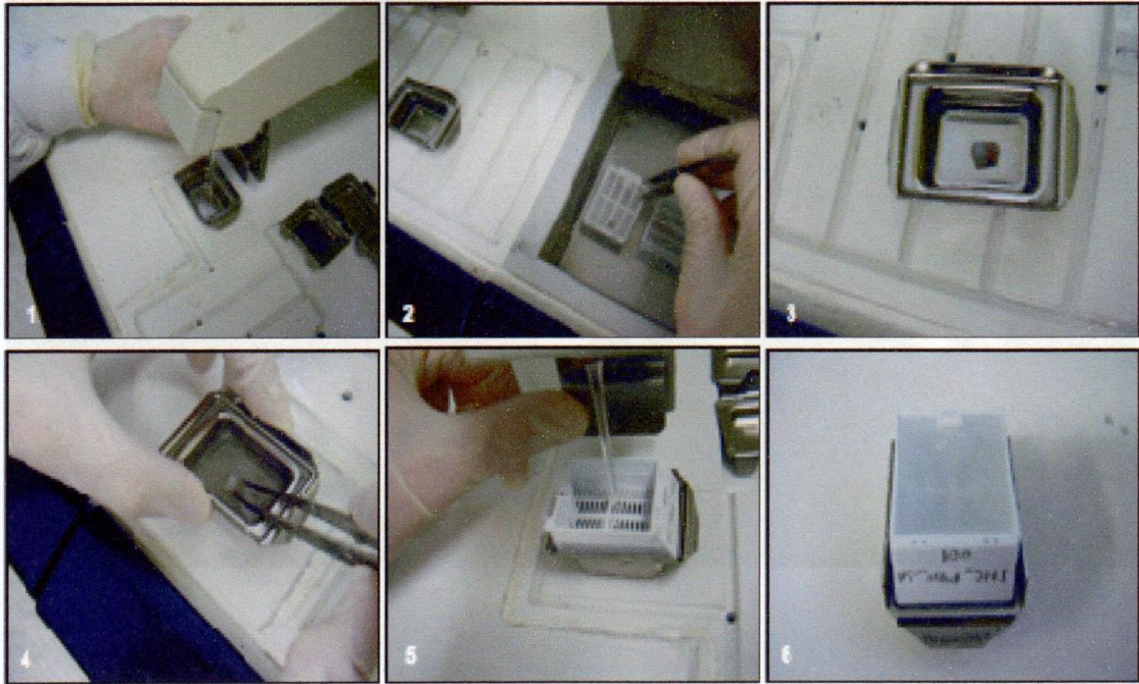


Figure 14 : Confection des blocs de paraffine

II.2.6.4. Confection des coupes et collage des rubans sur lames

Les coupes ont été effectuées au microtome de type « Leica » à 4 à 5 μ m d'épaisseur (Figure 15 a).

Les rubans sont étalés dans un bain marie (37°C) puis récupérés et collés sur des lames propres gélatinées (Figure 15b),

Les lames sont ensuite séchées dans une étuve réglée à 25 °C pendant 24 heures

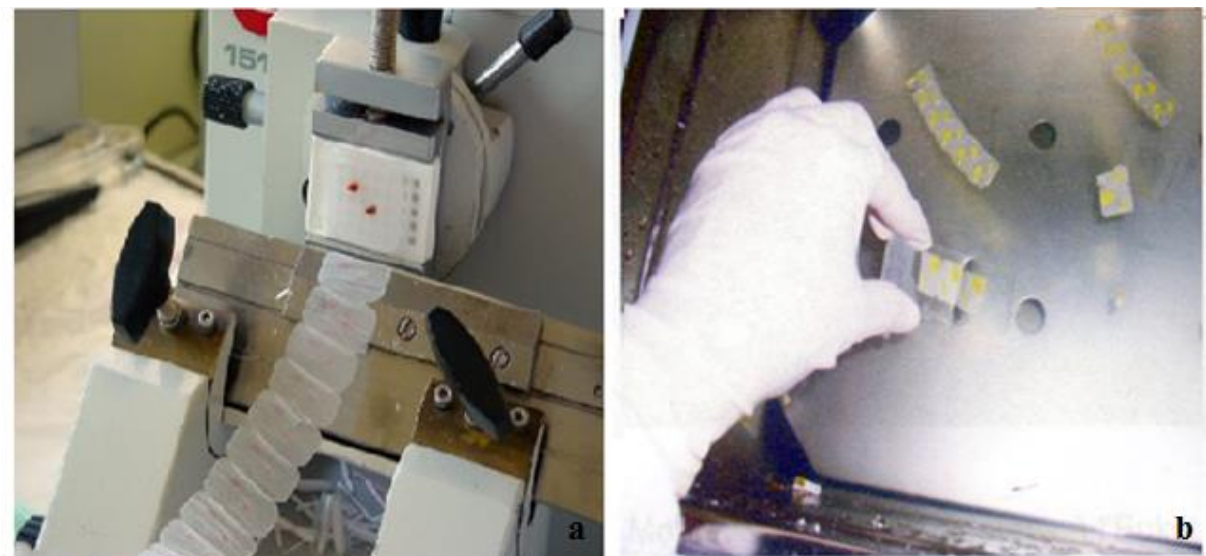


Figure 15 : Préparation des coupes histologiques **a.** confection des coupes au microtome ; **b.** collage des coupes sur les lames

II.2.5.5. Déparaffinage, réhydratation

Cette étape sert à retirer la paraffine du tissu et la remplacer par l'eau pour permettre la pénétration des colorants. Le déparaffinage a été réalisé dans un bain de xylène pendant 30 minutes et suivi par une réhydratation en immergeant les lames dans des bains d'alcool de degrés croissant puis dans l'eau distillée.

II.2.5.6. Coloration et éclaircissement

Coloration de Trichrome de Masson

- Un bain d'hématoxyline 10 sec
- Rinçage à l'eau courante.....5 min
- Un bain de Fuchsine Ponceau.....2 min
- Rinçage rapide à l'eau courante
- Un bain d'acide phosphomolybdique.....15 min
- Un bain de Vert lumière..... 5 min

- Rinçage rapide à l'eau courante.

Après la coloration, les lames ont été mises dans un bain de xylène pour l'éclaircissement. Le montage a été effectué avec une lamelle fixée par l'Eukit.

II.2.5.7. Montage et observation

Les lames ont été ensuite nettoyées au xylène puis séchées et observées au microscope optique aux différents grossissements ($\times 100$, $\times 400$ et $\times 1000$).

La prise des photos a été effectuée à l'aide d'un l'appareil photos Samsung prime 5.

CHAPITRE III

RESULTATS ET DISCUSSION

III.1. RESULTATS

III.1.1. Effet de *Metarhizium* sur la mortalité des larves de *L. migratoria*

III.1.1.1. Evaluation des taux de mortalité cumulé

Les résultats des taux de mortalité cumulée enregistrés chez les larves L3, L4 et L5 de *L. migratoria*, témoins et traitées par différentes doses de *M. anisopliae* var. *acridum* sont illustrés sur les figures 15, 16 et 17 et détaillés dans les tableaux 6 ;7 et 8 de l'annexe 2.

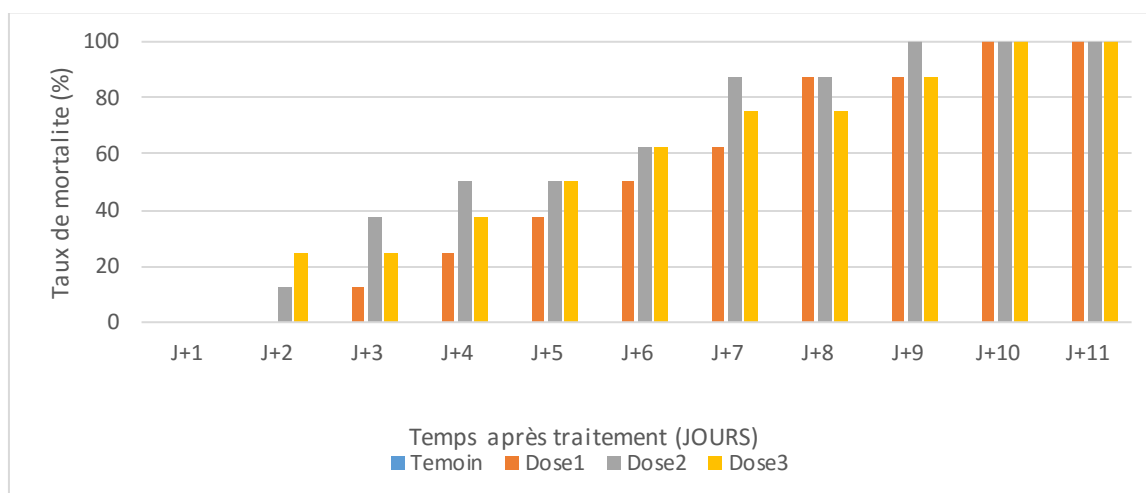


Figure 16: Evolution des taux de mortalité cumulée (%) chez les larves du 3^{ème} stade de criquet migrateur traitées au *Métarhizium anisopliae* (08 individus par lot).

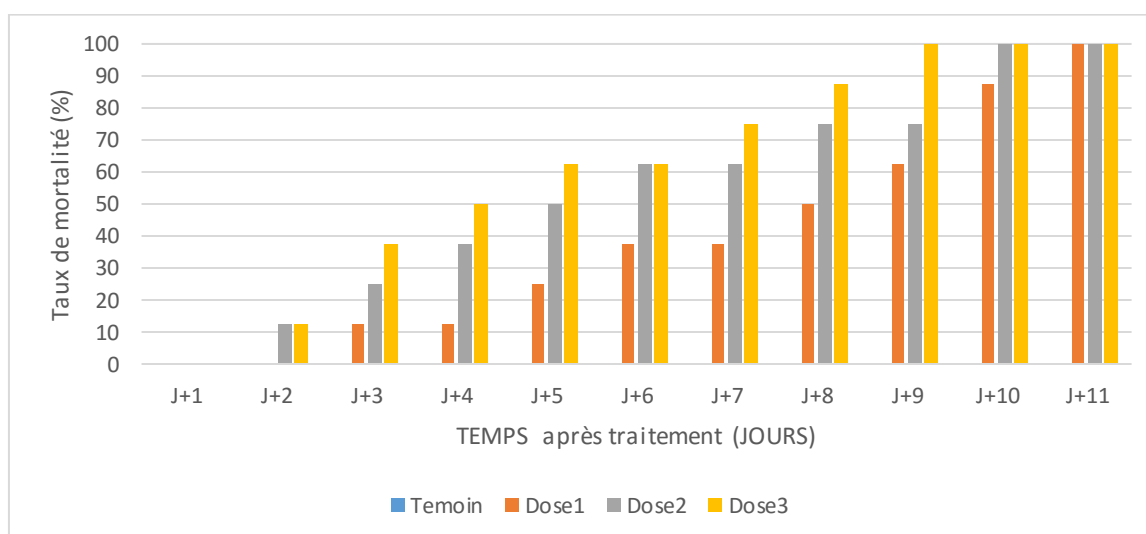


Figure 17: Evolution des taux de mortalité cumulée (%) chez les larves du 4^e stade de criquet migrateur traitées au *Metarhizium anisopliae* (08 individus par lot).

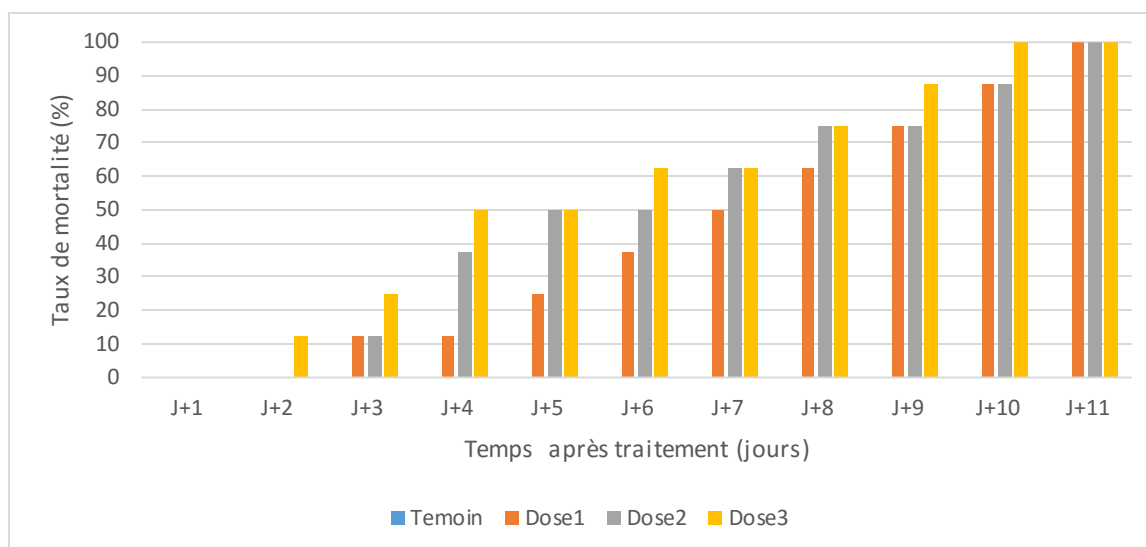


Figure 18: Evolution des taux de mortalité cumulée (%) chez les larves du 5^{ème} stade de criquet migrateur traitées au *Metarhizium anisopliae* (08 individus par lot).

Dose1= $2,3 \times 10^4$; Dose2= $2,3 \times 10^6$; Dose3= $2,3 \times 10^8$ et J=jour de traitement.

Nous n'avons enregistré aucune mortalité chez les larves témoins au niveau de tous les stades de développement.

D'après les résultats obtenus suite aux différents traitements au champignon entomopathogène, l'évolution de la mortalité cumulée est en fonction de l'avancement du temps après traitement, de l'augmentation de la dose appliquée et en fonction de l'avancement du stade larvaire.

Chez les larves de troisième stade, le premier enregistrement d'individus mort est le 2^{ème} jour pour les doses D2 et D3 avec 12.5% de mortalité et le 3^{ème} jour pour la dose D1 avec 12.5% de mortalité. Un taux de mortalité de 100% est observée à partir du 9^{ème} jour après traitement à la D2, et le 10^{ème} jour après traitement aux dose D3 et D1 (**Figure 16**).

Pour les L4 de *L. migratoria*, le début de la mortalité a été enregistré le 2^{ème} jour après traitement au D2 et D3, par contre les larves traitées à la D1, les mortalités ont commencé le 3^{ème} jour après traitement. Une mortalité totale est enregistrée le 9^{ème} jour après traitement à la forte dose, après le 10^{ème} à la dose intermédiaire et après le 11^{ème} jour à la dose faible (**Figure 17**).

Les doses D1 et D2 ne provoquent la mortalité qu'à après le 3^{ème} jour avec 12.5%, tandis que pour la D3, 12.5% de mortalité est observé le 2^{ème} jour. L'étude de l'effet sur la mortalité des larves L5 de *L. migratoria*, nous a permis aussi d'enregistrer un taux de mortalité de 100%,

le 10^{ème} jour après traitement par la dose D3. D'autres part les doses D1 et D2 causent une mortalité totale après 11 jours (**Figure 18**).

III.1.1.2. Calcul de TL50

Nous avons procédé au calcul des temps létaux au bout desquels 50% des individus de *L. migratoria* sont morts (TL50) après traitement aux différentes doses de *M. anisopliae var acridum*. Les temps létaux étaient calculés pour les trois stades larvaires étudiés et pour chaque dose administrée.

Nous avons effectué la transformation en probit des pourcentages des mortalités corrigées, et la transformation en logarithme décimaux du temps (Voir tableau 9 de l'annexe 2).

D'après les équations des droites de régressions (Figure 19, 20 et 21) ; nous observons que la relation qui lie la mortalité au temps est bien justifiée par les valeurs de coefficient de corrélation (R). On remarque que $0 < R < 1$ donc la corrélation est dite positive c'est-à-dire les taux de mortalités et les temps varient dans le même sens.

A partir de ces équations nous avons calculé le TL50 pour chaque dose (Tableaux 1, 2 et 3).

L'examen de TL50 montre que les larves traitées par des faibles doses ont des temps létaux plus élevés par rapport à celles traitées aux fortes doses chez les larves L4 et L5. Les temps létaux de 7.09 jours et 6.53 jours ont été enregistré pour les larves L4 et L5 respectivement traitées à la dose faible suivis par 5.05 et 5.49 jours pour la dose intermédiaire et la dose forte donne des temps létaux faibles (4.12 et 4.66 jours pour les L4 et L5 respectivement). Par contre les nymphes de stade L3 donnent un faible TL50 à la dose D2 (4.01 jours), suivi par 4.41 jours à la dose D3 et la D1 tue 50% des espèces dans 5.45 jours.

En générale, les temps létaux pour 50% des individus varient en fonction des doses appliquées.

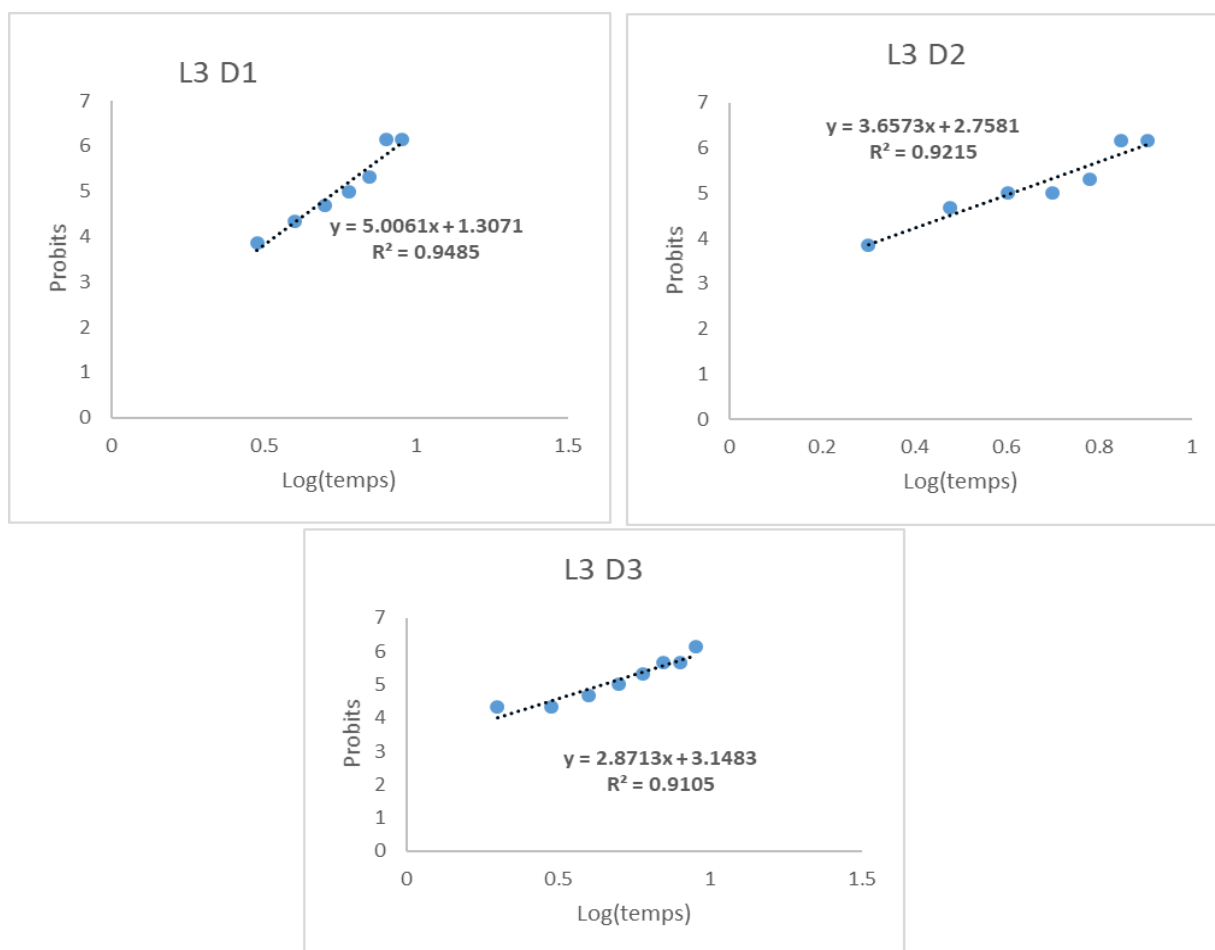


Figure 19: Efficacité de *M. anisopliae* en fonction du temps vis-à-vis des **L3** de *L. migratoria* traitées aux doses **D1** = $2,3 \times 10^4$ spores/ml ; **D2** = $2,3 \times 10^6$ spores/ml et **D3** = $2,3 \times 10^8$ spores/ml.

Tableau 1: Equations des droites de régression, coefficients de corrélation et les valeurs des TL50 des larves **L3** de *L. migratoria* traitées au *Metarhizium anisopliae*.

Dose (Spores/ml)	L'équation de la droite de régression	Coefficient de corrélation R ²	TL50 (Jours)
D1 = 2.3×10^4	$y = 5.01x + 1.31$	0.95	5.45
D2 = 2.3×10^6	$y = 3.66x + 2.76$	0.92	4.01
D3 = 2.3×10^8	$y = 2.87x + 3.15$	0.91	4.41

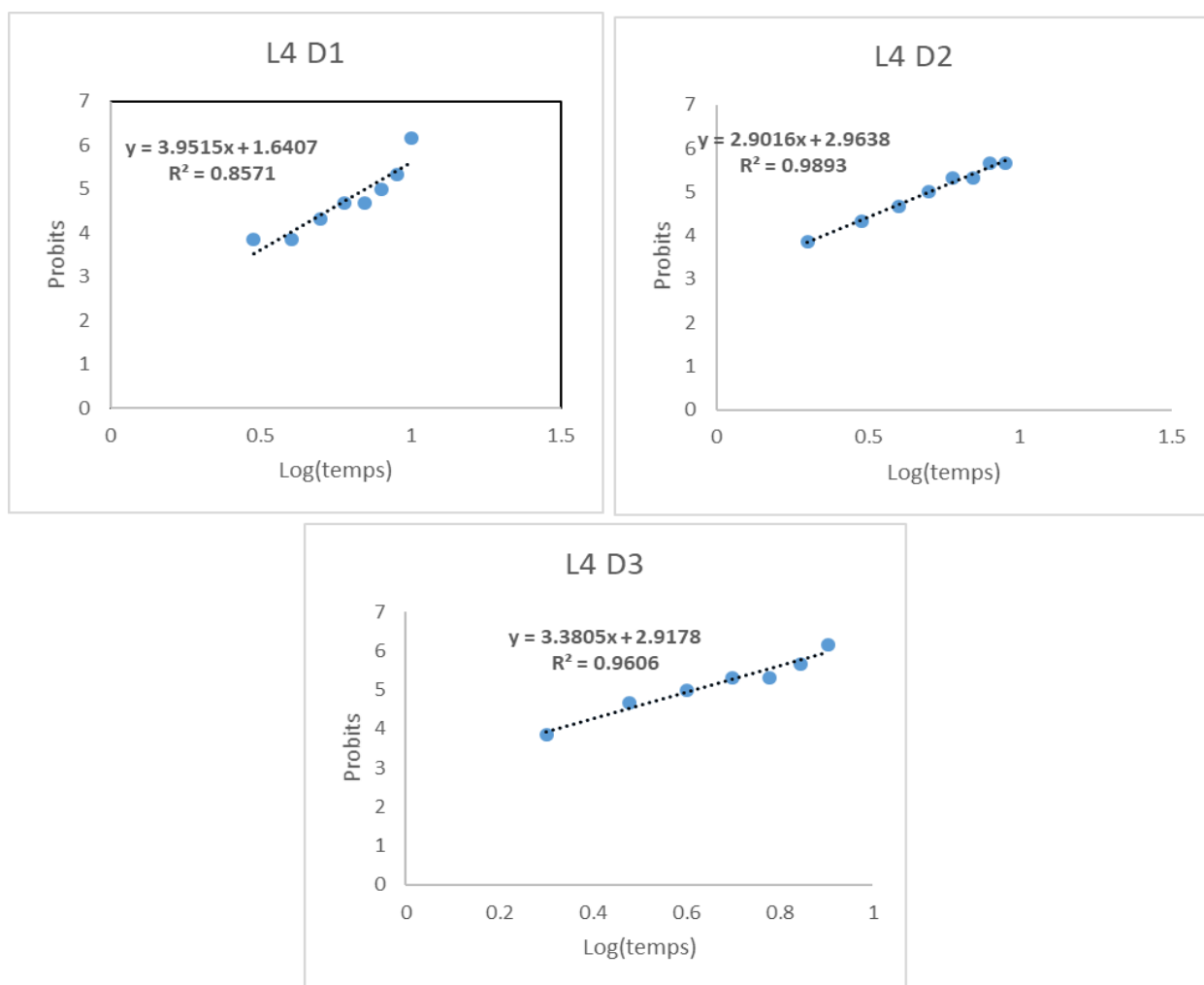


Figure 20: Efficacité de *M. anisopliae* en fonction du temps vis-à-vis des **L4** de *L. migratoria* traitées aux doses **D1** = $2,3 \times 10^4$ spores/ml ; **D2** = $2,3 \times 10^6$ spores/ml et **D3** = $2,3 \times 10^8$ spores/ml.

Tableau 2 : Equations des droites de régression, coefficients de corrélation et les valeurs des TL50 des larves **L4** de *L. migratoria* traitées au *Metarhizium anisopliae*.

Dose (Spores/ml)	L'équation de la droite de régression	Coefficient de corrélation R ²	de TL50 (jours)
D1 = 2.3×10^4	$y = 3.95x + 1.64$	0.86	7.09
D2 = 2.3×10^6	$y = 2.90x + 2.96$	0.99	5.05
D3 = 2.3×10^8	$y = 3.38x + 2.92$	0.96	4.12

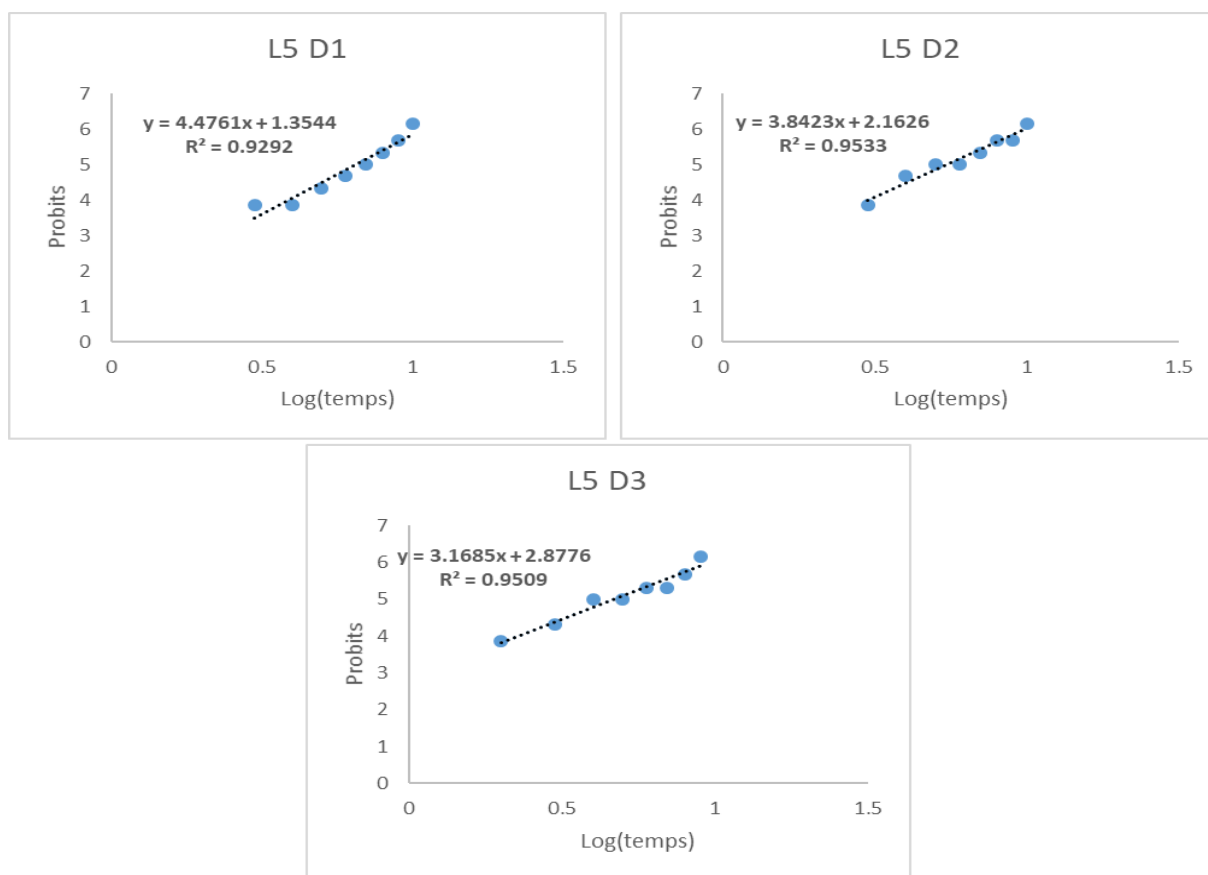


Figure 21: Efficacité de *M. anisopliae* en fonction du temps vis-à-vis des L5 de *L. migratoria* traitées aux doses **D1** = $2,3 \times 10^4$ spores/ml ; **D2** = $2,3 \times 10^6$ spores/ml et **D3** = $2,3 \times 10^8$ spores/ml.

Tableau 3 : Equations des droites de régression, coefficients de corrélation et les valeurs des TL50 des larves L5 de *L. migratoria* traitées au *Metarhizium anisopliae*.

Dose (Spores/ml)	L'équation de la droite de régression	Coefficient de corrélation R ²	TL50 (Jours)
D1 = 2.3×10^4	$y = 4.48x + 1.35$	0.93	6.53
D2 = 2.3×10^6	$y = 3.84x + 2.16$	0.95	5.49
D3 = 2.3×10^8	$y = 3.17x + 2.88$	0.95	4.66

III.1.1.3. Calcule de la DL50

Pour calculer les DL50 de *M. anisopliae* chez les L3, L4 et L5 de criquet migrateur, nous avons effectué la transformation probit des pourcentages des mortalités corrigées, et la transformation en logarithme décimaux des doses (Voir tableau 9 de l'annexe 2).

Nous remarquons que les valeurs de R² sont toutes comprises entre 0 et 1. La corrélation est donc positive. Les valeurs proches de 1 signalent qu'il existe une proportionnalité entre les

doses et les taux de mortalités. Pour les larves de L3, les valeurs de R^2 obtenus le 4^{ème} et 7^{ème} jours sont plus faibles (proches de 0) donc on n'a pas calculé les DL50.

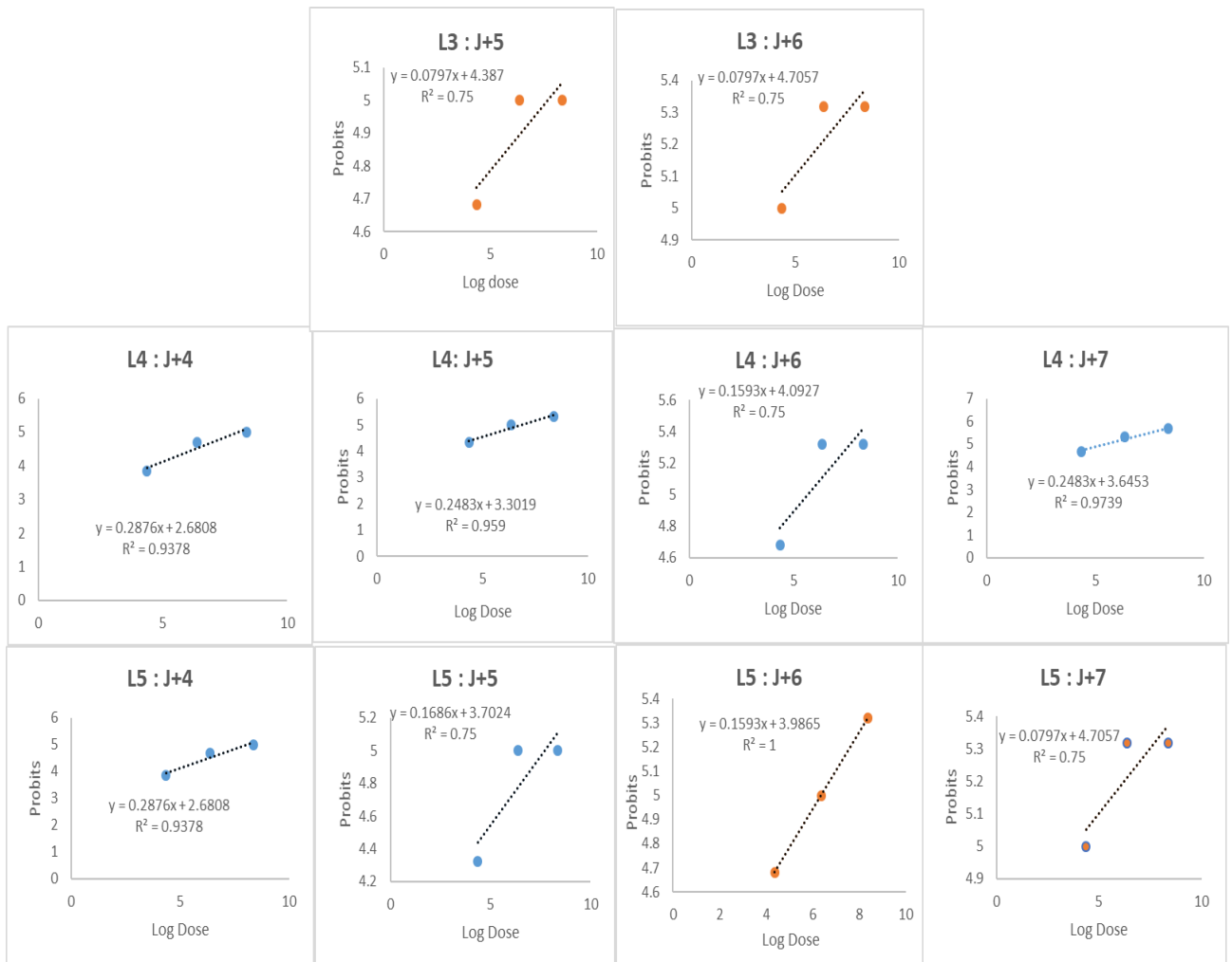


Figure 22: Droites de régression logistique exprimant les probits des taux de mortalité chez les L3, L4 et L5 traitées avec *M. anisopliae* en fonction des Logarithmes des doses.

J : le jour de traitements avec *M. anisopliae*.

Tableau 4: Equations des droites de régression, coefficients de corrélation et les valeurs des DL50 des larves **L3**, **L4** et **L5** de *L. migratoria* traitées au *Metarhizium anisopliae*.

Stade Larvaire	Temps (Jours)	L'équation de la droite de régression	Coefficient de corrélation R ²	DL50 (Spores/ml)
L3	J+4	$y = 0.09x + 4.10$	0.28	-
	J+5	$y = 0.08x + 4.39$	0.75	$4,2 \times 10^7$
	J+6	$y = 0.08x + 4.71$	0.75	$4,2 \times 10^3$
	J+7	$y = 0.09x + 5.18$	0.18	-
L4	J+4	$y = 0.29x + 2.68$	0.94	1×10^8
	J+5	$y = 0.25x + 3.30$	0.96	$6,3 \times 10^6$
	J+6	$y = 0.16x + 4.09$	0.75	$4,9 \times 10^5$
	J+7	$y = 0.25x + 3.65$	0.97	$2,5 \times 10^5$
L5	J+4	$y = 0.29x + 2.68$	0.94	1×10^8
	J+5	$y = 0.17x + 3.70$	0.75	$4,4 \times 10^7$
	J+6	$y = 0.16x + 3.99$	1	$2,1 \times 10^6$
	J+7	$y = 0.08x + 4.71$	0.75	$4,2 \times 10^3$

(-) : non déterminé

Les doses létales pour 50% (DL50) des individus varient en fonction de temps et du stade de développement larvaire selon les résultats présentés dans le tableau 4 ci-dessus.

D'après les résultats obtenus, nous constatons que plus le temps augmente, la DL50 diminue. Les DL50 les plus faibles sont obtenues le 6^{ème} jour pour les larves de stade L3 avec $4,2 \times 10^3$ spores/ml et le 7^{ème} jour pour les larves de stades L4 et L5 avec une dose létale de $2,5 \times 10^5$ spores/ml et $4,2 \times 10^3$ spores/ml respectivement. On a observé également l'existence des variations individuelles chez les larves du 3^{ème} stade qui n'obéissent pas à la règle générale.

Nous notons le sixième jour après traitement que la DL50 augmente avec les stades de développement. Les larves de stade L3 nécessitent $4,2 \times 10^3$ spores/ml pour tuer 50% des individus en comparaison avec $4,9 \times 10^5$ spores/ml et $2,1 \times 10^6$ spores/ml pour les L4 et L5 respectivement.

III.1.2. Effet histo-pathologique de *M. anisopliae* sur les larves de *Locusta migratoria*

III.1.2.1. Effet de *M. anisopliae* sur l'histologie du tégument

A- Chez les individus L5 témoins

L'étude au microscope optique des coupes histologiques de tégument provenant des larves non traitées avec *M. anisopliae*, montre une structure intacte.

La cuticule est composée en trois couches stratifiées : l'épicuticule, l'exocuticule et l'endocuticule (**Figure 23- A et B**).

- L'épicuticule est la couche la plus externe et est colorée en jaune, elle est très fine et d'une épaisseur mince.
- L'exocuticule représente la couche intermédiaire plus épaisse que la première et est colorée en violet rosâtre.
- La troisième couche est l'endocuticule ; est une couche rigide et épaisse, elle possède une structure lamellaire et est colorée en bleu clair.

L'épiderme est une assise de cellule épithéliale sous la cuticule présente une coloration violacée et une organisation structurale classique, épithélium simple pavimenteux (**Figure 23- A et B**).

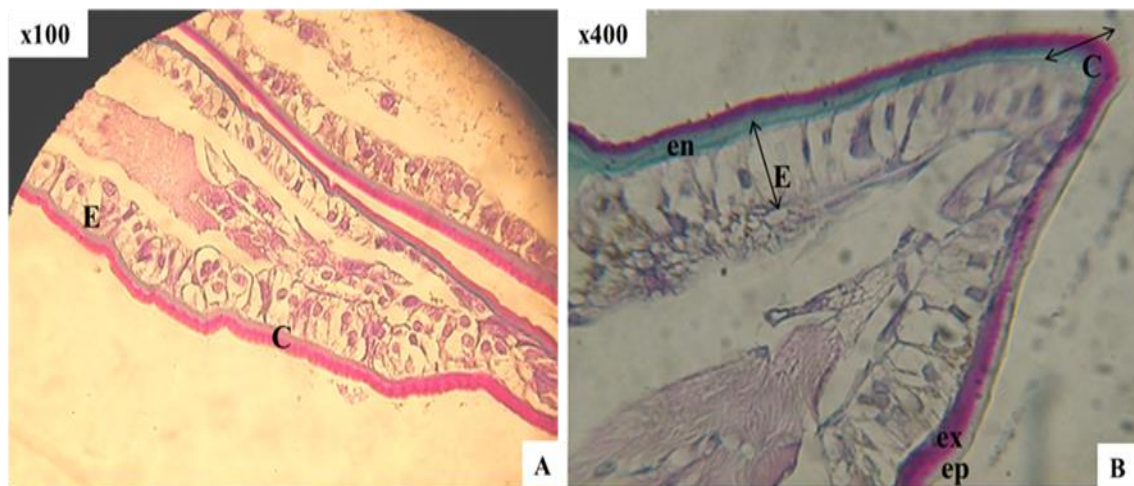


Figure 23 : Structure du tégument de larves de *L. migratoria* témoins Grossissement x100 (A) et x400 (B).

Epi : Epicuticule, **Exo**: exocuticule, **End**: endocuticule; **E**: cellules épithéliales, **C**: cuticule, **S**: spores.

B- Chez les individus L5 traitées au champignon entomopathogène

Nous avons recherché chez les L5 traitées au *M. anisopliae* à raison de 2.3×10^6 spores/ml des lésions au niveau du tégument traité par l'étude histologique le cinquième jour du traitement (J+4).

L'observation microscopique montre que la cuticule est devenue plus mince par rapport à celle observée chez les larves témoins.

Nous avons observé une disparition complète de l'épicuticule et une régression claire dans l'épaisseur de l'exocuticule et l'endocuticule (**Figure 24**).

Nos résultats montrent aussi que ce champignon entomopathogène a influencé sur la structure interne de l'endocuticule. Cette dernière présente un aspect amorphe plutôt que lamellaire ; ce qui suggère la désorganisation de sa composition biochimique en protéine et chitine (**Figures 24- F et G**).

L'unité élémentaire de notre souche fongique a été repérée dans les parties de la cuticule digéré. La pénétration des spores est observée à différents niveaux de la cuticule (**Figure 24 - D, H et J**). Ainsi que la germination de la spore par émission de tube germinatif (**Figure 24- J, H et I**).

Au niveau de l'épiderme, et en comparaison avec le témoin, la structure de l'assise cellulaire est complètement désorganisée par endroits (**Figure 24-E et F**) et est digérée dans d'autres endroits (**Figure 24-H et I**). Ce qui reflète l'effet cyto-pathologique de *Metarhizium anisopliae* sur l'épithélium sous cuticulaire.

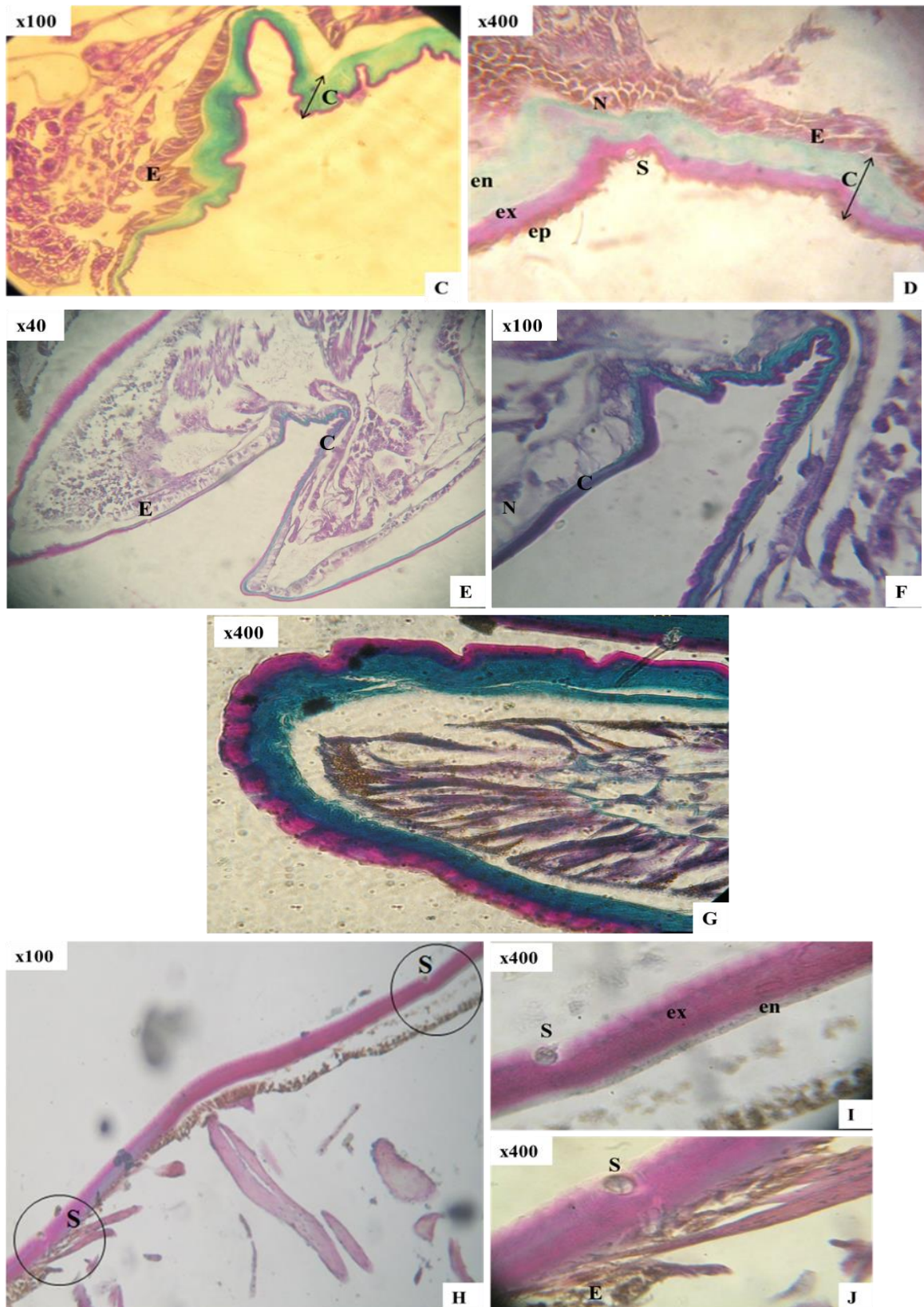


Figure 24: Lésions de la cuticule et de l'épiderme chez les L5 de *L. migratoria* traitées au *M. anisopliae* et pénétration des spores dans la cuticule.

ep : Epicuticule, ex : exocuticule, en : endocuticule, E: cellules épithéliales, C : cuticule, S : spores.

III.1.2.2. Effet de *M. anisopliae* sur l'histologie du tube digestif

Nous avons choisi de démontrer les principales lésions observées chez les larves traitées à le $2,3 \times 10^6$ spores /ml, le 5ème jour du traitement (J+4). Après ablation du tube digestif, l'examen macroscopique ne révèle pas de lésions.

L'étude au microscope photonique des lames préparées a révélé les observations suivantes au niveau des trois parties intestinales :

➤ Au niveau de l'intestin antérieur ou stomodeum

A- Chez les larves témoins

Le stomodeum est formé en première partie d'un jabot qui est une partie allongée tapissée par une couche intima cuticulaire, et constituée d'un épithélium simple cubique. Nous remarquons plusieurs petites villosités, sur lesquelles se dressent les épines cuticulaires en contact avec la lumière intestinale. La musculature présente, en coupe longitudinale, une couche de muscle circulaire externe qui entoure l'organe et de plusieurs couches de muscles longitudinaux interne bien développée en couche épaisse (**Figure 25- A et B**).

B- Chez les larves traitées

L'effet du champignon au niveau du Jabot n'est pas très remarquable, nous observons une légère destruction de la cuticule intima des épines (**Figure 25 -D**). Et le détachement par endroit des couches musculaires de l'assise épithéliale (**Figure 25 -C**).

➤ Au niveau du cæcum gastrique

A- Chez les larves témoins

La région du mésentéron est pourvue de six cæca gastriques disposés radialement autour du tube digestif. Le cæcum gastrique présente des villosités qui s'alternent avec les autres plus petites représentant les cryptes de régénération. Les villosités présentent un épithélium simple prismatique à noyaux rond et avec des bordures en brosse. La cuticule est absente à ce niveau, la musculature est très réduite et composée d'une seule couche de muscles circulaires très fine (**Figure 26 A et B**).

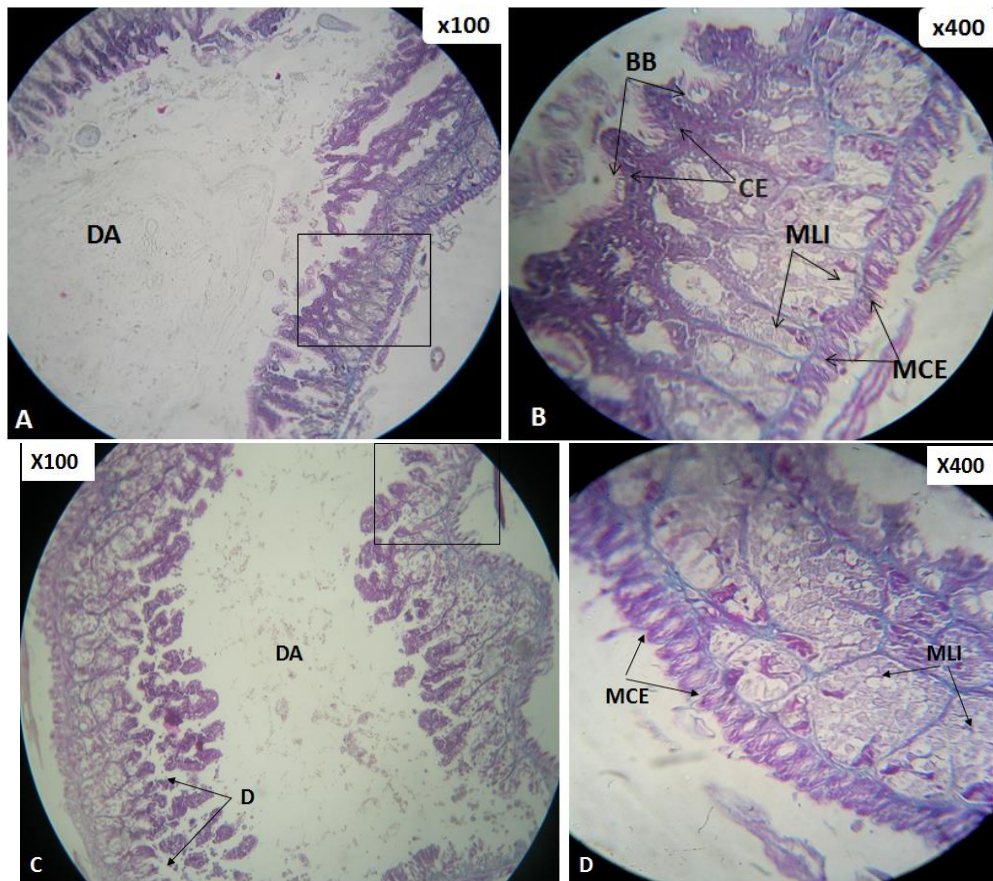


Figure 25 : Coupe longitudinale au niveau de stomodeum (Jabot) chez *L. migratoria*.

Témoins (A et B) et traité au *Metarhizium* (C et D)

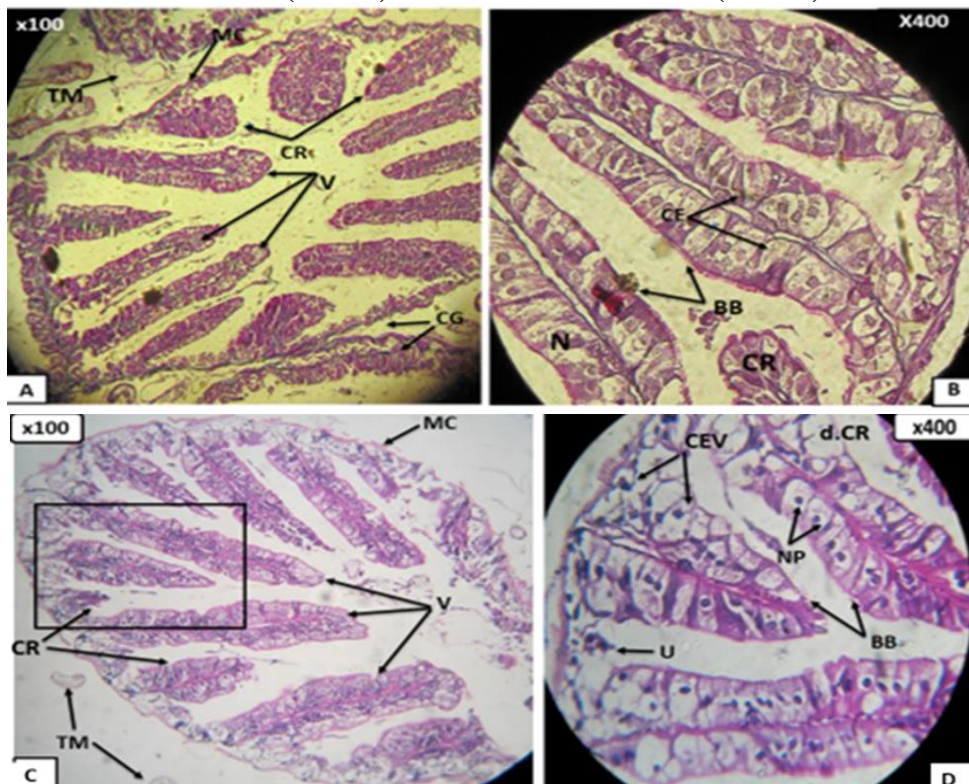


Figure 26 : Coupe longitudinale au niveau de cæca gastrique chez les L5 de *L. migratoria* témoins (A et B) et traité au *Metarhizium* (C et D)

B- Chez les larves traitées

Les cæca gastriques montrent la déformation des villosités. L'épithélium présente un aspect hypertrophié et désorganisé. Les noyaux deviennent volumineux à chromatine condensée en granules évidentes dans le nucléoplasme. Ces symptômes sont des signes typiques de nécrose cellulaire et de dégénérescence tissulaires (**Figure 26 C et D**).

➤ **Au niveau du mésentéron ou intestin moyen**

A- Chez les larves témoins

Le mésentéron présente parfois de profonds replis comprend un épithélium plus haut qu'au niveau du stomodeum et pseudostratifié palissadique à bordure en brosse et à cellules basales de régénération. Une musculature moins épaisse, forme une couche très fine discontinue, avec des fibres circulaires internes et quelques fibres longitudinales externes. A cette partie, la cuticule est absente (**Figure 27 A**).

B- Chez les larves traitées

Nous remarquons la dégradation des tissus épithéliaux notamment au niveau du mésentéron où la cohésion entre les cellules épithéliales n'est plus observée et altération des bordures en brosse (**Figure 27 C et D**).

➤ **Au niveau du proctodeum ou intestin postérieur**

A- Chez les larves témoins

Le proctodeum forme des replis épithéliaux moins développés et fructueux. Le revêtement chitineux est moins épais dans l'intestin antérieur. La musculature est composée de couches longitudinales et circulaires (**Figure 28 A et B**).

B- Chez les larves traitées

Les cellules épithéliales sont parfois désorganisées et vacuolisées. L'assise musculaire circulaire montre une atrophie et une distension de celle-ci. La cuticule est détachée par endroit de l'assise épithéliale (**Figure 28 C et D**).

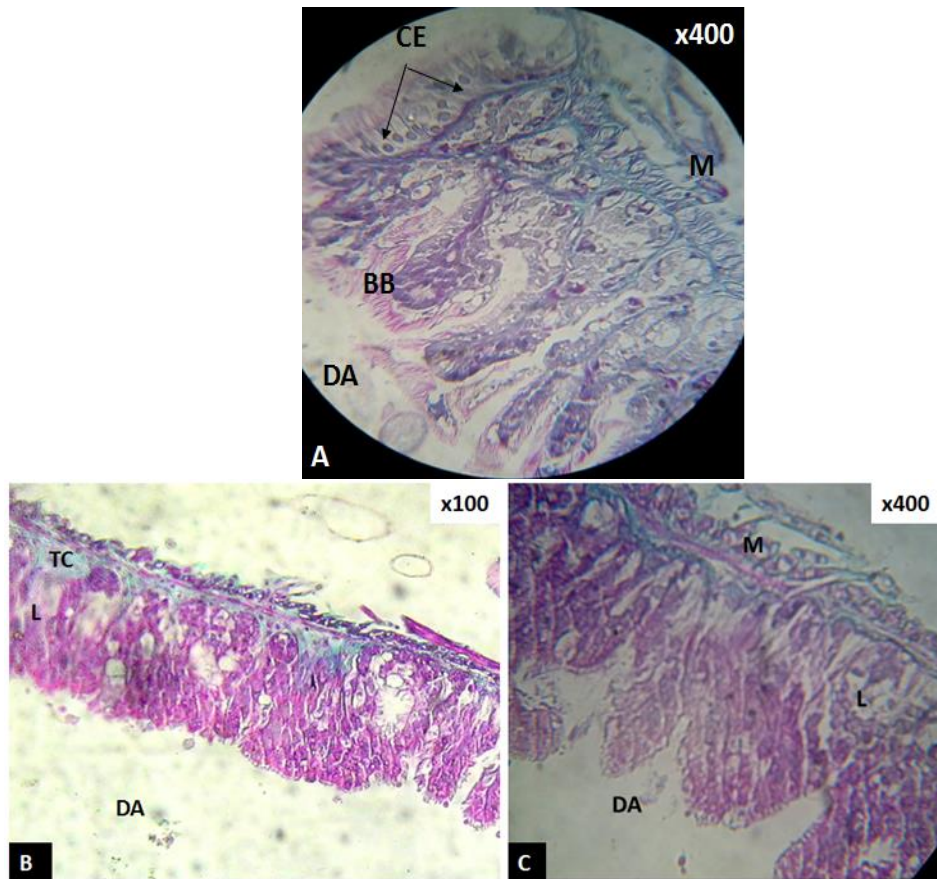


Figure 27: Coupes longitudinales au niveau de mésentéron chez les L5 de *L. migratoria*.
Témoin (A) et traités (B et C)

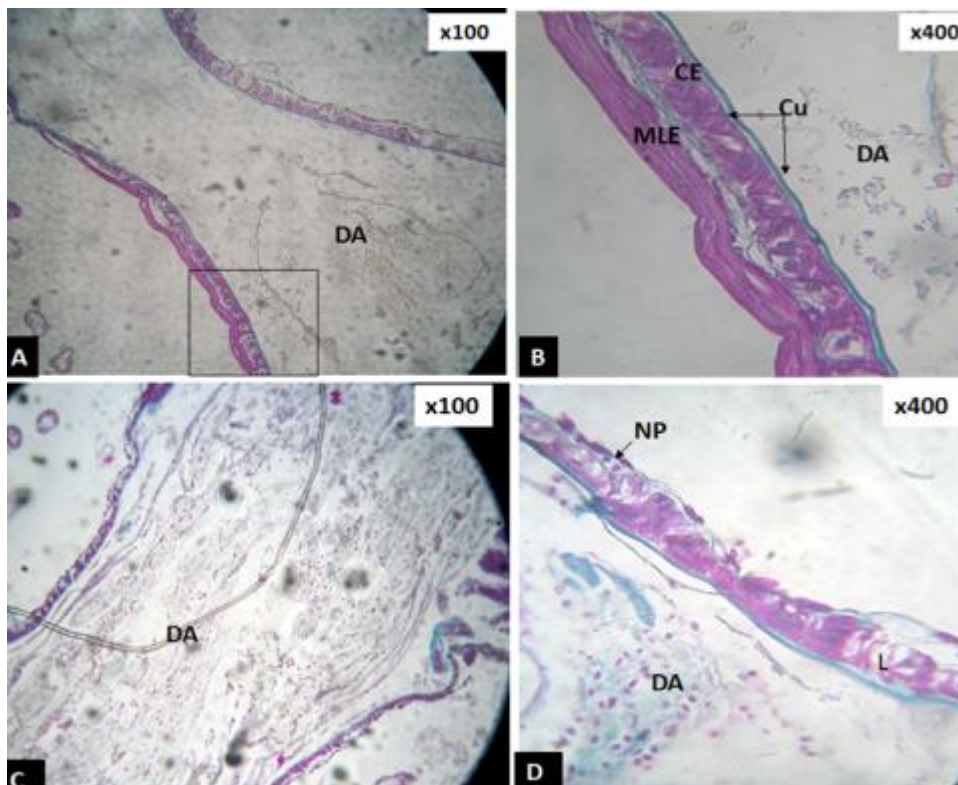


Figure 28: Coupes longitudinales au niveau du proctodeum chez les L5 de *L. migratoria*.
Témoin (A et B) et traités au *M. anisopliae* (C et D)

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

III.2. DISCUSSION

L'essai de mortalité a montré que les trois doses de *Metarhizium anisopliae* affectent significativement les larves de *L. migratoria*. Les taux de mortalité atteignent le 100% pour tous les stades larvaires mais diffèrent en fonction du temps après traitement et selon la dose appliquée. Avec la moyenne dose D2 (2.3×10^6), 100% de mortalité est noté chez les larves L3, L4 et L5 respectivement le 9^e, 10^e et 11^e jour après traitement. Plus la concentration de l'inoculum est élevée et plus les mortalités le sont et surviennent plus rapidement. En générale, les valeurs des DL50 augmentent avec l'avancement du stade larvaire et diminue en fonction du temps. Les valeurs de TL50 calculés diminuent avec l'augmentation de la dose et augmentent avec l'avancement du stade larvaire. Des temps létaux élevés ont été observés à la dose $2,3 \times 10^4$ spores/ml aux stades L4 et L5 (7,09 jours et 6,53 jours respectivement) contre les 4,12 et 4,66 jours obtenus à la dose $2,3 \times 10^8$ spores/ml. Cela reflète l'influence de la concentration en spores pulvérisée (dose de traitement) sur les taux de mortalité enregistrés.

Nos résultats corroborent avec ceux rapportés sur différentes espèces acridiennes dans les conditions du laboratoire. Ces études concernant l'effet de cette même souche fongique sur la mortalité des larves de criquet marocain (CHAOUCH, 2015) criquet migrateur (Bissaad et al., 2012) et criquet pèlerin (Halouane et al., 2013). Nos résultats vont dans le même sens avec ceux obtenus par (Arkam, 2019). *Metarhizium* s'est montrée efficace contre les larves de *D. maroccanus* traitées avec 1.2×10^3 spores /ml (D1), 1.2×10^5 spores /ml (D2) et 1.2×10^7 spores /ml (D3). L'analyse de la variance révèle un effet hautement significatif des mortalités pour les facteurs dose appliquée et temps. Les stades larvaires avancés résistent plus aux faibles doses

des traitements. D'après le même auteur, le traitement avec la D1 donne un TL50 de 7,27 j pour les L3 et 8,01 j pour les L5. Tandis que le traitement des L4 avec les concentrations D1, D2 et D3 montrent des TL50 de 7,45 j, 7,08 j et 6,60 j respectivement.

Dans nos conditions expérimentales, les larves de *L. migratoria* peuvent être contaminées par les spores de *Metarhizium* à travers une pénétration cuticulaire ou par ingestion de la végétation contaminée par les spores suite au traitement des larves par contact. Les larves sont devenues de moins en moins actives et moins voraces. Sans déformation morphologique observable. Ainsi nous avons jugé intéressant de rechercher l'effet histopathologique au niveau du tégument et du tube digestif.

En comparaison avec les larves témoins, nous avons observé des altérations tissulaires marquées au niveau de la cuticule et de l'épiderme des L5 traitées avec le champignon. Ces perturbations dépendent de la concentration en spores accumulées chez les individus.

Des altérations cyto-architecturales très comparables sont observées au niveau de la cuticule (ARKAM et al., 2017; Bissaad et al., 2012; Mahmoud, 2010). Le champignon engendre des altérations sur la structure de cuticule surtout d'un point de vue épaisseur des différentes couches qui la composent. Et cela suite à l'envahissement des spores qui ont fortement exsudé leurs toxines provoquant ainsi la mort des criquets (Mahmoud, 2010). Selon (Arkam et al., 2017a), les spores ont été également observées au niveau des parties de la cuticule digérées. La dégénérescence de ces différentes couches tégumentaires est suite à leur dégradation par les enzymes chitinolytiques et protéolytiques de l'unité infectieuse de notre souche fongique. (Bissaad et al., 2012) ont signalé que les altérations cuticulaires aboutissent à la diminution progressive du ratio des protéines cuticulaires chez les larves de *L. migratoria* traitées au *M. anisopliae*, d'une autre part la teneur en chitine cuticulaire diffère d'un stade à un autre. Halouane et al., (2013) ont observés des résultats comparables avec le champignon entomopathogène *Beauveria bassiana*. La perturbation de la mue larvaire et de la synthèse de l'épicuticule est notée chez les larves de *S. gregaria* traitées au *M. anisopliae* (Bissaad et al., 2012; Halouane et al., 2013).

Nos résultats confirment ceux effectués par (Kooyman, 2007) qui a constaté que les spores de *Metarhizium* tombées sur la cuticule de l'acaridien par contacte ou recueillies de la végétation par ingestion. Les spores germent pendant 24 à 48 h. la pénétration des hyphes sortants dans la cuticule se fait à l'aide des enzymes et se désintègrent ensuite en corpuscules hyphales qui se répondent à travers le corps de l'insecte et envahit l'hémolymphe.

La production d'appressorium dans l'étape de différenciation est caractérisée par pénétration dans une cellule hôte après la sporulation, les structures terminales vont fournir l'attachement et l'encrage ainsi que la viscosité cuticulaire. Après la germination le champignon développe une structure appressorium où les signaux d'ions cAMP et Ca²⁺ sont impliqués. La production des appressoriums s'effectue par la combinaison de pression mécanique et enzymatique telles que les lipases, les protéases et les chitinases. (Brunner-Mendoza et al., 2019).

Nous avons observé des lésions cyto-architecturales au niveau des trois parties intestinales chez les larves traitées avec notre champignon entomopathogène. Nos résultats convergent avec ceux obtenus par plusieurs auteurs au niveau de l'appareil digestif de différentes espèces acridiennes traités par contact ou par ingestion (Arkam, 2019; Arkam et al., 2017; Doumandji-Mitiche & Oulebsir-mohandkaci, 2012; KEMASSI et al., 2018; Miladi et al., 2019). Les coupes histologiques montrent que les organes internes de criquet sont attaqués différemment par le biopesticide (Toure et al., 2018). Concernant l'intestin moyen, de nombreux chercheurs ont évalués l'effet de *M. anisopliae* sur l'histologie de mésentéron surtout au niveau des entérocytes de la partie médiane, purement digestive et qui possède une forte sensibilité contre les champignons entomopathogènes comparativement avec deux autres parties intestinales (Arkam et al., 2019; Doumandji-Mitiche & Oulebsir-mohandkaci, 2012; KEMASSI et al., 2018). Ces auteurs signalent des modifications profondes dans la structure de l'intestin moyen relâchement des assises épithéliales, des nécroses cellulaires ; une atrophie et une distension de l'assise musculaire une hauteur réduite de l'épithélium mésentéral. Ce champignon entomopathogène provoque une cytotoxicité intestinale progressive. Cette cytotoxicité est liée à la concentration en conidies accumulées dans l'hôte ainsi que le temps de leur prolifération. Au cours d'une infection au *Metarhizium*, du mycélium germent dans les tissus de l'acridien hôte, suivis par la sortie des hyphes de mycéliums vers l'extérieur du corps de l'insecte et déclenche la sporulation. Ce qui pourrait exprimer la mort des individus, suite à l'action des toxines transmises par le champignon. Des masses de spores d'une couleur jaune-verdâtre, sont fructifères et couvrent la totalité du cadavre. Ce signe est relatif à la maladie de la muscardine verte (Arkam, 2019; Celia & Djedjiga, 2016)

De nombreux auteurs ont observés des extensions au niveau de cæca gastriques formant une lumière totalement visible couplée d'un effondrement de forme des plis épithéliaux. On prend un exemple des travaux de (Chaieb.I et al., 2007; Miladi et al., 2019) qui ont marquées

des altérations histopathologies du ceacum gastrique. Des lésions cellulaires ont été causées par des éruptions épithéliales et une perturbation de la couche musculaire entourant la cæcaum

Dans les conditions de terrain, les conditions éco-météorologiques influencent directement la vitesse de croissance de l'entomopathogène dans l'hôte infectée (Arkam, 2019). L'existence de l'humidité plus au moins élevée, permet de pousser le mycélium à creuser la cuticule au niveau des membranes inter-segmentaires et à envahir les tissus (Toure et *al.*, 2018). Cependant, l'inconvénient majeur d'utilisation de Green muscle est sa durée de prolifération dans l'hôte infecté ainsi sa faible persistance sur le feuillage (Atheimine et *al.*, 2014). La sporulation du champignon sur les larves mortes joue un rôle intéressant pour la rémanence du produit causant ainsi une pandémie parmi les larves (Toure et *al.*, 2018).

CONCLUSION

CONCLUSION

L'étude que nous avons menée sur l'effet de *M. anisopliae* var. *acidum* sur le criquet migrateur, nous a dirigé à des résultats prometteurs.

Le test réalisé sur *L. migratoria* L3, L4 et L5 à raison de 3 doses ($2,3 \times 10^4$ spores /ml; $2,3 \times 10^6$ spores/ml et $2,3 \times 10^8$ spores/ml) révèle que la mortalité est plus importante au jour où l'insecte ramasse une dose létale en spores. Les premiers stades larvaires sont plus sensibles.

D'après les résultats obtenus, la DL50 diminue en fonction du temps et augmente avec l'avancement du stade larvaire. Six jours après traitement, nous avons enregistré des DL50 de $4,2 \times 10^3$ spores /ml, $4,9 \times 10^5$ spores /ml et $2,1 \times 10^6$ spores /ml pour les larves L3, L4 et L5 respectivement. Les calculs des TL50 ont révélé que la forte dose a un TL50 le plus court (4,12 jours) par rapport au 7,09 jours enregistré avec la faible dose chez les L4.

Au terme de l'étude histologique, il ressort que *M. anisopliae* var. *acidum* exerce un effet cyto-pathologique au niveau du tube digestif et du tégument. Ce qui confirme son effet entomopathogène.

Nous avons observé une disparition complète de l'épicuticule et une nette diminution dans l'épaisseur de l'exocuticule et de l'endocuticule. La spore, a été repérée dans les parties de la cuticule digérée. L'épiderme est altéré avec perte de cohésion entre les cellules épithéliales.

L'examen des coupes intestinales au microscope optique a révélé des lésions plus ou moins importantes. Des détériorations épithéliales au niveau du mésentéron et des cæca gastriques et la présence des signes typiques de nécrose et d'ulcération avec le détachement local des couches musculaires au niveau du stomodeum et du proctodeum.

Afin d'approfondir les recherches sur les interactions hôte-pathogène exercé par notre souche fongique, il est intéressant :

- Etudier l'effet de *Metarhizium* sur d'autres tissus comme celui de l'appareil reproductif
- Utiliser Green muscle en synergie avec des huiles essentielles extrait à partir des plantes acridifuges ou acridicides comme le neem (*Azadirachta indica*) et le melia (*Melia volkensii*).
- Développer une stratégie de lutte intégrée par l'application de Green Muscle sur les premiers stades larvaires en combinaison avec d'autre méthodes de lutte.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abbott, W. S. (1925). The Value of the Dry Substitutes for Liquid Lime. *Journal of Economic Entomology*, 18, 265–267.
- AGUIB, S. (2019). *COURS Biologie du développement des insectes* (pp. 1–48).
- Annouar, S., Soufiane, A., & Mountadar, M. (2005). Étude De La Dénitratation Par Des Adsorbats Naturels (Chitine Et Chitosane). *Déchets, Sciences et Techniques*, 37, 34–42. <https://doi.org/10.4267/dechets-sciences-techniques.1886>
- Arkam, F. (2019). *EVALUATION DE LA TOXICITE DE L ' IMIDACLOPRIDE (INSECTICIDE CHIMIQUE NEONICOTINOÏDE) ET METARHIZIUM ANISOPLIAE (BIOINSECTICIDE ENTOMOPATHOGENE) SUR TERRAIN ET EN CONDITIONS CONTRÔLÉES*. Université de Blida 1. P270.
- ARKAM, F., KARA-TOUMI, F. Z., TAIL-HALIL, G., SAIDI, F., & AHMED SERIR, B. (2017). PRINCIPALES LÉSIONS HÉMOLYMPHATIQUES OBSERVÉES CHEZ LES LARVES DE DOCIOTAURUS MAROCCANUS TRAITÉES SUR TERRAIN PAR LE GREEN MUSCLE®. *Revue Agrobiologia*, 7(2), 401–411.
- Arkam, F., Saadi, L., & Kara-Toumi, F. Z. (2019). Histopathologie intestinale de Dociostaurus maroccanus traité avec GREEN MUSCLE. *International Journal of Natural Resources and Environment*, 1(1), 1–11.
- Arkam, F., Toumi, K., Zohra, F., Ghania, T. H., & Fairouz, S. (2017). Effect of the treatments with the Green muscle ® in natural environment (North-western of Algeria) on the nymphs of Dociostaurus maroccanus (Thunberg , 1815) et sur l'histologie du tégument. *Algerian Journal of Natural Products*, 3(3), 530–540.
- Atheimine, M., Ely, S., Mohamed, S., Barry, A., & Mounsif, B. (2014). Simulation de traitement en barrière avec Metarhizium acridum (Green muscle®) contre des larves grégaires du criquet pèlerin, schistoserca gregaria. *2 e Conférence Internationale Sur Les Ravageurs En Agriculture*.
- BELLMANN, H., & LUQUET, G. C. (1995). *Guide des Sauterelles, Grillons et Criquets d'Europe occidentale*. Delachaux & Niestlé.
- BENSERRADJ, O. (2014). *Thèse Evaluation de Metarhizium anisopliae à titre d ' agent de lutte biologique contre les larves de moustiques Remerciements*. Université Constantine 1.
- Betina, S. I., Harrat, A., & Petit, D. (2017). Analysis of factors involved in grasshopper diversity in arid Aurès mountains (Batna, Algeria). *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 5(5), 339–348.
- Bidochka, M. J., & Small, C. L. (2005). Phylogeography of Metarhizium, an insect pathogenic fungus. In F.E. Vega & M. Blackwell (Eds.), *Insect-fungal associations* (pp. 28-49). . Oxford University Press Inc.
- Bischoff, J. F., Rehner, S. A., & Humber, R. A. (2009). A multilocus phylogeny of the Metarhizium anisopliae lineage. *Mycologia*, 101(4), 512–530. <https://doi.org/10.3852/07-202>

- Bissaad, F. Z., Youcef, M., Bounacerur, F., & Doumandji-Mitiche, B. (2012). Nature & Technologie Activité biologique d ' un biopesticide le Green muscle sur le tégument du criquet pèlerin *Schistocerca gregaria* (Forskål , 1775) (Orthoptera , Acrididae). *Nature & Technologie*, N°6(September), 51–58.
<https://www.researchgate.net/publication/287543121%0AEffet>
- Brine, C. J. (1982). Chitin-protein interactions. In Chiting and Chitosan. In S. Hirano & S. Tokura (Eds.), *IInd Internat Conf. on Chitin & Chitosan* (pp. 105–110).
- Brunner-Mendoza, C., Reyes-Montes, M. del R., Moonjely, S., 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. *Biocontrol Science and Technology*, 29(1), 83–102. <https://doi.org/10.1080/09583157.2018.1531111>
- Cavelier, A. (1976). Cours de phytopharmacie. *Ed. Inst. Nat. Agro.*, 514p.
- Celia, A., & Djedjiga, H. (2016). *Activité biologique du champignon entomopathogène Metarhizium anisopliae var acridum et de la plante toxique Calotropis procera vis-à-vis des imagos de Schistocerca gregaria (Forskal , 1775) et de Locusta (Linné,1758)*. UNIVERSITEMOULOUDMAMMERI DE TIZI OUZOU.
- Chaieb, I., Mounia, B. H., & Habib, B. H. (2007). Toxicity experiments of the saponic extract of *Cestrum parqui* (Solanaceae) on some insect species. *Journal of Entomology*, 4(2), 113–120. <https://doi.org/10.3923/je.2007.113.120>
- CHAOUCH, A. (2015). *Bioécologie du criquet marocain Dociostaurus maroccanus Thunberg, 1815 (Acrididae, Gomphocerinae) dans sa phase grégaire en Algérie et perspectives de lutte biologique*. ECOLE NATIONALE SUPERIEURE D'AGRONOMIE D'EL HARRACH – ALGER.
- CHARA, B. (1995). *Eléments sur la biologie et l'écologie du criquet pèlerin Schistocerca gregaria (Forskål, 1775). Stage de formation de lutte antiacridienne.* , (pp. 32–45). Ed. INPVOADA.
- Christos, A. D., & Koutroubas, S. D. (2018). Current status and recent developments in biopesticide use. *Agriculture (Switzerland)*, 8(13).
<https://doi.org/10.3390/agriculture8010013>
- Deravel, J., Krier, F., & Jacques, P. (2014). Les biopesticides, compléments et alternatives aux produits phytosanitaires chimiques (synthèse bibliographique). *Biotechnology, Agronomy and Society and Environment*, 18(2), 220–232.
- Devi, S. (2020). Locust swarms in east Africa could be “a catastrophe.” *Lancet (London, England)*, 395(10224), 547. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30406-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30406-2)
- Dobson, H. M. (2001). 4 . Lutte antiacridienne. *Directives Sur Le Criquet Pèlerin*, 4, 85pp.
www.fao.org/ag/locusts/en/info/info/index.htm
- Doumandji-Mitiche, B., & Oulebsir-mohandkaci, H. (2012). ÉTUDE DE L'IMPACT BIOLOGIQUE DE PSEUDOMONAS SPP. FLUORESCENTS SUR LES MÉTABOLITES HÉMOLYPHATIQUES ET L'HISTOLOGIE DU TUBE DIGESTIF DES LARVES L5 DU CRIQUET MIGRATEUR LOCUSTA MIGRATORIA (LINNÉ, 1758). *Lebanese Science Journal*, 13(2), 99–115.

- Doumandji, S., & Doumandji-Mitiche, B. (1994). *Criquets et sauterelles (Acridologie)*. (p. 99p.).
- Elham, M. S. H., Kin, P. K., Lin, G. L. E., Ishak, I., & Azmi, W. A. (2018). Occurrence of Entomopathogenic Fungus, *Metarhizium anisopliae* isolated from Island, BRIS and coastal soils of Terengganu, Malaysia. *Journal of Sustainability Science and Management*, 13(Special Issue 5), 179–190.
- F.A.O. (2016). *Bioécologie du criquet pèlerin*.
http://www.fao.org/3/I8693FR/i8693fr.pdf%0Ahttps://www.researchgate.net/publication/257763109_Bioecologie_du_criquet_pelerin
- Fan, Y., Zurek, L., Dykstra, M. J., & Schal, C. (2003). Hydrocarbon synthesis by enzymatically dissociated oenocytes of the abdominal integument of the German cockroach, *Blattella germanica*. *Naturwissenschaften*, 90(3), 121–126.
<https://doi.org/10.1007/s00114-003-0402-y>
- Franke, C., Studinger, G., Berger, G., Böhling, S., Bruckmann, U., Cohors-Fresenborg, D., & Jöhncke, U. (1994). The assessment of bioaccumulation. *Chemosphere*, 29(7), 1501–1514. [https://doi.org/10.1016/0045-6535\(94\)90281-X](https://doi.org/10.1016/0045-6535(94)90281-X)
- Gabe, M. (1968). *Techniques histologiques* (Ed.Masson).
- Hajek, A. E., & St Leger, R. J. (1994). Interactions between fungal pathogens and insect hosts. *Annual Review of Entomology*, Vol. 39, 293–322.
<https://doi.org/10.1146/annurev.ento.39.1.293>
- Halouane, F, Bissaad, F. Z., Benzina, F., Chahbar, N., & Hamid, S. (2013). Study of the effect of *Beauveria bassiana* (vuil) on the biochemistry and structure of the cuticle of *Schistocerca gregaria* (forskal) Study of the effect of *Beauveria bassiana* (Vuil) on the biochemistry and structure of the cuticle of *Schistocerca*. *Annals of Biological Research*, 4(12), 68–74.
- Halouane, Fatma. (2008). *Recherche fondamentales sur l'entomopathogène Beauveria bassiana (Ascomycota : Hypocreales): Bioécologie, production et application sur Schistocerca gregaria (Forsk., 1775) et Locusta migratoria (Linné, 1758) (Orthoptera, Acrididae)*. Institut National Agronomique d'El Harrach.
- Jankowiak, C. (2013). *Les insectes - le criquet migrateur*". Disponible sur. www.biopathe.fr
- Jeuniaux, C. (1975). CHITINE ET COMPLEXES CHITINO-PROTEIQUES DE LA CUTICULE. In P. . GRASSE (Ed.), *TRAITE de ZOOLOGIE* (Tome VIII, pp. 31–34).
- KARA_TOUMI, F. (2010). *Evaluation du statut phasaire dans les biotopes solitaires du criquet pèlerin Schistocerca gregaria en Algérie et essai de lutte par un biopesticide* . Ecole Nationale Supérieure Agronomique d'El Harrach.
- KEMASSI, A., Zakaria, B., Abdelkader, H., Nawal, B., Amel, H., Khaled, M., Noureddine, B., & Didi, O. E. H.-K. A. et O. E. H. M. (2018). Etude de la Composition Floristique de la Region du Souf (Sahara Septentrional Algerien). *Algerian Journal of Arid Environment*, 8(2), 79–98. <https://doi.org/10.12816/0008911>
- Kiliç, E., Yazici, A., & Örtücü, S. (2019). Isolation, molecular characterization and pathogenicity of *metarhizium anisopliae* (METSCH.) Sorokin (Hypocreales):

- Clavicipitaceae) from soil in Erzincan Province, Turkey. *Applied Ecology and Environmental Research*, 17(3), 5401–5408.
https://doi.org/10.15666/aeer/1703_54015408
- Klein, I., Oppelt, N., & Kuenzer, C. (2021). Application of remote sensing data for locust research and management—a review. *Insects*, 12(3), 1–39.
<https://doi.org/10.3390/insects12030233>
- Kooyman, C. (2007). *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*, la matière active du Green Muscle®. *Atelier International Sur l'avenir Des Biopesticides En Lutte Contre Le Criquet Pèlerin*, 12–15.
- Kooyman, C., M.A., A., K., M., A., C., & Zaid, A. (2005). *Essai de GREEN MUSCLE® sur les larves du criquet pèlerin dans la wilaya d'El-Oued, Nord-Est Algérie. Rapport FAO- TAC 715*.
- Latchininsky, A. V. (2013). Locusts and remote sensing: a review. *Journal of Applied Remote Sensing*, 7(1), 075099. <https://doi.org/10.1117/1.jrs.7.075099>
- Lecoq, M. (1991). *The Migratory Locust in Africa and in Madagascar* (Issue January 1991). https://www.researchgate.net/publication/235695424_The_Migratory_Locust_in_Africa_and_in_Madagascar
- Mahmoud, Y. (2010). *Essai du champignon entomopathogène Metarhizium anisopliae sur la cuticule des larves L5 de Schistocerca gregaria (Acrididae, Cyrtacanthacridinae)*. Ecole Nationale Supérieure Agronomique.
- Mannino, M. C., Huarte-Bonnet, C., Davyt-Colo, B., & Pedrini, N. (2019). Is the insect cuticle the only entry gate for fungal infection? Insights into alternative modes of action of entomopathogenic fungi. *Journal of Fungi*, 5(2). <https://doi.org/10.3390/jof5020033>
- Martoja, R., & Martoja-Pierson, M. (1967a). Techniques d'histologie animale. *Ed. Masson et Cie, Paris, V*, 331.
- Martoja, R., & Martoja-Pierson, M. (1967b). Techniques d'histologie animale. In *Ed. Masson et Cie*.
- Mengli, C., Yuzhe, D., Guonian, Z., Takamatsu, G., Ihara, M., Matsuda, K., Zhorov, B. S., & Dong, K. (2018). Action of six pyrethrins purified from the botanical insecticide pyrethrum on cockroach sodium channels expressed in *Xenopus* oocytes. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 82–89. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2018.05.002>
- Miladi, M., Abdellaoui, K., Hamouda, A. Ben, Boughattas, I., Mhafdhi, M., Acheuk, F., & Halima-Kamel, M. Ben. (2019). Physiological, histopathological and cellular immune effects of *Pergularia tomentosa* extract on *Locusta migratoria* nymphs. *Journal of Integrative Agriculture*, 18(12), 2823–2834. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(19\)62704-8](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(19)62704-8)
- Murillo-Alonso, K. T., Hernández-Velázquez, V. M., Salazar-Schettino, P. M., Cabrera-Bravo, M., & Toriello, C. (2019). Effects of *Metarhizium anisopliae* on *Meccus pallidipennis* (Hemiptera: Reduviidae) over different types of wall surfaces. *Biocontrol Science and Technology*, 29(5), 466–477.
<https://doi.org/10.1080/09583157.2019.1566438>

- Narayanamma, V. L., & Krishnaiah, N. V. (2020). *Present Problem of Locusts Countries Affected by Locust. October*, 1098–1103.
- 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. <https://doi.org/10.22201/ib.20078706e.2019.90.2643>
- 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., Benaim, 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>
- Ould El Hadj, M. D., Bouziane, N., Minami, A., & Ould El Hadj-Khelil, A. (2011). Problèmes de la lutte chimique au Sahara Algérien: Cas des acridicides. *Algerian Journal of Arid Environment*, 1(1), 77–83. <http://dspace.crstra.dz:8080/jspui/handle/123456789/287>
- Radhika, S., Sahayaraj, K., Senthil-Nathan, S., & Hunter, W. B. (2018). Individual and synergist activities of monocrotophos with neem based pesticide, Vijayneem against *Spodoptera litura* Fab. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 101, 54–68. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2017.05.004>
- Schrank, A., & Vainstein, M. H. (2010). *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins. *Toxicon*, 56(7), 1267–1274. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.03.008>
- Senthil-Nathan, S. (2015). A Review of Biopesticides and Their Mode of Action Against Insect Pests. *Environmental Sustainability: Role of Green Technologies*, 1–324. <https://doi.org/10.1007/978-81-322-2056-5>
- Shah, P. A., & Pell, J. K. (2003). Entomopathogenic fungi as biological control agents. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 61(5–6), 413–423. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1240-8>
- Soudani, A., & Moussi, A. (2020). Updated Checklist and Assemblages of Grasshoppers (Orthoptera: Acridomorpha) Associated with Various Habitats, including Oases of Central Sahara in Algeria. *African Zoology*, 55(3), 213–223. <https://doi.org/10.1080/15627020.2020.1773310>
- Toure, M., Fall, A., Seye, F., & Ndiaye, M. (2018). Histopathologie et effet de *Metarhizium anisopliae* sur les stades larvaires du criquet sénégalais (*Oedaleus senegalensis*). *Afrique SCIENCE*, 14(2), 177–185.
- Tu, X., Hu, G., Fu, X., Zhang, Y., Ma, J., Wang, Y., Gould, P. J. L., Du, G., Su, H., Zhang, Z., & Chapman, J. W. (2020). Mass windborne migrations extend the range of the migratory locust in East China. *Agricultural and Forest Entomology*, 22(1), 41–49. <https://doi.org/10.1111/afe.12359>
- Vega, Fernando E., Meyling, N. V., Luangsa-Ard, J. J., & Blackwell, M. (2012). Fungal entomopathogens. In *Insect Pathology* (Second Edi). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384984-7.00006-3>

- Vincent, J. F. . (2001). Cuticle. In *Encyclopedia of materials: Science and technology* (Buschow K., pp. 1924–1928). Elsevier Science Ltd.
- Zakaria, O., & Sagnia, S. (2003). Lutte intégrée contre les sautereaux et les locustes: importance du biopesticide Green Muscle. *Bull. Trimestriel d'information Du Centre Régional AGRHYMET*, 5(3), 15.
- Zhang, L., Lecoq, M., Latchininsky, A., & Hunter, D. (2019). Locust and grasshopper management. *Annual Review of Entomology*, 64(September), 15–34.
<https://doi.org/10.1146/annurev-ento-011118-112500>
- Zimmermann, G. (2007). Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Biocontrol Science and Technology*, 17(9), 879–920.
<https://doi.org/10.1080/09583150701593963>

ANNEXES

ANNEXES

Annexe 1 : Matériel non biologique et appareillages**Tableau 5** : Liste des principaux matériaux et appareillages utilisés

Matériels utilisés lors des manipulations avec <i>Metarhizium</i>	Matériels utilisé lors des manipulations avec <i>L. migratoria</i>
- L'eau distillée.	- flacon de pulvérisation
- Tubes à essai	- Loupe binoculaire
- Boîtes de Pétri	- Epingles entomologique
- Milieux de culture	- Piluliers et flacon remplies de formol
- Béchers	- Eukit / le baume du Canada
- Pipettes Pasteur	- Formol 36°
- Compteur manuel	- Alcool (96%, 99.8%).
- Hotte	- Xylène
- Balance de précision	- Paraffine « Leica ».
- Réfrigérateur	- Colorants.
- Bec bunsen	- Lames et lamelles.
- Cellule de Malassez	- Porte-lames
- Autoclave	- Trousse de dissection
- Bécher.	- Boite à dissection
- Eprouvette graduée	- Bain d'eau thermo-statée.
- Erlen Meyer.	- Centrifugeuse.
- Parafilm.	- Microtome « Leica ».
- Pissette d'eau distillée	- Platine refroidissante « Leica ».
- Spatule	- Cages en bois.
- Entonnoir	- Trousse de dissection
- Papier filtre	- Cassette en plastique.
- microscope optique	- Moules en métal (porte-cassette).
- Etuve	- Appareil photos numérique
- Réfrigérateur.	- Appareil de circulation

➤ **La composition du Milieu de culture PDA (Potatos Dextrose 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.

Lorsque le milieu est prêt, il est mis dans un autoclave pendant une durée de 20 à 30 minutes à 120°C pour stériliser son contenu.

2. **Fiches techniques**

2.1. **Fiche technique de GREEN MUSCLE**

➤ **Information Générale**

- **Nom commercial du produit:** GREEN MUSCLE
- **Catégorie d'usage:** Biopesticide (acridicide)
- **Domaine d'application :** Lutte biologique antiacridienne
- **Ravageurs cibles:** Les criquets de l'infra-ordre Acrididae (Orthoptera).
- **Cultures:** Toutes cultures attaquées par les criquets

➤ **Matière active**

- **Matière active :** Matériel biologique
- **Nom scientifique de l'agent biologique :** *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* souche IMI 330189
- **Stade de développement :** Conidies (spores).
- **Nature de l'organisme :** un champignon pathogène appartenant au groupe des champignons mitosporiques, qui sont des anamorphes (stades asexués) de champignons dans l'embranchement Ascomycota. Il est très spécifique aux criquets. Parce que les criquets ont la capacité de détoxifier les toxines des autres champignons entomopathogènes, *M. acridum* a développé une autre stratégie pour tuer son hôte et dans le processus a perdu les gènes pour la synthèse de toxines.

- **Contenu en matière active** : $\pm 5 \cdot 10^{10}$ 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 μm

➤ Formulation

- **Type de formulation**: TC
- **Liquide de mélange** : Gasoil ou une autre huile appropriée, par ex. 70% pétrole lampante plus 30% huile végétale.
- **Dose recommandée** : 50 g/ha dans 1 L (application aérienne) ou 2 L (application terrestre) de gasoil.
- **Doses appliquées** : 25 à 100 g/ha : selon la densité de la végétation et la viabilité des spores.
- **Efficacité au champ**: Une dose de 50 g/ha dans 1-4 L de gasoil (en fonction de la densité de la végétation) ou une autre huile appropriée réduit les populations par au moins 80% dans 3 semaines (ou moins dans la présence d'ennemis naturels tels que des oiseaux).

➤ Propriétés physico-chimiques

- **Apparence** : Poudre fine de couleur vert marin.
- **Odeur** : sans odeur particulière
- **Stabilité** : Durée de stockage > 5 ans à 4°C.
- **Incompatibilités** : Incompatible avec la plupart des fongicides
- **Compatibilité avec d'autres pesticides** : compatible avec certains pesticides utilisés dans la lutte antiacridienne, par ex. les pyréthriinoïdes.
- **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 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°C et approximativement 6 mois sous un régime de 30 - 40°C.

➤ **Toxicité et pathogénicité**

- **Toxicité acute orale (rat) :** $DL_{50} > 2$ g/kg poids vif
- **Toxicité acute dermique (rat) :** $DL_{50} > 2$ g/kg poids vif
- **Toxicité acute inhalation (rat) :** $CL_{50} > 17,25$ mg/kg poids vif
- **Toxicité intrapéritonéale (rat) :** $DL_{50} > 100$ mg/kg poids vif
- **Irritation œil (lapin) :** Oui
- **Irritation peau (lapin) :** Oui, mais exposition doit dépasser 24 h
- **Sensibilisation :** Très rare
- **Toxicité envers les poissons :** CL_{50} de 96 heures > 100 mg/L
- **Toxicité envers les abeilles :** $DL_{50} > 100$ µg/individu (mortalité dans test au laboratoire due à la pathogénicité, pas la toxicité ; tests dans des ruches n'ont pas montré des signes d'intoxication ni de pathogénicité)
- **Toxicité envers les vers de terre :** $CL_{50} > 1$ g/kg de sol sec.
- **Toxicité envers les oiseaux :** Non toxiques dans des tests d'alimentation contaminée.
- **Phytotoxicité:** La matière active n'est pas phytotoxiques. Le mélange dans les épandeurs n'est pas phytotoxiques non plus si le volume d'application ne dépasse pas 5 L/ha.



Figure 29: Le biopesticide Green Muscle (IMI 330139) (a), le manuel d'utilisateur (b) et la fiche technique (c) (Originale).

2.2. Fiche technique du test de germination

- Peser 0,2g des spores en poussière de Green muscle formulé
- Ajouter 1 ml de Tween 80, mélanger jusqu'à l'obtention d'une pâte
- Diluer la pâte dans 99 ml de pétrole (a).
- Prélever 1 ml de (a) et diluer dans 9 ml de pétrole (b).
- Ensemencer avec trois gouttes de la solution (b) grâce à une pipette la boîte de pétri renfermant le milieu PDA sous des conditions stériles.
- Étaler 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.
- 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. Évitez 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 :

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

a : nombre de spores ayant germé

b : nombre de spores n'ayant pas germé

Les résultats illustrés dans le tableau ci-dessus montrent que le Green muscle possède une viabilité de spores de 80 % après 48 heures.

Description de la cellule de Malassez

La cellule de Malassez est une lame de verre contenant 100 rectangles d'égales surfaces. Un quadrillage a été gravé de 25 rectangles contenant eux-mêmes 20 petits carrés. Le principe consiste à compter le nombre des spores existant dans les 10 rectangles constituant les deux diagonales de la cellule.

Les caractéristiques de la cellule de Malassez

- Le quadrillage total a un volume de 1 μ l.
- Dimensions : L : 2,5 mm, l : 2 mm, H (ou profondeur) : 0,2 mm.

Le volume d'un rectangle quadrillé étant de 0,01 μ l, en comptant 10 rectangles, il suffit alors de multiplier le résultat par 10 000 pour obtenir le nombre de spores par ml.

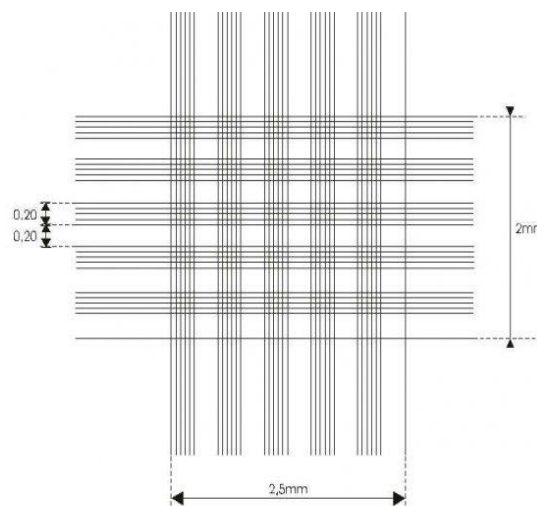


Figure 30 : Schéma de la cellule de Malassez



Figure 31 : Trousse de Dissection



Figure 32 : Formol à 36°



Figure 33 : Paraffine



Figure 34 : Eukit



Figure 35 : Colorant



Figure 36 : microtome



Figure 37 : Appareil de circulation



Figure 38 : Boîtes en verre



Figure 39 : Bécher

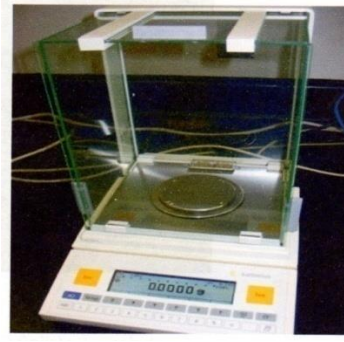


Figure 40: balance de précision



Figure 41 : Agitateur vortex



Figure 42 : Etuve



Figure 43 : Entonnoir



Figure 44: Erlenmeyer



Figure 45 : Parafilm



Figure 46: Pissette d'eau distillée



Figure 47 : Cassette



Figure 48: microscope



Figure 49 : Moules



Figure 50 : Lames porte-objet



Figure 51 : Porte-lames en métal



Figure 52 : La hotte



Figure 53 : Etapes de la technique histologique

Annexe 2 : Les résultats du test de la mortalité

Tableau 6 : Les mortalités cumulées (Nb d'individus morts) et les taux de mortalité cumulée (%) après traitement au *M. anisopliae*. **J** : jour de traitement

Stade L3

Temps Jours	Témoin			Mortalité cumulée (Nbr d'individus morts)									Taux de mortalité cumulée (%)								
				D1=2,3×10 ⁴			D2=2,3×10 ⁶			D3=2,3×10 ⁸			D1=2,3×10 ⁴			D2=2,3×10 ⁶			D3=2,3×10 ⁸		
	R1	R2	M	R1	R2	M	R1	R2	M	R1	R2	M	R1	R2	M	R1	R2	M	R1	R2	M
J+1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
J+2	0	0	0	0	0	0	1	1	1	2	2	2	0	0	0	12,5	12,5	12,5	25	25	25
J+3	0	0	0	1	1	1	3	3	3	2	2	2	12,5	12,5	12,5	37,5	37,5	37,5	25	25	25
J+4	0	0	0	1	3	2	4	4	4	4	2	3	12,5	37,5	25	50	50	50	50	25	37,5
J+5	0	0	0	2	4	3	4	4	4	4	4	4	25	50	37,5	50	50	50	50	50	50
J+6	0	0	0	3	5	4	5	5	5	6	4	5	37,5	62,5	50	62,5	62,5	62,5	75	50	62,5
J+7	0	0	0	4	6	5	7	7	7	6	6	6	50	75	62,5	87,5	87,5	87,5	75	75	75
J+8	0	0	0	6	8	7	7	7	7	6	6	6	75	100	87,5	87,5	87,5	87,5	75	75	75
J+9	0	0	0	6	8	7	8	8	8	8	6	7	75	100	87,5	100	100	100	100	75	87,5
J+10	0	0	0	8	8	8	8	8	8	8	8	8	100	100	100	100	100	100	100	100	100
J+11	0	0	0	8	8	8	8	8	8	8	8	8	100	100	100	100	100	100	100	100	100

Tableau 7 : Les mortalités cumulées (Nb d'individus morts) et les taux de mortalité cumulée (%) après traitement au *M. anisopliae*. **J** : jour de traitement

Stade L4

Temps Jours	Témoin			Mortalité cumulée (Nbr d'individus morts)									Taux de mortalité cumulée (%)								
				D1=2,3×10 ⁴			D2=2,3×10 ⁶			D3			D1=2,3×10 ⁴			D2=2,3×10 ⁶			D3=2,3×10 ⁸		
	R1	R2	M	R1	R2	M	R1	R2	M	R1	R2	M	R1	R2	M	R1	R2	M	R1	R2	M
J+1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
J+2	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5
J+3	0	0	0	1	1	1	2	2	2	3	3	3	12,5	12,5	12,5	25	25	25	37,5	37,5	37,5
J+4	0	0	0	1	1	1	3	3	3	4	4	4	12,5	12,5	12,5	37,5	37,5	37,5	50	50	50
J+5	0	0	0	2	2	2	5	4	4	5	5	5	25	25	25	62,5	50	50	62,5	62,5	62,5
J+6	0	0	0	3	3	3	5	5	5	5	5	5	37,5	37,5	37,5	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5
J+7	0	0	0	3	3	3	5	5	5	6	6	6	37,5	37,5	37,5	62,5	62,5	62,5	75	75	75
J+8	0	0	0	5	3	4	6	6	6	6	8	7	62,5	37,5	50	75	75	75	75	100	87,5
J+9	0	0	0	5	5	5	6	6	6	8	8	8	62,5	62,5	62,5	75	75	75	100	100	100
J+10	0	0	0	6	8	7	8	8	8	8	8	8	75	100	87,5	100	100	100	100	100	100
J+11	0	0	0	8	8	8	8	8	8	8	8	8	100	100	100	100	100	100	100	100	100

Tableau 8 : Les mortalités cumulées (Nb d'individus morts) et les taux de mortalité cumulée (%) après traitement au *M. anisopliae*. **J** : jour de traitement

Stade L5

Temps Jours	Témoïn			Mortalité cumulée (Nbr d'individus morts)									Taux de mortalité cumulée (%)								
				D1=2,3×10 ⁴			D2=2,3×10 ⁶			D3			D1=2,3×10 ⁴			D2=2,3×10 ⁶			D3=2,3×10 ⁸		
	R1	R2	M	R1	R2	M	R1	R2	M	R1	R2	M	R1	R2	M	R1	R2	M	R1	R2	M
J+1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
J+2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	12,5	12,5	12,5
J+3	0	0	0	1	1	1	1	1	1	2	2	2	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	25	25	25
J+4	0	0	0	1	1	1	3	3	3	4	4	4	12,5	12,5	12,5	37,5	37,5	37,5	50	50	50
J+5	0	0	0	2	2	2	4	4	4	4	4	4	25	25	25	50	50	50	50	50	50
J+6	0	0	0	3	3	3	5	3	4	5	5	5	37,5	37,5	37,5	62,5	37,5	50	62,5	62,5	62,5
J+7	0	0	0	4	4	4	5	5	5	5	5	5	50	50	50	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5
J+8	0	0	0	4	6	5	6	6	6	6	6	6	50	75	62,5	75	75	75	75	75	75
J+9	0	0	0	6	6	6	6	6	6	7	7	7	75	75	75	75	75	75	87,5	87,5	87,5
J+10	0	0	0	7	7	7	6	8	7	8	8	8	87,5	87,5	87,5	75	100	87,5	100	100	100
J+11	0	0	0	8	8	8	8	8	8	8	8	8	100	100	100	100	100	100	100	100	100

Tableau 9 : Logarithmes décimaux des temps et probits des pourcentages de mortalité cumulée (MC) chez les L3, L4 et L5 de *L. migratoria*.

Stade Larvaire	Temps (Jours)	log ₁₀ (temps)	log ₁₀ D1=4,362		log ₁₀ D2=6,362		log ₁₀ D3=8,362	
			MC %	Probits	MC %	Probits	MC %	Probits
L3	J+2	0,301	0	-	12,5	3,85	25	4,33
	J+3	0,477	12,5	3,85	37,5	4,68	25	4,33
	J+4	0,602	25	4,33	50	5,00	37,5	4,68
	J+5	0,699	37,5	4,68	50	5,00	50	5,00
	J+6	0,778	50	5,00	62,5	5,32	62,5	5,32
	J+7	0,845	62,5	5,32	87,5	6,15	75	5,67
	J+8	0,903	87,5	6,15	87,5	6,15	75	5,67
	J+9	0,954	87,5	6,15	100	-	87,5	6,15
L4	J+2	0,301	-	-	12,5	3,85	12,5	3,85
	J+3	0,477	12,5	3,85	25	4,33	37,5	4,68
	J+4	0,602	12,5	3,85	37,5	4,68	50	5,00
	J+5	0,699	25	4,33	50	5,00	62,5	5,32
	J+6	0,778	37,5	4,68	62,5	5,32	62,5	5,32
	J+7	0,845	37,5	4,68	62,5	5,32	75	5,67
	J+8	0,903	50	5,00	75	5,67	87,5	6,15
	J+9	0,954	62,5	5,32	75	5,67	100	-
L5	J+2	0,301	0	-	0	-	12,5	3,85
	J+3	0,477	12,5	3,85	12,5	3,85	25	4,33
	J+4	0,602	12,5	3,85	37,5	4,68	50	5,00
	J+5	0,699	25	4,33	50	5,00	50	5,00
	J+6	0,778	37,5	4,68	50	5,00	62,5	5,32
	J+7	0,845	50	5	62,5	5,32	62,5	5,32
	J+8	0,903	62,5	5,32	75	5,67	75	5,67
	J+9	0,954	75	5,67	75	5,67	87,5	6,15
J+10	1	87,5	6,15	87,5	6,15	100	-	

MC : Mortalité Cumulée J : jour de traitement D1 : $2,3 \times 10^4$; D2 = $2,3 \times 10^6$; D3 : $2,3 \times 10^8$ spores/ml