

*ERépublique Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de L'enseignement Supérieur et de La Recherche Scientifique*



*Université BLIDA 1
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie*

Département de Biologie et de Physiologie Cellulaire

*Mémoire de fin d'études
En vue de l'obtention du diplôme*

MASTER
Option : Biologie Cellulaire et Moléculaire

Thème

Recherche d'éventuels indices de l'inflammation rénale chez des souris traitées avec un champignon entomopathogène

Présenté par

M^{elle} Soumatia Rima

et

M^{elle} Saidani Houda

Soutenu le 17/07/2019

Devant le jury composé de :

M^{me} SOUR S.

Maitre de conférences B

UB1

Présidente

M^{me} ZEROUTI K.

Maitre Assistante A

UB1

Examinatrice

M^{me} SAADI L.

Maitre de Conférences A

UB1

Promotrice

M^{me} ARKAM F.

Assistante

UB1

copromotrice

Promotion: 2018-2019



Dédicace

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

Je dédie ce mémoire :

Je tiens à dédier ce modeste travail a ma maman, qui m'a donne tout ce que j'avais besoin afin de parvenir a ce stade : amour, persévérance et bonne éducation, et à qui revient le mérite d'être ce que je suis aujourd'hui.

A Mes très tendre frère : Mohamed Amine, pour ses encouragements et son aide.

A Tous mes oncles, mes tantes et leurs enfants et en particulier tous mes cousines et mes cousins.

A Mes très tendres amies spécialement : Marwa, Meriem et Manel.

A ma précieuse sœur et binôme Houda qui a fait preuve d'une incroyable compréhension a mon égard, a qui je souhait succès et réussite dans tout ce quelle entreprend.

Enfin, ce mémoire est dédie a ma très chère promotrice pour tout le savoir quelle a su m'inculquer avec sérieux et abnégation.

RIMA



Dédicace

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

Je dédie ce mémoire :

A ma très chère mère source d'amour et d'affection qui m'a toujours témoigné son sacrifice et sa bénédiction dans les moments les plus importants de ma vie.

A mon très cher père qui m'a toujours soutenu et aidé. Il était toujours à mes côtés, depuis mon enfance pour que je réussisse, Que Allah les garde et les protège.

“C'est le hasard qui fait la famille, mais c'est le cœur qui fait les amis !les amis sont la famille que l'on choisit !!” Je dédie spécialement ce travail à ma très chère et meilleure amie, copine, sœur, et partenaire dans cette recherche «Rima » que Dieu nous maintient notre amitié pour toujours.

Mes chères et adorables sœurs : Amel, Narimene, Selma, Samah et Loubna en témoignage de l'attachement, de l'amour et de l'affection que je porte pour vous.

A tous mes amis et camarades et à toute personne que j'ai aimée et respectée, A tous les étudiants de la deuxième année master «Biologie moléculaire et cellulaire »

Je voudrais ensuite adresser un remerciement particulier à mon fiancé Halim, pour ses encouragements et son aide.

Houda

REMERCIEMENTS

En premier lieu, Nous tiens à remercions Dieu, le tout puissant, qui nous a donné la force et le courage d'aller jusqu'au bout de nos études.

Au terme de ce travail, nous tenons à exprimer notre reconnaissance et remerciements à notre promotrice et le notre responsable d'option Dr Saadi L., maitre de conférences A l'Université Blida-1. Nous tiens lui exprimons notre gratitude vivement pour sa disponibilité, sa patience, sa compréhension, ses qualités humaines et ses intérêts portés pour notre thème de recherche.

Nos remerciements vont les plus sincères à Mme ARKAM F. de ces conseils pour bien diriger notre travail.

Nos remercions les membres de jury qui ont accepté de juger la qualité de notre travail : M^{me} SOUR., maitre de conférences B, à l'Université Blida1, Département de BPC. Vous nous faites un grand plaisir en présidant le jury de ce mémoire.

Nos remercieront vont aussi à, M^{me} ZEROUTI K., maitre assistante A L'Université Blida 1, d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Nos remerciements, s'adressent également à M^{me} Dahnane H. Ingénieur de laboratoire pour son aide tout au long de la réalisation de la partie pratique.

Nous tenons à exprimer notre affectueuse reconnaissance à M^{me} bouazza pour son aide et ses précieux conseils.

Nous souhaiterons également remercier nos professeurs de la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie pour leur savoir et disponibilité.

Enfin, notre profonde gratitude va à l'égard de toutes les personnes qui ont aimablement contribué à la réalisation de ce travail par leur aide et leur encouragement.



RESUME

Le Novacrid ®, développé à base de spores de *Metarhizium anisopliae* var. *acidum*, occupe une place importante parmi les méthodes alternatives de la lutte antiacridienne. L'application généralisée de ce biopesticide peut favoriser l'apparition de mycoses chez les mammifères. Dans la présente étude, nous avons recherché l'inflammation rénale chez les souris femelles traitées par voie orale avec Novacrid et avec les spores de culture de *M. anisopliae* var. *acidum* à raison de la même dose $1,4 \times 10^8$ spores/ml. Les souris ont fait l'objet d'une pesée hebdomadaire. Les traitements sont appliqués en trois fois a une période de 14 jour par la voie orale .Le sang est recueilli pour la détermination des teneurs plasmatiques en l'urée et créatinine. Les reins sont prélevés, pesés et destinés à l'étude histopathologiques.

Les différents traitements n'ont aucun effet significatif sur la croissance pondérale des souris ni sur le poids relatif des reins. Les changements en urée et en créatinine chez les souris traitées sont non significatifs. L'analyse histologique révèle des images de dilatation des capillaires interstitiels et glomérulaire, dégénérescence locale des tubules corticales et médullaires et congestion sanguine modérée. Tous ces résultats nous laissent suggérer l'installation discrète de l'inflammation rénale qui est inaperçue à l'échelle fonctionnelle suite à l'administration subaiguë des spores conditionnées et germées de *Metarhizium anisopliae* var. *acidum*.

Mots clés: Histopathologie, Inflammation rénale, *Metarhizium anisopliae* var. *acidum*, Novacrid, Souris femelles.

ABSTRACT

Novacrid ®, developed from spores of *Metarhizium anisopliae* var. *acidum*, occupies an important place among the alternative methods of locust control. The widespread application of this biopesticide can promote the development of mycosis in mammals. In the present study, we investigated renal inflammation in female mice treated orally with Novacrid and with culture spores of *M. anisopliae* var. *acidum* at the same dose 1.4×10^8 spores / ml. The mice were weighed weekly. The treatments are applied three times orally with an interval of 5 days. Blood is collected for the determination of plasma levels of urea and creatinine. The kidneys are removed, weighed and intended for histopathological study.

The different treatments have no significant effect on the weight growth of the mice or on the relative weight of the kidneys. Changes in urea and creatinine in treated mice are insignificant. Optical microscopy reveals dilated images of interstitial and glomerular capillaries, local degeneration of cortical and medullary tubules, and moderate blood congestion. All these results suggest the discreet installation of renal inflammation that is unobservable at the functional scale following the subacute administration of conditioned and germinated spores of *Metarhizium anisopliae* var. *acidum*.

Key words: Histopathology, Renal inflammation, *Metarhizium anisopliae* var. *acidum*; Novacrid, female mice.

ملخص

النوفاكريد تم تطويره من أبواغ الفطر الممرض للحشرات ميتاريزيوم أنيزوبليا فار اكريدوم يحتل مكانة كبيرة بين الطرق البديلة لمكافحة الجراد أن التطبيق واسع النطاق لهذا المبيد الحيوي يمكن أن يعزز تطوير الفطريات عند الثدييات، نسعى في عملنا هذا البحث عن الالتهاب الكلوي عند إناث الفئران المعالجة عن طريق الفم بميتاريزيوم أنيزوبليا المستنبت 1.4×10^8 بوغ /أبواغ مل مع وزن الفئران أسبوعيا تم تطبيق نفس الجرعات ثلاث مرات عن طريق الفم، ثم استرجاع الدم لتحديد مستويات اليوريا و الكرياتينين في البلازما ونزع الكلى مع وزنها لتوجه نحو الدراسة النسيجية المرضية .

العلاجات المختلفة ليس لها تأثير معتبر على وزن الفئران أو على الوزن النسبي للكلى وأيضا إحصائيا ليس لها تأثير معتبر على مستوى الكرياتينين و اليوريا .

يكشف المجهر عن صورة موسعة للشعيرات الدموية الخلوية ، والتنكيس الموضعي لأنابيب القشريات النخاعية ، و احتقان الدم . كل هذه النتائج تشير إلى التثبيت لالتهاب كلوي الذي لا يمكن ملاحظته على نطاق وظيفي بعد إعطاء الأبواغ المتبرعة و الأبواغ المتكيفة على شكل نوفاكريد بجرعة تحت الجلد.

الكلمات المفتاحية: الدراسة النسيجية المرضية ،الالتهاب الكلوي ، ميتاريزيوم فار اكريد، نوفاكريد،أناث الفئران .

LISTE DES ABREVIATIONS

FG : c'est la formulation à base des spores germées.

FN: c'est formulation à base des spores de Novacrid®.

H.E: Hématoxyline-Eosine.

N.M.R.I.: Naval medical research institute.

tobs : Valeur de « t » observée.

tth : Valeur de « t » théorique de la table.

GLOSSAIRE

Atrophie : diminution de volume d'une cellule ou d'un tissu ou d'un organe d'origine pathologique ou physiologique (Jeuge-Maynard et *al.*, 2010).

Congestion: accumulation anormale du sang dans les vaisseaux d'un organe ou d'une partie d'organe (Jeuge-Maynard et *al.*, 2010).

Hypertrophie : est une augmentation du volume d'un tissu ou d'un organe, liée soit à une hypertrophie cellulaire, soit à une hyperplasie, soit aux deux à la fois (Jeuge-Maynard et *al.*, 2010).

Destruxines: des composés toxiques non enzymatiques produits par *Metarhizium anisopliae* qui lui permettent de surmonter les mécanismes de défense de l'hôte et de proliférer (Benserradj, 2014).

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

Hydrocarbures cuticulaires: sont des composés chimiques constitués uniquement de carbone et d'hydrogène, Ils servent essentiellement à protéger contre la dessiccation chez l'insecte (Chung et Carroll, 2015).

Mucilage hygroscopique: Substance végétale qui gonfle au contact de 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).

Mésophile: est une forme de vie qui prospère au mieux dans des conditions de température modérée (Jeuge-Maynard et *al.*, 2010).

Nécrose : se traduit par des altérations du noyau et du cytoplasme de la cellule suivies éventuellement par des modifications des éléments extracellulaires (Chung et Carroll, 2015).

Saprophyte : est un organisme végétal, fongique ou bactérien capable de se nourrir de matière organique non vivante (Benserradj, 2014).

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Titre	page
Tableau 1	Composition des bouchons alimentaires	Annexe 1
Tableau II	Réactifs du dosage de l'urée.	Annexe 1
Tableau III	Réactifs du dosage de la créatinine.	Annexe 1
Tableau IV	Table de Student.	Annexe 1
Tableau V	Table de Fisher.	Annexe 1
Tableau VI	Table de dilution d'alcool (Table de Gay-Lussac).	Annexe 1
Tableau VII	Poids corporel des souris femelles témoins.	Annexe 2
Tableau VIII	Poids corporel des souris femelles traitées par la forme germinative de champignon <i>Metarhizium anisopliae var acridum</i> .	Annexe 2
Tableau IX	Poids corporel des souris femelles traitées par la formule conditionné de champignon <i>Metarhizium anisopliae var acridum</i> (Novacrid®).	Annexe 2
Tableau X	Valeurs moyennes des poids corporels des souris femelles témoins et traitées par différents traitements de champignon <i>Metarhizium anisopliae var acridum</i> .	Annexe 2
Tableau XI	Valeurs individuelles des poids absolu et relatif des reins chez les souris témoins et traités par différents traitements de <i>Metarhizium anisopliae var acridum</i> .	Annexe 2
Tableau XII	Valeurs moyennes des poids absolu et relatif des reins chez les souris témoins et traités par différents traitements de champignon <i>Metarhizium anisopliae var acridum</i> (pour chaque rein Gauche et Droit).	Annexe 2
Tableau XIII	Valeurs moyennes des poids relatif de rein chez les souris témoins et traités par différents traitements de champignon <i>Metarhizium anisopliae var acridum</i> (Les moyennes entre rein Gauche et Droit).	Annexe 2
Tableau XIV	Résultat de l'analyse statistique de poids corporel chez les souris témoins et traités par différents formulation de <i>Metarhizium anisopliae var acridum</i> .	Annexe 2
Tableau XV	Résultat de l'analyse statistique de poids relative des reins chez	Annexe 2

	les souris témoins et traités par différents formulation de <i>Metarhizium anisopliae var acridum</i> .	
Tableau XVI	<i>Valeurs de l'urémie et de la créatinémie chez les souris femelles témoins.</i>	Annexe 2
Tableau XVII	<i>Valeurs de l'urémie et de la créatinémie chez les souris femelles traitées par formulation germinative de Metarhizium anisopliae vae acridum.</i>	Annexe 2
Tableau XVIII	<i>Valeurs de l'urémie et de la créatinémie chez les souris femelles traitées par formulation conditionnée de Metarhizium anisopliae vae acridum (Novacrid®).</i>	Annexe 2
Tableau XIX	<i>Valeurs moyennes de l'urémie et de la créatinémie chez les souris femelles témoins et traitées par la formulation germinative et la formulation commercialisée a base de Metarhizium anisopliae vae acridum.</i>	Annexe 2
Tableau XX	Résultat de l'analyse statistique de taux de l'urémie et de la créatinémie de chez les souris témoins et traités par la formulation germinative et la formulation commercialisée a base de <i>Metarhizium anisopliae vae acridum</i> .	Annexe 2

LISTE DES FIGURES

<i>Figure 1</i>	Aspect macroscopique de <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i> (originale).	6
<i>Figure 2</i>	Aspect microscopique de <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i> A. Gr 100 / B. Gr 100 avec Zoom (originale).	6
<i>Figure 3</i>	Mode d'infection de l'insecte lépidoptère par <i>Metarhizium anisopliae</i> .	8
<i>Figure 4</i>	Images d'acridiens infectés par <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i> . a :Adulte de <i>Locusta migratoria</i> , b : Larve L4 de <i>L.migratoria</i> . c : Ailé de <i>Doclostaurus maroccanus</i> .	8
<i>Figure 5</i>	Anatomie du rein	14
<i>Figure 6</i>	Evolution du poids corporel (g) des souris femelles témoins et traitées par deux formulations, germinative et conditionnée de <i>Metarhizium acridum</i> .	28
<i>Figure 7</i>	Variations du poids relatif des reins chez les souris témoins et traitées par les deux formulations, germinative et conditionnée de <i>Metarhizium acridum</i> .	29
<i>Figure 8</i>	Influence de <i>Metarhizium anisopliae</i> sur le taux plasmatique de l'urée (g/l) chez des souris femelles adultes.	30
<i>Figure 9</i>	Influence de <i>Metarhizium anisopliae</i> sur le taux plasmatique de la créatinine (mg/l) chez des souris femelles adultes.	31
<i>Figure 10</i>	Structure du parenchyme rénal chez les souris femelles témoins. <i>a</i> : Vue d'ensemble ; <i>b, c</i> : partie du cortex rénal ; <i>d</i> : partie de la médulla. Coloration : HE ; Grossissements : x 40 (<i>a</i>), x 100 (<i>b</i>), x 400 (<i>c</i> et <i>d</i>).	33
<i>Figure 11</i>	Structure du parenchyme rénal chez les souris femelles traitées par la formulation à base de spores germées de <i>M. anisopliae</i> var. <i>acridum</i> . Coloration: HE. Grossissements : x 100 (<i>a, d</i>), x 400 (<i>b, g, d</i> et <i>e</i>).	36
<i>Figure 12</i>	Structure du parenchyme rénal chez les souris femelles traitées par la formulation à base de spores conditionnées de <i>M. anisopliae</i> Acridum. Coloration: HE (<i>a, c</i> et <i>f</i>) et Trichrome de Masson (<i>b, d</i> et <i>e</i>). Grossissements : x 100 (<i>a</i> et <i>b</i>) et x 400 (<i>c, d, e</i> et <i>f</i>).	39

Sommaire

INTRODUCTION	1
CHAPITRE I : DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES	
I.1.GENERALITES SUR LES BIOPESTICIDES	3
I.1.1.Définition	3
I.1.2. Classification	3
I.1.3. Biopesticides a base du <i>Metarhizium anisopliae</i>	4
I.2. Toxicité rénale	10
I.2.1. substances néphrotoxiques	11
I.2.2. Natures des lésions	13
I.2.3. Biomarqueurs d'atteinte rénale	14
CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES	
II.1.Matériel	15
II.1.1. Animaux	15
II.1.2. Champignon entomopathogène	15
II.1.3. Matériel non biologique	15
II.2. Méthodes	15
II.2.1.Préparation des formulations de traitement	16
II.2.2. Expérimentation	19
II.2.3.Sacrifice des animaux et prélèvement des échantillons	19
II.2.3. Etude histologique	22

II.2.4. Dosage biochimique rénaux	21
II.2.5. Etude statistique	23
CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION	24
III.1.RESULTATS	24
III.1.1. Comportement	24
III.1.2. Evolution pondérale	25
III.1.3. Evolution de poids de reins	25
III.1.4. Dosage biochimique	26
III.1.5. Etude histologique	28
III.2.DISCUSSION	34
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	37

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANNEXES

INTRODUCTION

L'utilisation des produits phytosanitaires a considérablement diminué la pénibilité du travail au champ tout en permettant une production suffisante et à moindre coût pour satisfaire aussi bien le marché que le consommateur (Deravel et *al.*, 2014). Cependant l'application massive de ces produits continue à apporter des effets néfastes sur la santé humaine, animale et sur les écosystèmes. De plus, l'exposition aux pesticides chimiques favorise l'expression de mécanismes de résistance chez les insectes ravageurs agricoles et causent des effets létaux ou sublétaux sur des espèces d'insectes non cibles (Boudjelida, 2010 ; Jeschke, 2016).

Pour minimiser les répercussions négatives des pesticides chimiques, de nouvelles orientations sont considérées. La lutte biologique, précisément par utilisation de micro-organismes entomopathogènes est une alternative très prometteuse pour assurer une protection phytosanitaire performante (Arkam, 2019).

L'un des plus intéressants champignons entomopathogènes qui appartient à la classe des *Ascomycètes*, *Metarhizium anisopliae*. Ce dernier a attiré l'attention de plusieurs chercheurs pour sa compétence dans l'infection d'une large gamme d'insectes (Nourrisson et *al.*, 2017; Mannino et *al.*, 2019). Lors de l'invasion de l'hôte par les hyphes du champignon, des métabolites/toxines, principalement les destruxines sont émis. Ces derniers accélèrent la mycose et la mort de l'insecte (Kilic et *al.*, 2019).

En Algérie, de nombreux essais ont été menés, dans les conditions de laboratoire et de terrain avec la souche IMI 330189 de *M. anisopliae* var. *acidum* développée en biopesticide Green muscle. Ces essais ont révélé des résultats très satisfaisants sur le criquet pèlerin (Kooyman et *al.*, 2005) et sur le criquet marocain (Chaouch, 2015; Arkam, 2017-a).

Plusieurs recherches toxicologiques faites sur des modèles de mammifères ont considéré *M. anisopliae* comme ni pathogène ni toxique avec des risques minimales et acceptables dans les

écosystèmes (Zimmermann., 2007; Toriello et *al.*, 2009). Cependant, des cas rares de mycoses causées par ce champignon entomopathogène sont signalés. D'après Nourrisson et *al.* (2017), une analyse documentaire approfondie a enregistré 19 cas de mycose au *Metarhizium* spp. Chez les humains et un seul cas chez les chats entre 1997 et 2015. Néanmoins, aucun de ces cas, la mycose n'a été associée à l'utilisation du champignon comme biopesticide. L'exposition accrue des humains et des animaux au *Metarhizium* spp. en raison de l'utilisation commerciale et le nombre croissant des personnes immunodéprimées peuvent favoriser une augmentation du nombre de mycoses causées (Roberts et St-Leger, 2004 ; Nourrisson et *al.*, 2017).

Vu le manque des tests de toxicité chez les mammifères avec la souche EVCH077 de *M. anisopliae* var. *acridum*, développée en biopesticide Novacrid®, nous nous sommes intéressés dans le présent travail par l'étude de quelques aspects de la toxicité orale subaigüe de la souche fongique EVCH077 avec deux formulations aqueuses, germée et conditionnée au niveau des reins des souris femelles de souche M.N.R.I.

Le travail comporte trois chapitres. Dans le premier chapitre, nous rapportons des rappels bibliographiques sur les biopesticides et la toxicité rénale. Le deuxième chapitre comporte le détail du matériel et des techniques utilisés. Les résultats obtenus sont rapportés et discutés dans le troisième chapitre. A la fin, une conclusion et des perspectives seront présentées.

I.1.GENERALITES SUR LES BIOPESTICIDES

I.1.1.Définition

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

I.1.2. Classification

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

I.1.2.1. 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⁺ au cours de la phase de reconstitution du potentiel d'action des neurones. En conséquence une hyperactivité suivie de convulsion chez l'insecte (Chen et *al.*, 2018).

Parmi les biopesticides végétaux les plus utilisés, l'huile de neem qui est un insecticide extrait des graines d'*Azadirachtaindica* (Deravel et *al.*, 2014). Ce dernier est efficace sur un grand nombre d'insectes et sur les acariens. L'ingestion de l'huile de neem 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, 2018).

I.1.2.2. Biopesticides animaux

Les biopesticides d'origine animale sont des animaux comme les parasites, ou des molécules dérivées d'animaux, souvent d'invertébrés comme les venins d'araignées. Ce type de pesticides biologiques sont des substances produits par un organisme et qui changent le

comportement d'individus de la même espèce ou d'espèces différentes. En effet, ils ne vont pas provoquer la mort des bio-agresseurs, mais plutôt créer une confusion chez ces derniers. Cette confusion les empêchera de se propager dans la zone traitée (Deravel et *al.*, 2014).

I.1.2.3. Biopesticides microbiens

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

Les champignons entomopathogènes attirent l'attention de plusieurs chercheurs pour leur compétence dans l'infection d'une large gamme d'insectes. Comme les ravageurs de l'agriculture ou vecteurs de maladies (par exemple, moustiques, punaises embrassâtes, mouches tsé-tsé) (Mannino et *al.*, 2019).

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).

I.1.3. Biopesticides a base du *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).

Cette espèce comprend un grand nombre de souches différentes et d'isolats de diverses origines géographiques et de différents types d'hôtes. Le genre *Metarhizium* comprend les saprophytes du sol appartenant aux Hyphomycètes. Ce genre est parmi les moisissures les plus communément isolées à partir de sols cultivés ou naturels, ils se retrouvent dans régions tropicales et tempérées (Nourrisson et *al.*, 2017).

I.1.3.1. Classification

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 et *al.*, 2015).

La classification de *Metarhizium anisopliae* est la suivante :

Règne : *Fungi*

Embranchement : Dikarya

Sous-embranchement : *Ascomycota*

Classe : Pezizomycotina

Ordre : *Hypocreales*

Famille : *Clavicipitaceae*

Genre : *Metarhizium*

Espèce : *Metarhizium anisopliae*

I.1.3.2. Morphologie de *Metarhizium anisopliae*

D'après Zimmermann (1993 à 2007), *Metarhizium anisopliae* peut être aisément identifié par les spores ovoïdes vertes de longueur variant de 5 à 8 µm qui sont produites en chaînes et qui forment une couche compacte de spores. Les colonies vertes de ce champignon sont formées d'une agrégation des chaînes de conidies. *Metarhizium anisopliae* apparaît blanc avant la maturation des spores et il devient après vert foncé. Cette espèce est caractérisée par des conidiophores de longueur variable sont relativement courts, irrégulièrement ramifiés ou non et arrangés en groupes compacts formant une masse, les spores sont allongées avec des cotés parallèles (Bischoff et *al.*, 2009).

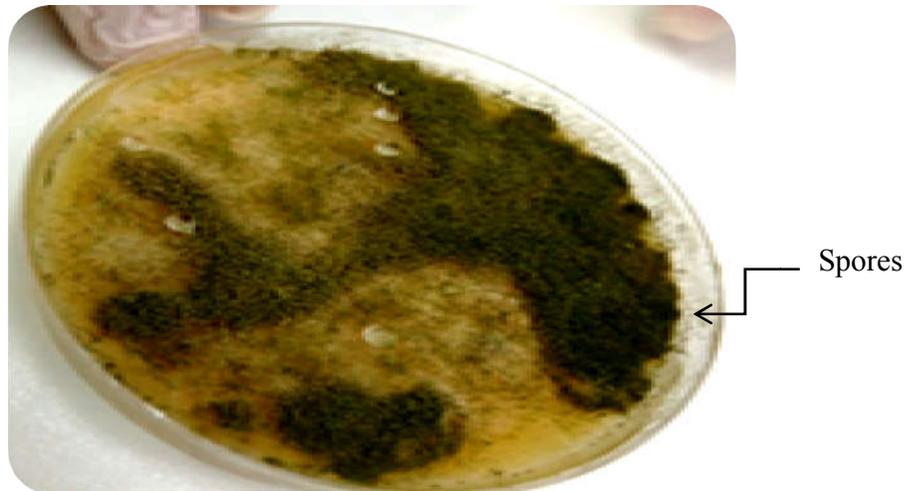


Figure1 : Aspect macroscopique de *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* (originale).

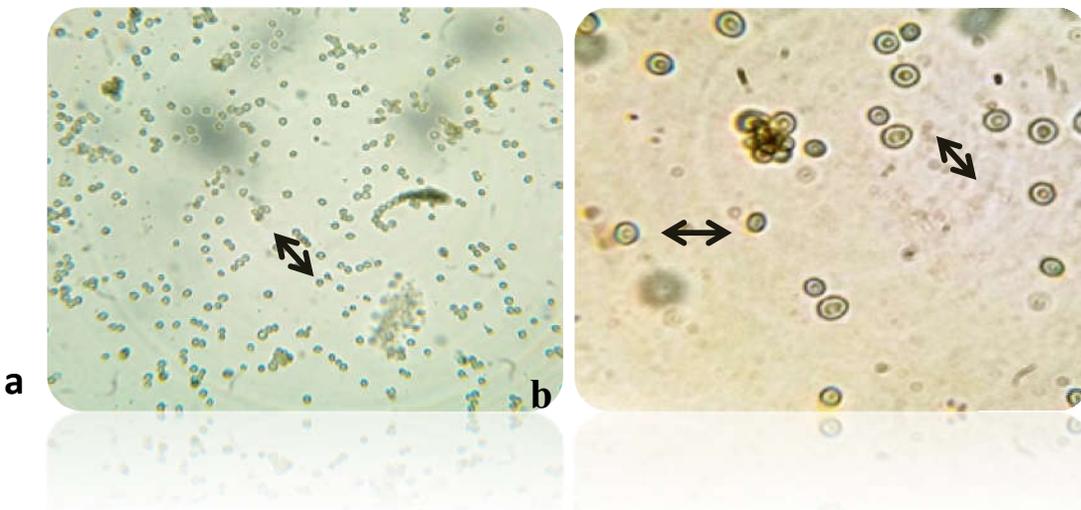


Figure2 : Aspect microscopique de *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*

a. Gr \times 100 / **b.** Gr \times 100 avec Zoom (originale).

I.2.4 .Mode d'infection

Les champignons entomopathogènes infectent généralement les insectes par pénétration directe de la cuticule suivie de multiplication dans l'hémocœle (Kilic et *al.*, 2019) ou bien par les stigmates ou la voie digestive (Chaouch., 2009).

Le mode d'infection de *Metarhizium anisopliae* var *acidum* se divise en quatre étapes distinctes qui sont l'adhésion, la germination, la pénétration et la dissémination (Brunner-Mendoza et al., 2019) (Figure 3).

Phase d'adhésion : Les principales protéines impliquées sont des andésines spécifiques. Une fois fixer, les spores produisent activement un mucilage hygroscopique qui permet la modification de l'épicuticule de l'insecte facilitant la germination des spores et peut créer un environnement favorable aux enzymes exo- cellulaires libérées par ces dernières (Brunner-Mendoza et al., 2019).

Phase de germination: La germination des spores dépend de nombreux facteurs biotiques, tels que les hydrocarbures cuticulaires des insectes ainsi que des facteurs abiotiques (température, rayonnement solaire et humidité) (Brunner-Mendoza et al., 2019). Après la fixation, Les spores émettent un tube germinatif continue de s'allonger et forme un hyphe qui traverse les assises supérieures de l'insecte pour pénétrer à l'intérieur de celui-ci. Le champignon forme l'appressorium qui lui permet le prélèvement des substances nutritives nécessaires à son développement et à sa reproduction.

Phase de pénétration: Les hyphes sortant pénètrent dans la cuticule de l'insecte à l'aide des enzymes (protéases et chitineuses) qui attaquent et dissolvent la cuticule permettant aux spores de pénétrer à travers la cuticule et de se développer dans le corps de l'insecte.

Phase de dissémination: La colonisation de l'hôte se fait lorsque le champignon parvient à surmonter les mécanismes immunitaires de défense de l'insecte et envahit l'hémolymphe, cela peut être facilitée par une rapide reproduction et formation de mycéliums par le champignon, ainsi qu'une forte production des métabolites secondaires ou des toxines tels que les destruxines qui paralysent et tuent l'hôte (Zimmermann ,2007 ; Benserradj 2014 ; Brunner-Mendoza et al., 2019).

La mort de l'insecte survient en général après l'infiltration des différents tissus par les filaments mycéliens causant des dommages par destruction des tissus, entraînant la mort de l'hôte, si les conditions de l'environnement sont favorables, du mycélium commence à sortir des articulations. Au bout d'un certain temps, le champignon fructifie et le cadavre devient vert, un phénomène appelé " la muscardine verte" (figure 4). Les spores se disséminent peu à peu dans le sol pour infecter d'autres criquets causant ainsi une épidémie.

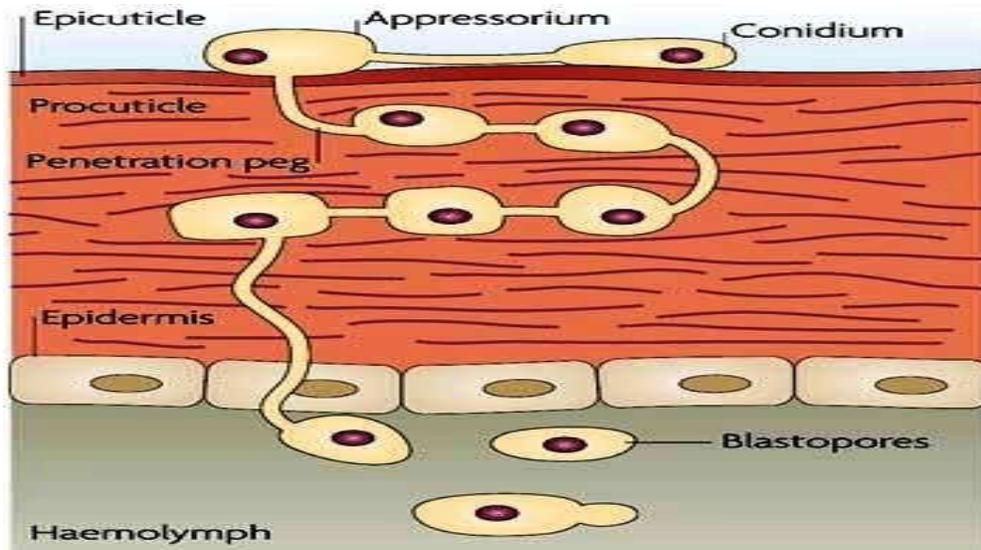
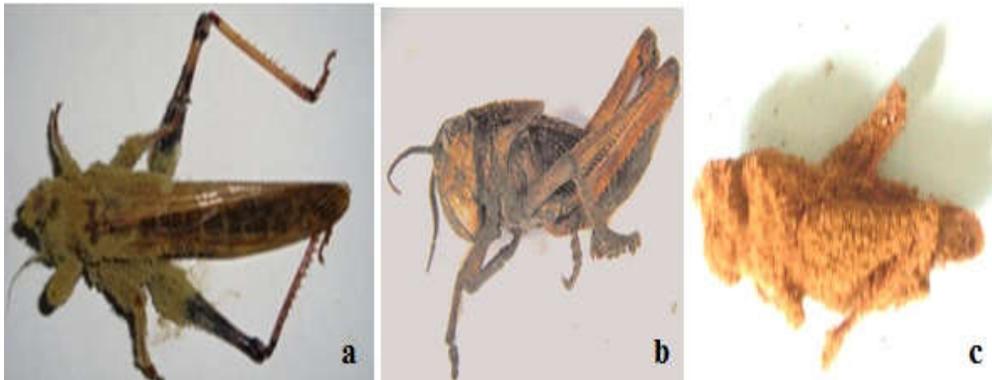


Figure 3 : mode infection *Metarhizium anisopliae var acridum* chez l'hôte (Thomas et Read, 2007).



a :Adulte de *Locusta migratoria* , **b**: Larve L4 de *L.migratoria*. (Bissaad, 2012), **c** : Ailé de *Dociostaurus maroccanus* (Chaouch, 2015).

Figure 4: Images d'acridiens infectés par *Metarhizium anisopliae var.acridum*.

I.2.5.Toxicité et pathogénicité de *Metarhizium anisopliae*

Les premiers tests de toxicité de *M. anisopliae* chez des rats blancs adultes ont été menés par Schaerffenberg, (1968) par injection, inhalation et par ingestion. Ces tests n'ont montré aucune toxicité.

Shadduck et *al.* (1982) ont recherché l'effet pathogène de *Metarhizium* chez des rats, des souris et des cobayes. Il n'y avait aucune preuve d'irritation oculaire ou de germination des spores dans les différents tissus étudiés. *Metarhizium anisopliae* a été retrouvé dans l'estomac, les poumons et la rate après 2 semaines d'exposition des souris à des poussières de spores mais pas à la fin de la 3^e semaine.

El-Kadi et *al.* (1983) ont rapporté des résultats d'innocuité de *Metarhizium anisopliae* chez des cobayes et des souris blanches testé par l'administration orale et application cutanée. Les examens histopathologiques suggèrent le non toxicité de ce champignon chez les animaux expérimenté.

De même, des études histopathologiques de toxicité aiguë et chronique rénales réalisés par Fan et *al.* (1990) et Siegel et Shadduck, (1990) chez des rats, souris et cobayes ont souligné la biosécurité de *M. anisopliae* administrés par différentes voies chez les animaux qui ne présentait aucun signe d'infection ni de maladie.

Dans un autre test, l'administration orale et parentérale de suspensions de spores de *M. anisopliae* à des rats albinos pendant 21 jours ne révèle aucune anomalie de comportement ou de déséquilibres des paramètres sanguins testés (Jevanand et Kannan ,1995).

Metarhizium anisopliae a été considéré ni pathogène ni toxique pour les mammifères (Zimmermann., 2007). Cependant, certains rapports récents démontrent qu'il est capable de causer des infections chez les mammifères, y compris les humains (Anand et *al.*, 2010 ; Goodman et *al.*, 2018).

Quelques infections normales chez les mammifères et les humains ont été rapportés par plusieurs auteurs. Une kératite est signalé chez un homme immunocompétent (Cepero de Garcia et *al* 1997), et deux cas de sinusite (Revankar et *al*, 1999). Un autre cas chez les mammifères a impliqué un chat atteint de rhinite envahissante due aux *M. anisopliae* de (Muir et *al.*, 1998). Quatre cas d'infections oculaires à *M. anisopliae* ont été rapportés par Eguchi et *al.* (2015) chez des humains sains ou qui présentent d'autres pathologies. Des lésions de la peau causées par *M. anisopliae* sont décrites chez un patient adulte atteint par la leucémie aiguë myéloïde (Osorio et *al.*, 2007). Un cas de mycose invasive et disséminée causé par *Metarhizium anisopliae* chez un enfant *immunodéprimée* (Burgner et *al.*, 1998). D'après Goettel et Jaronski (1997), la société Mycotech a observé une toxicité extrême chez la souris après une provocation pulmonaire (intranasale) par un isolat de *M. anisopliae* var. *anisopliae*.

En revanche, la plus part des expériences sur la sécurité de ce champignon chez les animaux étaient négatives et ne présentent pas d'effet nuisible sur la santé (Zimmermann, 2007) considérant *M. anisopliae* comme sûr avec un risque minimal et acceptable pour les vertébrés, l'homme et l'environnement (Goodman et al., 2018 ; Brunner-Mendoza et al., 2019).

I.2. Toxicité rénale

Le rein est le deuxième organe vital ciblé par de nombreuses substances. Cette sensibilité s'explique par sa structure et ses fonctions. Les reins possèdent une surface d'endothélium vasculaire la plus importante de l'organisme et même joue un rôle crucial dans la détoxification de nombreuses substances appelées néphrotoxines. Ces substances peuvent inclure des champignons, des médicaments anticancéreux tels que le cisplatine, des antibiotiques tels que les aminosides et des métaux lourds comme l'uranium (Barnett et Cummings, 2018).

I.2.1. Nature des lésions

Le rein est constitué de nombreux types de cellules organisées dans le néphron, unité fonctionnelle du rein (Figure 5). Tous stimuli induisant la perte de ces cellules peuvent provoquer aussi des lésions et des insuffisances rénaux (Barnett et Cummings, 2018).

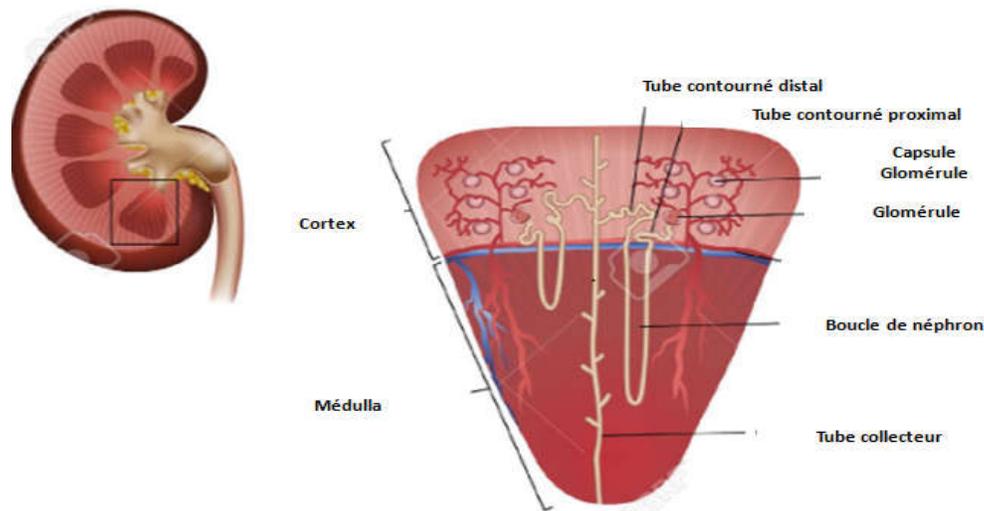


Figure 5 : Anatomie du rein (Atlas de Hill sur l'anatomie clinique vétérinaire, 2017).

Il ya principalement trois types de lésions pouvant conduire à un état d'insuffisance rénale aiguë ou chronique : la nécrose tubulaire aiguë, la néphrite interstitielle et la glomérulonéphrite.

Les tubes distaux et proximaux sont la cible principale des molécules néphrotoxiques (Fontaine, 2012).

a. Nécrose tubulaire aiguë

La nécrose tubulaire aiguë est la cause la plus courante de lésion rénale aiguë qui se manifeste principalement par l'altération ou la destruction des cellules épithéliales des tubes rénaux. Elle peut être due à l'action directe du toxique ou indirect par une ischémie (Bourouhou et *al.*, 2016). Les lésions tubulaires de la nécrose tubulaire aiguë peuvent se manifester histologiquement par un épithélium tubulaire aplati régénératif sans nécrose et par la dégénérescence de cellules isolées ou par une nécrose franche (Fontaine, 2012).

b. Néphrite tubulo-interstitielle

La néphrite tubulo-interstitielle est une lésion primitive des tubules rénaux et de l'interstitium qui induit une réduction de la fonction rénale. La forme aiguë est le plus souvent due à des réactions allergiques aux médicaments ou à des infections. Alors que la forme chronique est associée à un ensemble de causes diverses, dont des maladies génétiques ou métaboliques, l'exposition chronique à des toxines environnementales ou à certains médicaments et plantes (Mathilde et *al.*, 2019).

c. Glomérulonéphrite

La glomérulonéphrite est une inflammation du glomérule et peut être induite à la fois par des néphrotoxiques et des pathologies rénales. Cette maladie néphrotique caractérisée par des niveaux plus élevés de prolifération cellulaire et des changements dans la membrane basale glomérulaire et hématurie et par des taux plus élevés de protéinurie et créatinine. Elle peut altérer l'architecture et la fonction des cellules épithéliales des podocytes du glomérule (Barnett et Cummings, 2018).

1.2.2. Substances néphrotoxiques d'origine biopesticide

Généralement, les pesticides et les biopesticides ont des effets toxiques néfastes sur les reins (Valcke et *al.*, 2017 ; Mossa et *al.*, 2018).

✓ Avermectines

L'étude de la toxicité subaiguë du biopesticide avermectine a été réalisée chez des rats adultes. Les groupes traités recevaient 2,13 mg/jour d'ivermectine par voie orale pendant 28 jours. Ce biopesticide a provoqué une baisse significative ($p < 0,05$) des poids absolu et relatif des reins, ainsi qu'une augmentation significative de la concentration plasmatique en créatinine et en acide urique. L'analyse des coupes histologiques des reins des rats traités par ce produit montre une structure rénale altérée avec dégénérescence au sein des glomérules et des tubes urinifères, une congestion et une hémorragie intra-glomérulaires (Khaldoun et al., 2015).

✓ Bactérie entomopathogène *Bacillus thuringiensis*

Les travaux de Lemos et al. (2013) ont rapporté que la toxine de *Bacillus thuringiensis* induit une nécrose, une dégénérescence des tubules et glomérulonéphrite proliférant dans les reins de rates gavées avec une dose de 370 mg /100 g quotidiennement pendant 21 jour (Moussa, 2018).

✓ Pyréthrines

Le parenchyme rénal des rats traités avec des pyréthrinés à raison de 170 mg/ kg/ j pendant une période de 3 mois a révélé des dommages au niveau des reins. De nombreuses altérations sont notées avec dégénérescence dans les tubes rénaux (Moussa et al., 2018).

✓ Spinosad

L'effet toxique du spinosad à raison 35 et 350 mg /kg sur certains paramètres biochimiques et histologiques du rein de souris mâles a été évalué. Une augmentation significative de la concentration en urée dans le sérum est noté chez des souris mâles a reçu 350 mg / kg de spinosad. Au niveau histologique, une dégénérescence cytoplasmique et une nécrose des cellules rénales a été observé (Moussa et al., 2018).

I.2.3. Marqueurs de la Toxicité rénale

Les marqueurs biologiques de la toxicité rénale peuvent être en rapport avec l'étiologie de l'insuffisance rénale et avec les lésions cellulaires et leur réparation. Les lésions induites par des substances toxiques peuvent se produire au niveau des cellules du glomérule, de l'interstitium ou des tubules avec une libération de marqueurs correspondant au niveau

lésé. Selon le type d'affection rénale, il ya des biomarqueurs également sont perturbées comme le taux plasmatique de l'urée de la créatinine, le volume urinaire et même le a1-microglobuline et b2microglobuline etc... (Zaoui et Bouleghlimat, 2015).

Dans le cadre de l'étude de la biosécurité d'un champignon entomopathogène, *Metarhizium anisopliae* var. *acidum*, notre travail a pour objectif la recherche quelques aspects de la toxicité orale subaigüe des spores chez des souris femelles adultes de souche N.M.R.I. Cette toxicité est évaluée sous deux formes, à savoir la forme germinative des conidies et la forme conditionnée en matière active du biopesticide Novacrid®. L'évaluation est basée sur la recherche des effets des deux traitements sur le poids corporel et sur les teneurs plasmatiques en urée et en créatinine ainsi que sur la structure du parenchyme rénal.

L'expérimentation animale est réalisée au niveau de la station expérimentale de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie à l'Université Blida 1. Les dosages sanguins sont effectués au laboratoire des analyses médicales à Boufarik. Alors que l'étude histologique est réalisée au niveau de laboratoire de cytologie au Centre Hospitalo-universitaire de N'FFISSA HAMOUD à Hussein Day, Alger. Notre travail a duré 8 mois de novembre au juin 2019.

II.1. MATERIEL

II.1.1. Animaux

Notre étude est portée sur 12 souris de souche N.M.R.I provenant de l'institut Pasteur-Alger. Les animaux sont répartis dans des cages en plastique équipées d'une couche de sciure et de biberons. La sciure est renouvelée chaque deux jours afin d'entretenir les conditions d'hygiène appropriées. L'eau et la nourriture sont administrées *ad libitum*. L'alimentation standard est sous forme de croquets, composée d'un concentré équilibré en protéines, glucides, lipides, vitamines et sels minéraux (Tableau I, Annexe 1).

Les souris de poids corporel moyenne 25,26g sont soumises à des conditions de température et d'éclairage contrôlées (de 25 à 30°C avec un cycle de 12h de lumière / 12h obscurité).

II.1.2. Champignon entomopathogène

La souche fongique utilisée est *Metarhizium anisopliae* var. *acidum* (*Ascomycota* : *Hypocreales* : *Clavicipitaceae*) (souche EVCH077). Les conidies de cette souche sont développées en un biopesticide entomopathogène dont le nom commercial est NOVACRID®. Ce produit est sous forme de poudre fine de spores de couleur vert militaire sans odeur

particulière. Le biopesticide appartient à la gamme NOVAPROTECT, fabriquée par la société Eléphant Vert au Maroc et est conditionné dans des sachets de 1kg (contenant au minimum 5×10^{10} conidies /g). Le biopesticide est fourni par l'institut National de Protection des Végétaux (INPV) d'El-Harrach. Il est conservé à 4°C.

II.1.3. Matériel non biologique

Le matériel utilisé au cours de notre expérimentation comporte les équipements, les appareillages, la verrerie, les produits chimiques, les milieux de culture et les réactifs (Annexe1).

II.2. METHODES

II.2.1. Préparation des formulations de traitement

L'inoculation orale des souris avec *Metarhizium anisopliae* est réalisée sous les mêmes conditions expérimentales avec les deux formulations aqueuses titrées à la concentration $1,4 \times 10^8$ spores /ml.

- La première est à base de spores de *Metarhizium acridum* nouvellement germés après mise en culture.
- La deuxième formulation, à base des spores de la même souche, constitue la matière active de Novacrid.

II.2.1.1. Préparation de la formulation à base de spores nouvellement germés (traitées 1)

Les manipulations sont réalisées selon les méthodes décrites par Chaouch (2015) et Arkam (2019).

➤ Culture de *Metarhizium anisopliae*

Pour la production des spores de *M. anisopliae*, nous avons utilisé le milieu PDA (Potatos Dexton Agar) (Annexe 1), stérilisé par une autoclavage réglée à 120°C. Les boîtes de Pétri, remplies à moitié, sont refroidies devant un bec de benzène jusqu'à ce que le milieu de culture soit solidifier et le couvercle de la boîte devient sec. Les boîtes sont ensuite fermées hermétiquement et gardées dans une étuve à 28°C préalablement stérilisée (Annexe 1).

Pour l'ensemencement du champignon, nous avons préparé une solution mère à base de spores de *M. anisopliae* extraites du biopesticide Novacrid.

Comme les spores fongiques sont plus miscibles dans les formulations huileuses qu'aqueuses, nous avons utilisé de l'huile de tournesol comme solvant organique naturel. Ainsi, 0,9 g de la poudre de spores est diluée dans 20 ml de l'huile. La formulation huileuse obtenue est agitée manuellement pendant 10 minutes pour mieux désagréger les spores.

Dans une étape suivante, nous avons ensemencé quelques gouttes de la suspension par la méthode de stries sur l'ensemble du milieu de culture PDA. Les boîtes sont étiquetées et sont fermées hermétiquement par le parafilm. L'incubation des cultures est maintenue dans une étuve réglée à 28 °C. Au bout de trois jours, le champignon commence à proliférer. La fructification des spores est plus importante à partir de la deuxième semaine d'incubation.

➤ Multiplication et purification de *M. anisopliae*

La purification de la souche nécessite le repiquage successif des colonies pures sur des milieux de culture vierges suivis par l'incubation à 25°C. L'identification de la souche *Metarhizium acridum* est confirmée par l'observation macroscopique des cultures et par l'observation microscopique sur lame. Ces opérations sont répétées jusqu'à l'obtention en masses de cultures pures. Toutes les manipulations sont faites sous des conditions aussi stériles que possible à fin d'éviter toutes contaminations.

➤ Récupération et quantification des spores produites

À partir des cultures âgées de 15 à 20 jours ayant bien sporulées, nous avons gratté le contenu des boîtes de pétri avec une spatule stérile devant le bec Benzène. La méthode consiste à introduire l'ensemble des spores de chaque culture dans un flacon contenant 50 ml d'eau physiologique stérile. La solution mère est agitée pendant 10 à 15 minutes pour disperser les spores superposées.

A fin de faciliter le comptage des spores, nous avons préparé des dilutions. Ainsi, nous avons prélevé 1ml de la solution mère et 3ml d'eau physiologie stérile (dilution 1/4). Les volumes prélevés sont mis dans un tube à essai et agités pendant 10 à 15 minutes. Nous avons procédé au comptage des spores produits à l'aide de la cellule de Mallassez (Annexe 1) en utilisant le microscope optique aux différents grossissements (x40 et x100).

Pour le dénombrement de spores, trois prélèvements sont effectués à partir de la solution mère et trois répétitions sont faites pour chaque prélèvement. Nous avons par la suite calculé la moyenne de ces répétitions.

Pour le calcul de la concentration en spores, nous avons utilisé la formule décrite et utilisée par Chaouch et *al.* (2009 ; 2015).

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

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

$$C \text{ (spores/ml)} = (10^6 \times \text{Nombre de spores}) / 100$$

La solution mère est concentrée à **1,4 X 10⁸ spores/ml (D)**.

II.2.1.2. formulation à base de spores conditionnées en biopesticide (traitées 2)

La recherche du poids des spores (g) à prélever du produit pour l'obtention de D1 (D= 1,4 X 10⁸ spores/ml) sachant que 1g de Novacrid contient environ 5 × 10¹⁰ spores.

$$1000 \text{ mg} \longrightarrow 5 \times 10^{10} \text{ spores}$$

$$\text{D1 (mg)} \longrightarrow 1,4 \times 10^8 \text{ spores/ml}$$

$$\text{D1 (mg)} = \frac{1,4 \times 10^8 \times 1000}{5 \times 10^{10}} = 2,8 \text{ mg.}$$

Le poids correspondant à 1,4 × 10⁸ spores est calculé à 2,8 mg de la matière active de Novacrid®.

Nous avons préparé la solution de traitement avec le biopesticide (titrée à la concentration 1,4 × 10⁸ spores/ml) comme suit : avec une spatule stérile, nous avons prélevé 2,8 mg de la poudre sèche de spores. Après la pesée, les spores sont introduites dans un flacon stérile contenant 10 ml d'eau physiologique stérile. La formulation ainsi préparée est agitée pendant 10 à 15 minutes pour bien désagréger les spores.

II.2. METHODES

II.2.1. Expérimentation

II.2.2.1. Inoculation des souris

Les souris sont réparties en trois groupes de quatre individus chacun avec un poids corporel moyenne de 25,26g. Après la mise à jeun la veille du chaque test, les souris sont

inoculées par voie orale trois fois avec un intervalle de 6 jours entre chaque traitement. Chaque inoculum est préparé juste avant traitement.

- Le premier groupe comporte les souris témoins qui sont gavées, sous les mêmes conditions, avec 1ml d'eau physiologie stérile.
- Le deuxième groupe : les individus sont gavés avec 1 ml de la formulation à base des spores de *Metarhizium anisopliae* produites après la mise en culture à raison de $1,4 \times 10^8$ spores /ml.
- Le troisième groupe : les individus sont gavés avec 1 ml de la formulation à base des spores prélevées directement du biopesticide Novacrid® à raison de $1,4 \times 10^8$ spores/ml.

II.2.2.2. Suivi des souris

A fin de suivre l'évolution du poids corporel, les souris témoins et traitées sont pesées chaque trois jours à compter du premier jour de l'expérimentation. Les dernières pesées sont faites le jour du sacrifice.

Durant l'expérimentation, les souris sont minutieusement observés à fin de suivre leur comportement et de rechercher les symptômes cliniques avant et après chaque gavage. De manière à déceler toutes les manifestations éventuelles de toxicité ou d'allergie consécutive à l'accumulation des spores de *Metarhizium acridum* dans l'organisme de ces rongeurs.

II.2.2. Sacrifice des animaux et prélèvement des échantillons

Après 14 jours d'expérimentation, les animaux sont sacrifiés par décapitation rapide. Le sang est récupéré dans des tubes héparinés est destiné à la réalisation de le dosage de l'urée et de la créatinine.

La dissection des souris a permis de prélever les reins qui sont soigneusement débarrassés du tissu adipeux adhérent sur un lit de glace. Les reins sont rapidement pesés, coupés longitudinalement en deux fragments, placés dans des cassettes étiquetées et immergés dans le formol à 10% pour les fixés.

II.2.3. Etude histopathologique

L'étude histologique est réalisée selon les étapes décrites par Martoja et Martoja-Pierson (1967 ; modifié).

II.2.3.1. Fixation et rinçage

Le but de la fixation est de conserver les tissus dans un état proche de l'état naturel à fin d'empêcher l'autolyse cellulaire. Après heures de fixation dans le formol, les reins sont rincés à l'eau courante pendant 24 heures.

II.2.3.2. Déshydratation, éclaircissement et imprégnation

Ces deux étapes sont effectuées dans un automate composé de plusieurs bacs. La déshydratation est réalisée dans des bains d'alcool éthylique de degrés croissants (70°, 95° et 100°). L'éclaircissement est effectué dans trois bains de xylène. L'imprégnation est faite dans le xylène.

II.2.3.3. Inclusion et mise en bloc

L'inclusion est réalisée dans des moules de la paraffine pure. Les blocs obtenus sont refroidis rapidement sur une plaque métallique réfrigérée pendant environ 15 minutes.

II.2.3.4. Confection des coupes et collage

Les blocs obtenus sont coupés au microtome « types Leica » avec une épaisseur de 3µm. Les rubans des coupes sont ensuite étalées dans un bain d'eau thermo statée (37°C) puis récupérés et collés sur les lames gélatinées. Les lames sont ensuite séchées dans une étuve à 40 pendant 25 minutes.

II.2.3.5. Déparaffinage et réhydratation

Le déparaffinage est réalisé dans quatre bains de xylène pendant deux minutes chacun. Les coupes sont réhydratées dans quatre bains d'éthanol décroissant : 100° ; 95° ; 90° ; 70° pendant deux minutes chacun.

II.2.3.6. Coloration

Le but de la coloration est de visualiser et de différencier certains composants tissulaires et cellulaires. Dans notre étude, nous avons appliqué deux types de coloration :

- Coloration d'hématoxyline-Eosine

C'est une coloration topographique qui permet de visualiser la morphologie des cellules (noyau bleu et cytoplasme rose violacé) afin de déterminer leur répartition, architecture et structure.

- Coloration Trichrome de Masson

C'est une coloration spécifique. Elle est utilisée pour mettre en évidence les éléments du tissu de soutien, en particulier le collagène ainsi les altérations tissulaires tel que les fibres et les inclusions. Les étapes de colorations sont présentées dans l'annexe 1.

II.2.3.7. Montage et observation

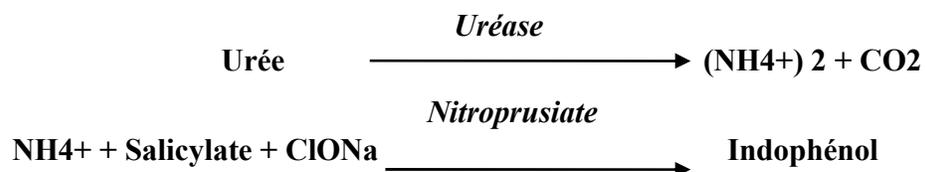
Une lamelle est fixée à l'aide d'un Eukitt sur chaque coupe. Les lames sont séchées et nettoyées par le xylène. L'observation microscopique est réalisée à l'aide d'un microscope photonique «Leica » aux différents grossissements : x40, x100 et x400. La prise des photos est effectuée à l'aide d'un appareil photos numérique.

II.2.4. Détermination des teneurs plasmatiques de l'urée et de la créatinine

II.2.4.1. Urée plasmatique

- Principe

La méthode utilisée est une méthode enzymatique et colorimétrique basée sur l'action spécifique de l'urée ase qui hydrolyse l'urée en ions ammonium et carbonate. Les ions ammonium réagis avec le salicylate et l'hypochlorite, en présence du catalyseur nitroprusiade pour former un indophénol vert. L'intensité de la couleur formée est proportionnelle à la concentration de l'urée dans l'échantillon (Tabacco et *al.*, 1979).



- Mode opératoire

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

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

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

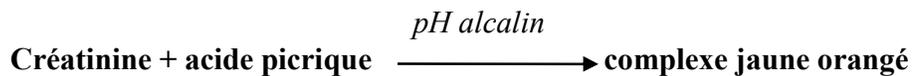
- Lecture

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

II.2.4.2. Créatinine plasmatique

- Principe

C'est une réaction colorimétrique cinétique avec l'acide picrique en milieu alcalin dont la cinétique de développement est mesurée à 490nm (490-510). La créatinine réagit avec l'acide picrique en milieu alcalin (NaOH) pour donner un complexe rouge orangé dont la vitesse de formation de la coloration est proportionnelle à la concentration de la créatinine dans l'échantillon (Bartels et Bohmer, 1971).



- Mode opératoire

La solution de travail est obtenue par un mélange à volume égal des réactifs R1 et R2. Le mélange reste stable pendant 10 jours à la température de laboratoire (entre 15°C et 32 °C). Nous préparons les réactifs de travail R1 et R2 (Tableau 5 de l'annexe 1).

Nous pipetons dans des tubes à essai :

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

- Lecture

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

II.2.5. Etude statistique

Les résultats obtenus sont présentés sous forme de moyennes \pm écart type (annexe 1). La normalité de la distribution des échantillons est vérifiée par un test de Shapiro-Wilk (Statistic Package for the Social Science) via le logiciel statistique S.P.S.S. Version 23. Les comparaisons intra et inter groupes sont effectuées par un test t de student.

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

III.1. RESULTATS

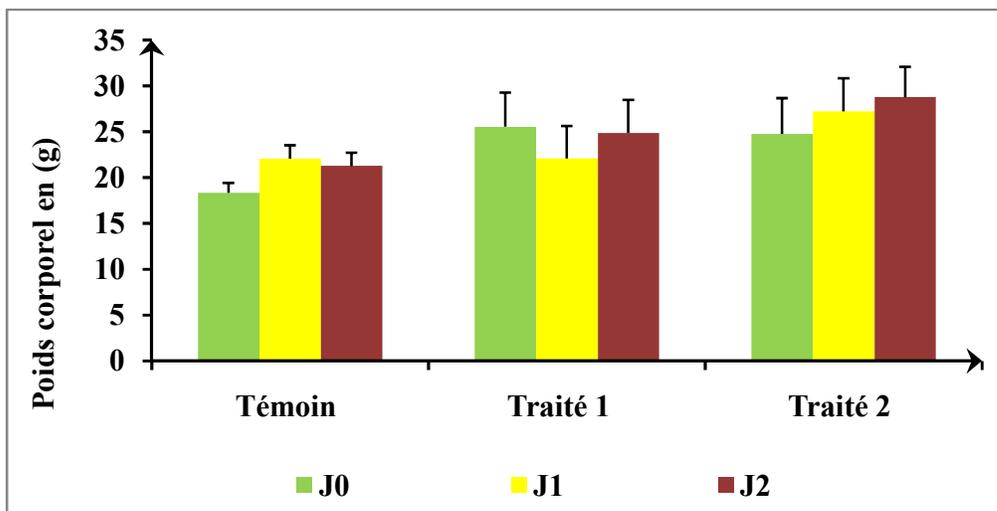
Notre travail porte sur l'étude du comportement des souris femelles adultes de souche N.M.R.I., l'évolution de leur poids corporel, les teneurs plasmatiques en urée et en créatinine et sur la structure du parenchyme rénal.

III.1.1. Comportement des souris

Durant l'expérimentation, toutes les souris ont gardé leur comportement habituel et leur consommation en alimentation.

III.1.2. Evolution pondérale

Les résultats des variations des poids corporels des souris femelles témoins et traitées et leurs significations statistiques sont présentés dans la figure 6. Le détail des résultats est mentionné dans les tableaux VII, VIII, IX, X, XIV de l'annexe 2.



Traité 1 : lot de souris inoculées avec la formulation germinative de spores ; **Traité 2** : lot de souris inoculées avec la formulation conditionnée (NOVACRID®) ; **J0** : Début de l'expérimentation ; **J1** : au cours de l'expérimentation ; **J2** : fin de l'expérimentation.

Figure 6 : Evolution du poids corporel (g) des souris femelles témoins et traitées par deux formulations, germinative et conditionnée de *Metarhizium acridum*.

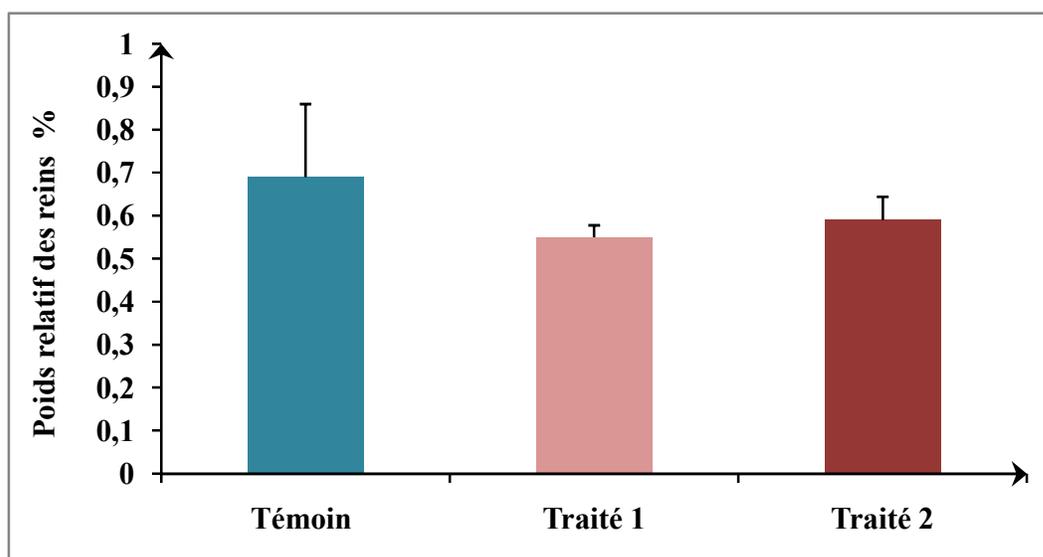
D'après les résultats obtenus, toutes les souris témoins ont gagné du poids de l'ordre de 20,16 % au cours de la première semaine de l'expérimentation ($18,35 \pm 1,06$ vs $22,05 \pm 1,48$) qui

est statistiquement significatif ($P = 0,003$). Ce poids est maintenu au cours de la deuxième semaine avec 3,53 % ($18,35 \pm 1,06$ vs $21,27 \pm 1,45$; avec un $P = 0,008$).

Les souris traitées avec les deux formulations de *Metarhizium acridum* ont préservé leurs poids corporels. Les changements sont statistiquement non significatifs. Avec la formule germinative, la moyenne calculée est de $25,55 \pm 3,74$ vs $22,10 \pm 3,53$; avec un $P = 0,114$ au cours de la 1^{ère} semaine et de $25,55 \pm 3,74$ vs $24,5 \pm 1,97$; avec un $P = 0,370$ durant la 2^{ème} semaine. Avec la formule conditionnée de spores, la moyenne est de $24,77 \pm 3,90$ vs $27,22 \pm 3,62$; avec un $P = 0,196$ pendant la 1^{ère} semaine et de l'ordre de $24,77 \pm 3,90$ vs $28,77 \pm 3,31$; avec un $P = 0,084$ pendant la 2^{ème} semaine.

III.1.3. Effet des traitements sur les poids absolu et relatif des reins

Les résultats relatifs aux variations des poids absolus et relatifs des reins avec leurs significations statistiques sont présentés dans la figure 7. Le détail des résultats est reporté dans les tableaux XI, XII, XIII, XV de l'annexe2.



Traité 1 : lot de souris inoculées par la formulation germinative de spores.

Traité 2 : lot de souris inoculées par la formulation conditionnée (NOVACRID®).

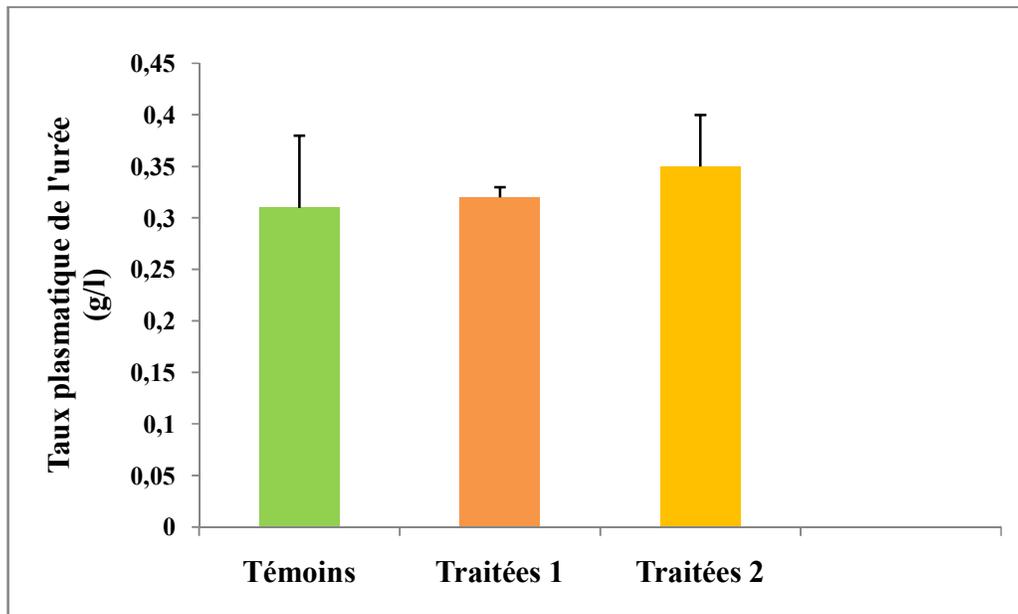
Figure 7: Variations du poids relatif des reins chez les souris témoins et traitées par les deux formulations, germinative et conditionnée de *Metarhizium acridum*.

D'après la figure ci-dessus, les poids relatifs des reins montre, en comparaison avec le témoin ($0,69 \pm 0,17$) de légères diminutions jugées statistiquement non significatives chez les individus traités par la formulation germinative ($0,55 \pm 0,028$) avec $p = 0,10$ et chez les individus traités par la formulation conditionnée de *Metarhizium acridum* ($0,59 \pm 0,054$) avec un $p = 0,12$).

III.1.4. Dosage biochimique

III.1.4.1. Urémie

Les résultats des variations de l'urémie chez les souris femelles témoins et traitées et leurs significations statistiques sont rassemblés dans la figure 8 et les tableaux *XVI, XVI I, XVIII, XIX, XX* de l'annexe2.



Traité 1 : lot de souris inoculées par la formulation germinative des spores.

Traité 2 : lot de souris inoculées par la formulation conditionnée (NOVACRID®).

Figure 8: Effet de *Metarhizium acridum* sur le taux plasmatique de l'urée (g/l) chez des souris femelles adultes.

Le dosage de l'urémie chez les souris traitées par la formulation germinative des spores de *Metarhizium* montre une faible augmentation qui est de $0,32\text{g/l} \pm 0,01$ ($P = 0,41$) par rapport aux témoins ($0,31\text{ g/l} \pm 0,07$). De même, chez les souris traitées par la formulation commercialisée des spores, le taux plasmatique de l'urée révèle une faible augmentation de l'ordre de $0,35\text{ g/l} \pm 0,05$ ($P = 0,21$). Ces variations restent statistiquement non significatives ($p > 0,05$).

III.1.4.2. Créatinémie

Les résultats des variations de la créatinémie chez les souris femelles témoins et traitées et leurs significations statistiques sont rassemblés dans la figure 9 et les tableaux *XVI, XVII, XVIII, XIX, XX* de l'annexe 2.



Traité 1 : lot de souris inoculées par la formulation germinative des spores.

Traité 2 : lot de souris inoculées par la formulation conditionnée (NOVACRID®).

Figure 9: Effet de *Metarhizium anisopliae* sur le taux plasmatique de la créatinine (mg/l) chez des souris femelles adultes.

En comparaison avec la créatinémie enregistrée chez les souris témoins ($0,7 \text{ mg/l} \pm 0,52$), le taux plasmatique de ce paramètre noté chez le groupe traité par la formulation germinative montre une augmentation statistiquement non significative ($1 \text{ mg/l} \pm 0,14$ avec $P = 0,21$). Chez les souris traitées par la formulation conditionnée Novacrid®, la créatinémie montre une augmentation statistiquement non significative ($1,02 \text{ mg/l} \pm 0$ avec $P = 0,09$).

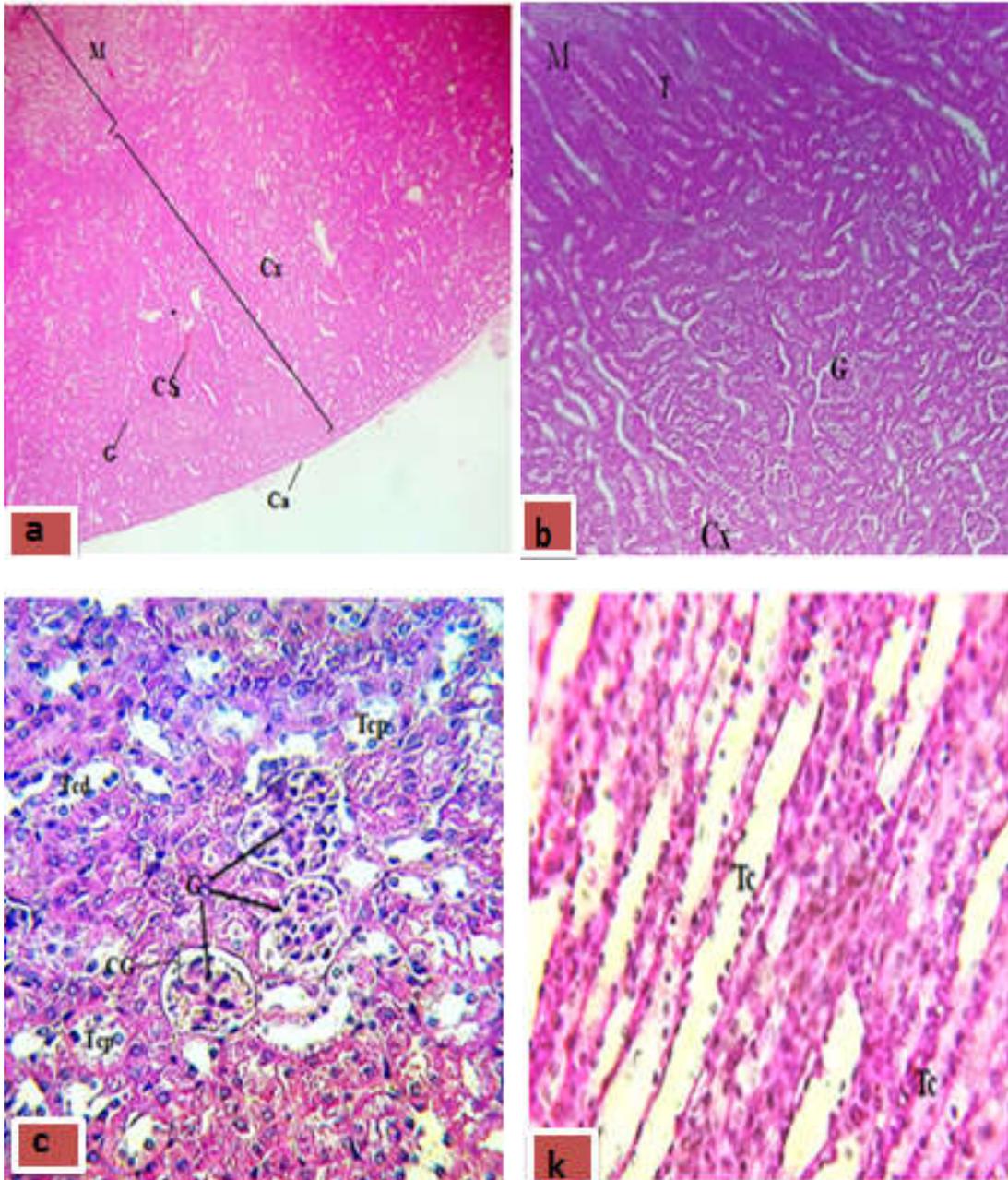
III.1.5. Etude histo-pathologique du parenchyme rénale

➤ Chez les souris témoins

La microscopie optique du parenchyme rénal des souris témoins révèle une architecture rénal normale avec une fine capsule conjonctive externe au-dessus d'un cortex dense et une médullaire centrale plus claire (Figure 10 a et b).

Le cortex rénal est composé de plusieurs formes glomérulaires et tubulaires (Figure 10 a, b et c). Les glomérules rénaux sont reconnaissables par leur forme dense et arrondi. Ils sont inclus dans une chambre glomérulaire et entourés par des coupes transversales de tubes contournés proximaux et de tubes contournés distaux. Les tubes contournés proximaux sont plus denses et plus nombreux que les distaux (Figure 10 c).

La médulla présente une structure tubulaire nette. Les principaux tubules observés sont les tubes collecteurs qui sont reconnaissables par leurs cellules cubiques et leur diamètre important. Les vaisseaux droits se trouvent entre les différentes structures tubulaires et sont identifiables grâce à la présence du sang dans leur lumière (Figure 10 d).



Ca : capsule ; CG : chambre glomérulaire ; Cx : cortex ; G : glomérule ; M : médullaire ; T : tubule ; Tc : tube collecteur ; Tcd : tube contourné distal ; Tcg : tube contourné proximal ; Ca : Capillaire; sanguin.

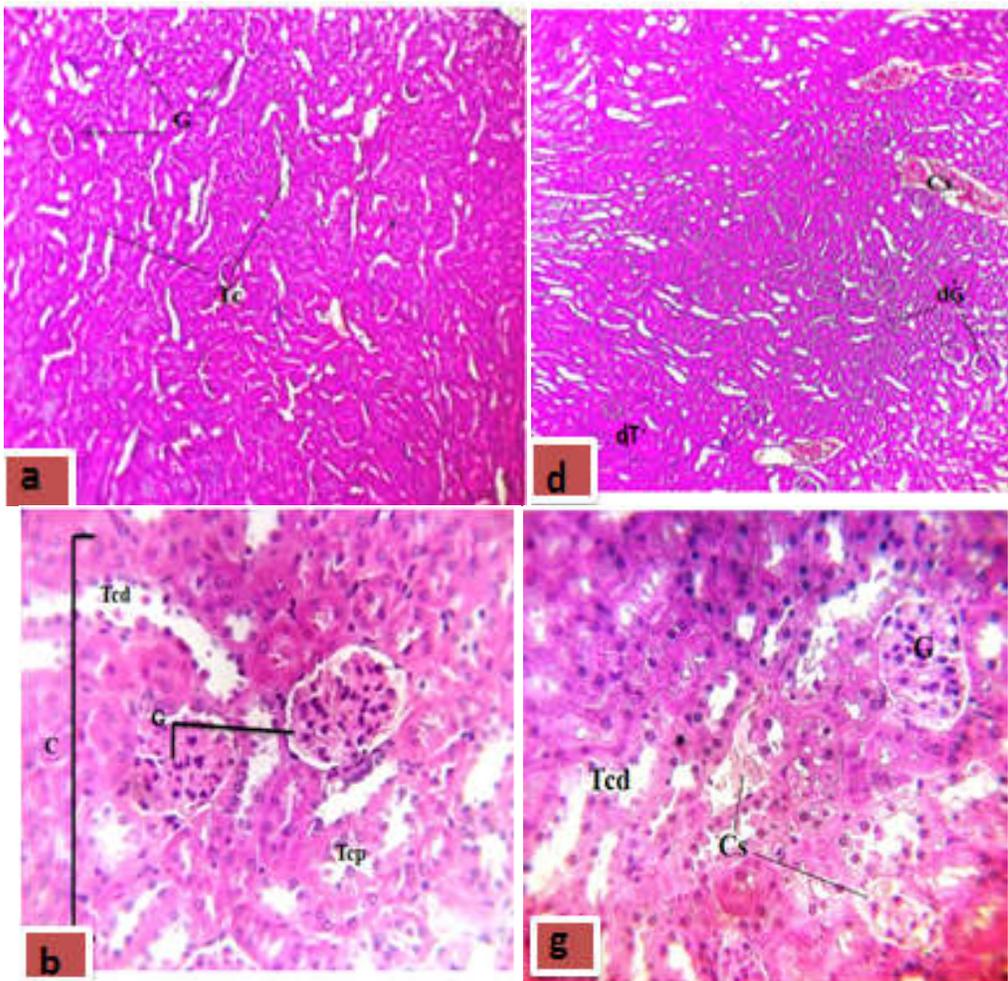
Figure 10 : Structure du parenchyme rénal chez les souris femelles témoins.

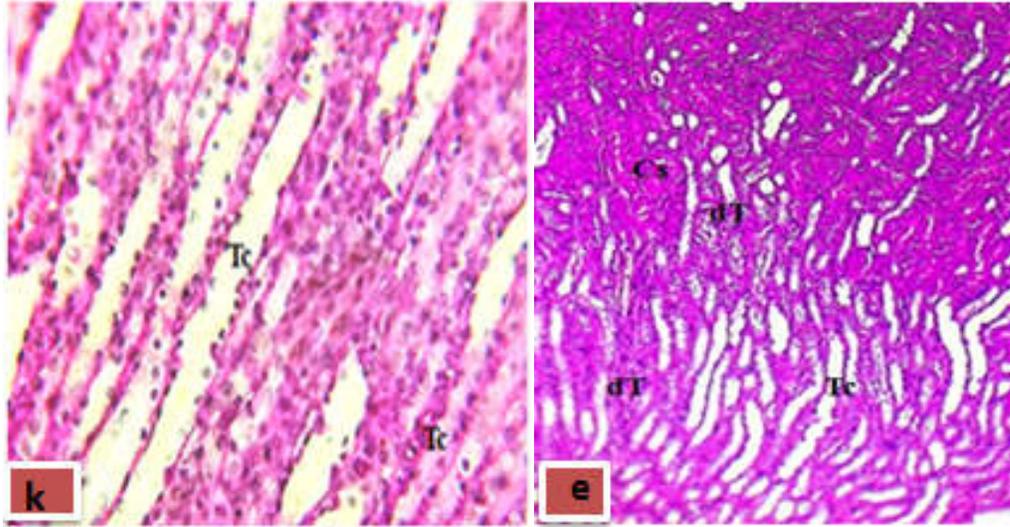
a : Vue d'ensemble ; b, c : partie du cortex rénal ; d : partie de la médulla.
Coloration : HE ; Grossissements : x 40 (a), x 100 (b), x 400 (c et d).

➤ Chez les souris traitées par les spores germées de *M. anisopliae*

En comparaison avec le témoin (Figure 11 a, b et k) le parenchyme rénal chez les souris traitées avec des spores germées à raison de $1,4 \times 10^8$ spores /ml /individu présente une structure générale normale avec quelques désorganisations de l'architecture tissulaire au niveau cortical et médullaire, dont le degré vari d'un animal à l'autre. Ces altérations sont illustrées comme suit :

- Des congestions sanguines, des débuts de nécrose (Figure 11 d, e et g).
- Dégénérescence de l'épithélium tubulaire et glomérulaire (**Figure 11 d, e**).
- La dilatation des capillaires interstitiels et inter-tubulaires au niveau de médulla (figure 11 e).





G : glomérule rénal ; C : cortex ; Tcd : tube contourné distal ; Tcp : tube contourné proximal ; dC : dilatation des capillaires ; TC : tube collecteur ; aG : atrophie glomérulaire ; dT : dégénérescence tubulaire ; dG : dégénérescence glomérulaire ; CS : congestion sanguine.

Figure 11: Structure du parenchyme rénal chez les souris femelles traitées par la formulation à base de spores germées de *M. anisopliae* var. *acridum*.

Coloration: HE.

Grossissements : x 100 (a, d), x 400 (b, g, d et e).

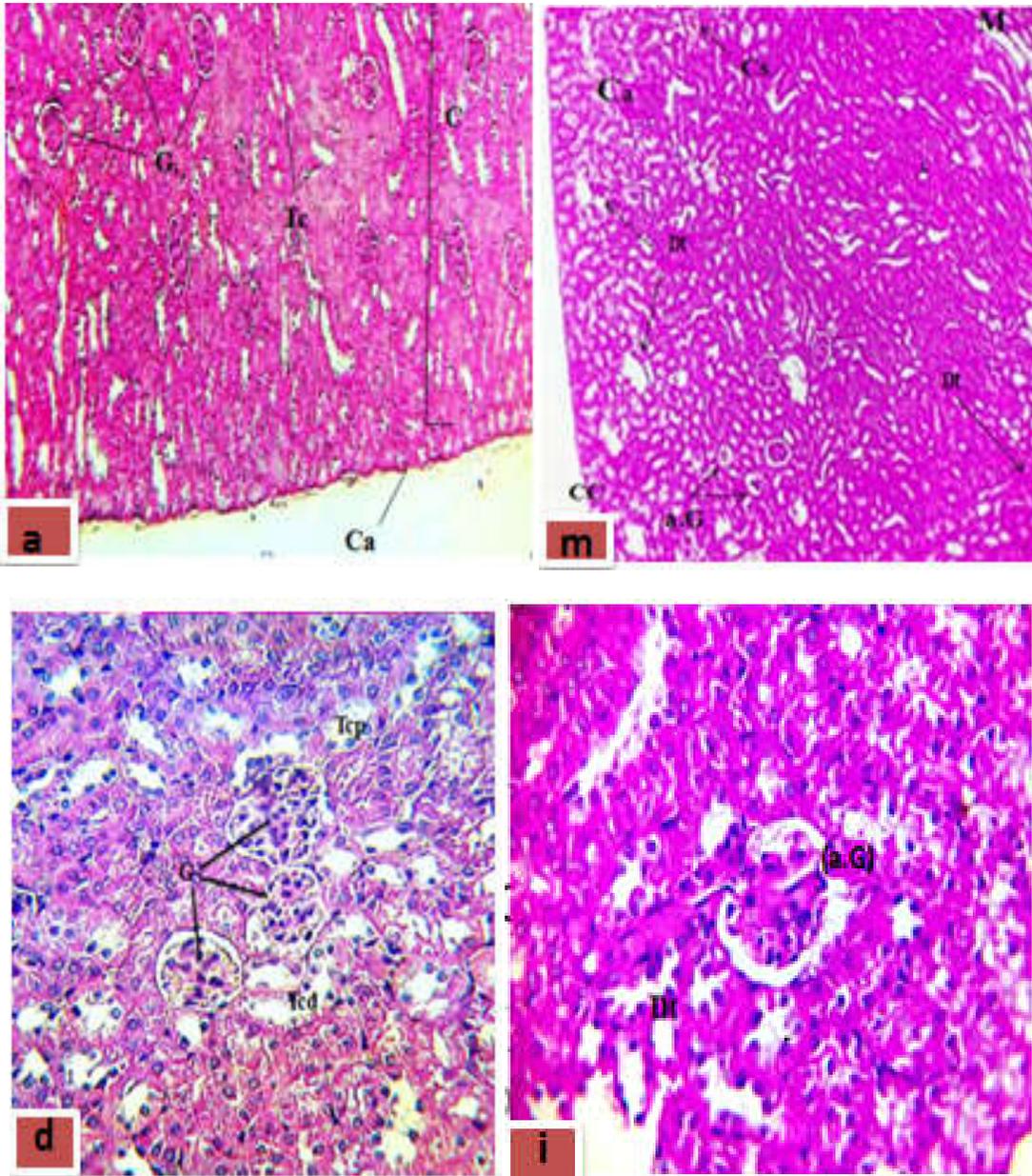
➤ Chez les souris traitées par les spores conditionnées de *M. anisopliae*

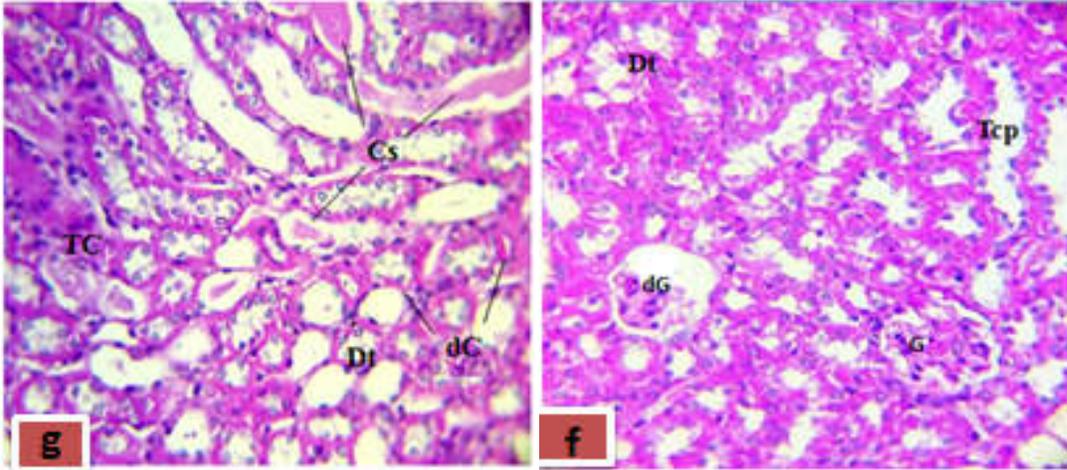
Nous avons étudié la structure du parenchyme rénale chez les souris traitées par les spores de *M. anisopliae* var. *acridum*, prélevées directement à partir de Novacrid®, à raison de $1,4 \times 10^8$ spores /ml /individu.

L'observation au microscope photonique du tissu rénal provenant des souris traitées montre une structure conservée comme à celle observée chez les individus témoins (Figure 12 a, d et c) et un aspect cyto-architecturale comparable à celui observé sur les coupes rénales provenant des souris traités avec la formulation de spores germées. Les principales altérations tissulaires sont illustrées comme suit :

- Les dégénérescences des tubes contournés proximaux et des tubes contournés distales (figure 12 m, i, f et g).
- La dégénérescence et l'atrophie et de quelques glomérules qui montrent une chambre glomérulaire plus large (figure 12 m, i, f et g).
- Des congestions sanguines modérées à proximité des tubules endommagés (figure 12 m et g).

- La dilatation des capillaires glomérulaires et inter-tubulaires avec infiltration cellulaire (figure 12 g et h).
- Une dégénérescence de l'épithélium des tubules médullaires marquée par la présence de signe de nécrose (figure 12 h).





G : glomérule rénal ; C : cortex ; M: médullaire ; Ted : tube contourné distal ; Tcp : tube contourné proximal ; Vs : vaisseau sanguin, Dc : dilatation des capillaires ; TC : tube collecteur ; a.G : atrophie glomérulaire ; Dt : dégénérescence tubulaire; dG : dégénérescence chambre glomérulaire ; CS : congestion sanguine.

Figure 12: Structure du parenchyme rénal chez les souris femelles traitées par la formulation à base de spores conditionnées de *M. anisopliae* Acridum.

Coloration: HE (a, m, d, f, et g) et Trichrome de Masson (c et h).

Grossissements : x 100 (a et m) et x 400 (c, d, f, g et h).

III.2. DISCUSSION

Notre étude vise la recherche d'éventuels indices de la toxicité rénale subaiguë de deux formulations de *Metarhizium anisopliae* var *acridum* (souche EVCH077) chez les souris femelles adultes de souche N.M.R.I. à savoir la formulation à base des spores de Novacrid® (FN) et la formulation à base des spores germées (FG). L'inoculation des souris est réalisée trois fois par voie orale à raison de $1,4 \times 10^8$ spores/ml /individu.

Durant notre expérimentation, nous n'avons remarqué aucun changement de comportement chez les souris traitées. Les mêmes observations sont notées par Arkam, (2019) suite aux traitements des rates Wistar avec le biopesticide Green muscle (*M. anisopliae* var *acridum*, souche IMI 330189) par voie orale pendant 30 jour à raison 200 mg /Kg /jr ou 10^{10} spores /kg, 20 mg /kg /jr ou 10^9 spores /kg et 10 mg /kg /jr ou 5×10^8 spores /kg.

La croissance des souris témoins est normale au cours de la première semaine d'expérimentation. Pendant la deuxième semaine, les souris commencent à perdre du poids. Cette perte statistiquement non significative est probablement due au stress du gavage et aux conditions d'élevage. Les souris ayant reçu $1,4 \times 10^8$ spores /ml de FN présentent une augmentation non significative du poids corporel au cours de l'expérimentation. Alors que les souris traitées par $1,4 \times 10^8$ spores /ml de FG, ont montré une diminution non significative du poids corporel pendant la première semaine. Cette diminution peut être due à l'effet des spores du champignon entomopathogène sur le tractus gastro-intestinal, à une mauvaise absorption des aliments ou à la perte de l'appétit. Cette dernière est considérée comme un signe de toxicité et de détérioration de l'état général de santé des souris. Durant la 2^{ème} semaine, les changements en poids restent statistiquement non significatifs.

Les travaux de Arkam, (2019) rapportent que les formulations huileuses à base des spores de *M. anisopliae* conditionnées en biopesticide Green muscle n'ont pas d'effet sur la croissance pondérale des rats femelles traitées par rapport aux rats témoins. Les mêmes résultats sont rapportés par plusieurs auteurs qui ont étudié l'activité toxique de différents champignons entomopathogènes vis-à-vis des cobayes. Dans ce contexte, nous citons les travaux de Toriello et al. (2006), suite à l'administration orale unique de *M. anisopliae* var. *anisopliae* chez des souris CD-1 mâles et femelles traitées par 10^8 spores /ml de souche virulente (EH-479/2) pendant 21 jours. Les mêmes résultats sont trouvés par Hadj Rabia, (2014), lors de l'étude de la toxicité orale aigue de deux champignons entomopathogènes, *B. bassina* et *M. anisopliae* var. *acridum* chez les rats Wistar. De même, Raizada et al. (2001) ont montré qu'un traitement

chronique par voie orale chez des rats mâles et femelles à raison de 500, 1000 et 1500 mg / kg / jour du biopesticide l'azadirachtine, n'affecte pas le poids corporel des rats expérimentés.

En comparaison avec le lot témoin, le suivi des poids relatifs des reins montre une légère diminution non significative chez les lots traités avec les deux formulations de *M. anisopliae* var *acidum*. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par Arkam (2019). Khaldoun-Oularbi et *al.* (2015) ont constaté que l'administration de 2,13 mg/jour du biopesticide abamectine chez des rats pendant 28 jours cause une diminution significative des poids absolus et relatifs des reins. Ceci s'explique par les changements histopathologiques observés au niveau du tissu rénal.

L'exploitation de la fonction rénale par le dosage de quelques paramètres biochimiques. Les résultats révèlent une augmentation non significative des teneurs plasmatiques en urée et en créatinine chez des souris femelles traitées. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Nasr et *al.* (2016) chez des rats mâles adultes traités par abamectine à raison de 30mg/kg/jour pendant 7 jours.

Sur le plan structural, le parenchyme rénal provenant de souris traitées avec les deux formulations à base de *M. anisopliae* montre plusieurs altérations qui sont marquées principalement par la présence de congestions sanguines, l'atrophie, la dégénérescence de quelques glomérules, la dilatation des capillaires glomérulaires et interstitiels corticales et médullaires associée à la dégénérescence par endroit de l'épithélium tubulaire corticale. Ces lésions cyto-architecturales suggèrent la présence d'une inflammation au niveau du tissu rénal. Nos résultats sont assez comparables avec ceux rapportés par Arkam (2019) qui a signalé que les lésions tissulaires s'accroissent avec l'augmentation des concentrations en spores de *Metarhizium* administrées pendant 30 jours chez des rats Wistar.

Dans nos conditions de toxicité, les perturbations des paramètres biochimiques rénaux sont jugés statistiquement non significatives ce qui suggère que la fonction rénale est conservée. Cela est peut être dû à la courte durée des différents traitements.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

A travers ce travail, réalisé sur les souris femelles adultes, nous avons cherché les effets toxiques d'un champignon entomopathogène, *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* sous deux formulations à l'état conditionné (Novacrid®) et à l'état germinatif, administré par voie orale à raison de $1,4 \times 10^8$ spores/ml pendant 15 jours. Cette recherche touche la fonction et la structure rénale.

Les résultats obtenus sont en faveur d'une inflammation rénale bien apparente au niveau structural avec le maintien de la fonction normale.

Afin d'approfondir la recherche de la toxicité du bioinsecticide, il serait intéressant :

- ✚ D'appliquer les traitements sur un effectif plus élevé des souris
- ✚ D'étudier la chronicité des effets à long terme.
- ✚ D'établir une étude comparative selon le sexe des souris
- ✚ De chercher la toxicité aux niveaux des autres organes tels que le foie, le cerveau, la rate, l'appareil reproducteur, etc...
- ✚ D'appliquer d'autres tests spécifiques dans la recherche de la toxicité rénale.
- ✚ De chercher la toxicité chez l'être humain par des enquêtes et des dosages sanguins.

A

Anand, R., Tiwary, B. N. (2010) - Cytokine profile and cytotoxicity in response to acute intratracheal dose of *Metarhizium anisopliae* in BALB/c mice. *Medicalmycology*, 48(8), 1039-1048.

Arkam F, Kara-Toumi F.Z., Tail-Halil G., Saidi F. (2017-a)- Effets des traitements avec le Green muscle® en milieu naturel (Nord-Ouest de l'Algérie) sur les larves de *Dociostaurus maroccanus* (Thunberg, 1815) et sur l'histologie du tégument, *Algerian J. Nat. Products*, 5:3 530-540.

Arkam, (2019)- Evaluation de la toxicité de l'imidaclopride (insecticide chimique néonicotinoïde) et *metarhizium anisopliae* (bioinsecticide entomopathogène) sur terrain et en conditions contrôlées. Thèse Doctorat en Biologie. Université de Blida 1, 270p.

B

Bartels H., Bohmer M., (1971)- Micro-determination of creatinine. *Clin. Chim. Acta.*, 17: 696-700.

Benserradj.O., (2014)- Evaluation de *Metarhizium anisopliae* à titre d'agent de lutte biologique contre les larves de moustiques, Thèse de doctorat, université de Constantine 1, 5p.

Barnett, L. M., Cummings, B. S., (2018) - Nephrotoxicity and renal pathophysiology: a contemporary perspective. *Toxicological Sciences*, 164(2), 379-390.

Bischoff J.F., Rehner S.A., Humber R.A. (2009) - A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage, *Mycologia*, 101: 512-530.

Bissaad, F.Z., Youcef, M., Bounacerur, F. et Doumandji-Mitiche, B., (2012)- "Activité biologique d'un biopesticide le Green Muscle sur le tégument du criquet pèlerin *Schistocerca gregaria*(Forskål, 1775) (Orthoptera, Acrididae)", *Nature & Technologie*, V. 6, 51 - 58.

Brancini, G. T., Tonani, L., Rangel, D. E., Roberts, D. W., & Braga, G. U. (2018)- Species of the *Metarhizium anisopliae* complex with diverse ecological niches display different susceptibilities to antifungal agents. *Fungal biology*, 122(6), 563-569.

Brunner-Mendoza, C., Reyes-Montes, M. D. 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.

Benzarour, H., et Belateche, F. (2019)- Étude de la place des facteurs de risque médicamenteux de l'insuffisance rénale chronique enquête cas témoins-chu Hussein dey (2012-2015) (doctoral dissertation).

Bidochka, M. J., & Small, C. L. (2005) - Phylogeography of *Metarhizium*, an insect pathogenic fungus. *Insect-fungal associations: ecology and evolution*. Oxford University Press, Oxford, 28-50.

Boudjelida, H., et Soltani, N. (2010)- Lutte biologique avec un champignon entomopathogène *Metarhizium anisopliae* Metch. à l'égard de *Cydia pomonella* L. *Travaux de l'Institut Scientifique, Série Zoologie Rabat*, 47,113-116.

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

C

Chaouch A., (2009) -“Étatsphasaire de *Dociostaurus maroccanus* Thunberg, 1815 (*Acrididae*, *Gomphocerinae*). Effets de deux champignons entomopathogènes, *Beauveria bassiana* (Balsamo) et *Metarhizium anisopliae* var. *acidum* sur quelques paramètres biophysiologicals”, Thèse Magistère, Ecol. Nat. Sup. Agro, El-Harrach.107p.

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

Chen, M., Du, Y., Zhu, G., Takamatsu, G., Ihara, M., Matsuda, K., 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*, 151,82-89.

Chalamet, M. (2015)- Toxiques rénaux et biomarqueurs: essai de cartographie des différents modes d'action des substances néphrotoxiques en médecine vétérinaire, ”, Thèse Doctorat École nationale vétérinaire d'alfort, 145p.

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

Chung H. et S. B. Carroll, (2015). Wax, sex and the origin of species: Dual roles of insect cuticular hydrocarbons in adaptation and mating. *Bio Essays* 37:822-83.

D

Damalas, C., Koutroubas, S. (2018) -Current status and recent developments in biopesticide use.

Deravel, J., Krier, F., Jacques, P. (2014)- Les biopesticides, compléments et alternatives aux produits phytosanitaires chimiques (synthèse bibliographique). *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 18(2) ,220-232.

E

El-Kadi MK, Xara´ LS, De Matos PF, Da Rocha JVN, De Oliveira DP., (1983)- Effets of the entomopathogène *Metarhizium anisopliae* on guinea pigs and mice. *Environmental Entomology* 12:37_42.

Eguchi, H., Toibana, T., Hotta, F., Miyamoto, T., Mitamura, Y., & Yaguchi, T. (2015)- Severe fungal sclerokeratitis caused by *Metarhizium anisopliae*: a case report and literature review. *Mycoses*, 58(2), 88-92.

F

Fontaine JJ., (2012)-Lésions de l'appareil urinaire. Polycopié. École Nationale Vétérinaire d'Al fort., Unité pédagogique d'Histologie et d'anatomie Pathologique, 96p.

G

Goodman, A. L., Lockhart, S. R., Lysen, C. B., Westblade, L. F., Burnham, C. A. D., Burd, E. M.,(2018) -Two cases of fungal keratitis caused by *Metarhizium anisopliae*. *Medicalmycology case reports*, 21,8-11.

Gueguen, Y., & Rouas, C. (2012)- Données nouvelles sur la néphrotoxicité de l'uranium. *Radioprotection*, 47(3), 345-359.

Goettel MS, Jaronski ST. (2013)- Safety and registration of microbial agents for control of grasshoppers and locusts, In: Goettel MS, Johnson DL. (Eds.) *Microbial Control of Grasshoppers and Locusts*. Mem Entomol Soc. Can 1997; 171: 83–99.

H

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

J

Jevanand HR, Kannan N. 1995- Evaluation of *Metarhizium anisopliae* as a biocontrol agent for coconut pest *Oryctes rhinoceros* and its mammalian toxicity test on rats. *Journal of Ecotoxicology and Environmental Monitoring* 5:51_57.

Jeschke, P. (2016)-Progress of modern agricultural chemistry and future prospects. *Pest Manag. Sci.* 72, 433–455.

K

Khaldoun-Oularbi, H., Richeval, C., Djenas, N., Aissani, H., Zerrouki-Daoudi, N., Allorge, D. (2015)-Néphrotoxicité d'un biopesticide, l'abamectine, chez le rat Wistar. *Toxicologie Analytique et Clinique*, 27(2), S66.

Kilic, 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.

Kooyman, C., Ammati, M., Moumene, K., Chaouch, A. et Ahmed Zaid, A., (2005), “Essai de Green Muscle® sur les larves du criquet pèlerin dans la wilaya d'El-Oued, Sud-Est Algérie”, Rapport FAO - TAC 715, 23p.

Khaldoun-Oularbi, H., Richeval, C., Djenas, N., Aissani, H., Zerrouki-Daoudi, N., & Allorge, D. (2015). Néphrotoxicité d'un biopesticide, l'abamectine, chez le rat Wistar. *Toxicologie Analytique et Clinique*, 27(2), S66.

L

Lemos, A. J. J., Siqueira, H. A., Wanderley-Teixeira, V., Maia, F. C., Teixeira, Á. A., Silva, DJ., & Oliveira, J. V. (2013). Effect of sub-lethal doses of *Bacillus thuringiensis* subsp. Aizawai and deltamethrin with regard to fertility and organ toxicity in pregnant albino rats. *Experimental and toxicologic pathology*, 65(5), 489-495.

Lord, A., & Ménard, C. (2002) La néphrotoxicité médicamenteuse. *Le Médecin du Québec*, 37.

M

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), 33.

Mossa, A. T. H., Mohafrash, S. M., & Chandrasekaran, N. (2018). Safety of natural insecticides: toxic effects on experimental animals. *BioMed research international*, 2018.

Murillo-Alonso, K. T., Hernández-Velázquez, V. M., Salazar-Schettino, P. M., Cabrera-Bravo, M., & Toriello, C. (2019). Effects of *Metarhizium anisopliae* on *Meccuspallidipennis* (Hemiptera: Reduviidae) over different types of wall surfaces. *Biocontrol Science and Technology*, 1-12.

Martoja R., Martoja M., 1967- Initiation aux techniques de l'histologie animale. *Ed., Masson, Paris, 345p.*

Muir D, Martin P, Kendall K, Malik R.(1998) Invasive hyphomycotic rhinitis in a cat due to *Metarhizium anisopliae*. *Med Mycol*; 36: 51 – 54.

N

Nortier, J., Pozdzik, A., Roumeguere, T., & Vanherweghem, J. L. (2015). Néphropathie aux acides aristolochiques («néphropathie aux herbes chinoises»). *Néphrologie Thérapeutique*, 11(7), 574-588.

Navarro-Barranco, H., Brunner-Mendoza, C., delRocío Reyes-Montes, M., Duarte-Escalante, E., Toriello, C.,(2019) -Phenotypic and molecular analysis of Mexican *Metarhizium anisopliae* strains. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 90.

Nourrisson, C., Dupont, D., Lavergne, R.-A., Dorin, J., Forouzanfar, F., Denis, J., Weeks, K., Joubert, R., Chiambaretta, F., Bourcier, T., Roux, S., Sen echal, A., Benaïm, G., Wallon, M., Candolfi, E., Letscher-Bru, V., Poirier, P., Sabou, M.,“Species of *Metarhizium anisopliae* complex implicated in human infections: retrospective sequencing study”, *Clin. Microbiol. Infect.* V 23, (2017), 994- 999.

Nourrisson, C., Dupont, D., Lavergne, R. A., Dorin, J., Forouzanfar, F., Denis, J., Roux, S.(2017).Species of *Metarhizium anisopliae* complex implicated in human infections: retrospective sequencing study. *Clinical Microbiology and Infection*, 23(12), 994-999.

O

Orr, S., & Bridges, C. (2017)-Chronic kidney disease and exposure to nephrotoxic metals. *International journal of molecular sciences*, 18(5), 1039.

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

R

Radhika, S., Sahayaraj, K., Senthil-Nathan, S., & Hunter, W. B-(2018). Individual and synergist activities of monocrotophos with neem based pesticide, Vijayneem against *Spodopteralitura* Fab. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 101, 54-68.

Revankar, S. G., Sutton, D. A., Sanchez, S. E., Rao, J., Zervos, M., Dashti, F., &Rinaldi, G. (1999) - *Metarhizium anisopliae* as a cause of sinusitis in immunocompetent hosts. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(1), 195–198.

Raizada, R. B., Srivastava, M. K., Kaushal, R. A., & Singh, R. P. (2001)- zadirachtin, a neem biopesticide: subchronic toxicity assessment in rats. *Food and chemical toxicology*, 39(5), 477-483.

Roberts, D. W., & St Leger, R. J. (2004)- *Metarhizium* spp., cosmopolitan insect-pathogenic fungi: mycological aspects. *Advances in applied microbiology*, 54(1), 1-70.

S

Senthil-Nathan, S. (2015). A review of biopesticides and their mode of action against insect pests. In *Environmental sustainability* (pp. 49-63) . Springer. New Delhi.

Schaerffenberg, B. (1968). Untersuchungen über die Wirkung der Insektentötenden Pilze *Beauveria bassiana* (Bals. Vuill.) and *Metarrhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. auf Warmblütler. *Entomophaga*, 13(2), 175-182.

Shaddock JA, Roberts DW, Lause S., (1982). Mammalian safety tests of *Metarrhizium anisopliae*. Preliminary results. *Environmental Entomology* 11:189_192.

T

Toriello C, Perez-Torres A, Burciaga-Diaz A, Navarro-Barranco H, Perez-Mejia A, Lorenzana-Jimenez M, Mier T., (2006) - Lack of acute pathogenicity and toxicity in mice of an isolate of *Metarrhizium anisopliae* var. *anisopliae* from spittlebugs. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 65:278_287.

Toriello, C., Pérez-Torres, A., Burciaga-Díaz, A., Navarro-Barranco, H., Pérez-Mejía, A., Lorenzana-Jiménez, M., & Mier, T., (2006)-Lack of acute pathogenicity and toxicity in mice of an isolated of *Metarrhizium anisopliae* var. *anisopliae* from spittlebugs. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 65(2), 278–287.

Treffel, M., Champigneulle, J., Meibody, F., Laurain, E., Frimat, L., et Busby-Venner, H., (2019)-Néphrite tubulo-interstitielle et maladie de Crohn, néphrotoxicité ou atteinte extradiigestive de la maladie de Crohn? À propos d'un cas. *Néphrologie & Thérapeutique*, 15(1), 59-62.

T

Thomas, M. B., & Read, A. F.(2007)-Can fungal biopesticides control malaria?. *Nature Reviews Microbiology*, 5(5), 377.

Tabacco A., Meiattini F., Moda E., Tarli P., 1979- Simplified enzymic/ colorimetric serum urea nitrogen determination. *Clinical chemistry*, 25: 336-337.

V

Valcke, M., Levasseur, M. E., da Silva, A. S., &Wesseling, C. (2017).Pesticide exposures and chronic kidney disease of unknown etiology: an epidemiologic review. *Environmental Health*,16(1), 49.

Z

Zimmermann G., (2007)- eview on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Biocontr.Sci.Technol.*17:879-920.

Zimmermann, G. (1993)- The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and its potential as a biocontrol agent. *Pesticide Science*, 37(4), 375-3

Le Milieu de culture PDA

➤ *Milieu de culture PDA (Potatos Dextros Agar)*

- *Pomme de terre (pour obtenir le jus).*
.....200g.
- *Glucose*.....40g.
- *Gélose (Agar agar)*
.....40g.
- *L'eau distillée.*1000ml.

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.

Matériel et réactifs

II.1. Réactifs

- L'eau distillée.
- L'héparine.
- Formol 36°.
- Alcool (96%, 99.8%).
- Xylène.
- Paraffine « Leica ».
- Colorants.



Figure 13: Formol 36°



Figure 14: Colorants



Figure 15: Paraffine



Figure 16 : Alcool



Figure 17: Xylène

« Leica »

II.2. Appareillage

- Balance électrique.
- Balance de précision.
- Bain Marie.
- Centrifugeuse.
- Etuve.
- Microscope photonique.
- Microtome de type « Leica ».
- Platine refroidissante de type « Leica ».
- Réfrigérateur



**Figure 18 : Balance de
Précision**



Figure 20: Etuve



Figure 21: Centrifugeuse



**Figure 22 : Microscope
Photonique**



**Figure23 : Microtome
de type « Leica »**



Figure 24: Platine refroidissante type « Leica »

II.3. Autre matériel

- Cages en plastiques.
- Mangeoires et biberons.
- Sonde de gavage pour souris.
- Seringues et aiguilles.
- Pochette thermique.
- Tubes héparines.
- Boîtes en verre.
- Bécher.
- Entonnoir.
- Eprouvette graduée.
- Erlenmeyer.
- Parafilm.
- Pince en bois.
- Pissette d'eau distillée.
- Spatule.
- Cassettes en plastique
- Moules en metal
- Porte-lames
- Lamelles
- Trousse à dissection
- Brille
- Boîtes de pétri
- Papier filtre



Figure 25 : sonde de gavage
Dissection



Figure 26 : Seringues



Figure 27: Trousse de
Dissection



Figure 28: tubes héparinés



Figure 29 : Boîtes en verre



Figure 30: Bécher



Figure 31 : Entonnoir



Figure 32: Erlenmeyer



Figure 33 : Parafilm



Figure 34 : Pince en bois



Figure 35: Pissette d'eau distillée



Figure 36 : Cassette



Figure 37 : Moules



Figure 38: Lames porte-objet métal



Figure 39 : Porte-lames en métal

Tableau I : Composition des bouchons alimentaires

Composition des bouchons alimentaires	
Protéines (%)	20
Matières grasses brutes (%)	4
Cendre brutes	6.5

Cellulose brute (%)	5.5
Calcium (%)	1.1
Phosphore (%)	0.8
Vitamine A (UI/kg)	22000
Vitamine D3 (UI/kg)	2200
Vitamine E (mg/kg)	100
Sulfate de cuivre penta hydraté/cuivre (mg/kg)	8

Tableau II : Les réactifs du dosage de l'urée

Réactifs	Composition
R1	- Uréase 30000 U/L - Tampon phosphates pH 6,7 50 mmol/L - EDTA 2 mmol/L
R2	- Salicylate de sodium 400 mmol/L - Nitroprusiate de sodium 10 mmol/L - Hypochlorite de sodium 7 mmol/L - Hydroxyde de sodium 62 mmol/L
Etalon	- Parton primaire de détection d'urée 50 mg/dl

Tableau : Les réactifs du dosage de la créatinine

Réactifs	Composition
R1	- Acide picrique 38,2 mmol/L - Tampon non réactif
R2	- Hydroxyde de potassium 900 mmol/L - Phosphate 135 mmol/L - Conservateur - Stabilisateur
Etalon	Créatinine aqueuse 20 mg/l.

➤ Description de la cellule de Mallassez

La cellule de Malassez est une lame de verre contenant 100 rectangles d'égalles 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.

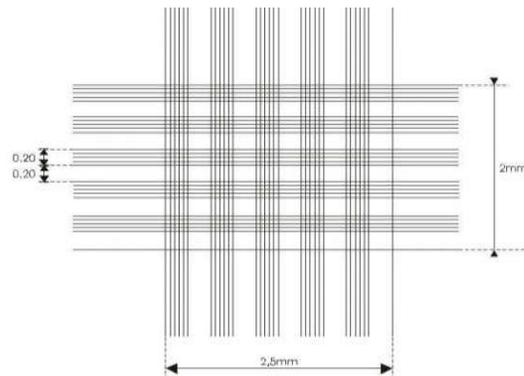


Schéma de la cellule de Maltose

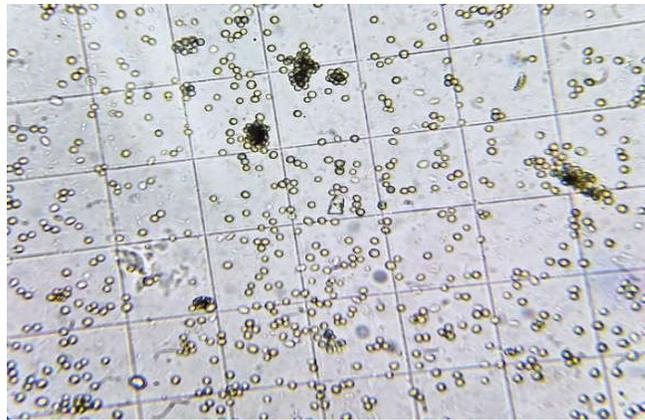


Figure 40 : Micrographie originale représentant les spores obtenues dans la cellule de Maltosez sous microscope optique. Grossissement x100.

III. Fiches techniques de Novacrid

- ✓ Produit à utiliser

NOVACRID (5 x 10¹⁰ conidies/g), une poudre fine de couleur verte marine sans odeur particulière, la durée de stockage est >5 ans à 4°C, il est incompatible avec la plupart des fongicides.

- ✓ Fiche de données techniques



Metarhizium acridum (souche EVCH077)

AGENT BIOLOGIQUE CONTRE LES CRIQUETS

1. Information Générale

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

Commune rurale de Mejjate, 50122 Meknès, Maroc.

1.2. Nom commercial du produit: NOVACRID

1.3. No. CIPAC: Pas encore attribué

1.4. Catégorie d'usage: Biopesticide (acridicide)

1.5. Ravageurs cibles: Les criquets de l'infraordre Acrididea (Orthoptera)

1.6. Cultures: Toutes cultures attaquées par les criquets

1.7. Type de formulation: TC

1.8. Efficacité au champ: Une dose de 50 g/ha dans 1-4 L de gasoil (en fonction de la densité de la végétation) ou une autre huile appropriée réduit les populations par au moins 80% dans 3 semaines (ou moins dans la présence d'ennemis naturels tels que des oiseaux).

2. Formulation et matière active

2.1. Matière active : Matériel biologique

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

2.1.1. Nom scientifique : *Metarhizium acidum* souche EVCH077 (Ascomycota : Hypocreales : Clavicipitaceae)

2.1.2. Stade de développement : Conidies (spores).

2.1.3. Provenance : Le Bénin

2.1.4. Nature de l'organisme : L'organisme est un champignon pathogène appartenant au groupe des champignons mitosporiques, qui sont des anamorphes (stades asexués) de champignons dans l'embranchement Ascomycota. Il est très spécifique aux criquets.

Parce que les criquets ont la capacité de détoxifier les toxines des autres champignons entomopathogènes, *M. acidum* a développé une autre stratégie pour tuer son hôte et dans le processus a perdu les gènes pour la synthétisation de toxines.

2.1.5. Apparence : Poudre à couleur vert marin.

2.2. Méthode d'analyse :

- Culture sur milieu artificiel et examen des structures sporogènes afin de vérifier l'identité du champignon.

- Analyse d'ADN et/ou d'isozymes afin de vérifier la souche (marqueur disponible)

2.3. Contenu en matière active : $\pm 5 \cdot 10^{10}$ spores sèches par g

2.4. Viabilité à l'issue de l'usine : Au moins 90%

2.5. Impuretés : moins d'1%

2.6. Contenu en eau : moins de 6%

2.7. Taille des particules : moins de 60 μm

2.8. Liquide de mélange : Gasoil ou une autre huile appropriée, par ex. 70%

pétrole lampante plus 30% huile végétale.

2.9. Dose recommandée : 50 g/ha dans 1 L (application aérienne) ou 2 L (application terrestre) de gasoil.

2.10. Compatibilité avec d'autres pesticides : Matière active est tuée par la plupart des fongicides mais elle est compatible avec certaines pesticides utilisés dans la lutte antiacridienne, par ex. les pyréthriinoïdes.

2.11. Stabilité en stockage : Des données expérimentales montrent que des conidies sèches ($\leq 5\%$ contenu en eau) peuvent être stockées jusqu'à 2 ans à $\pm 20^\circ\text{C}$ et pendant plus de 3 ans à $< 10^\circ\text{C}$. Des modèles de stockage, basés sur des données expérimentales extensives (Hong *et al.*, 1998, *Annals of Botany*, 81: 625-630), indiquent qu'une viabilité des conidies de $> 80\%$ peut être maintenue pendant > 10 ans, si le matériel technique est stocké dans des sachets imperméables sous réfrigération ($< 10^\circ\text{C}$). Sous des conditions de stockage tropicales, une durée de vie de > 2 ans peut être attendue à des températures de nuit/jour de $20 - 30^\circ\text{C}$ et approximativement 6 mois sous un régime de $30 - 40^\circ\text{C}$.

2.12. Formulation : Le produit n'est pas formulé (TC) donc doit être mélangé avec de l'huile avant épandage.

3. Toxicité et pathogénicité

La toxicité et la pathogénicité de la matière active n'ont pas encore été testées. Pourtant il est improbable que ces paramètres soient très différents des mêmes paramètres des trois autres souches de *Metarhizium acridum* qui sont déjà homologuées dans certains pays. La raison en est que dans toutes les analyses génétiques du genre *Metarhizium* les souches de *M. acridum* se regroupent toujours très proches les unes des autres, donc elles sont très semblables. En plus, des études approfondies ont montré que cette espèce ne possède pas les gènes nécessaires pour produire les toxines qui sont souvent trouvées chez les autres espèces de *Metarhizium* (Gao *et al.*, 2011 ; Wang *et al.*, 2012). Par conséquent, les souches de cette espèce ne sont pas toxiques. Comme exemple les données de la souche IMI330189 (Green Muscle) sont montrées ici :

3.1. Toxicité acute orale (rat) : $DL_{50} > 2$ g/kg poids vif.

3.2. Toxicité acute dermique (rat) : $DL_{50} > 2$ g/kg poids vif.

3.3. Toxicité acute inhalation (rat) : $CL_{50} > 17,25$ mg/kg poids vif.

3.4. Toxicité intrapéritonéale (rat) : $DL_{50} > 100$ mg/kg poids vif.

3.5. Irritation œil (lapin) : Oui

3.6. Irritation peau (lapin) : Oui, mais exposition doit dépasser 24 h

3.7. Sensibilisation : Très rare

3.8. Toxicité envers les poissons : CL_{50} de 96 heures >100 mg/L

3.9. Toxicité envers les abeilles : $DL_{50} >100$ $\mu\text{g}/\text{individu}$ (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).

3.10. Toxicité envers les vers de terre : $CL_{50} >1$ g/kg de sol sec

3.11. Phytotoxicité: La matière active n'est pas phytotoxique. Le mélange dans les épandeurs n'est pas phytotoxique non plus si le volume d'application ne dépasse pas 5 L/ha.

VI. Fiches techniques

VI.1. Fiche technique N°1 : Fixation

Fixateur : formol 10%

Formule brute : CH_2O

Masse molaire : 30.026 ± 0.0012 g/mol

Compose:

- Eau distille
- Chlorure de sodium
- Formol concentré

VI.2. Fiche technique N°2 : Coloration

Les protocoles des deux colorations sont les suivants :

VI.2.1. Coloration à l'hématoxyline-éosine

- Un bain d'hématoxyline.....10 secondes.
- Rinçage à l'eau courante.....5 minutes.
- Un bain d'éosine.....30 seconde.
- Rinçage rapide à l'eau courante.

VI.2.2. Coloration de Trichrome de Masson

- Un bain d'hématoxyline10 secondes.
- Rinçage à l'eau courante.....5 minutes.
- Un bain de Fuchsine Ponçeau.....2 minutes.

- Rinçage rapide à l'eau courante
- Un bain d'acide phosphomolybdique.....15 minutes.
- Un bain de Vert lumière.....5 minutes.
- Rinçage rapide à l'eau courante

VI. Calcul statistique

Soit $X_1 ; X_2 ; X_3 \dots X_n$ une suite fini de nombre .

La moyenne arithmétique est le rapport :

$$m = \frac{X_1 + X_2 + X_3 + \dots + X_n}{n} = \frac{\sum X_i}{n}$$

m : la moyenne aréthmithique.

n : l'effectif de la série.

x : le caractère étudié.

VI.2. La variance

La variance d'une série des valeurs du caractère est la valeur moyenne arithmeque des carres des écarts de ces valeurs par rapport a leur moyenne arythmique.

$$V = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - m)^2}{n}$$

Dont :

V : la variance.

m : la moyenne arithmétique.

n : l'effectif de la série.

x : le caractère étudié.

VI.3. L'écart type

Ecart type est la racine carre de la variance.

$$\delta = \sqrt{V}$$

Où

δ : l'écart type.

V : la variance

III.4. Test de Student (indépendant)

On étudie deux variables X et Y et on cherche à savoir si les deux observations de taille n_X et n_Y , de moyennes observées m_X et m_Y et de variances observées s^2_X et s^2_Y issues respectivement d'une population de moyenne μ_X et de variance δ^2_X et d'une population de moyenne μ_Y et de variance δ^2_Y , proviennent de la même loi théorique de moyenne μ . Les hypothèses sont:

H_0 : $\mu_X = \mu_Y$ et le traitement n'a pas d'effet.

H_1 : $\mu_X \neq \mu_Y$ et le traitement a provoqué un changement.

Pour $n_X < 30$ ou $n_Y < 30$, et $\delta^2_X = \delta^2_Y$, la statistique du test est :

La variance commune estimée :

$$S = \sqrt{\frac{n_X s_X^2 + n_Y s_Y^2}{n_X + n_Y - 2}}$$

Le test de Student :

$$t_{obs} = \frac{|m_X - m_Y|}{s \sqrt{\frac{1}{n_X} + \frac{1}{n_Y}}}$$

dont :

m_X : la moyenne arithmétique de l'observation X.

m_Y : la moyenne arithmétique de l'observation Y.

s : la variance commune estimée.

n_X : l'effectif de l'observation X.

n_Y : l'effectif de l'observation Y.

s^2_X : la variance de l'observation X.

s^2_Y : la variance de l'observation Y.

On compare le t_{obs} avec t_{th} de la table de Student avec un pourcentage d'erreur $\alpha = 5\%$ et un degré de liberté $ddl = n_1 + n_2 - 2$:

- Si $t_{obs} < t_{th}$: H_0 est retenue, la différence est non significative et le traitement n'a pas d'effet.
- Si $t_{obs} > t_{th}$: H_1 est retenue, la différence est significative et le traitement a un effet.

VI.6. Test de Fisher

Il sert à vérifier l'égalité de deux variances (homoscédasticité). Les hypothèses du test sont :

$H_0 : \sigma^2 X = \sigma^2 Y$

$H_1 : \sigma^2 X \neq \sigma^2 Y$

La statistique du test est :

$$F_{obs} = \frac{\frac{n_X s_X^2}{n_X - 1}}{\frac{n_Y s_Y^2}{n_Y - 1}}$$

dont:

n_X : l'effectif de l'observation X.

n_Y : l'effectif de l'observation Y.

$s^2 X$: la variance de l'observation X.

$s^2 Y$: la variance de l'observation Y.

On compare le ***Fobs*** avec la valeur seuil dans la table de Fisher-Snédecors à $n_X - 1$ et $n_Y - 1$ degrés de liberté.

- Si ***Fobs*** < valeur seuil : H_0 est retenue, la différence entre les variances des deux observations n'est pas significative.
- Si ***Fobs*** > valeur seuil : H_1 est retenue, la différence de variance des deux observations est significative.

Tableau III: table de Student

Avec α est le pourcentage d'erreur et ν est le degré de liberté

ν \ α	0,900	0,500	0,300	0,200	0,100	0,050	0,020	0,010	0,001
1	0,1584	1,0000	1,9626	3,0777	6,3138	12,7062	31,8205	63,6567	636,6193
2	0,1421	0,8165	1,3862	1,8856	2,9200	4,3027	6,9646	9,9248	31,5991
3	0,1366	0,7649	1,2498	1,6377	2,3534	3,1824	4,5407	5,8409	12,9240
4	0,1338	0,7407	1,1896	1,5332	2,1318	2,7764	3,7469	4,6041	8,6103
5	0,1322	0,7267	1,1558	1,4759	2,0150	2,5706	3,3649	4,0321	6,8688
6	0,1311	0,7176	1,1342	1,4398	1,9432	2,4469	3,1427	3,7074	5,9588
7	0,1303	0,7111	1,1192	1,4149	1,8946	2,3646	2,9980	3,4995	5,4079
8	0,1297	0,7064	1,1081	1,3968	1,8595	2,3060	2,8965	3,3554	5,0413
9	0,1293	0,7027	1,0997	1,3830	1,8331	2,2622	2,8214	3,2498	4,7809
10	0,1289	0,6998	1,0931	1,3722	1,8125	2,2281	2,7638	3,1693	4,5869
11	0,1286	0,6974	1,0877	1,3634	1,7959	2,2010	2,7181	3,1058	4,4370
12	0,1283	0,6955	1,0832	1,3562	1,7823	2,1788	2,6810	3,0545	4,3178
13	0,1281	0,6938	1,0795	1,3502	1,7709	2,1604	2,6503	3,0123	4,2208
14	0,1280	0,6924	1,0763	1,3450	1,7613	2,1448	2,6245	2,9768	4,1405
15	0,1278	0,6912	1,0735	1,3406	1,7531	2,1314	2,6025	2,9467	4,0728
16	0,1277	0,6901	1,0711	1,3368	1,7459	2,1199	2,5835	2,9208	4,0150
17	0,1276	0,6892	1,0690	1,3334	1,7396	2,1098	2,5669	2,8982	3,9651
18	0,1274	0,6884	1,0672	1,3304	1,7341	2,1009	2,5524	2,8784	3,9216
19	0,1274	0,6876	1,0655	1,3277	1,7291	2,0930	2,5395	2,8609	3,8834
20	0,1273	0,6870	1,0640	1,3253	1,7247	2,0860	2,5280	2,8453	3,8495
21	0,1272	0,6864	1,0627	1,3232	1,7207	2,0796	2,5176	2,8314	3,8193
22	0,1271	0,6858	1,0614	1,3212	1,7171	2,0739	2,5083	2,8188	3,7921
23	0,1271	0,6853	1,0603	1,3195	1,7139	2,0687	2,4999	2,8073	3,7676
24	0,1270	0,6848	1,0593	1,3178	1,7109	2,0639	2,4922	2,7969	3,7454
25	0,1269	0,6844	1,0584	1,3163	1,7081	2,0595	2,4851	2,7874	3,7251
26	0,1269	0,6840	1,0575	1,3150	1,7056	2,0555	2,4786	2,7787	3,7066
27	0,1268	0,6837	1,0567	1,3137	1,7033	2,0518	2,4727	2,7707	3,6896
28	0,1268	0,6834	1,0560	1,3125	1,7011	2,0484	2,4671	2,7633	3,6739
29	0,1268	0,6830	1,0553	1,3114	1,6991	2,0452	2,4620	2,7564	3,6594
30	0,1267	0,6828	1,0547	1,3104	1,6973	2,0423	2,4573	2,7500	3,6460
40	0,1265	0,6807	1,0500	1,3031	1,6839	2,0211	2,4233	2,7045	3,5510
60	0,1262	0,6786	1,0455	1,2958	1,6706	2,0003	2,3901	2,6603	3,4602
80	0,1261	0,6776	1,0432	1,2922	1,6641	1,9901	2,3739	2,6387	3,4163
120	0,1259	0,6765	1,0409	1,2886	1,6577	1,9799	2,3578	2,6174	3,3735
∞	0,1257	0,6745	1,0364	1,2816	1,6449	1,9600	2,3263	2,5758	3,2905

Tableau IV: table de Fisher

$V1$ est le nombre de ddl du numérateur avec $\alpha= 0,05$.

$V2$ est le nombre de ddl du dénominateur avec $\alpha= 0,05$

$\frac{P_1}{P_2}$	1	2	3	4	5	6	8	10	15	20	30	∞
1	161	200	216	225	230	234	239	242	246	248	250	254
2	18,5	19,0	19,2	19,2	19,3	19,3	19,4	19,4	19,4	19,4	19,5	19,5
3	10,1	9,55	9,28	9,12	9,01	8,94	8,85	8,79	8,70	8,66	8,62	8,53
4	7,71	6,94	6,59	6,39	6,26	6,16	6,04	5,96	5,86	5,80	5,75	5,63
5	6,61	5,79	5,41	5,19	5,05	4,95	4,82	4,74	4,62	4,56	4,50	4,36
6	5,99	5,14	4,76	4,53	4,39	4,28	4,15	4,06	3,94	3,87	3,81	3,67
7	5,59	4,74	4,35	4,12	3,97	3,87	3,73	3,64	3,51	3,44	3,38	3,23
8	5,32	4,46	4,07	3,84	3,69	3,58	3,44	3,35	3,22	3,15	3,08	2,93
9	5,12	4,26	3,86	3,63	3,48	3,37	3,23	3,14	3,01	2,94	2,86	2,71
10	4,96	4,10	3,71	3,48	3,33	3,22	3,07	2,98	2,85	2,77	2,70	2,54
11	4,84	3,98	3,59	3,36	3,20	3,09	2,95	2,85	2,72	2,65	2,57	2,40
12	4,75	3,89	3,49	3,26	3,11	3,00	2,85	2,75	2,62	2,54	2,47	2,30
13	4,67	3,81	3,41	3,18	3,03	2,92	2,77	2,67	2,53	2,46	2,38	2,21
14	4,60	3,74	3,34	3,11	2,96	2,85	2,70	2,60	2,46	2,39	2,31	2,13
15	4,54	3,68	3,29	3,06	2,90	2,79	2,64	2,54	2,40	2,33	2,25	2,07
16	4,49	3,63	3,24	3,01	2,85	2,74	2,59	2,49	2,35	2,28	2,19	2,01
17	4,45	3,59	3,20	2,96	2,81	2,70	2,55	2,45	2,31	2,23	2,15	1,96
18	4,41	3,55	3,16	2,93	2,77	2,66	2,51	2,41	2,27	2,19	2,11	1,92
19	4,38	3,52	3,13	2,90	2,74	2,63	2,48	2,38	2,23	2,16	2,07	1,88
20	4,35	3,49	3,10	2,87	2,71	2,60	2,45	2,35	2,20	2,12	2,04	1,84
22	4,30	3,44	3,05	2,82	2,66	2,55	2,40	2,30	2,15	2,07	1,98	1,78
24	4,26	3,40	3,01	2,78	2,62	2,51	2,36	2,25	2,11	2,03	1,94	1,73
26	4,23	3,37	2,98	2,74	2,59	2,47	2,32	2,22	2,07	1,99	1,90	1,69
28	4,20	3,34	2,95	2,71	2,56	2,45	2,29	2,19	2,04	1,96	1,87	1,65
30	4,17	3,32	2,92	2,69	2,53	2,42	2,27	2,16	2,01	1,93	1,84	1,62
40	4,08	3,23	2,84	2,61	2,45	2,34	2,18	2,08	1,92	1,84	1,74	1,51
50	4,03	3,18	2,79	2,56	2,40	2,29	2,13	2,03	1,87	1,78	1,69	1,44
60	4,00	3,15	2,76	2,53	2,37	2,25	2,10	1,99	1,84	1,75	1,65	1,39
80	3,96	3,11	2,72	2,49	2,33	2,21	2,06	1,95	1,79	1,70	1,60	1,32
100	3,94	3,09	2,70	2,46	2,31	2,19	2,03	1,93	1,77	1,68	1,57	1,28
∞	3,84	3,00	2,60	2,37	2,21	2,10	1,94	1,83	1,67	1,57	1,46	1,00

Tableau VI : Table de dilution d'alcool (Table de Gay-Lussac)

Les chiffres en noir indiquent la quantité d'eau en ml à ajouter à 100mL d'alcool de concentration initiale x (en bleu) pour obtenir la concentration désirée.

		Concentration initiale													
		100	99	98	97	96	95	90	85	80	75	70	65	60	50
Concentration finale	95	6,5	5,15	3,83	2,53	1,25									
	90	13,25	11,83	10,43	9,07	7,73	6,41								
	85	20,54	19,05	17,58	16,15	14,73	13,33	6,56							
	80	28,59	27,01	25,47	23,95	22,45	20,95	13,79	6,83						
	75	37,58	35,9	34,28	32,67	31,08	29,52	21,89	14,48	7,2					
	70	47,75	45,98	44,25	42,54	40,85	39,18	31,05	23,14	15,35	7,64				
	65	59,37	57,49	55,63	53,81	52	50,22	41,53	33,03	24,66	16,37	8,15			
	60	72,82	70,80	68,8	65,85	64,92	63	53,65	44,48	35,44	26,47	17,58	8,76		
	55	88,6	86,42	84,28	82,16	80,06	77,99	67,87	57,9	48,07	38,32	28,63	19,02	9,47	
	50	107,44	105,08	102,75	100,44	98,15	95,89	84,71	73,90	63,04	52,43	41,73	31,25	20,47	
	45	130,26	127,67	125,11	122,57	120,06	117,57	105,34	93,30	81,38	69,54	57,78	46,09	34,46	11,41
	40	158,56	155,68	152,84	150,02	147,22	144,46	130,8	117,34	104,01	90,76	77,58	64,48	51,43	25,55
	35	194,63	191,39	188,19	185,01	181,85	178,71	163,28	148,01	132,88	117,82	102,84	87,93	73,08	43,59
	30	242,38	238,67	234,99	231,33	227,70	224,08	206,22	188,57	171,05	153,61	136,04	118,94	101,71	67,45
	25	308,9	304,52	300,18	295,86	291,56	287,28	266,12	245,15	224,3	203,61	182,83	162,21	141,65	100,73
	20	408,5	403,13	397,79	392,47	387,17	381,9	355,8	329,84	304,01	278,26	252,58	226,98	201,43	150,55
	15	574,75	567,43	560,53	553,55	546,59	539,66	505,27	471	436,85	402,81	368,83	334,91	301,07	233,64
	10	907,09	896,73	886,4	876,1	865,15	855,15	804,5	753,65	702,89	652,21	601,6	551,06	500,50	399,85

Les chiffres en noir indiquent la quantité d'eau en ml à ajouter à 100mL d'alcool de concentration initiale x (en bleu) pour obtenir la concentration désirée.

Tableau VII: Poids corporel des souris femelles témoins

Souris	Poids corporel à J0 (g)	Poids corporel à J1 (g)	Poids corporel à J2 (g)
1	19,7	22	20,3
2	18,3	20	19,8
3	18,3	23 ,4	22,8
4	17,1	22,8	22 ,2
Moyenne	18,35	22,05	21,27
Ecart type	1,06	1,48	1,45

Tableau VIII : Poids corporel des souris femelles traitées par la forme germinative de champignon *Metarhizium anisopliae* var *acridum*.

Souris	Poids corporel à J0 (g)	Poids corporel à J1 (g)	Poids corporel à J2 (g)
1	26 ,6	23,8	25,9
2	29,8	26,2	Mort
3	20,8	18,5	23,1
4	25	19,9	25,6
Moyenne	25 ,55	22,10	24,86
Ecart type	3,74	3,53	1,97

Tableau IX : Poids corporel des souris femelles traitées par la formule conditionné de champignon *Metarhizium anisopliae* var *acridum* (Novacrid®).

Souris	Poids corporel à J0 (g)	Poids corporel à J1 (g)	Poids corporel à J2 (g)
1	28,2	30,4	32,6
2	28	27,4	29
3	20,6	22,1	24,5
4	22,3	29	29
Moyenne	24,77	27,22	28,77
Ecart type	3,90	3,62	3,31

Tableau X: Valeurs moyennes des poids corporels des souris femelles témoins et traitées par différents traitements de champignon *Metarhizium anisopliae* var *acridum*.

Souris	Poids corporel à J0 (g)	Poids corporel à J1 (g)	Poids corporel à J2 (g)
Témoin	18,35 ± 1,06	22,05 ± 1,48	21,27 ± 1,45
Traité 1	25,55 ± 3,74	22,10 ± 3,53	24,86 ± 1,97
Traité 2	24,77 ± 3,90	27,22 ± 3,62	28,77 ± 3,31

Tableau XI : Valeurs individuelles des poids absolu et relatif des reins chez les souris témoins et traités par différents traitements de *Metarhizium anisopliae* var *acridum*.

Souris		Poids absolu (g%)		Poids relatif (g%)	
		Rein gauche	Rein Droit	Rein gauche	Rein Droit
Témoin (n=4)	S1	0,124	0,138	0,61	0,679
	S2	0,118	0,135	0,595	0,681
	S3	0,136	0,138	0,596	0,605
	S4	0,132	0,127	0,594	0,572
Traité 1 (n=2)	S1	0,136	0,160	0,525	0,617
	S2	0,146	0,126	0,57	0,492
Traité 2 (n=4)	S1	0,221	0,194	0,677	0,595
	S2	0,170	0,168	0,586	0,579
	S3	0,131	0,133	0,534	0,524
	S4	0,176	0,201	0,606	0,693

$$\text{Poids relatif de l'organe} = \frac{\text{Poids absolu de l'organe (g)} \times 100}{\text{Poids final de Souris (g)}}$$

Tableau XII : Valeurs moyennes des poids absolu et relatif des reins chez les souris témoins et traités par différents traitements de champignon *Metarhizium anisopliae* var *acridum* (pour chaque rein Gauche et Droit).

Paramètres	Lots expérimentaux					
	Témoin		Traité 1		Traité 2	
	Rein D	Rein G	Rein D	Rein G	Rein D	Rein G
Poids absolu des reins	0,1345 ± 0,005	0,1275 ± 0,008	0,143 ± 0,024	0,141 ± 0,007	0,174 ± 0,030	0,1745 ± 0,036
Poids relatif des reins	0,63 ± 0,054	0,59 ± 0,007	0,55 ± 0,088	0,54 ± 0,031	0,602 ± 0,064	0,6 ± 0,059

D : Droit ; G : Gauche

Tableau XIII : Valeurs moyennes des poids relatif de rein chez les souris témoins et traités par différents traitements de champignon *Metarhizium anisopliae* var *acridum* (Les moyennes entre rein Gauche et Droit).

Souris	Témoin	Traité 1	Traité 2
Poids relatif des reins	0,69 ± 0,17	0,55 ± 0,028	0,59 ± 0,054

Tableau XIV : Résultat de l'analyse statistique de poids corporel chez les souris témoins et traités par différents formulation de *Metarhizium anisopliae* var *acridum*.

P value	J0 J1	J0 J2
Témoin	0.003	0.008
Significantly different? (P < 0.05)	Hautement significative	Hautement significative
Traité 1	0.114	0.370
Significantly different? (P < 0.05)	No significative	No significative
Traité 2	0.196	0.084
Significantly different ? (P < 0.05)	No significative	No significative

XV : Résultat de l'analyse statistique de poids relative des reins chez les souris témoins et traités par différents formulation de *Metarhizium anisopliae* var *acridum*.

Souris	Témoin –Traité 1	Témoin –Traité 2
P value	0,10 No significative	0,12 No significative

Tableau XVI: Valeurs de l'urémie et de la créatinémie chez les souris femelles témoins

<i>Souris</i>	<i>Urée sanguine (g/l)</i>	<i>Créatinine (mg/l)</i>
1	0,30	3,3
2	0,46	2,8
3	0,34	3,6
Moyenne	0,28	3,23
Ecart type	0,22	0,40

Tableau XVII: Valeurs de l'urémie et de la créatinémie chez les souris femelles traitées par formulation germinative de Metarhizium anisopliae var acridum.

<i>Souris</i>	<i>Urée sanguine (g/l)</i>	<i>Créatinine (mg/l)</i>
1	0,33	1
2	0,30	1
Moyenne	0,30	1
Ecart type	0,01	0

Tableau XVIII: Valeurs de l'urémie et de la créatinémie chez les souris femelles traitées par formulation conditionnée de Metarhizium anisopliae var acridum (Novacrid®).

<i>Souris</i>	<i>Urée sanguine (g/l)</i>	<i>Créatinine (mg/l)</i>
1	0,39	1
2	0,42	1
3	0,30	1
4	0,32	1
<i>Moyenne</i>	0,35	1
<i>Ecart type</i>	0,05	0

