

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA  
RECHERCHESCIENTIFIQUE**

**Université BLIDA 1**

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



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

**Option : Biologie Moléculaire et Cellulaire**

## **Thème**

**L'effet de l'intoxication avec un biopesticide entomopathogène  
au niveau de la rate et de l'intestin grêle chez les rats WISTAR**

.

Présenté par :

M<sup>elle</sup> : Hafian GHANIA et M<sup>elle</sup> : Sagouma CHAIMA

Soutenu le 15/09/2020

Devant le jury composé de :

Mme Matmoura A.	Maitre Assistante A	UB1	présidente.
Mme Bouazza M.	Assistante	UB1	examinatrice.
Mme Arkam F.	Assistante	UB1	promotrice .

2019/2020

## *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 est toujours à mes cotés , depuis mon enfance pour que je réussisse, que ALLAH les garde et les protège .

Ma chère et adorable sœur : Yasmine

**GHANIA**

## *Dédicace*

En premier lieu je remercie ALLAH le tous puissant de m'avoir donné la volonté ,la santé et le courage pendant tout mon parcours et pour réaliser ce travail

Je dédie ce mémoire :

A ma très chère mère Sabrina source d'amour et d'affection mon exemple , la femme qui a sacrifié sa vie pour moi qui m'a toujours soutenu et donner de la force pour affronter les moments difficiles et réaliser tout mes objectifs

A mon très cher père Mohamed qui m'a toujours soutenu et aidé .Il est toujours à mes cotés , depuis mon enfance pour que je réussisse, que ALLAH les garde et les protège .

Mes chères et adorables sœurs : amina et hadjer

A une personne très chère a mon cœur une personne qui n'est plus a mes cotés mais qui m'a toujours encouragé et soutenir pour mes études et mes rêves .

A toutes la famille SAGOUMA et la famille BOURAADA

A mon amie yasmine linda

**CHAIMA**

## **REMERCIEMENT**

Tout d'abord, louange à « Allah » le tout généreux qui nous a guidé sur le droit chemin tout au long du travail et nous a inspiré. Sans sa miséricorde, ce travail n'aurait pas abouti.

Au terme de ce travail, nous tenons à exprimer toute notre reconnaissance et remerciements à notre chef d'option **Pr Saadi L.** professeur à l'université de Blida-1 qui a fait preuve d'une grande patience. Sa confiance, ses conseils ainsi que ses orientations nous ont permis de mener à terme ce projet. Qu'il trouve ici, le témoignage d'une profonde gratitude.

Nos vifs remerciements à **Mme ARKAM.F** assistante à l'université de Blida-1 et notre promotrice, pour avoir bien dirigé le travail merci pour tout madame

Nous remercions également **Mme BOUAZZA**, maître assistante à l'université de Blida-1, et **Mme MATMOURA** maître assistante à l'université de Blida-1 pour avoir accepté de juger notre travail et de l'apporter ses critiques constructives.

Nous tenons à exprimer notre affectueuse reconnaissance à **Mme DAHNAN H**, technicienne au niveau de laboratoire de biologie moléculaire et cellulaire à l'université de Blida -1 et nos collègues pendant son parcours pour son aide et ses précieux conseils pendant la partie expérimentale de son projet.

Notre profond respect et remerciement s'adresse aux membres du service d'anatomie pathologie, en particulier **Pr ABDELLALI M.**, qui nous a bien accueillis dans son service et **Kenza** et **Yasmine** qui nous ont aidés dans la réalisation des coupes et la coloration.

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

## **RESUME**

*Metarhizium anisopliae* var. *acridum* (Green Muscle®) est l'un des bio-insecticides les plus connus et utilisés dans le monde. Cependant, l'application généralisée peut favoriser l'apparition de mycoses chez les mammifères. Notre étude toxicologique cherche les effets nocifs probables du champignon entomopathogène chez un modèle animal.

Des rats Wistar femelles sont inoculées avec le biopesticide à raison de trois doses, 200, 20 et 10 mg /Kg/ jr. Après 15 jours de traitement par voie oral, la rate et l'intestin grêle sont prélevés pour l'examen histologique.

Les différents traitements n'ont aucun effet significatif sur la croissance pondérale relative des rattes. L'étude microscopique révèle des images de vasodilatation et infiltration leucocytaire. Les lésions tissulaires sont plus importante avec la forte dose (environ  $10^{10}$  spores /kg/jr) ; le parenchyme splénique révèle une fibrose, déplétion lymphocytaire et dégénérescence de quelques nodules spléniques. Les coupes iléales montrent l'extension dans la largeur du tissu lymphoïde associé à la muqueuse intestinale.

Nos résultats suggèrent l'effet immunogène et inflammatoire de notre souche fongique administrée à forte dose pendant deux semaines.

**Mots clés:** *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*, Green muscle, rats Wistar, rate, intestin.

## **ABSTRACT**

*Metarhizium anisopliae* var. *acidum* (Green Muscle®) is one of the world's most well known and used bioinsecticides. However, widespread application may promote mycosis in mammals. This toxicological study investigates the likely adverse effects of entomopathogenic fungus in an animal model.

Female Wistar rats were inoculated, by oral route with biopesticide at three doses, 200, 20 and 10 mg /Kg/ day. After 15 days of oral treatments, the spleen and small intestine are collected for histological examination.

Different treatments have no significant effect on the relative weight growth of rats compared to the control, optical microscope observations of histological cuts of treated rats showed multiple lesions such as vasodilatation and leukocyte infiltration. Tissue damages are greater with the high dose (about  $10^{10}$  spores/kg/day) the splenic parenchyma reveals fibrosis, lymphocyte depletion, fusion and degeneration of some splenic nodules. Ileal cuts show the alteration of the villi and the extension in the width of the lymphoid tissue associated with the intestinal mucosa.

Our results suggest the immunogenic and inflammatory effect of this fungal strain administered at high doses for two weeks.

**Keywords:** *Metarhizium anisopliae* var. *acidum*, Green muscle, Wistar rats, spleen, small intestine.

## المخلص

يعتبر *Metarhizium anisopliae* var. *acidum* (قرين ماسل®) واحد من المبيدات الحشرية الحيوية الأكثر شهرة واستخداما في العالم. إلا أن تطبيقه على نطاق واسع قد يعزز من ظهور عدوى الفطريات لدى الثدييات. تتطرق هذه الدراسة السمية للبحث عن الآثار الضارة المحتملة للفطر الممرض للحشرات لدى نموذج حيواني.

تمت معالجة إناث الجرذان ويستار، عن طريق الفم، باستخدام المبيد الحيوي بمعدل ثلاث جرعات، 200 و 20 و 10 ملغ / كلغ / يوم. و بعد 15 يوما يتم استئصال الطحال و المعى الدقيق من أجل الفحص النسيجي.

لا يوجد تأثير معتبر للمعالجات المختلفة على تطور الوزن الجسمي النسبي للجرذان، بالمقارنة مع الشاهد، تظهر الملاحظة، بالمجهر الضوئي، للمقاطع النسيجية لدى الجرذان المعالجة عن وجود تلف نسيجي متعدد مثل توسع الأوعية الدموية وتسلل الخلايا. والذي بدى أكثر حدةً مع الجرعة العالية (حوالي  $10^{10}$  أبواغ / كلغ / اليوم)، حيث أظهر نسيج الطحال وجود تليف، استنزاف للخلايا اللمفاوية، دمج و تنكس بعض عقيدات الطحال. تُظهر المقاطع على مستوى المعى اللفائفي امتدادا في عرض النسيج اللمفاوي المرتبط بمخاطية الأمعاء .

تشير نتائجنا إلى التأثير المناعي والالتهابي لهذه السلالة الفطرية المقدمة بجرعة عالية لمدة أسبوعي

**الكلمات المفتاحية :** *Metarhizium anisopliae* var. *acidum* ، قرين ماسل ، جرذان ، ويستار ، الطحال ، الأمعاء الدقيقة.

## Liste des abréviations

**GM** : green muscle .

**Pc** : poids corporel .

**PGPR** :Plant Growth Promoting Rhizobacteria

**NO** :oxyde nitrique .

**iNOS** : oxyde nitrique synthase inductible .

**ROS** : espèces réactives de l'oxygène .

**Tlr2** : Toll Like Receptor 2 .

**Tlr4** : Toll Like Receptor 4 .

**ADN** :acide désoxyribonucléique .

**TNF** : Tumor Necrosis Factor .



## Glossaire

**Pesticides** : ensemble de produits chimiques destinés à assurer la destruction ou à prévenir l'action d'animaux, végétaux ou microorganismes nuisibles : • Insecticides • Herbicides • Fongicides

**La lutte biologique** : est définie comme étant une stratégie de lutte contre les organismes nuisibles qui fait appel aux auxiliaires, antagonistes ou compétiteurs, insectes stériles ou autres agents de lutte biologiques (NIMP, 2005).

**La lutte intégrée** : est une stratégie de gestion à long terme des bio-agresseurs qui minimise les risques pour les populations, l'écosystème et l'environnement (Derauel et al., 2014).

**Atrophie** : diminution de volume d'une cellule, d'un tissu, d'un organe, survenant après la naissance (Jeuge-Maynard et al., 2010).

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

**Desquamation** : détachement des couches superficielles de l'épiderme sous forme de squames (Jeuge-Maynard et al., 2010).

**Dose létal 50** : c'est la dose capable de tuer 50% des animaux d'expérience (Moulin et Coquerel, 2002) .

**Hypertrophie** : augmentation de volume d'un tissu, d'un organe, due à une augmentation de volume de ses cellules (Jeuge-Maynard et al., 2010).

**Hyperplasie** : C'est l'augmentation du volume d'un tissu qui est un phénomène physiologique visant à réparer une perte tissulaire consécutive à une destruction.

**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 (Benserradj, 2014).

## Liste des tableaux

tableau	Titre	Page
I	Exemples de biopesticides commercialisés.	3
II	Evolution du poids corporel (PC) durant l'expérimentation et augmentation relative de PC chez les rats témoins et traités par GM.	25
III	Nombre de spores germés et non germés du test de germination	Annexe 1
IV	Evolution du poids corporels (PC) et augmentation relative du PC chez les rats WISTAR témoins et traités avec le biopesticide Green muscle (GM) pendant 15 jours par voie oral.	Annexe 2
V	Analyse de variance (ANOVA) relative à l'augmentation du poids corporel entre début et fin de l'expérimentation pour chaque lot de rats.	Annexe 2
VI	Analyse de la variance de l'augmentation relative des poids corporels chez les rats témoins et traités avec le green muscle.	Annexe 2
VII	Test de comparaison multiple du paramètre augmentation relative des poids corporels chez les rats témoins et traités avec le Green Muscle (d'après le test de Tukey).	Annexe 2
VIII	Définition des groupes homogènes du paramètre Augmentation relative du poids corporels chez les rats témoins et traités avec le Green muscle (d'après le test de Tukey).	Annexe 2

## Liste des figures

Figure	Titre	Page
<b>1</b>	Cycle biologique d'un champignon entomopathogène (Suty, 2010).	<b>8</b>
<b>2</b>	image d'acridiens infectés par <i>Metarhizium anisopliae</i> (fructification du champignon : la muscardine verte) (Bissaad, 2012), (Jiang et al., 2020), (Arkam, 2019) .	<b>9</b>
<b>3</b>	Conidies de <i>M. anisopliae</i> var. <i>acridum</i> , l'isolat IMI 330139 (Green Muscle®) (Arkam, 2019).	<b>10</b>
<b>4</b>	Schéma de la structure de plaque de Payer, tissus lymphoïde associé à la muqueuse de l'intestin grêle (Mowat et al., 2003).	<b>13</b>
<b>5</b>	système de filtration et constituant de de la rate (pulpe blanche, zone marginale et pulpe rouge).	<b>15</b>
<b>6</b>	Répartition des rats WISTAR femelles en lot (Original).	<b>19</b>
<b>7</b>	Pulvérisation de l'inoculum de traitement avec le Green muscle sur le bouchon alimentaire consommé par les rats (Originale).	<b>20</b>
<b>8</b>	Evolution de la masse corporelle (a) et augmentation relative de poids corporels (b) chez les rats témoins et traités par Green Muscle®	<b>25</b>
<b>9</b>	Structure du parenchyme splénique chez les rats témoins	<b>26</b>
<b>10</b>	Structure du parenchyme splénique chez les rattes traitées avec GM à 10 mg/kg/jr ou $5 \times 10^8$ spores /kg /jr (D3). Coloration : HE	<b>29</b>
<b>11</b>	Structure du parenchyme splénique chez les rats femelles traitées avec GM à 20	<b>31</b>

	mg/kg/jr ou 10 <sup>9</sup> spores /kg /jr (D2). Coloration : HE	
<b>12</b>	Structure du parenchyme splénique chez les rats femelles traitées avec 200 mg/kg/jr ou 10 <sup>10</sup> spores /kg /jr (D1). Coloration : HE	<b>33</b>
<b>13</b>	Structure de l'intestin grêle chez les rats femelles WISTAR témoins. Coloration : Trichrome de Masson	<b>35</b>
<b>14</b>	Structure de l'intestin grêle chez les rattes traitées avec GM à 10 mg/kg/jr ou 5×10 <sup>8</sup> spores /kg /jr (D3). Coloration : Trichrome de Masson	<b>37</b>
<b>15</b>	Structure de l'intestin grêle chez les rattes traitées avec GM à 20 mg/kg/jr ou 10 <sup>9</sup> spores /kg /jr (D2). Coloration : Trichrome de Masson	<b>39</b>
<b>16</b>	Structure de l'intestin grêle chez les rattes traitées avec GM à 200 mg/kg/jr ou 10 <sup>10</sup> spores /kg /jr (D1). Coloration : Trichrome de Masson	<b>41</b>
<b>17</b>	Le biopesticide Green Muscle (IMI 330139) (a), le manuel d'utilisateur (b) et la fiche technique (c) (Arkam, 2019).	<b>Annexe 1</b>
<b>18</b>	Dissection des rats et prélèvement des organes (Originale)	<b>Annexe 1</b>

## Sommaire

<b>Introduction</b> .....	<b>1</b>
<b>Chapitre I : recherche bibliographiques</b> .....	<b>3</b>
<b>I.1 GENERALITES SUR LES INSECTICIDES BIOLOGIQUES</b> .....	<b>3</b>
<b>I.1.1 Généralités sur les bioinsecticides d'origine microbiennes</b> .....	<b>4</b>
I.1.1.1. Principaux microorganismes à activité entomopathogène.....	4
I.1.1.2. Autres avantages des bioinsecticides d'origine microbienne.....	5
I.1.1.3. Les inconvénients des biopesticides.....	6
<b>I.1.2 Généralités sur <i>Metarhizium anisopliae</i></b> .....	<b>6</b>
I.1.2.1. classification .....	6
I.1.2.2 Mode d'infection à <i>Metarhizium acridum</i> de l'insecte hôte.....	7
I.1.2.3. Généralités sur le développement du biopesticide Green Muscle ®.....	9
<b>I.2 MODULATION DE LA REPONSE IMMUNITAIRE CHEZ LES MAMMIFERES VIS- A-VIS DES AGENTS FONGIQUES DE BIOCONTROLE</b> .....	<b>10</b>
I.2.1 Revue de la littérature sur les cas d'infections à <i>Metarhizium spp.</i> .....	10
I.2.2 la La réponse des mammifères à des infections induites par des mycopesticides .....	11
<b>I.3 GENERALITES SUR CERTAINS TISSUS LYMPHOÏDES SECONDAIRES CHEZ LES MAMMIFERES</b> .....	<b>12</b>
I.3.1 Les tissus lymphoïdes associés à l'intestin.....	12
I.3.2 Structure et fonctions de la rate .....	13

<b>CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES</b> .....	16
<b>II.1.MATERIEL</b> .....	16
II.1.1.Matériel animal.....	17
II.1.2.Matériel technique.....	17
II.1.3.Le biopesticide Green muscle .....	17
<b>II.2.METHODES</b> .....	18
<b>II.2.1. Elevage des animaux</b> .....	18
<b>II.2.2.Expérimentation</b> .....	19
<b>II.2.2.1. Réalisation de l'inoculation des rats femelles Wistar</b> .....	19
<b>II.2.2.2. Le suivis des rats durant la période de l'expérimentation</b> .....	21
<b>II.2.2.3. Sacrifice des animaux et prélèvement des échantillons</b> .....	21
<b>II.2.2.4. Etude histologique</b> .....	21
<b>II.2.2.5. Etude statistique</b> .....	23
<b>ChapitreIII :résultats et discussion</b> .....	24
<b>III.1 Résultats</b> .....	24
III.1.1 comportement .....	24
III.1.2 Evolution du poids corporel.....	24
III.1.3 Etude histologique.....	26
<b>III.2 Discussion</b> .....	42
<b>Conclusion et perspectives</b> .....	45
<b>Références bibliographiques</b> .....	48
<b>Annexes</b> .....	55

# INTRODUCTION

L'utilisation intensive des pesticides chimiques améliore le rendement agricole; Cependant, cette pratique continue a apporté les effets néfastes sur la santé humaine, animale et les insectes bénéfiques, en particulier les abeilles. De plus, l'exposition continue aux insecticides favorise l'expression des mécanismes de résistance. Ce phénomène développé de plus en plus chez les insectes ravageurs est une nuisance pour la production agricole (Moutang et *al.*, 2020).

Les effets nocifs potentiels de l'exposition aux pesticides ont soulevé la considération de méthodes alternatives. Il y'a plus de cinquante ans, les insecticides biologiques tels que les pesticides microbiens ont reçu une attention particulière en tant qu'alternatives plus sûres pour l'environnement (Abbasi Larki et *al.*, 2019).

La lutte biologique par l'utilisation du champignon entomopathogène *Metarhizium anisopliae* var. *acidum* est une alternative très prometteuse pour assurer une protection phytosanitaire performante (Arkam, 2019).

Le projet LUBILOSA (Lutte biologique contre les Locustes et les Sauteriaux) a sélectionné l'isolat IMI 330189 de *M. anisopliae* var. *acidum* Gams & Rozsypal (Deuteromycotina : Hyphomycetes) comme étant la matière active de Green Muscle® (LUBILOSA, 1999). En conditions naturelles, ce mycopesticide infecte presque exclusivement les orthoptères aux antennes courtes et est développé pour la protection des culture contre les locustes (Jiang et *al.*, 2019).

L'activité fongique de Green Muscle® a montré son efficacité en plein champs, sur les larves de criquet marocain au Nord-Ouest de l'Algérie, et a confirmé les potentialités acridicides de *Metarhizium anisopliae* var. *acidum* qui exerce des effets cytopathologique au niveau du tégument (Arkam, et *al.*, 2017-a), de l'hémolymphe (Arkam, et *al.*, 2017-b) et du tube digestif (Arkam, et *al.*, 2019).

Les études de la biosécurité des variétés de *M. anisopliae* chez les mammifères sont conduites par plusieurs auteurs (Siegel, 1997; Goettel et Jaronski, 1997; Goettel et al.,2001 ; Vestergaard et *al.*, 2003). Des exérimentations de toxicité sont faites sur différents modèles animales par différentes voies d'expositions. Les données rapportées soulignent l'innocuité de *M. anisopliae* avec des risques de toxicité minimales et acceptables dans l'environnement (Zimmermann, 2007 ; Goodman et *al.*, 2018 ; Brunner-Mendoza et *al.*, 2005).

L'exposition orale aux pesticides microbiens est l'une des principales voies d'exposition humaine et animale en raison de l'application de ces produits dans les cultures agricoles. Bien

entendu, l'exposition humaine lors de la fabrication de biopesticide est inévitable. En revanche, il existe des inquiétudes concernant les effets probables sur la santé des vertébrés (Abbasi Larki et *al.*, 2019).

L'exposition accrue des humains et des animaux au *Metarhizium spp.* en raison de l'utilisation commerciale, du nombre croissant des personnes immunodéprimées et le recours aux thérapies immunosuppressives ont créé un scénario qui pourrait favoriser une augmentation du nombre de mycoses causées (Roberts et St Leger, 2004 ; Nourrisson et *al.*, 2017 ; Brancini et *al.*, 2018).

Dans le but de mieux métriser l'application du biopesticide Green Muscle® à une échelle garantissant la biosécurité humaine et environnementale, des études toxicologiques sont indispensables.

Cette étude a comme objectif d'enquêter sur de probables effets néfastes des conidies de *M. anisopliae* var. *acridum* conditionnées en biopesticide. Nous cherchons l'inflammation splénique et intestinale chez les rats WISTAR femelles. Ces dernières sont traitées avec le Green Muscle® par voie orale pendant 15 jours, à raison de trois concentrations, 200 mg /kg de poids corporel /jour, 20 mg /kg /jour et 10 mg/ kg /jour.

Notre travail comporte trois chapitres. Dans le premier, nous rapportons des généralités sur les insecticides microbiens, l'immunotoxicité des mammifères exposés à des champignons de biocontrôle et les tissus lymphoïdes étudiés. Le deuxième chapitre comporte les matériels et les techniques utilisés. Les résultats obtenus sont rapportés et discutés dans le troisième chapitre. Une conclusion et des perspectives sont présentées.



## I.1. GENERALITES SUR LES INSECTICIDES BIOLOGIQUES

Les biopesticides sont à base d'organismes vivants (microorganismes, protozoaires, nématodes entomophages..) ou de produits issus d'organismes vivants (Métabolites bactériens; phéromones d'insectes; substances naturelles dérivés de plantes), ayant la particularité de tuer ou délimiter la densité des ravageurs de cultures (Thakore, 2006; Deravel et *al.*, 2014).

**Tableau 1 : Exemples de biopesticides commercialisés** (Deravel et *al.*, 2014 -modifié).

	Catégorie	Type	Organisme	Produit commercial	Cible
microbiens	Bactérie	Fongicide	<i>Bacillus subtilis</i> QST713	Serenade®	<i>Botrytis</i> spp.
		Fongicide	<i>Bacillus subtilis</i>	HiStick®	<i>Fusarium</i> , <i>Rhizoctonia</i> , <i>Aspergillus</i>
		Fongicide	<i>Bacillus licheniformis</i> SB 3086	EcoGuard®	<i>Sclerotinia</i> spp., anthracnose
		Fongicide	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Taegro®	<i>Rhizoctonia</i> , <i>Fusarium</i>
		Fongicide	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> MA342	Cerall®	<i>Tilletia caries</i> , <i>Fusarium nivale</i> , <i>Septoria nodorum</i>
		Insecticide	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Rona Eco®	Chenille, larves de lépidoptères
		Insecticide	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Biobit®DF	Lépidoptères
	Virus	Insecticide	<i>Cydia pomonella granulosis</i> virus	Carpovirusine®	Carpocapse ( <i>Cydia pomonella</i> )
		Larvicide	<i>Helicoverpa zea</i> HzSNPV	Gemstar®	<i>Heliothis</i> et <i>Helicoverpa</i> larva
		Larvicide	<i>Spodoptera exigua nucleopolyhedrosis</i> virus	SpodX®	Larves de <i>Spodoptera exigua</i>
Champignon	Fongicide	<i>Coniothyrium constans</i>	Constans® WG	<i>Sclerotinia</i> spp.	
	Fongicide	<i>Trichoderma atroviride</i>	Esquive® WG	<i>Eutypa lata</i>	
	Nématocide	<i>Paecilomyces lilacinus</i>	BioAct® WG	<i>Meloidgyne</i> spp., <i>Rodopholus similis</i> , <i>Heterodera</i> spp., <i>Globodera</i> spp., <i>Protylechus</i> spp.	
	Insecticide	<i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acidum</i> (IMI 330189)	Green Muscle®	Criquets Locustes et sautereaux	
végétaux	Extrait végétal	Insecticide	<i>Chrysanthemum cinerariaefolium</i>	Trounce®	Pucerons, cochenilles, aleurodes
		Insecticide	<i>Quassia amara</i>	Quassam®	<i>Hoplocampa testudinea</i>
		Insecticide	<i>Azadirachta indica</i>	TotalCare®	± 400 espèces d'insectes ravageurs
		Insecticide	<i>Brassica napus</i>	VegOil®	Pucerons et acariens
Biopesticides animaux	Insectes	Insecticide	Acariens	Bioline®	Insectes, ravageurs
		Insecticide	Coccinelle	Adaline b®	Pucerons
	Semio-chimiques issus d'insectes	Lutte par confusion sexuelle	Phéromones naturelles de <i>Cydia pomonella</i>	Ginko®	<i>Cydia pomonella</i>
Nématodes	Anti limace	Nématodes entomopathogènes	Bioslug®	<i>Derocecas reticulatum</i> , <i>Arion distinctus</i>	

Les produits considérés comme des biopesticides par les agences de réglementation européennes et mondiales sont d'origines diverses. Ils peuvent être classés en trois grandes catégories, selon leur nature: les biopesticides microbiens, les biopesticides végétaux et les biopesticides animaux (Chandler et *al.*, 2011; Leng et *al.*, 2011) (**Tableau 1**).

### **I.1.1. Généralités sur les bioinsecticides d'origine microbienne**

Les microorganismes entomopathogènes peuvent être des espèces de bactéries, champignons, protozoaires et de virus et rickettsies (Senthil-Nathan, 2015). L'efficacité de l'activité insecticide d'un nombre important d'entre eux repose sur des substances actives dérivées ces microorganismes. Ce sont, ces substances actives qui agissent contre le bioagresseur plutôt que le micro-organisme lui-même (Deravel et *al.*, 2014).

#### **I.1.1.1. Principaux microorganismes à activité entomopathogène**

##### **a- Bioinsecticides à base de souches bactériennes**

Les espèces entomopathogènes appartiennent aux familles des: *Bacilliaceae*, *Pseudomonaceae* et *Enterobacteriaceae*.

Les insecticides à base de *Bacillus thuringiensis* sont les plus commercialisés contre les lépidoptères, les diptères et les larves de coléoptères. *Bacillus T.* est une bactérie Gram+ produit des protéines cristallines qui sont libérées dans l'environnement après la lyse des parois bactériennes lors de la phase de sporulation. Ces protéines sont actives, une fois ingérées par les ravageurs (Rosas-Garcia, 2009).

En lutte biologique, *Bacillus subtilis* est utilisé comme insecticide, bactéricide et biofongicide dans l'agriculture (Greathead et *al.*, 1994).

##### **b- Bioinsecticides à base de virus et les rickettsies**

Les virus et les rickettsies entomopathogènes sont représentés surtout par : *Melanoplus* et *Rickettsiella* (Keith et Kevan, 1992).

Les Baculoviridae sont des virus qui infectent les arthropodes insectes ou larves. Aucun virus similaire n'a, à l'heure actuelle, été répertorié dans l'infection des vertébrés ou des plantes (Chen et *al.*, 2002).

Les nucleopolyhedrovirus infectent les larves de lépidoptères selon un mode atypique. Les tissus meurent et se liquéfient. Cette liquéfaction, caractéristique des maladies provoquées par une infection aux

nucleopolyhedrovirus, libère des millions de formes de virions incluses qui infectent les nouveaux hôtes (Washburn et *al.*, 2003).

#### **c- Bioinsecticides à base de protozoaires**

Les protozoaires entomopathogènes sont représentés par les familles *Amoebidae*, *Nosematidae*, *Neogrageridae* et *Cugregarinidae*. Selon Keith et Kevan, (1992), *Nosema locustae* peut infecter les espèces de criquet *Locusta migratoria* et *Schistocerca gregaria*.

#### **d- Bioinsecticides à base de souches fongiques**

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 entomopathogènes. 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.1.1.2. Autres avantages des bioinsecticides d'origine microbienne**

Certains insecticides microbiens présentent des bénéfices supplémentaires à leur rôle de lutte à faible risque sanitaire vis-à-vis des organismes non cibles.

la lutte biologique fongique présente de nombreux avantages, ces agents peuvent survivre et se reproduire dans l'environnement (Hansen et *al.*, 2010; Luangsa-Ard et *al.*, 2011). Les champignons du genre *Trichoderma* ont la particularité de faciliter l'absorption d'éléments nutritifs du sol par les plantes (Harman, 2011).

Dans certains produits commercialisés, les molécules bioactives emploient plusieurs modes d'action, ce qui les rend particulièrement intéressantes pour limiter l'apparition de bio-agresseurs résistants. Ainsi, les lipopeptides cycliques produits par les bactéries du genre *Bacillus* peuvent, à la fois, faciliter la colonisation de l'environnement par le micro-organisme producteur (surfactines et

iturines), avoir une activité antifongique directe (iturines et fengycines) et induire les mécanismes de défense des plantes (surfactines, fengycines) (Ongena *et al.*, 2008).

La plupart des bactéries genre *Bacillus* commercialisées en biopesticides font partie du groupe des PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) qui favorise la croissance et augmente le rendement des cultures agricoles (Deravel *et al.*, 2014).

Les souches de *Bacillus* sont capables de coloniser les racines des plantes et produire des molécules qui peuvent soit activer les défenses des plantes, soit avoir un effet antibactérien ou antifongique direct (Pérez-Garcia *et al.*, 2011).

### **I.1.1.3. Les inconvénients des biopesticides**

Certains des avantages écologiques des biopesticides, leur faible rémanence dans le sol ou le fait qu'un produit soit actif contre un faible spectre d'espèces nuisibles, peuvent être considérés comme des inconvénients. En effet, ces deux avantages combinés à leur activité dépendante des conditions environnementales et climatiques rendent les biopesticides moins efficaces et leurs action est plus lente que leurs homologues chimiques (Popp *et al.*, 2013).

Malgré ces désavantages, les biopesticides sont l'objet d'un intérêt croissant de la part des exploitants, notamment dans le cadre de la lutte intégrée. Cette dernière est une stratégie de gestion à long terme des bio-agresseurs qui minimise les risques pour les populations, l'écosystème et l'environnement. (Deravel *et al.*, 2014).

### **I.1.2. Généralités sur *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.1.2.1. Classification**

*Metarhizium* est un genre de champignons entomopathogènes qui a été initialement classé en trois espèces et variétés. Plus récemment, le séquençage de l'ADN a amélioré la résolution

phylogénétique de *Metarhizium* qui comprend désormais 30 espèces (Brunner-Mendoza et al., 2019). D'après Bidochka et al., (2015), la classification de *M. anisopliae* var. *acridum* est la suivante :

**Règne : Fungi**

**Embranchement : Dikarya**

**Sous-embranchement : Ascomycota**

**Classe : Pezizomycotina**

**Ordre : Hypocreales**

**Famille : Clavicipitaceae**

**Genre: *Metarhizium***

**Espèce : *Metarhizium anisopliae***

### **I.1.2.2 .Mode d'infection à *Metarhizium acridum* de l'insecte hôte**

Le mode d'infection des champignons entomopathogènes se divise en quatre étapes distinctes qui sont l'adhésion, la germination, la pénétration et la dissémination (Bissaad et al., 2012 ; Brunner-Mendoza et al., 2019) (**Figure 1**).

#### **a- Les processus tégumentaires**

Les spores de *M. anisopliae* var. *acridum* se fixe sur la cuticule de l'insecte principalement par les protéines andésines. Les spores germent et émettent un tube germinatif qui s'allonge et forme un hyphe. Les hyphes sortant pénètrent dans la cuticule à l'aide des enzymes (protéases et chitineuses) (Bissaad et al., 2012 ; Brunner-Mendoza et al., 2019).

Des altérations histopathologiques du tégument du criquet marocain sont apparues dès le 3e jour après traitement avec *Metarhizium acridum*, une disparition complète de l'épicuticule et une nette diminution dans l'épaisseur de l'exocuticule et de l'endocuticule. L'unité infectieuse du champignon entomopathogène, la spore, a été repérée dans les parties de la cuticule digérée (Arkam et al., 2017-a).

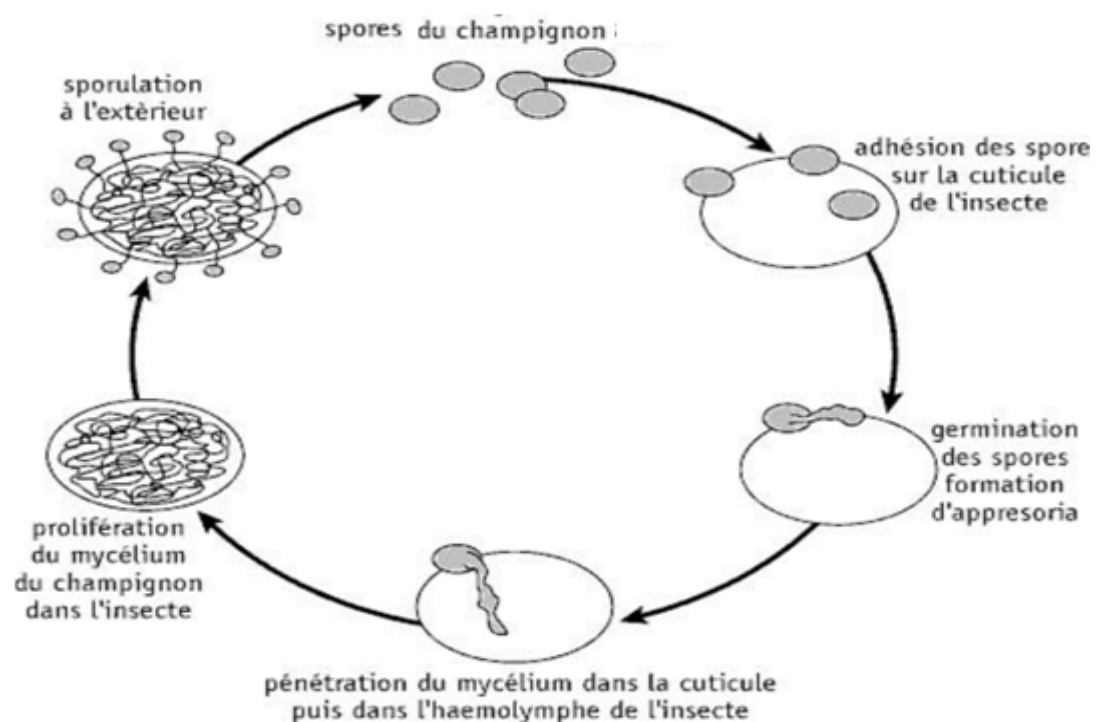
#### **b- Les processus intrahémocoéliens**

Le champignon parvient à surmonter les mécanismes immunitaires de défense de l'insecte hôte et envahit l'hémolymphe, suivis par la multiplication dans l'hémocoèle et exerce un effet cytopathologique sur les hémocytes (Arkam et al., 2017-b et Kilic et al., 2019)

#### **c- Les processus intratissulaires**

La colonisation de l'hôte peut être facilitée d'une part avec une rapide reproduction et formation de mycélium par le champignon qui se développe dans tous le corps. Et d'autre part, suite à une forte production des métabolites secondaires ou des toxines tels que les destruxines (Zimmermann, 2007 ; Benserradj 2014 ; Brunner-Mendoza et al., 2019).

*Metarhizium* cause la destruction des tissus et attaque le tube digestif. Le mésentéron et les cæca gastriques sont les plus endommagés par l'altération de l'architecture épithéliale et la présence des signes typiques de nécrose et d'ulcération des muqueuses. *Metarhizium* exerce une cytotoxicité intestinale progressive à l'origine de la réduction de la voracité et de l'activité et la paralysé avant la mort des criquets quelques jours après infection (Arkam et al., 2019).



**Figure 1** : Cycle biologique d'un champignon entomopathogène (Suty, 2010).

#### a- La propagation de l'infection fongique

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 2**). Les spores se disséminent peu à peu dans le sol et infectent les nouveaux hôtes causant ainsi une épidémie parmi les larves de criquet (Arkam, 2017-a).



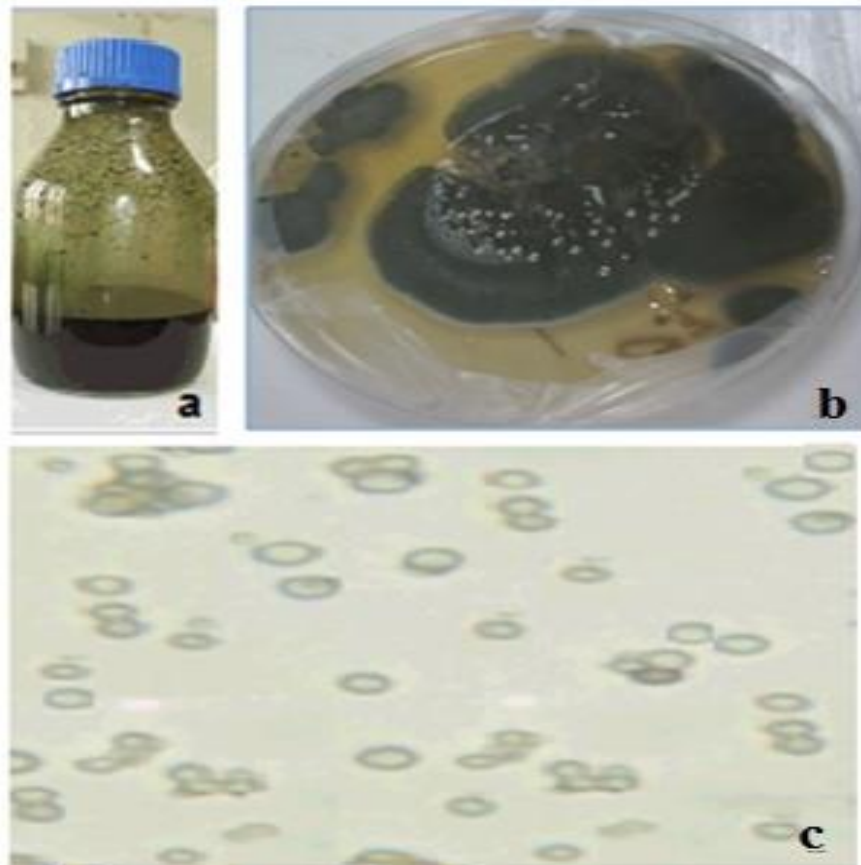
**Figure 2 :** image d'acridiens infectés par *Metarhizium anisopliae* (fructification du champignon : la muscardine verte)

**a :**Adulte de *Locusta migratoria* (Bissaad, 2012), **b:** Larve de *L.migratoria*. (Jiang et *al.*, 2020), **c et d:** Larve de *D. maroccanus* (Arkam, 2019) .

### **I.1.2.3. Généralités sur le développement du biopesticide Green Muscle ®**

Il s'est avéré également que *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* était presque toujours la souche la plus virulente pour les sauteriaux et les criquets, (DOUTHWAITE et *al.*, 2001 ; BIOCONTROLE, 2007). Les propriétés biologiques et physiques de ce champignon ont donc fait de lui le candidat idéal. C'est ainsi que LUBILOSA « Lutte Biologique contre les Locustes et les Sautereaux » a développé un bio pesticide sous le nom de «Green Muscle ®» à base de formulation huileuse de spores de cet entomopathogène (**Figure 3**). Ce produit est homologué en Afrique du Sud, dans plusieurs pays ouest africains et au Soudan (LOMER et *al.*, 1999 ; BIOCONTROLE, 2007).





**Figure 3 : Conidies de *M. anisopliae* var. *acridum*, l'isolat IMI 330139 (Green Muscle®) (Arkam, 2019). a : en suspension huileuse, b : Aspect macroscopique du champignon sur le milieu de culture. c : observation sous microscopie optique, Gr : 1000**

## **I.2 MODULATION DE LA REPOSE IMMUNITAIRE CHEZ LES MAMMIFERES VIS-A-VIS DES AGENTS FONGIQUES DE BIOCONTROLE**

### **I.2.1. Revue de la littérature sur les cas d'infections à *Metarhizium* spp.**

Une série d'études (Goettel et *al.*, 1997; Barbieri et *al.*, 2005; Instanes et *al.*, 2006, Ward et *al.*, 2011) a démontré que l'extrait allergénique brut de *M. anisopliae* contient des composants qui induisent chez les animaux de laboratoires, des réponses immunologiques, inflammatoires et histopathologiques caractéristiques de l'allergie.



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*. Un autre cas a impliqué un chat atteint de rhinite envahissante due aux *M. anisopliae* de (Muir et al., 1998).

En raison de l'application généralisée de *M. anisopliae* au Brésil pour le contrôle biologique des ravageurs de canne à sucre, plusieurs personnes ont développé des symptômes asthmatiques, d'où la possibilité pour ce champignon d'être l'agent étiologique de l'asthme bronchique (Barbieri et al., 2005). Des cas d'infections humaines à *Metarhizium* spp. sont rapportés. Une kératite est signalé chez un homme immunocompétent (Cepero de Garcia et al 1997), et deux cas de sinusite (Revankar et al, 1999). 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).

Nourrisson et al. (2017) a signalé huit nouveaux cas d'infection dus au *Metarhizium* chez l'homme. Les souches isolées de ces huit cas et trois d'autres cas, qui avaient déjà été publiés et déclarés, ont l'identification moléculaire comme *M. robertsii* (six), *M. guizhouense* (trois), *M. brunneum* (un) et *M. pingshaense* (un). Dans aucun de ces cas, la mycose n'a été associée à l'utilisation de *Metarhizium* comme bioinsecticide.

### **I.2.2. La réponse des mammifères à des infections induites par des mycopesticides**

Des modèles expérimentaux avec des rongeurs sont utilisés pour mesurer les effets potentiels tels que l'allergénicité, la toxicité, l'infectiosité et la pathogénicité, afin d'évaluer la sécurité des biofongicides (EPA, 1996 ).

L'exposition accrue aux spores et aux mycotoxines des espèces *Cladosporium* affecte les cellules alvéolaires de type II, les macrophages et la production et la composition des surfactants pulmonaires (Kuhn et Ghannoum, 2003). L'exposition de cellules humaines aux extraits de *Cladosporium* in vitro induit la migration des cytokines des cellules T helper Th1 et Th2 et des éosinophiles (Shin et al., 2004).

Quelques études ont démontré que les agents fongiques de lutte biologique peuvent altérer l'homéostasie du système immunitaire par modulation négative:

D'après une étude est réalisée par Alves-Filho et *al.*, (2011) pour voir la modulation immunitaire, des souris exposées à des spores intranasales du champignon *Trichoderma stromaticum* utilisées dans des dosages *ex vivo* pour les mesures de cytokines, ont révélé une diminution des taux d'IL-10 et d'IFN- $\gamma$  dans le liquide de lavage bronchoalvéolaire et les cultures de splénocytes

Les phagocytes obtenus à partir de souris traitées au thioglycolate, exposées à des spores de *T. stromaticum in vitro* ont montré une production régulée à la baisse d'oxyde nitrique (NO) par l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS) et les espèces réactives de l'oxygène (ROS) par les neutrophiles. En outre, les deux types de cellules présentent une expression diminuée du gène *Clec7a* qui code le récepteur Dectin-1, TollLikeReceptor 2 (*Tlr2*) et Toll Like Receptor 4 (*Tlr4*).

Ces expériences *in vitro* et *in vivo* menés avec *T. stromaticum* ont suggéré une éventuelle modulation négative principalement des composants cellulaires du système immunitaire inné

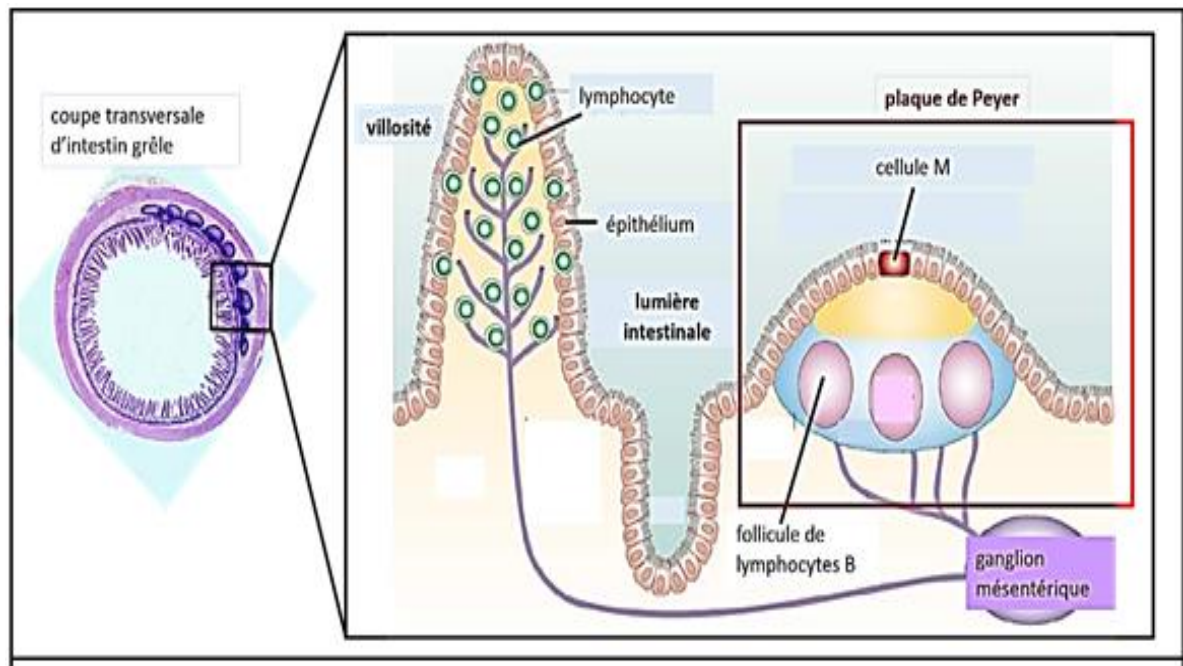
### **I.3. GENERALITES SUR CERTAINS TISSUS LYMPHOÏDES SECONDAIRES CHEZ LES MAMMIFERES**

#### **I.3.1. Les tissus lymphoïdes associés à l'intestin**

Parmi les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses (MALT), les tissus lymphoïdes associés à l'intestin comprennent, outre les amygdales, les tissus adénoïdes et l'appendice, des structures spécialisées appelées les plaques de Peyer (**Figure 4**) située dans la partie terminale de l'intestin grêle (l'iléon).

Les plaques de Payer ont une grande importance. Elles contiennent des cellules épithéliales spécialisées dans la capture des antigènes du système digestif. L'antigène pénètre à travers un épithélium spécialisé formé de cellule M. La masse du tissu lymphoïde est formée de cellule B organisées en follicules formant un dôme sous la couche des cellules M et entouré par une couronne de cellules T. Le follicule de cellules B est très active et

comporte un centre germinatif (Petr et *al.*, 2008).



**Figure 4** : Schéma de la structure de plaque de Peyer, tissu lymphoïde associé à la muqueuse de l'intestin grêle (Mowat et *al.*, 2003).

#### I.4.1. Structure et fonctions de la rate

La rate (**Figure 5**) est l'organe lymphoïde secondaire le plus volumineux de l'organisme. Elle est située dans la partie supérieure gauche de l'abdomen (Stevens et Lowe, 1997). L'artère splénique et drainée par la veine splénique dans le système porte hépatique (Wheater et *al.*, 2004).

La rate possède deux constituants principaux dont les fonctions sont déférentes: la pulpe rouge et la pulpe blanche et une zone marginale intermédiaire (Kierszenbaum, 2006).

❖ **La pulpe blanche** : correspond au tissu lymphoïde. Elle est située pour l'essentiel autour d'une artériole centrale, constitués d'une trame de fibres réticulaires anastomosées et comporte une zone T et une zone B.

- La gaine ou manchon lymphoïde périartériolaire riche en lymphocyte T.
- Le corpuscule de Malpighi correspond à un amas de lymphocytes, essentiellement de LB, organisées en structures nodulaires constituants soit en follicules primaires non stimulés soit en follicules secondaires stimulés. Ces derniers présentent un centre germinatif contenant

essentiellement des lymphocytes B et T activateurs et des cellules réticulaires dendritiques pour la capture et rétention des antigènes et complexes immuns (Kouassi, 2003).

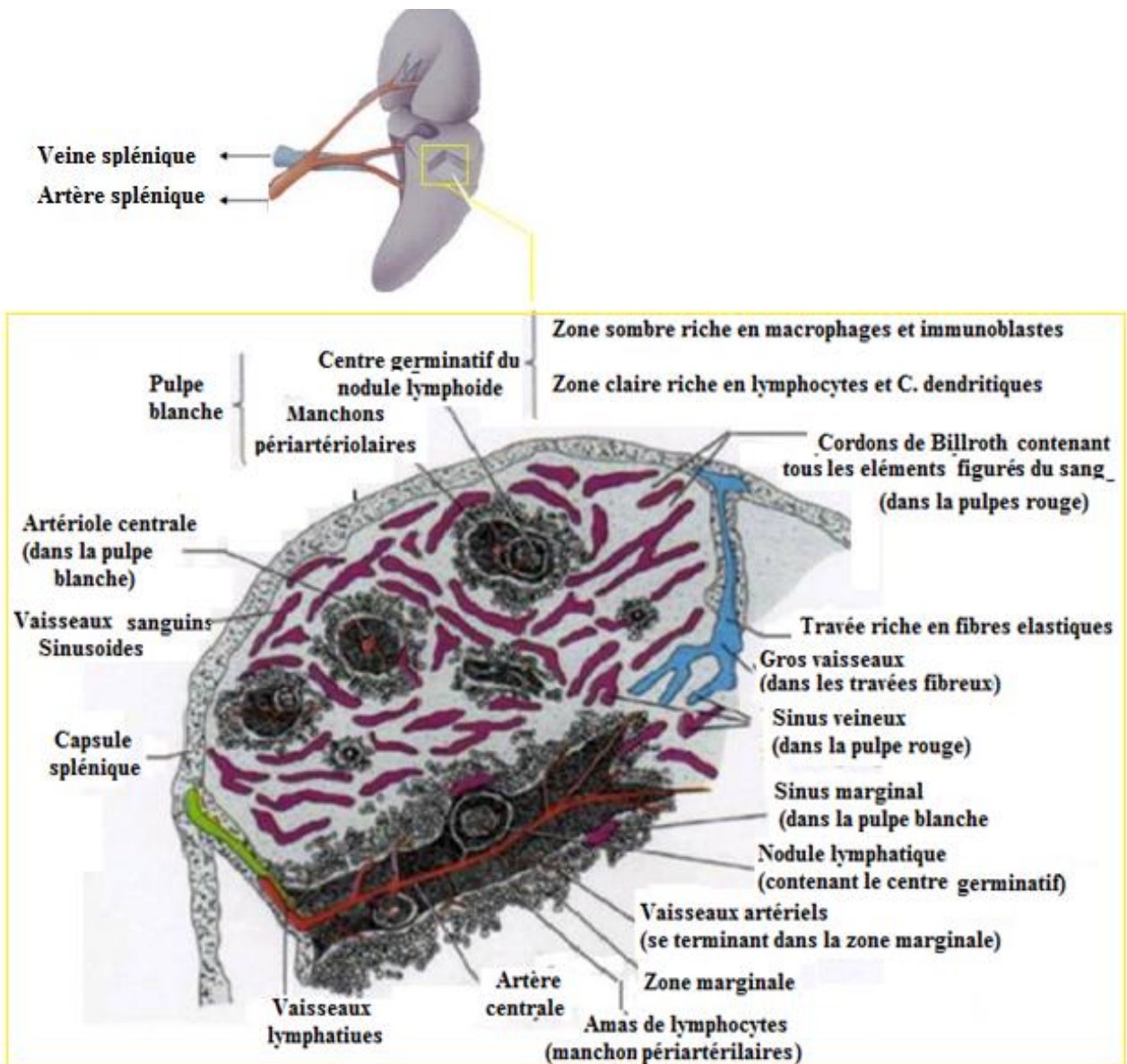
❖ **La pulpe rouge** : formé d'un réseau de fibres de réticuline et d'un réseau anastomotique de sinus veineux séparés par des cordons de Billroth. Ces derniers incluant de très nombreux macrophages, lymphocytes, des plasmocytes, des granulocytes, et des hématies.

❖ **La zone marginale**: en périphérie de la pulpe blanche, mal individualisée morphologiquement, le réseau fibrillaire réticulé se renforce, contenant un grand nombre d'histiocytes et de macrophage, comportant un stroma de type hématopoïétiques et une vascularisation complexe (Dadoune, 1998) .

- Fonction de la rate

Pendant la vie fœtale, la rate forme le site de l'hématopoïèse qui disparaît vers le septième mois de la gestation.

A l'âge adulte, la rate est un filtre placé en dérivation sur la circulation. La pulpe blanche assure l'épuration antigénique du sang et la production des réponses immunologiques spécifiques. La pulpe rouge assure le stockage des globules rouges et des plaquette et élimine de la circulation des cellules sanguines âgées ou anormales (destruction par les macrophages spléniques) en particulier les hématies. Le fer et d'autres substances utiles pour l'hématopoïèse sont récupérés. La zone marginale est le lieu principale de capture des antigènes par les macrophages (Dadoune, 1998)



**Figure 5** : système de filtration et constituant de de la rate (pulpe blanche, zone marginale et pulpe rouge). (Osorio S, De et al.,(2007))

Notre travail est une contribution à l'étude de la biosécurité expérimentale du mycopesticide Green Muscle® (GM), développé à bases des conidies du champignon entomopathogène *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*.

Les rats Wistar femelles sont traités par voie orale pendant 15 jours, à raison de trois concentrations, 10 mg de GM /kg de poids corporel /jour, 20 mg /kg /jr et 200 mg/ kg /jr.

Notre étude est basée sur l'évaluation des effets du biopesticide sur le poids corporel des animaux. La rate et l'intestin grêle font l'objet d'une étude histopathologique.

L'élevage et le traitement des rats ont été menées conformément aux normes établies par l'Organisation de Coopération et de Développement Economiques, Guideline-407, adopté le 3 octobre 2008. Et par la Comité d'Ethique de l'Université de Blida1 et à la législation Algérienne de la protection des animaux d'expérimentation utilisées à des fins scientifiques [loi n°12-235 /2012 ; Décret exécutif n° 10-90].

- L'expérimentation animale a été réalisée au niveau de la station expérimentale de la Faculté SNV à l'Université Blida-1 durant la période de septembre - octobre 2018.
- La préparation des doses de traitement et la dissection des animaux sont réalisés au niveau du laboratoire de recherche, Biotechnologies, Environnement et Santé, Université de Blida1.
- La technique histologique a été réalisée au laboratoire d'histologie au service de Cytologie à l'Hôpital Nafissa Hamoud d'Alger durant le mois de février 2020.
- L'observation microscopique et l'étude histopathologique des photomicrographies sont réalisé au laboratoire des projets de fin d'étude de la Faculté SNV à l'Université Blida-1

## II.1.MATERIEL

### II.1.1. Matériel animal

Notre étude a été menée sur un échantillon de 20 rats femelles adultes de souche *Rattus norvegicus* Wistar, acquièrent de l'animalerie de l'institut pasteur de Kouba- Alger. Le poids corporels moyen des animaux est de **162,4 g ± 25**.



### II.1.2. Matériel technique

L'ensemble des appareillages, verreries, solutions et des réactifs utilisés pour l'expérimentation et l'étude histologique sont présentés dans l'**annexe 1**.

### II.1.3. Le biopesticide Green muscle

Green muscle® (IMI 330189), biopesticide en forme de poudre sèche de spores (conidies), de couleur verte foncée contenant environ  $5 \times 10^{10}$  conidies /g (**image du biopesticide, voir l'annexe 1**).

Le produit est fourni par l'Institut National de Protection des Végétaux (INPV) d'El-Harrach-Alger. (**Fiche technique, voir annexe 1**).

Pour évaluer la viabilité des conidies avant l'expérimentation, nous avons réalisé un test de germination décrit par Atheimine et *al.* (2014). Le taux de viabilité des conidies est considéré important, le taux de germination des spores après mise en culture est obtenu à 90, 18%. (**Test de germination, voir annexe 1**).

- Préparation des formulations de traitement avec *M. anisopliae*

Chez les rats Wistar, la dose létale 50 du biopesticide Green muscle® (DL50 GM) est supérieure à 2 g de matière active en spores /kg de poids corporel (PC) (Zimmerman, 2007).

DL 50 (GM) > **2g de spores** d'où **DL50 (GM) >  $10^{11}$**  conidies de *M. anisopliae* /kg de PC de rat (car 1g  $5 \times 10^{10}$  conidies /g).

Les trois doses testées D1, D2 et D3 sont les suivantes :

**DL 50 (GM) > 2000 mg** de spores de **spores contenues dans GM** d'où

**1/10 DL50 > 200 mg de GM /Kg de PC (D1)** contenant environ  $10^{10}$  spores de *M. anisopliae*

**1/100 DL50 > 20 mg de GM /Kg de PC (D2)** contenant environ  $10^9$  spores de *M. anisopliae*

**1/200 DL50 > 10 mg GM/Kg de PC (D3)** contenant environ  $5 \times 10^8$  spores de *M. anisopliae*

Ces doses sont calculées comme suit :

- Calcul de la première dose D1

Recherche de la concentration en spores contenue dans 200 mg de GM

$$1000 \text{ mg GM} \longrightarrow 5 \times 10^{10} \text{ spores} \quad 5 \times 10^{10} \times 200$$

$$D_1 = \frac{\quad}{1000} = 10^{10} \text{ spores}$$

$$200 \text{ mg} \longrightarrow D_1$$

**D1 = 200 mg de GM /Kg de PC correspond à environ  $10^{10}$  spores de *M. anisoplie* /kg /jr**

➤ Calcul de la deuxième dose

Recherche de la concentration en spores contenue dans 20 mg de GM

$$1000 \text{ mg GM} \longrightarrow 5 \times 10^{10} \text{ spores} \quad 5 \times 10^{10} \times 20$$

$$20 \text{ mg} \longrightarrow D_2 \quad 1000$$

$$D_2 = \frac{5 \times 10^{10} \times 20}{1000} = 10^9 \text{ spores}$$

**D2 = 20 mg de GM /Kg de PC correspond à environ 10<sup>9</sup> spores de *M. anisoplie* /kg /jr**

➤ Calcul de la troisième dose

Recherche de la concentration en spores contenue dans 10 mg de GM

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

$$10 \text{ mg} \longrightarrow D_3 \quad 1000$$

$$D_3 = \frac{5 \times 10^{10} \times 10}{1000} = 5 \times 10^8 \text{ spores}$$

**D3 = 10 mg de GM /Kg de PC correspond à environ 5x 10<sup>8</sup> spores de *M. anisoplie* /kg /jr**

Le biopesticide Green muscle utilisé présente une formulation huileuse« OF » c'est-à-dire que les conidies de *M. anisopliae* ne sont pas miscibles dans une formulation aqueuse.

Pour inoculer les rats, nous avons préparé les formulations, à base de spores de *Metarhizium anisopliae*, mélangées dans de l'huile de tournesol. Cette huile végétale a été choisie comme solvant organique naturel.

## II.2. METHODES

### II.2.1. Elevage des animaux

Les règles d'usage en vigueur pour le soin et l'utilisation des rats Wistar ont été suivies conformément aux dispositions légales concernant l'expérimentation animale.

Les rats femelles Wistar sont réparties dans des cages de polypropylène de 30cm /40cm /15cm. Avant toute expérimentation, les rattes sont soumises à une semaine d'acclimatation dès leurs arrivées à l'animalerie. Tous les animaux vivent dans un environnement contrôlé (12h de lumière et



12h d'obscurité), à température ambiante ( $24 \pm 1^\circ\text{C}$ ). Les cages, comportant une litière de copeaux de bois, ont été nettoyées une fois sur trois jours tout au long de l'expérimentation (**Figure 6**).

Tous les animaux reçoivent de l'eau par des biberons et un régime alimentaire standard équilibré sous forme de granulés. L'aliment est composé d'un concentré équilibré de glucides, protéines, lipides, vitamines et minéraux (49,80%, 34,50%, 10% et 5,70% respectivement) provenant de la société industrielle de concentré à Bouzerea, Alger.

Pour notre expérimentation nous avons formés quatre lots de cinq individus chacun.

- Lot 1 : rats témoin.
- Lot 2 : rats traités avec D1 (200 mg GM /Kg /jr contenant environ  $10^{10}$  spores /kg/jr)
- Lot 3 : rats traités avec D2 (20 mg de GM /kg /jr ou  $10^9$  spores/kg /jr)
- Lot 4 : rats traités avec D3 (10 mg de GM /kg/jr ou  $5 \times 10^8$  spores/kg /jr).



**Figure 6: Répartition des rats Wistar femelles en lot (Original)**

## II.2.2. Expérimentation

### II.2.2.1. Réalisation de l'inoculation des rats femelles Wistar

Les manipulations sur les rates ont été effectuées dans le respect de leur bien-être, excluant tout type de stress susceptible d'interférer avec les résultats.

Comme il est difficile de réussir le gavage des rats avec une formulation huileuse, nous avons choisis d'introduire l'inoculum de traitement dans l'appâts alimentaire de chaque cinq rats encagés ensemble (Ayant des poids corporels rapprochés).

Les cages de rats ont été approvisionnées de l'eau et la nourriture durant les 15 jours d'expérimentation. Le poids d'aliment consommé quotidiennement par 5 individus est estimé à 250 g de copeaux de bois.

- Pour le les rats du lot témoins : pulvérisation quotidienne de 5 ml d'huile de tournesol sur 250 g de bouchon alimentaire consommé chaque jour par les 5 rats encagés.
- Pour les trois lots traités avec le biopesticide : selon la dose choisie, le poids à prélever de Green muscle est multiplié par 5, pesé par une balance de précision, puis dilué dans 5 ml d'huile de tournesol. Après agitation pendant 5 minutes, pour désagréger les spores, l'inoculum est pulvérisé sur 250 g de bouchon alimentaire consommés chaque 24 h. chaque inoculum est préparé juste avant traitement **(Figure7)**.



**Figure 7: Pulvérisation de l'inoculum de traitement avec le Green muscle sur le bouchon alimentaire consommé par les rats (Originale).**

Les doses choisies sont ajustées en fonction de l'évolution du poids corporels des rats.

**Exemple :** Rechercher le poids (mg) à prélever de GM pour traiter les rats avec D1:

Si le poids corporel moyen des 5 rats du lot traité avec D1 (200 mg/kg/jr) est 160 g, la dose administrée sera par conséquent

1000 g de PC  $\longrightarrow$  200 mg de GM

175 g  $\longrightarrow$  X<sub>3</sub>

$$X_3 = \frac{175 \times 200}{1000} = 35 \text{ mg}$$

$$5 \times 35 = 175 \text{ mg}$$

**Le poids correspondant à 200 mg GM /kg PC /jr a administré pour les 5 rats du lot 2 (175 g de PC moyen) = 175 mg /jr**

### II.2.2.2. Le suivis des rats durant la période de l'expérimentation

Durant la période de traitement, une attention particulière est accordée pour le suivie du comportement des rats femelles. Et cela pour la recherche de probables signes de toxicité ou d'allergie suite à l'administration de Green Muscle ® en comparaison avec le lot témoin.

Pour suivre l'évolution du poids corporel, l'ensemble des rats a fait l'objet de pesées hebdomadaires juste avant l'opération de traitement journalier (J1 et J7) et le jour du sacrifice (J 15). Pour chaque lot traité avec GM, la masse vive moyenne de 5 rattes encagées est retenue pour recalculer la masse de spores qui correspond à la dose choisie/Kg de PC

L'augmentation relative du poids corporels pour chaque animal ont été calculé comme suit :

$$\text{Augmentation relative du PC} = \frac{(\text{PC à la fin de l'exp (g)} \times 100) - 100}{\text{PC au début de l'exp (g)}}$$

### II.2.2.3. Sacrifice des animaux et prélèvement des échantillons

Après la durée requise pour les traitements réalisés avec le Green muscle (15 jours), les rattes Wistar sont sacrifiées. Et cela la matinée, entre 8h et 11h afin d'éviter les variations hormonales pendant la journée.

Chaque rat est pesés puis anesthésié par l'éther éthylique à l'aide d'un coton l'égerment imbibé de cette solution. Après décapitation rapide de la tête, le rat est placé sur sa partie ventrale dans la cuve à dissection. Avec les outils de dissection, la rate et l'intestin grêle sont prélevés, et débarrassés du tissu adipeux adhérent sur un lit de glace. Ces tissus sont rapidement plongés dans le formol à 10 % pour la fixation et font l'objet de l'étude histopathologique.

### II.2.2.4. Etude histologique

Afin d'obtenir des coupes histologiques colorées et prêtes à l'observation microscopique, nous avons adopté la technique histologique classique présentées selon la technique de Gabe, (1967), Martoja et Martoja-Pierson, (1968).

La technique histologique passe par plusieurs opérations successives (**voir les figures de l'annexe 1**)

- Fixation et rinçage des tissus

La fixation a pour but d'immobiliser les cellules tout en conservant leurs morphologies. Le cerveau et le cervelet, sans être séparées, ont été plongés dans le formol commercialisé dilué à 10% pendant 48 heures, puis rincés à l'eau courante écoulée pendant 24 heures. Les organes ont été mis dans des cassettes afin de permettre le passage des liquides au cours de la manipulation.

- Déshydratation, éclaircissement et inclusion

Les cassettes ont été ensuite placées dans un automate à l'histologie (un appareil de circulation) qui sert à assurer la déshydratation, l'éclaircissement des tissus et l'inclusion à la paraffine. Chaque cassette passe dans plusieurs bains d'éthanol de concentration croissante (70°, 90°, et 100°) pendant 1 heure chacun afin d'éliminer l'eau des tissus.

- Inclusion dans la paraffine et confection des blocs

Les cassettes ont été plongées dans deux bains successifs de xylène pendant 1 heure puis dans un bain de mélange xylène-paraffine 50% de chaque et ensuite dans un bain de paraffine pure. Les blocs de paraffine ont été confectionnés dans des moules en métallique puis réfrigérés

- Confection des coupes

Les coupes ont été effectuées au microtome de type «Leica» à 4 à 5µm d'épaisseur

- Collage des rubans et séchage

Les rubans sont étalés dans un bain marie (37°C) puis récupérés et collés sur des lames propres, puis séchés dans une étuve réglée à 25 °C pendant 24 heures.

- Déparaffinage, réhydratation

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

- Coloration

Les coupes de la rates ont été ensuite colorées à l'hématoxyline-éosine (**Voir fiche technique- annexe 1**). Cette coloration topographique permet de visualiser la morphologie des cellules, le noyau en bleu et cytoplasme en rose violacé afin de déterminer leur répartition, architecteur et structure.

Les lames portant les coupes intestinales sont colorée au trichrome de Masson (**Voir fiche technique- annexe 1**). C'est une coloration spécifique qui permet de visualiser les fibres de collagènes colorées en vert.

- Eclaircissement et montage

Après la coloration, les lames ont été mises dans un bain de xylène pour l'éclaircissement. Le montage a été effectué avec une lamelle fixée par l'Eukitt. Les lames ont été ensuite nettoyées au xylène puis séchées

- Observation microscopique et prise de photomicrographies

Les lames histologiques sont observées au microscope optique aux différents grossissements ( $\times 100$ ,  $\times 400$  et  $\times 1000$ ). La prise des photos a été effectuée à l'aide d'un l'appareil photos Samsung prime 5 pour l'étude histopathologique des photomicrographies.

#### II.2.2.5. Etude statistique

Les résultats ont été représentés sous forme de moyennes avec leur écart-type (Moyenne  $\pm$  SEM).

L'analyse des données a été effectuée par le test de Student, qui est basé sur la comparaison des moyens inters et intra groupes.

Le test ANOVA unidirectionnel avec le test *posthoc* de *Tukey* ont été appliqués pour comparer les différences entre les groupes expérimentaux. Le logiciel SPSS statistique version 23 a été utilisé pour analyser les données.

Les différences sont considérées comme :

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

## **RESULTATS**

Notre étude est une contribution à la recherche de l'effet immunotoxique du mycopesticide Green Muscle®, chez les rats Wistar femelles traitées pendant 15 jours à raison de trois doses, D1 (200 mg /kg de PC / jr contenant environ  $10^{10}$  spores /kg), D2 (20 mg /kg de PC / jr contenant environ  $10^9$  spores / kg/jr) et D3 (10 mg/kg de PC / jr contenant environ  $5 \times 10^8$  spores /kg/ jr). Nous cherchons les effets possibles de *M. anisopliae* sur le comportement, la croissance et l'inflammation au niveau du tissu splénique et sur l'histologie de l'intestin grêle

### **Comportement des rats Wistar femelles**

les animaux sont gardés sous surveillance durant la période de l'expérimentation avec les spores du champignon entomopathogène, *M. anisopliae* var *acridum* (GM®)

Les différents traitements avec le biopesticide n'ont pas entravé la prise de nourriture par les rattes Wistar. L'administration de notre souche fongique n'a pas changé le comportement habituel des rattes. Nous avons noté l'absence de symptômes cliniques de toxicité et d'allergie.

### **Etude pondérale**

Les résultats relatif à la croissance des rats femelles témoins et traitées sont illustrés sur la figure 6 (a et b) et le tableau 2. Les significations statistiques sont présentés est détaillées sur les tableaux I, II, III, V et VI de l'annexe 2.

Nous avons suivis l'évolution de la masse corporelle des rats femelles expérimentées pendant les deux semaines. D'après les résultats obtenus, tous les animaux ont gagné du poids. La croissance pondérale entre début et fin de l'expérimentation est jugée statistiquement hautement significative ( $p < 0,01$ ) pour tous les lots à l'exception du lot traité avec la forte dose, D1 (différence non significative avec  $p=0.365$ ).

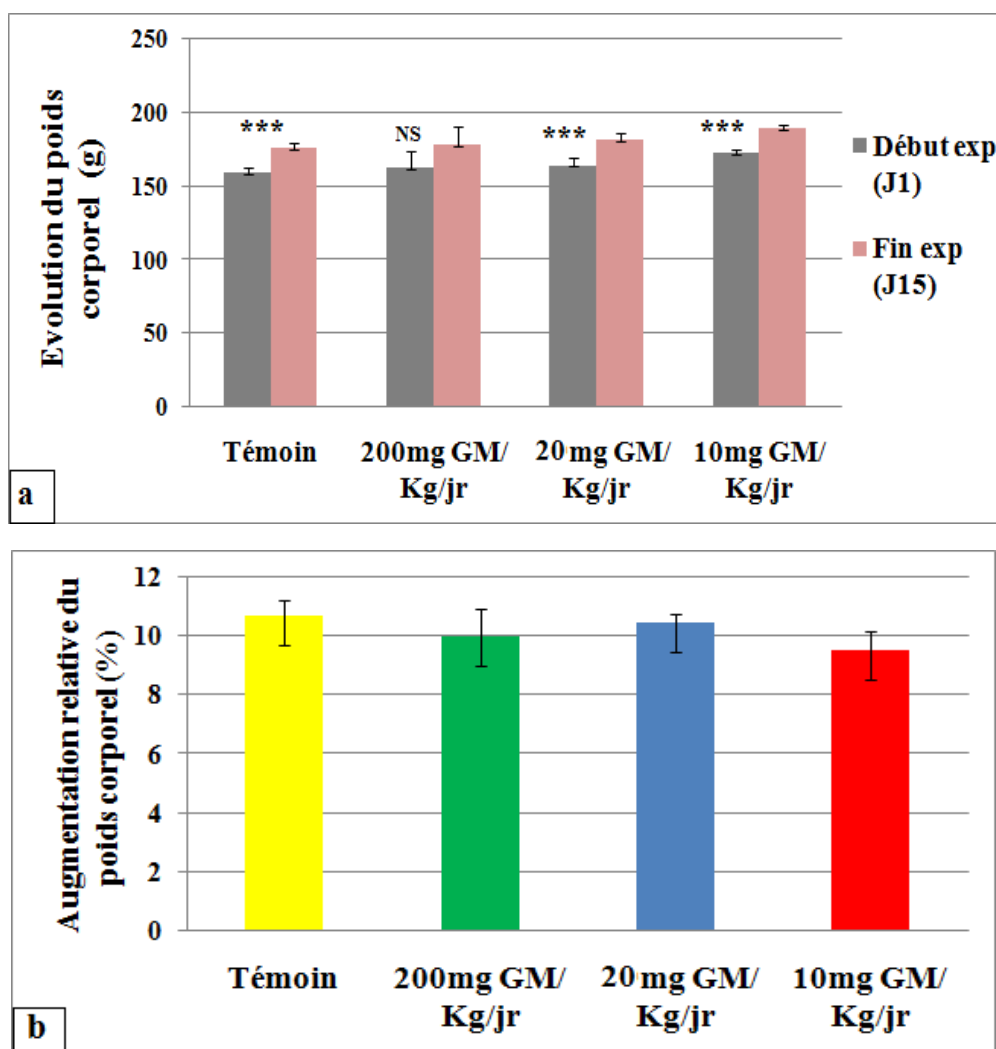
L'analyse de variance (ANOVA) de l'augmentation relative du poids corporels révèle des différences non significatives ( $p > 0,05$ ) entre les différents lots. De même, le test de comparaison multiple de Tukey révèle un seul groupe homogène.

**Tableau II:** Evolution du poids corporel (PC) durant l'expérimentation et augmentation relative de PC chez les rats témoins et traités par GM.

Lots	Poids corporel (g) Début exp (J1)	Poids corporel (g) Fin exp (J15)	Aug relative du PC (%)
Témoin	159,2 ± 7,46	176,2 ± 7,56	10,70 ± 1,14
D1	162,4 ± 25,96	178,4 ± 26,68	10,00 ± 2,04
D2	164,4 ± 10,50	181,6 ± 10,92	10,48 ± 0,63
D3	172,8 ± 5,93	189,2 ± 4,96	9,52 ± 1,39

Valeurs en moyenne et écart type. J : jour. Exp : Expérimentation.

D1= 200 mg de GM /kg /jr ; D2= 20 mg de GM /kg /jr ; D3= 10 mg de GM /kg/jr



**Figure 8 :** Evolution de la masse corporelle (a) et augmentation relative de poids corporels (b) chez les rats témoins et traités par Green Muscle®

**Etude histopathologique**

Notre objectif est de rechercher d'éventuelles lésions splénique et intestinale observables en microscopie photonique et de comparer l'importance de ces altérations tissulaires entre les lots des rats traitées avec chacune des trois doses testées.

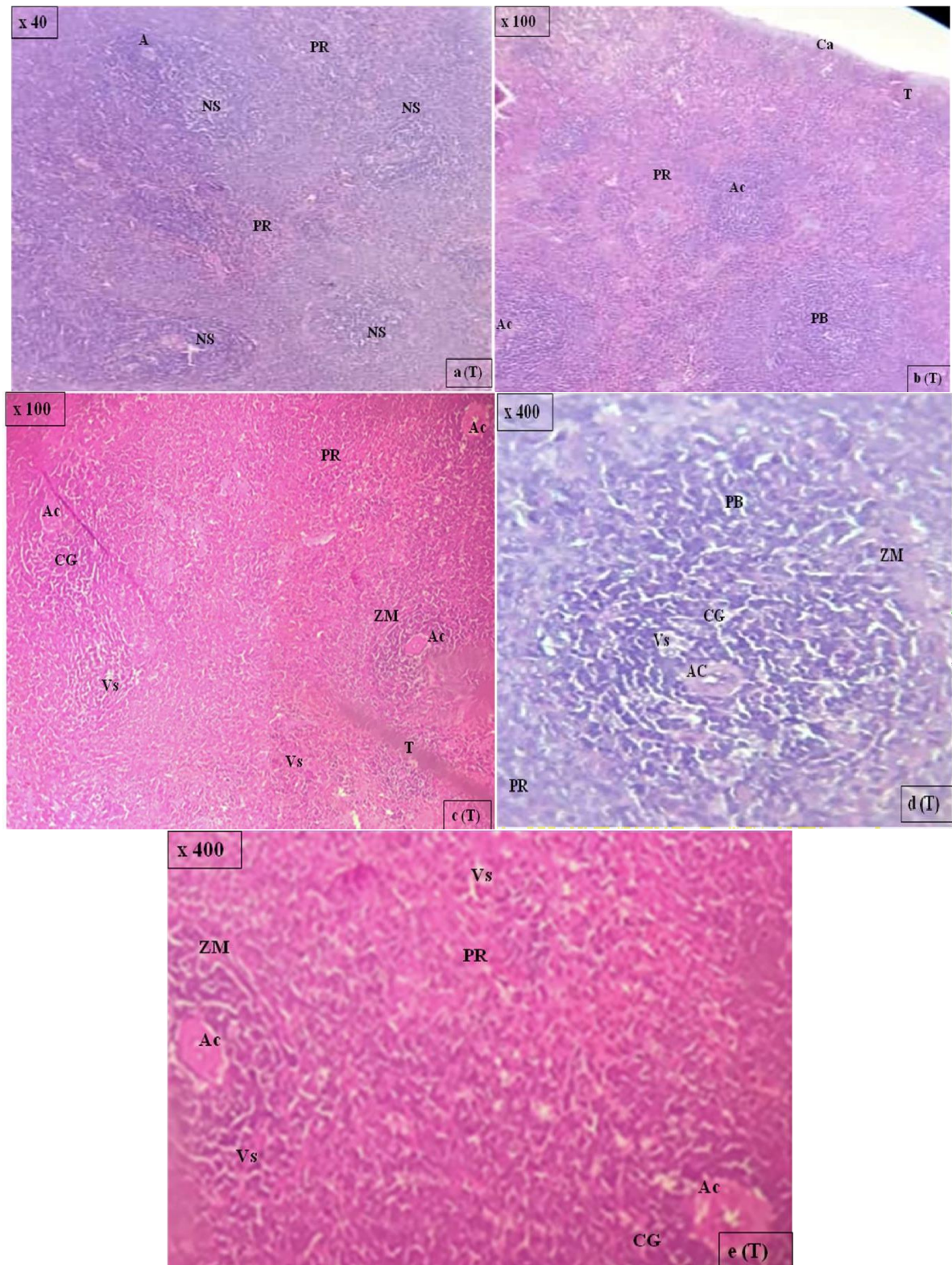
**Structure du parenchyme splénique****➤ Chez les rats témoins**

L'observation microscopique des coupes histologiques de rates provenant des rongeurs témoins révèle une structure normale.

Le parenchyme splénique est formé de petits nodules blanchâtres formant la pulpe blanche qui sont disséminés dans une matrice rougeâtre appelée la pulpe rouge (Figure 9-a et b).

- La rate est entourée d'une capsule conjonctive qui envoie de nombreuses travées dans le parenchyme (Figure 9-b).
- La pulpe blanche est située pour l'essentiel autour d'une artériole centrale, elle est constituée d'amas de tissu lymphoïde (corpuscules de Malpighi) qui correspond à des agrégats lymphocytaires, organisés en structures nodulaires. La zone marginale est en périphérie du nodule splénique qui contient le centre germinatif (Figure 9 - c, d et e)
- La pulpe rouge est un tissu richement vascularisé. Elle est constituée d'un réseau anastomosé de sinus veineux fenêtrés et séparés par les cordons de Bilioth (Figure 9- c, d et e).





**Figure 9 (a, b, c, d et e) : Structure du parenchyme splénique chez les rats témoins**

Ca : capsule conjonctive ; PB : pulpe blanche ; PR : pulpe rouge ; T : travées conjonctives ; NS : nodules spléniques ; VS : vaisseaux sanguins, AC : artériole centrale ; A : artère ;

CG: centre germinatif ; ZM: zone marginale;

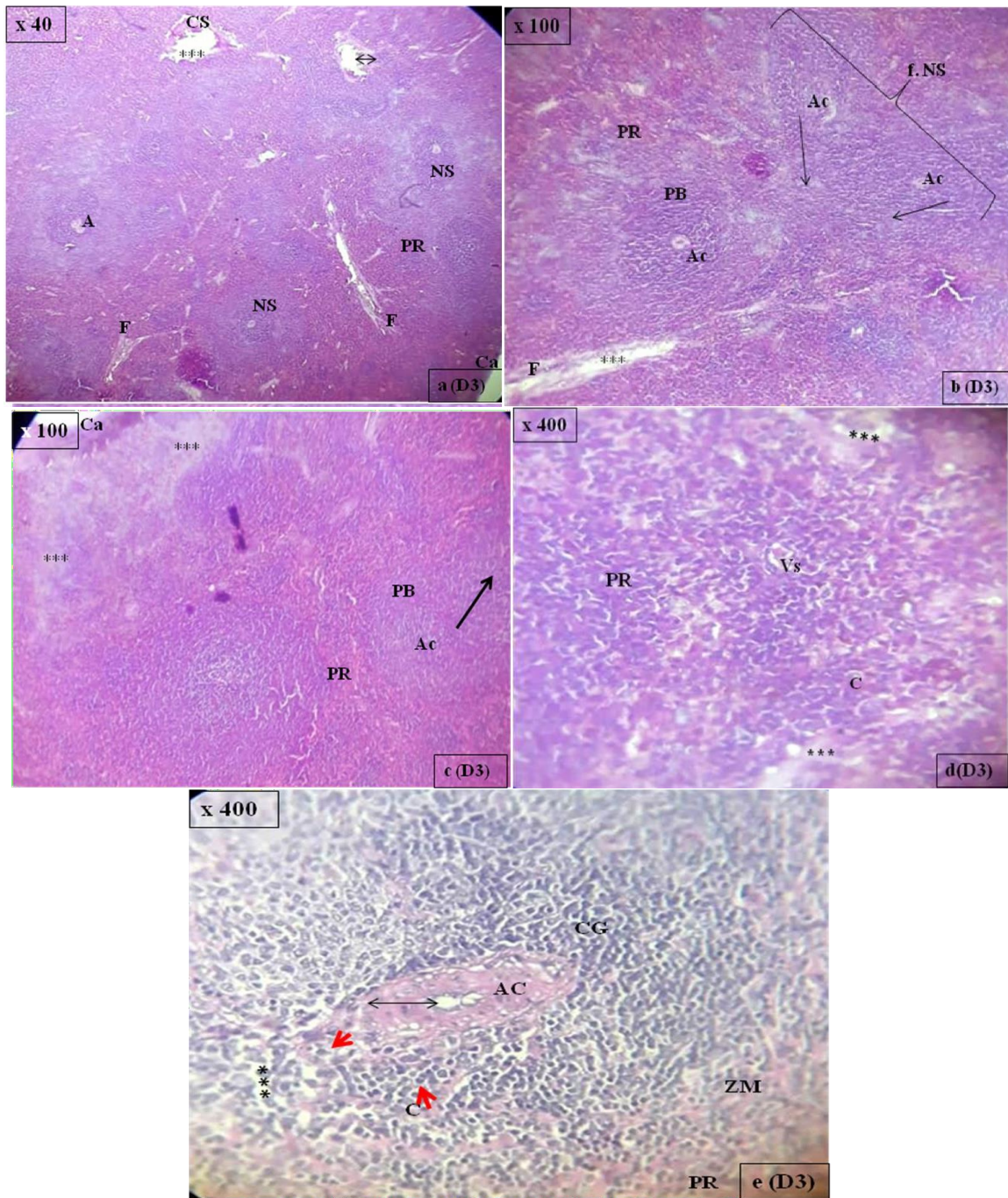
Chez les rats traitées par le biopesticide Green Muscle® à raison de 10 mg /kg / jr contenant environ  $5 \times 10^8$  spores de *M. anisopliae* /kg /jr (D3)

En comparaison avec le témoin, le parenchyme splénique chez les rats traités avec la faible dose (D3) présente une structure générale plus au moins conservée avec quelques désorganisations, de l'architecture tissulaire par endroits, dont le degré vari d'un animal à l'autre.

Les principales altérations tissulaires sont illustrées comme suit :

- Développement locale de tissus conjonctif fibreux (figure 10- a et b)
- Epaissement de la paroi des artères (Figure 10- a et e)
- Faible déplétion cellulaire au niveau de la pulpe rouge (Figure 10- a, d et e) et de la pulpe blanche (Figure 10- b et c).
- Présence de deux artères centraux dans la pulpe blanche par fusion de deux nodules spléniques (Figure 10-b) et une légère hyperplasie de la pulpe blanche (Figure 10- a, b et c).
- Dilatation des sinusoides et diapédèse de quelques cellules sanguines (Figure 10-e).





**Figure 10 (a, b, c, d et e):** Structure du parenchyme splénique chez les rattes traitées avec GM à 10 mg/kg/jr ou  $5 \times 10^8$  spores /kg /jr (D3). Coloration : HE

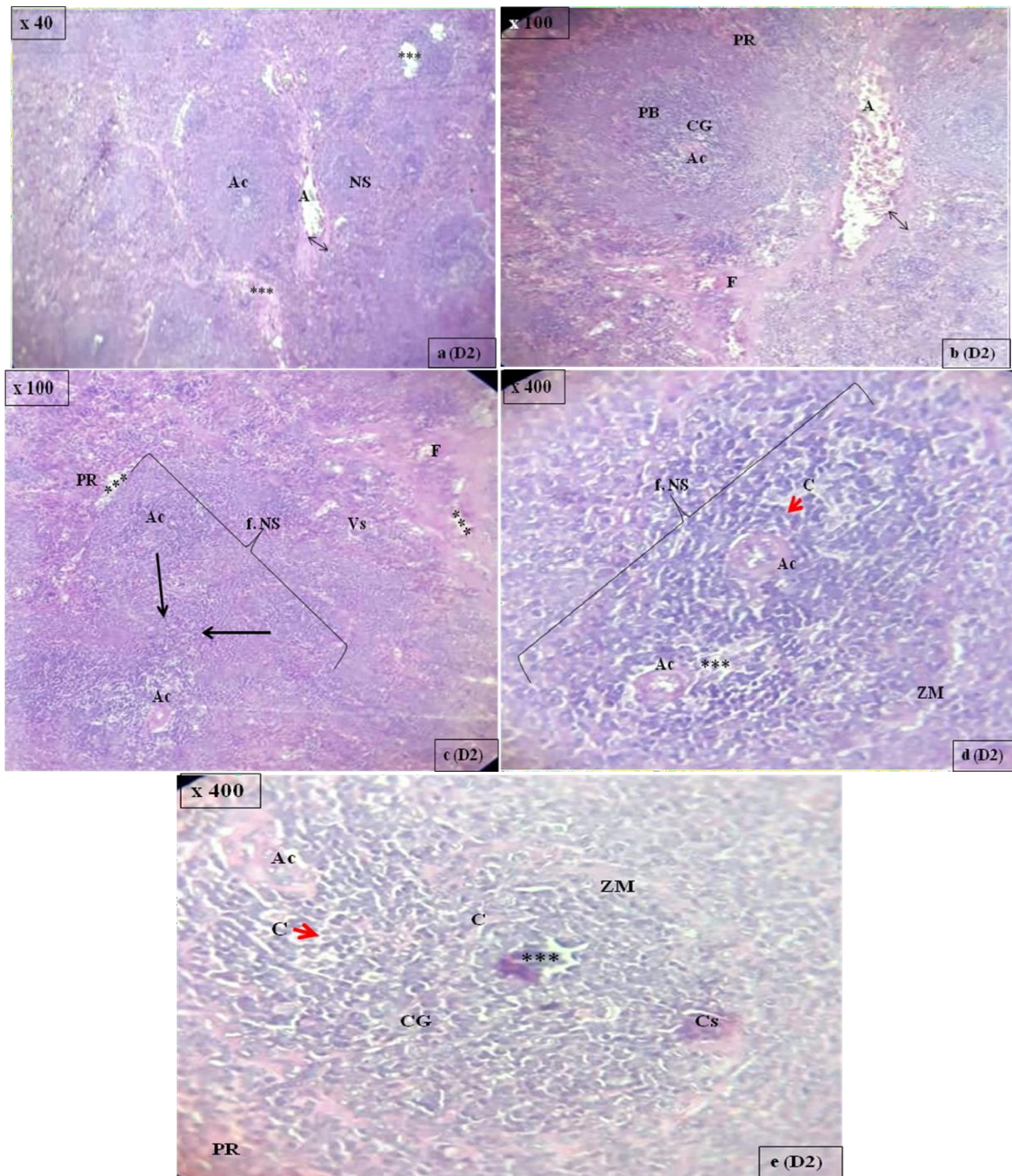
Ca : capsule conjonctive ; PB : pulpe blanche ; PR : pulpe rouge; T : travées conjonctives; NS: nodules spléniques; VS : vaisseaux sanguins, AC : artériole centrale; A: artère; CG: centre germinatif; ZM: zone marginale; CS: congestion sanguine, \*\*\*: déplétion lymphocytaire; F: fibrose; **double flèche:** Epaissement de la paroi des artère; **flèche rouge:** Diapédèse ou Envahissement par les cellules sanguines. **Flèche noir :** Hyperplasie de la pulpe blanche; **f.NS:** fusion de deux nodules spléniques; C: dilatation des capillaires sinusoides.

- Chez les rats traitées par le biopesticide Green Muscle® à raison de 20 mg /kg / jr contenant environ  $10^9$  spores de *M. anisopliae* /kg /jr (D2)

L'étude microscopique du tissu splénique provenant des rattes traitées avec la moyenne dose (D2) de GM, montre une structure un peu désorganisée par rapport à celle observée chez les individus témoins et a permet de mettre en évidence des modifications plus ou moins importantes, illustrées comme suit :

- Dilatation des artères et artères centrales avec épaissement de leurs parois endothéliales (Figure 11 - a et b).
- Une forte déplétion leucocytaire au niveau de la pulpe rouge (Figure 11 - a, b et c) pertes de lymphocytes au niveau du centre germinatif (Figure 11 - d et e)
- Présence de fibrose locale (Figure 11- b et c).
- Fusion des deux nodules spléniques et désorganisation de la zone marginale (Figure 11 -c et d).
- congestion sanguine modérée (Figure 11- e).
- Dilatation des vaisseaux et des sinus veineux accompagnée de l'infiltration par les cellules sanguine au niveau de la pulpe blanche (Figure 11- d et e).





**Figure 11 (a, b, c, d, et e):** Structure du parenchyme splénique chez les rats femelles traitées avec GM à 20 mg/kg/jr ou 10<sup>9</sup> spores /kg /jr (D2). Coloration : HE

Ca : capsule conjonctive ; PB : pulpe blanche ; PR : pulpe rouge; T : travées conjonctives; NS: nodules spléniques; VS : vaisseaux sanguins, AC : artériole centrale; A: artère; CG: centre germinatif; ZM: zone marginale; CS: congestion sanguine, \*\*\*: déplétion lymphocytaire; F: fibrose; **double flèche:** Epaissement de la paroi des artère; **flèche rouge:** Diapédèse ou Envahissement par les cellules sanguines. **Flèche noire:** Hyperplasie de la pulpe blanche; f.NS: fusion de deux nodules spléniques; C: dilatation des capillaires sinusoides;

- Chez les rats traitées par le biopesticide Green Muscle® à raison de 200 mg /kg / jr contenant environ 10<sup>10</sup> spores de *M. anisopliae* /kg /jr (D1)

Les coupes de la rate provenant des individus traitées avec la forte dose du biopesticide GM (D1) sont étudiées sous microscope photonique.

Les altérations décrites chez les individus traitées par D2 et D3 semblent être accentuées avec l'augmentation de concentration en spores de *M. anisopliae* administrées pendant 15 jours.

Les modifications cyto-architecturales du parenchyme splénique sont les suivantes :

- Hyperplasie de la pulpe blanche par augmentation du nombre de nodules spléniques et par fusion de ces derniers (Figure 12- a, b, d et f)
- Présence de fibrose diffuse et de congestion sanguine (Figure 12- a ,b, c et f).
- Dilatation des artères, vaisseaux et sinusoides avec épaissement des parois endothéliales et envahissement par les cellules sanguines (Figure 12 - d, e et f).
- Epuisement sévère des lymphocytes du corpuscule de Malpighi (figure 12 e et f).
- Hémorragie bien apparente qui se présente au niveau de la pulpe rouge au tour de l'artère dilatée (Figure 12 – b et e)
- Dégénérescence du parenchyme marquée par la présence de signe de nécrose au niveau de la pulpe rouge et des nodules spléniques (Figure 12- f)



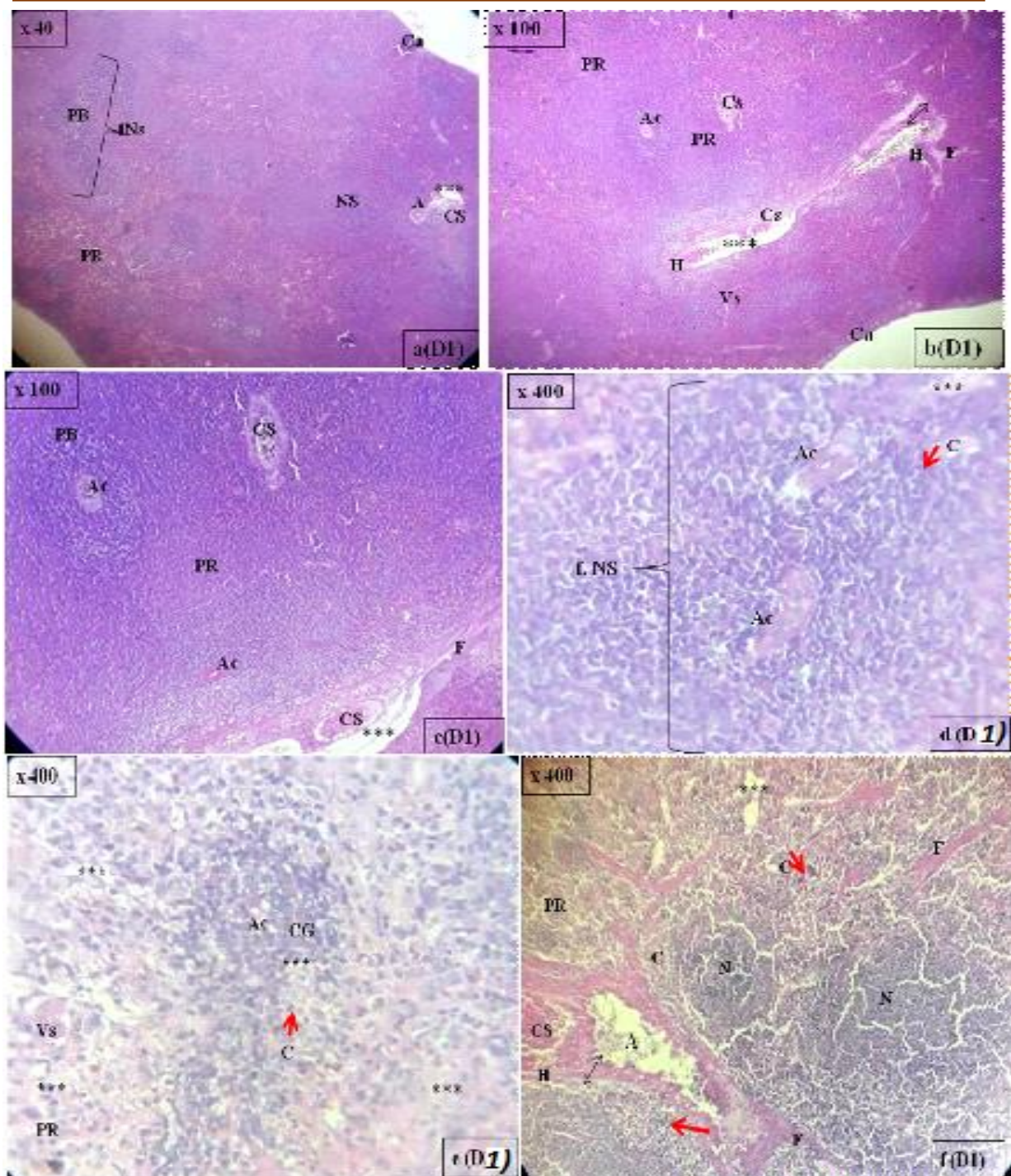


Figure 12 (a, b, c, d, et e): Structure du parenchyme splénique chez les rats femelles traitées avec 200 mg/kg/jr ou  $10^{10}$  spores /kg /jr (D1). Coloration : HE

Ca : capsule conjonctive; PB : pulpe blanche; PR : pulpe rouge; T : travées conjonctives; NS : nodules spléniques; VS : vaisseaux sanguins, AC : artériole centrale; A: artère; CG: centre germinatif; ZM: zone marginale; CS: congestion sanguine, \*\*\*: déplétion lymphocytaire; F: fibrose; N: nécrose; H: hémorragie; double flèche: Epaisseur de la paroi des artère; flèche rouge: Diapédèse ou Envahissement par les cellules sanguines. Flèche noire: Hyperplasie de la pulpe blanche; f.NS : fusion de deux nodules spléniques; C: dilatation des capillaires sinusoides;

**Structure histologique de l'intestin grêle**➤ Chez les rats témoins

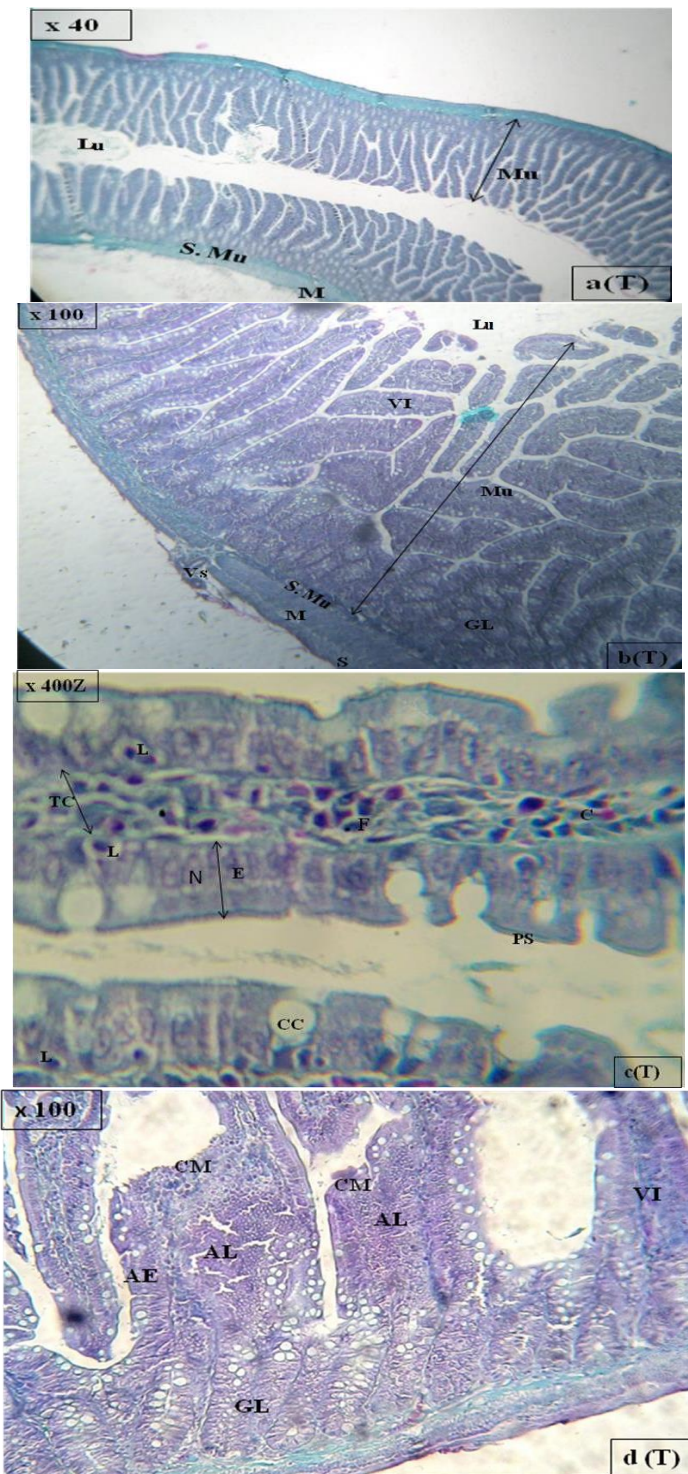
Les coupes histologiques réalisées au niveau de l'intestin grêle des individus témoins montrent une structure intacte et présentent à partir de l'intérieur vers la lumière digestive (Figure 13- a et b) :

- La séreuse, entoure l'intestin et est riche en vaisseaux lymphatiques.
- La musculuse est une couche de muscles lisses.
- La sous muqueuse est un tissu conjonctif riche en vaisseaux sanguins.
- La muqueuse constituée par les glandes de Liberkhün à la base, et par des cryptes en forme de villosités en contact avec le bol alimentaire.

L'assise épithéliale des villosités intestinales est simple prismatique à plateau strié ; composée de deux types cellulaires; les entérocytes et les cellules caliciformes sécrétrices de mucus avec la présence de lymphocytes intra-épithéliale. Le chorion, au centre des villosités, est riche en fibroblastes et leucocytes (Figure 13- b et c).

Les coupes histologiques iléales (partie distale de l'intestin grêle) montre une structure normal de la plaque de Payer, un tissu lymphoïde associé à la muqueuse intestinale (MALT). Nous notons la présence d'agrégats lymphoïdes et de cellule M intra- épithéliale (Figure 13- d).





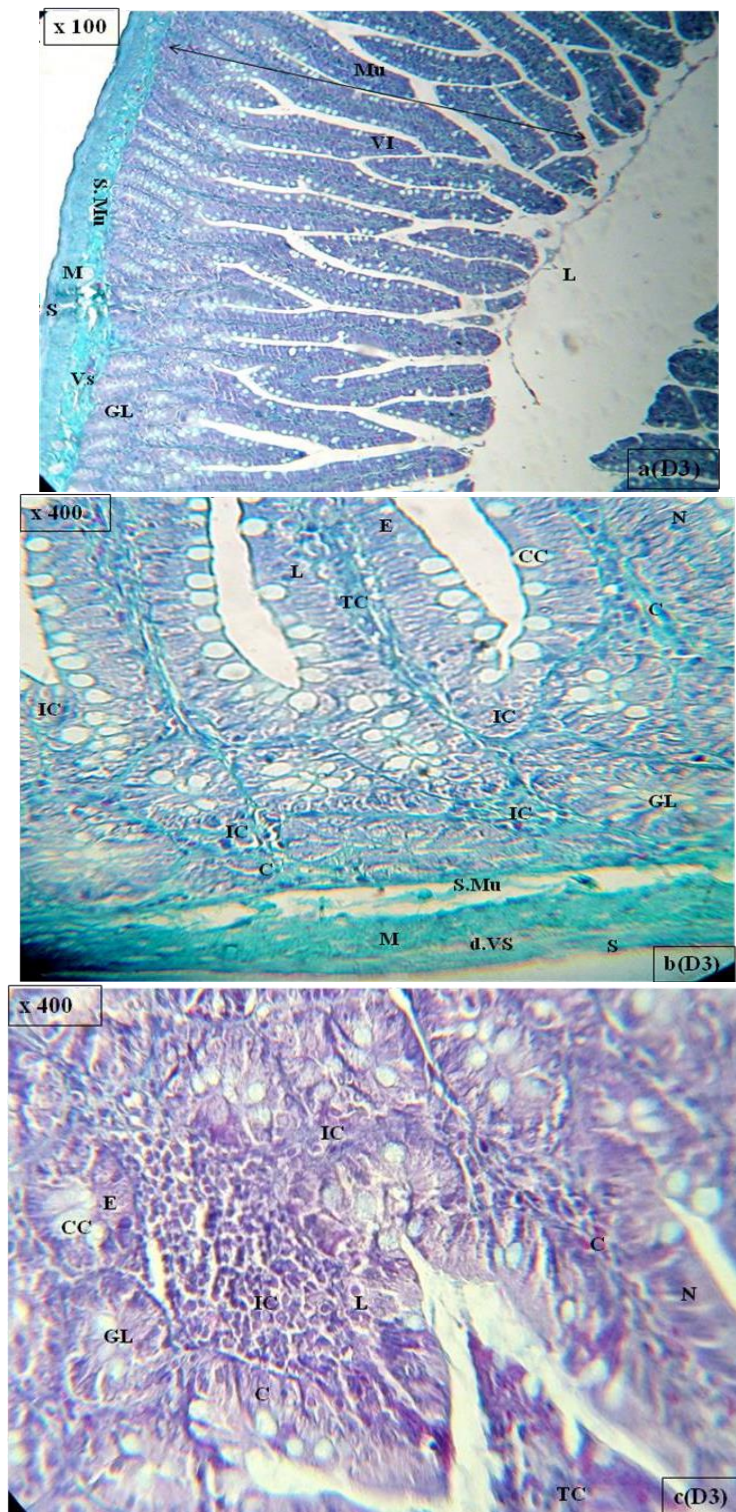
**Figure 13 (a, b, c et d) : Structure de l'intestin grêle chez les rats femelles Wistar témoins. Coloration : Trichrome de Masson**

**Mu** : la muqueuse. **S.Mu**: sous-muqueuse. **M**: musculature. **S** : la séreuse. **Lu** : lumière intestinale. **F** : fibroblaste, **L** : lymphocyte. **TC** : le tissu conjonctif (chorion). **GL** : glande de Lieberkhün ; **AE**: assise épithéliale, **E**: entérocytes ; **CC**: cellule caliciforme, **VI**: villosités intestinale, **L**: lymphocyte intra épithéliale, **PS** : plateau strié ; **N** : noyau de l'entérocyte ; **AL** : agrégats lymphoïdes ; **CM** : Cellules M.

- Chez les rats traitées par le biopesticide Green Muscle® à raison de 10 mg /kg / jr contenant environ  $5 \times 10^8$  spores de *M. anisopliae* /kg /jr (D3)

L'histologie de l'intestin grêle, provenant des individus traités avec D3, révèle la conservation de l'architecture tissulaire pour toutes les coupes observées au microscope optique (Figure 14 - a, b et c).

- Nous notons la dilatation de vaisseaux sanguins au niveau de la sous muqueuse (Figure 14 – a).
- Le chorion de la muqueuse intestinale est riche en capillaires dilatés et en infiltrats leucocytaires (Figure 14 – b).
- Quelques villosités montrent un aspect hypertrophié par envahissement de lymphocytes et de plasmocytes (Figure 14 – c).



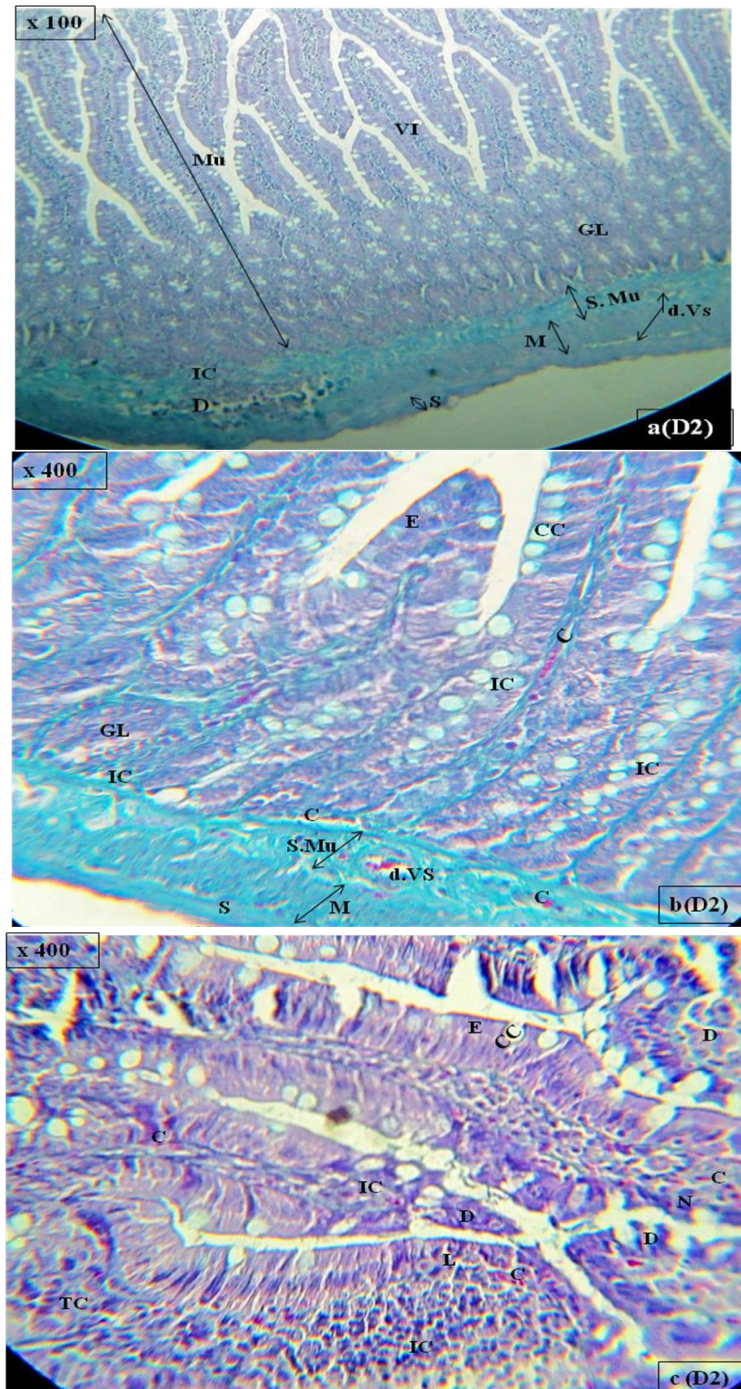
**Figure 14 (a, b et c) : Structure de l'intestin grêle chez les rattes traitées avec GM à 10 mg/kg/jr ou  $5 \times 10^8$  spores /kg /jr (D3). Coloration : Trichrome de Masson**  
**Mu** : la muqueuse. **S.Mu**: sous-muqueuse. **M**: musculuse. **S** : la séreuse. **Lu** : lumière intestinale. **F** : fibroblaste, **L** : lymphocyte. **TC** : le tissu conjonctif (chorion). **GL** : Glande de Liberkhün ; **AE**: Assise épithéliale, **E**: Entérocytes ; **CC**: Cellule caliciforme, **V**: Villosités Intestinale, **C**: dilatation des capillaires, **IC**: Infiltrat cellulaire, **L**: Lymphocyte intra épithéliale, **N** : noyau de l'entérocyte ; **d.Vx**: dilatation des vaisseaux,

Chez les rats traitées par le biopesticide Green Muscle® à raison de 20 mg /kg / jr contenant environ 10<sup>9</sup> spores de *M. anisopliae* /kg /jr (D2)

L'observation microscopique des coupes histologiques intestinales des rats traités avec la moyenne dose (D2) de GM, montre quelques lésions tissulaires locales, marquées principalement par :

- L'altération structurale, par endroits, de la sous muqueuse et de la musculature associée à la vasodilatation et diapédèse leucocytaire (Figure 15- a et b).
- La déformation de quelques glandes de Liberkhün. Le tissu conjonctif adjacent montre la dilatation des capillaires et la circulation des hématies (Figure 15- b).
- L'hypertrophie de quelques villosités par augmentation de la largeur du chorion, riche en infiltrat cellulaire. L'assise épithéliale présente un aspect altéré (Figure 15- c).





**Figure 15 (a, b et c):** Structure de l'intestin grêle chez les rattes traitées avec GM à 20 mg/kg/jr ou 10<sup>9</sup> spores /kg /jr (D2). Coloration : Trichrome de Masson Mu : la muqueuse. S.Mu: sous-muqueuse. M: musculuse. S : la séreuse. Lu : lumière intestinale. F : fibroblaste, L : lymphocyte. TC : le tissu conjonctif (chorion). GL : Glande de Liberkhün ; AE: Assise épithéliale, E: Entérocytes ; CC: Cellule caliciforme, V: Villosités Intestinale, C: dilatation des capillaires, IC: Infiltrat cellulaire, CS: Congestion sanguine, FI : Foyer inflammatoire, L: Lymphocyte intra épithéliale, PS : plateau strié ; d.Vx: dilatation des vaisseaux, Np : noyaux pycnotique des entérocytes. D : dégénérescence.

Chez les rats traités par le biopesticide Green Muscle® à raison de 200 mg /kg / jr contenant environ 10<sup>10</sup> spores de *M. anisopliae* /kg /jr (D1)

L'examen des coupes de l'intestin grêle des rats traités avec la forte concentration de GM (D3) révèle des altérations plus importantes par rapport à celles notées chez les individus inoculés avec la faible (D1) et la moyenne dose (D2).

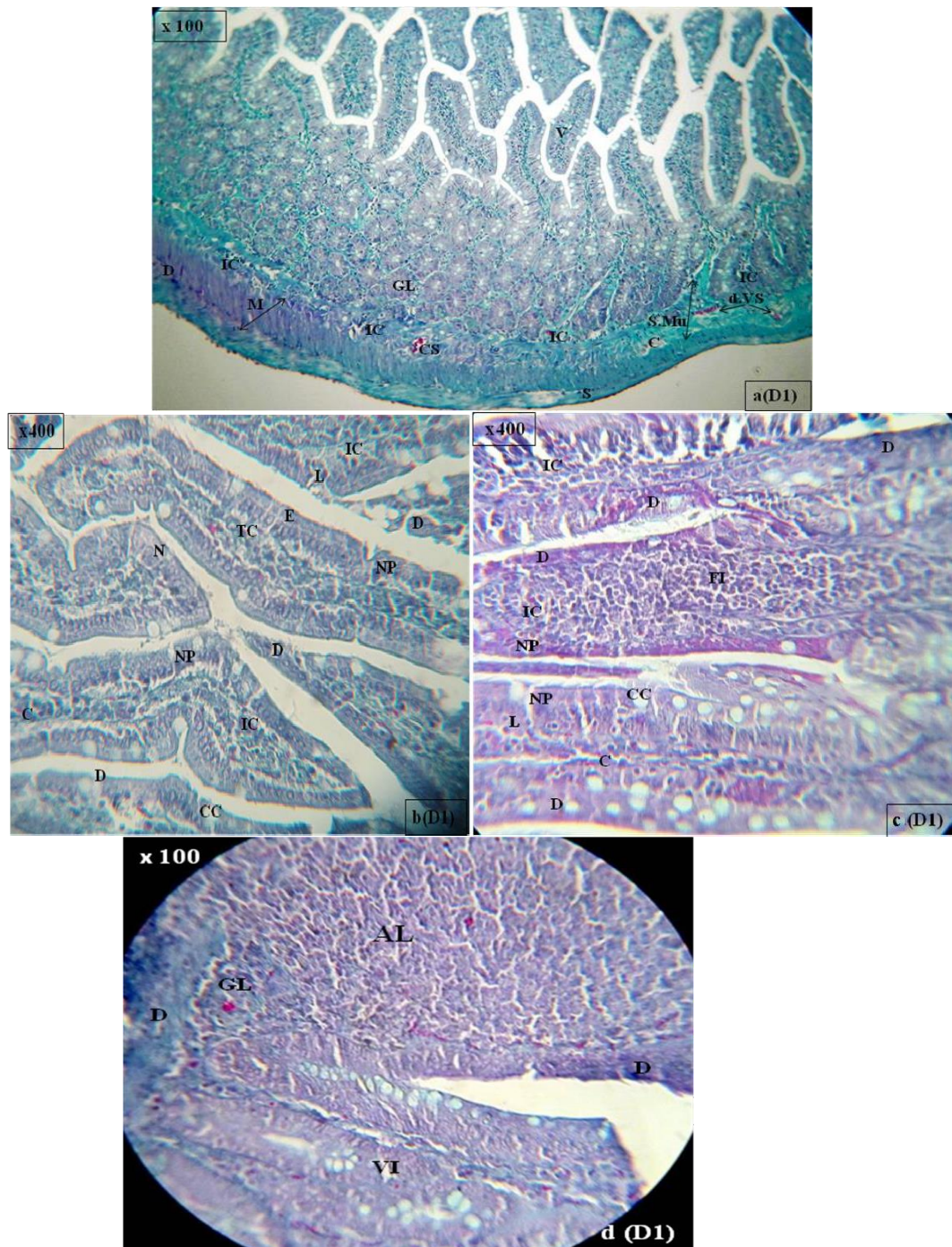
- Au niveau de la musculature, la structure des muscles lisses est plus au moins altérée (Figure 16-a).
- Au niveau de la sous muqueuse, nous notons la dilatation des vaisseaux sanguins associée à des infiltrats leucocytaires envahissant la muqueuse en surface avec altération des glandes de Liberkhün (Figure 16-a).
- Au niveau de la muqueuse, nous observons, par endroit, la présence de foyers inflammatoires témoignée par l'hypertrophie de quelques villosités intestinales avec lésions des cellules épithéliales à noyaux picnotiques et présence d'amas lymphocytaires dans le chorion (Figure 16- b et c).
- Les coupes histologiques iléales révèlent l'abondance des agrégats lymphoïdes au niveau des plaques de Payer ce qui cause une prolongation dans la largeur de ce tissu lymphoïde intramuqueux. L'hyperplasie de ce dernier est à l'origine de l'effacement, par endroits, du relief villositaire et les structures glandulaires (Figure 16- d).

**Figure 16 (a, b, c et d) : Structure de l'intestin grêle chez les rattes traitées avec GM à 200 mg/kg/jr ou 10<sup>10</sup>spores /kg /jr (D1). Coloration : Trichrome de Masson**

**Mu** : la muqueuse. **S.Mu**: sous-muqueuse. **M**: musculature. **S** : la séreuse. **Lu** : lumière intestinale. **F** : fibroblaste, **L** : lymphocyte. **TC** : le tissu conjonctif (chorion). **GL** : Glande de Liberkhün ; **AE**: Assise épithéliale, **E**: Entérocytes ; **CC**: Cellule caliciforme, **V**: Villosités Intestinale, **C**: dilatation des capillaires, **IC**: Infiltrat cellulaire, **CS**: Congestion sanguine, **FI** : Foyer inflammatoire, **L**: Lymphocyte intra épithéliale,

**PS** : plateau strié ; **d.Vx**: dilatation des vaisseaux, **Np** : noyaux pycnotique des entérocytes. **D** : dégénérescence ; **VI** : villosité intestinale ; **AL** : agrégats lymphocytaires de la plaque de Payer ; **CM** : cellule M.





**Figure 16 (a, b, c et d) :** Structure de l'intestin grêle chez les rattes traitées avec GM à 200 mg/kg/jr ou  $10^{10}$  spores /kg /jr (D1). Coloration : Trichrome de Masson

**Mu** : la muqueuse. **S.Mu**: sous-muqueuse. **M**: musculuse. **S** : la séreuse. **Lu** : lumière intestinale. **F** : fibroblaste, **L** : lymphocyte. **TC** : le tissu conjonctif (chorion). **GL** : Glande de Lieberkhün ; **AE**: Assise épithéliale, **E**: Entérocytes ; **CC**: Cellule caliciforme, **V**: Villosités Intestinale, **C**: dilatation des capillaires, **IC**: Infiltrat cellulaire, **CS**: Congestion sanguine, **FI** : Foyer inflammatoire, **L**: Lymphocyte intra épithéliale, **PS** : plateau strié ; **d.Vx**: dilatation des vaisseaux, **Np** : noyaux pycnotique des entérocytes. **D** : dégénérescence ; **VI** : villosité intestinale ; **AL** : agrégats lymphocytaires de la plaque de Payer ; **CM** : cellule M.

### III. 2 DISCUSSION

Sous nos conditions expérimentales de toxicité subaigue, les rats femelles traitées avec le biopesticide GM, sont exposées aux *M. anisopliae* par deux voies en même temps, l'ingestion répétée et l'inhalation étendue des conidies du champignon entomopathogène à raison de trois concentrations D1 (10 mg /kg /jr ou  $5 \times 10^8$  spores /kg) ; D2 (20 mg /kg /jr ou  $10^9$  spores /kg) et D3 (200 mg /Kg /jr ou  $10^{10}$  spores /kg).

Aucune anomalie clinique ou changement de comportement n'ont été remarqués, durant les 15 jours de traitement. Au cours de l'expérimentation, tous les animaux ont gagné du poids ce qui reflète la croissance et une surcharge calorique qui reste moins importante chez les rattes traitées avec la forte dose (D3). Cependant notre souche fongique n'a pas d'effet significatif sur la croissance pondérale relative des rats traités par rapport aux rats témoins. Les mêmes remarques sont notées par Arkam, (2019) suite aux traitements des rattes Wistar avec les mêmes doses de GM sous des conditions de toxicité subchronique (30 jours).

Des résultats similaires sont rapportés par plusieurs auteurs qui ont étudié l'activité toxique de différents champignons entomopathogènes vis-à-vis des cobayes. 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 signalés par Hadj Rabia, (2014), lors de l'étude de la toxicité orale aigue de deux champignons entomopathogènes, *Beauveria bassiana* et *M. anisopliae* var. *acridum* chez les rats Wistar. 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).

Nos résultats relatifs à l'étude histo-photologique du parenchyme splénique révèlent des lésions au niveau de la pulpe blanche (fusion et hyperplasie des nodules spléniques, épuisement lymphocytaire..) et de la pulpe rouge (vasodilatation, déplétion leucocytaire ...). Ces altérations semblent être accentuées avec l'augmentation de la dose administrée (fibrose diffuse, hémorragie, atrophie et nécrose de quelques nodules). Les dommages tissulaires sont en faveur de la réaction immunitaire spécifique vis-à-vis de notre souche fongique au niveau de cet organe lymphoïde périphérique et suggère une splénotoxicité. D'après Garg et al. (2004), les effets toxiques des xénobiotiques sur la rate peuvent se manifester sous plusieurs formes : diminution du poids de la rate et de l'activité des macrophages résidants, réduction de la taille des follicules spléniques avec épuisement lymphocytaire et la présence des foyers hémorragiques.

L'étude des coupes intestinales provenant des rattes traitées avec GM montre quelques altérations (vasodilatation, infiltration cellulaire) au niveau du chorion hypertrophié, et altération de



l'assise épithéliale). Ces lésions suggèrent l'inflammation intestinale suite au passage important des spores de *M. anisopliae* envahissant la muqueuse et sont des signes de toxicité intestinale. Au niveau de l'iléon des rats administrés de  $10^{10}$  spores/kg/jr pendant 15 jours, l'hypertrophie des plaques de Payer par hyperplasie des agrégats lymphoïdes intramuqueux reflètent la réaction immunitaire spécifique et l'activation des lymphocytes B en réponse à l'infection fongique.

En effet, les mécanismes de l'immunité innée sont les premiers à être mis en jeu. Cette immunité est assurée par la peau et les muqueuses constituant une barrière physique et chimique qui empêche les micro-organismes d'accéder au tissu. Quand cette barrière est rompue, les germes pénètrent dans les tissus et les organes et déclenchent l'infection qui se traduit alors par des lésions et des inflammations (Benzar, 1999). Après l'inflammation la réparation passe par la constitution d'un nouveau tissu conjonctif qui va remplacer les tissus détruits au cours de l'inflammation (Fleisher, 2012).

Nos résultats sont assez comparables avec ceux obtenus par Arkam, (2019) sous des conditions de toxicité subchronique avec les mêmes doses de GM. D'après cet auteur, les lésions histologiques observées au niveau des parenchymes rénale, hépatique et pulmonaire, suggèrent le caractère inflammatoire dose-dépendant. Cette étude a enregistré une augmentation hautement significative en nombre de globules blancs, de globules rouges et du taux de l'hématocrite et augmentation très significative du taux de l'hémoglobine chez les rats traités avec 200 mg/kg/jr pendant 30 jours. Cependant, les perturbations des paramètres biochimiques rénaux et hépatiques sont jugées non significatives, cela suggère que les altérations tissulaires observées sont non fonctionnelles mais transitoires due à des réponses inflammatoires normales bien attendues après l'administration répétée des spores de *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. De telles particules étrangères sont immunogènes et donc à l'origine des anomalies notées au niveau systémique et tissulaire chez les rats Wistar.

Nos observations au microscope optique ne nous offrent aucune preuve histologique de la germination des spores de *Metarhizium* au niveau des tissus étudiés. Shaddock et al. (1982) annonce que les conidies de *M. anisopliae* sont récupérées de l'estomac, des poumons et de la rate après 2 semaines d'exposition des souris aux poussières de spores, mais pas à la fin de la 3<sup>ème</sup> semaine. D'après le même auteur, suite à l'injection intra-péritonéale des spores de *M. anisopliae* à des rats, le champignon a été récupéré à partir de granulomes focaux et à partir de rates des rats ; mais les rates étaient stériles 21 jours après l'exposition.

Toriello et al, (2006) ont testé la pathogénicité intra gastrique aiguë chez les souris CD-1 d'une souche de *M. anisopliae* var. *anisopliae* ( $10^8$  conidies/animal). Cette souche a pu pénétrer l'intestin et se disséminer par diffusion hémotogène dans l'hôte. D'après le même auteur, des signes

de germination fongique ont été observés chez une seule souris morte au niveau de deux ganglions lymphatiques, des poumons et du foie. Cependant, l'étude histopathologique ne révèle aucune réaction inflammatoire dans les organes examinés chez les souris traités, le champignon n'a pas pu germer ni se développer, suggérant le statut non immunogène et non toxique de cette souche fongique.

Anand et Tiwary, (2010), ont étudié les réponses immunologiques et cytotoxiques de la dose intratrachéale aiguë ( $10^8$  conidies/50 $\mu$ l) de suspension de conidies brute de *M. anisopliae* chez des souris BALB/c, les niveaux significativement élevés de protéines totales plasmatiques, lactate déshydrogénase et albumine ont indiqué une cytotoxicité. Les données sur les cytokines obtenues par les mêmes auteurs suggèrent l'activation des voies IL-23 / Th17 conduisant à une réponse de type Th1 non contrôlée (production élevée de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  et IL-6) en réponse à l'infection fongique. D'après le même auteur, *M. anisopliae* a la capacité d'augmenter une réponse allergénique chez la souris (taux sérique élevé des IgE et des protéines totales plasmatiques et de la lactate déshydrogénase (LDH). De pareilles signes d'allergie sont également détectées au niveau de la peau et des poumons des souris suite à l'administration d'une dose de  $10^8$  spores /ml de *M. anisopliae* (Ward et al., 2009).

Plusieurs travaux ont étudié la toxicité aiguë des bio-insecticides chez des rongeurs; D'après une étude récente de Abbasi Larki et al. (2019), des rats Wistar ont été traités par gavage unique à une dose sub létale (5000 mg/kg) de suspension de bactérie entomopathogène *Bacillus thuringiensis*. Les résultats ont démontré certaines complications pathologiques, des anomalies hématologiques et biochimique y compris la congestion et l'inflammation des organes vitaux des rats tels que le foie, le cœur, les poumons et les reins. Cependant, les études des aspects histologiques de l'effet d'une administration unique de *B. bassiana* (Halouane, 2008 et Hadj rabia-Haddadj, 2014) et *M. anisopliae* (Hadj rabia-Haddadj, 2014) n'ont révélé aucune lésion histologique sur les différents organes étudiés des rats et des souris.

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Green muscle®, biopesticide développé à base de *Metarhizium anisopliae* var. *acidum*, occupe une place importante parmi les méthodes alternatives de la lutte antiacridienne.

Dans nos conditions expérimentales, l'inhalation étendue et l'ingestion massive répétée des spores du champignon, pulvérisées sur l'appât alimentaire des rats durant 15 jours, sont à l'origine des inflammations tissulaires au niveau de la rate et l'intestin grêle. Sans avoir un effet significatif sur le poids corporel relatif des rats Wistar femelles.

Nos résultats reflètent l'influence de la dose sur l'importance des altérations histologiques observées. A faibles doses, 10 mg/kg/jr et 20 mg/kg/jr, GM s'est montré très peu agressif. L'administration de 200 mg/kg/jr ou  $10^{10}$  spores/kg/jr suggèrent une forte activation de la réponse immunitaire spécifique antifongique en réponse à la mycose induite. Cela est révélé par l'induction de dommages cyto-architecturaux plus importants :

- Au niveau de l'intestin grêle :
  - Hypertrophie de quelques villosités associée à l'altération de l'épithélium, vasodilatation et envahissement cellulaire du chorion.
  - Hyperplasie des plaques de Payer par accroissement des agrégats lymphoïdes.
- Au niveau du parenchyme splénique :
  - Hyperplasie de la pulpe blanche et fusion de quelques nodules spléniques alors que d'autres montrent un aspect dégénéré avec déplétion lymphocytaire sévère.
  - Fibrose, épaissement des parois artérielles et hémorragie.

Nous suggérons l'absence d'effet toxique remarquable de Green muscle vis-à-vis des mammifères une fois appliqué en plein champ à sa dose recommandée. Cependant nous recommandons en perspectives les notes suivantes :

- D'autres études plus approfondies de toxicité expérimentale à long termes (sur le système endocrinien et reproducteur, les paramètres de stress oxydant, le profil immunologique...) sont nécessaires pour caractériser les effets toxicologiques probables chez les mammifères.
- Des preuves soigneuses de biosécurité et de non toxicité après exposition au Green Muscle ou aux molécules fongiques (in vivo) restent indispensables pour évaluer les risques d'allergie ou de mycose chez les êtres humains (fabricant du bioinsecticide, agriculteur, habitants au voisinage de champs agricoles).
- L'utilisation du biopesticide en lutte antiacridienne nécessite une certaine précaution (évitement de l'inhalation des poussières de spores et le contact cutané ou oculaire...).

- Sensibiliser les agriculteurs sur les risques d'une mauvaise utilisation de cet insecticide biologique qui peut augmenter le risque d'exposition humaine à une échelle significative pour causer des problèmes de santé conséquents.

# Les références

- \***Abbasi Larki R, Zayerzadeh E, Harzandi N, Anissian A (2019)**- Toxicological examinations following oral administration of *Bacillus thuringiensis* var *kurstaki* biological insecticide in Wistar rats. *J Appl Biotechnol Rep.* 2019;6 (1):34-39.
- \***Alves-Filho, E. R., Maioli, T. U., Faria, A. M., Noronha, F. S., Silva, N. M., Costa, M. G., et al. (2011)**-The biocontrol fungus *Trichoderma stromaticum* downregulates respiratory burst and nitric oxide in phagocytes and IFN-gamma and IL-10. *J. Toxicol. Environ. Health A* 74, 943–958.
- \***Anand R. et Tiwary B.R. (2010)**- Profil de cytokine et cytotoxicité en réponse à une dose intratrachéale aiguë de *Metarhizium anisopliae* chez des souris BALB / c . *Med Mycol.* 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 F, kara-toumi F Z, Tail-Halil G, Saidi F, Ahmed Serir B (2017-b)**- Principales lésions hémolymphatiques observées chez les larves de *Dociotaurus maroccanus* traitées sur terrain par le Green muscle®, *Agrobiologia*, vol 7(2) pp 401-411.
- \***Arkam F., Saadi L., Fatma Zohra Kara-Toumi F.Z. (2019)** Histopathologie intestinale de *Dociostaurus maroccanus* traité avec GREEN MUSCLE *Inter. J. Nat. Resour. Env.* Vol. 1, No. 1; pp. 1-11 (2019)
- \***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.
- \* **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.
- \***Benzar A.B.( 1999 )**– Pour comprendre l'immunologie. Ed. Dés Iris. Paris. 192p.
- \***Bidochka M. J. et Kachatourians G. G., (1991)**- The implication of metabolic acid produced by *Beauveria bassiana* in pathogenesis of the migratory grasshopper, *Melanoplus sanguinipes*. *J. Invert. Path.*, n°58, pp: 106-117.
- \***Bissaad F Z, Youcef M, Bounacerur F, 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*, vol 6 pp 51-58.
- \* **Brancini GTP, Tonani L, Rangel DEN, Roberts DW, Braga GUL. (2018)**- Species of the *Metarhizium anisopliae* complex with diverse ecological niches display different susceptibilities to antifungal agents, *Fungal Biology* 2018; 1-7 <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2017.12.004>.

- \***Barbieri RT, Croce J, Gandra RF, Gagete E, Paula CR, Gambale W.(2005)**- Allergenic extracts from *Metarhiziumanisopliae* obtainment and characterization, *J Invest Allerg Clin*; 15: 131–139. <https://www.researchgate.net/publication/7697428>.
- \* **Benserradj.O., (2014)**- Evaluation de *Metarhizium anisopliae* à titre d'agent de lutte biologique contre les larves de moustiques, Thèse *de doctorat, université de Constantine 1*, 5p.
- \***Brunner K. et al., (2005)**- Improvement of the fungal biocontrol agent *Trichoderma atroviride* to enhance both antagonism and induction of plant systemic disease resistance. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71, 3959- 3965.
- \***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.
- \* **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 immunocompromised child. *J. Clin. Microbiol.* 36: 1146–1150.  
<https://jcm.asm.org/content/jcm/36/4/1146.full.pdf>
- \***Chandler D. et al., (2011)**- The development, regulation and use of biopesticides for integrated pest management. *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B.*, 366(1573), 1987- 1998.
- \***Chen X. et al., (2002)**- Comparative analysis of the complete genome sequences of *Helicoverpa zea* and *Helicoverpa armigera* single-nucleocapsid nucleopolyhedroviruses. *J. Gen. Virol.*, 83, 673-684.
- \* **Cepero de Garcia MC, Arboleda ML, Barraquer F, Grose E.(1997)**- Fungal keratitis caused by *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. *J. Med. Vet. Mycol.* ; 35: 361–363.
- \***Deravel J., Krier F. & Jacques Ph. (2014)**- Les biopesticides, compléments et alternatives aux produits phytosanitaires chimiques (synthèse bibliographique). *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 18(2), 220-232.
- \* **Douthwaite, B., Langewald, J., and Harris, J.,(2001)**- “Development and commercialization of the Green Muscle biopesticide”, © International Institute of Tropical Agriculture, Ibadan, Nigeria, , 23p.

## Références bibliographiques

---

- \* **E.P.A.,(2006)**- “Environmental Protection Agency, Imidacloprid risk characterization document dietary and drinking water exposure”, health assessment section, medical toxicology branch, department of pesticide regulation, California,.
- \***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.
- \***Fleisher L.A., (2012)** – Anesthesia and uncommon Diseases. Six<sup>th</sup> edition. Elsevier Health Science ,p.168.
- \***Garg U. K., Pal A. K., Jha G. J., Jadhao S. B., (2004)**- Haemato-biochemical and immunopathophysiological effects of chronic toxicity synthetic pyrethroid, organophosphate and chlorinated pesticides in broiler chicks. *International Immunopharmacology*, 4: 1709-1722.
- \***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.
- \* **Goettel MS, Hajek AE, Siegel JP, Evans HC.,(2001)**- Safety of Fungal Biocontrol Agents. In: Butt T, Jackson C, Magan N, editors. *Fungal Biocontrol Agents—Progress, Problems and Potential*. CABBI Press; 347–375.
- \* **Goettel MS, Jaronski ST.,(1997)**- 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 ; 171: 83–99.
- \***Greathead D.J., Kooyman C., Launois-Luong M.H et Popov G.B., (1994)**-. Les ennemis naturels des criquets du Sahel. Ed. Cirad/Prifas, „Collection Acridologie Opérationnelle n°8“, Montpellier, 147 p.
- \***Hadj Rabia-Haddaj F. (2014)**- Influence de certain paramètres sur la viabilité et le développement de deux champignons entomopathogènes *Beauverea Bassiana* et *Metarhizium anisopliae* var. *acidum*: Effet sur un aspect physiologique de *Schistocerca gregaria*. Thèse Doc, Sci. Agro., Ecol. Nat. Sup. Agro. El-Harrach 117p. 50



## Références bibliographiques

- \*Halouane,(2008)- F., “Recherche fondamentales sur l’entomopathogène *Beauveria bassiana* (Ascomycota : Hypocreales): Bioécologie, production et application sur *Schistocerca gregaria* (Forsk., 1775) et *Locusta migratoria* (Linné, 1758) (Orthoptera, Acrididae)”, Thèse Doctorat, Sci. Agro., Ecol. Nat. Sup. Agro., El-Harrach,190p
- \*Hansen, V. M., Winding, A., and Madsen, A. M. (2010)- Exposure to bioaresols during the growth season of tomatoes in an organic greenhouse using *Trichoderma harzianum* and Mycostop (*Streptomyces griseoviridis*). *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 5874–5881.
- \*Harman G., (2011)- *Trichoderma* not just for biocontrol anymore. *Phytoparasitica*, 39, 103-108.
- \*Instanes C, Ward MDW, Hetland G (2006)- The fungal biopesticide *Metarhizium anisopliae* has an adjuvant effect on the allergic response to ovalbumin in mice. *Toxicology Letters* ;161: 219–225.
- \* Jeuge-Maynard I., Karoubi L., Haboury F., Maire P., Houssemaine-Florent H., Ouvrard C., Klinkenberg J. M., Knecht P., Bédard J., Auger P., Boulanger J. C., Faye S., Durand B., Rein-Nikolaev N., Tamine M., Delacroix F., Charrier A., La Cotardière P., Margotin M., Giraud M., Girerd L., Baladier C., Bardintzeff J. M., Barthélemy G., Cheruette P., Collet J., Costaz G., Eudes M. T., Fortier D., Geoffroy E., Géré F., Grenié M., Laupies F., Lecomte N., Lemaire V., Margotin P., Mathivet E., Morvan P., Mougín P., Perrichet C., Poirier A., Saffar D., Sanfourche J. P., Watin-Augouard M., Zalkind S., Grosse F., Vaugeois D., Deschenes S., Charniot J. N., Chiesa P., Cuq M. L., Florent J., Grisat C., Olivaux T., Tamisier J. C., Jaspars W., Maljael S., Mouchot M., Pagès C., Biaujeaud M., Goldszal H., Meindl U., 2010- *Le petit Larousse illustré. Ed., Larousse, Paris, 1782p.*
- \* 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.
- \*Jiang W., Peng Y., Ye J., Wen Y., Liu G. et Xie J. (2019)- Effects of the Entomopathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae* on the Mortality and Immune Response of *Locusta migratoria* . *J. Insect* 18p.
- \* 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.
- \*Keith, D. et Kevan, M.E.,(1992)- “Les agents de la lutte biologique existant en potentiels contre les

orthoptéroïdes nuisibles”, 107 – 150 cités par Vincent C. et Coderred D., “La lutte biologique”, Ed. Gaëtan Morin, Québec, 67 p.

\***Kierszenbaum A. L., (2006)**- Histologie et biologie cellulaire : une introduction à l’anatomie pathologique. Ed., De Boeck & Larcier, Espagne, 593p.

\***Kouassi é, Revillard J-P , Fournier M , Ayotte P, Roy R ,Brousseau P & Hadji L, (2003) -** Système immunitaire . In: Environnement et santé publique- Fondements et pratique .Edisem /Tec & Doc, Acton Vale / Paris .PP 687-698.

\***Kuhn, D. M., and Ghannoum, M. A., (2003)**- Indoor mold, toxigenic fungi, and stachybotrys chartarum: infectious disease perspective. Clin. Microbiol. Rev. 16, 144–172.

\***Leng P., Zhiming Z., Guangtang P. & Maojun Z., (2011)**-Applications and development trends in biopesticides. Afr. J. Biotechnol., 10(86), 19864-19873.

\***Lomer, C.J., Bateman, R.P., Johnson, D.L., Langewald, J. & Thomas, M.B.,(2001)**- “Biological control of locusts and grasshoppers”, Annu. Rev. Entomol. 46, 667–702.

\***Luangsa-Ard, J., Houbraken, J., van Doorn, T., Hong, S. B., Borman, A. M., Hywel-Jones, N. L., et al. (2011)**- Purpureocillium, a new genus for the medically important Paecilomyces lilacinus. FEMS Microbiol Lett. 321, 141–149.

\* **LUBILOSA.,(1999)**- “Green Muscle, Manuel d’utilisateur, Version 4”, lutte Biologique contre les Locustes et les Sautériaux, programme, International Institute of Tropical Agriculture, Cotonou, Bénin, (1999).

\* **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.

\***Moat et al.,(2003)**- Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. Nature reviews immunology.

\***Motaung T.E.,(2020)**- Chloronicotinyl insecticide imidacloprid: Agricultural relevance, pitfalls and emerging opportunities *Crop Protection* 131 , 10509.

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

\* **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.

- \* 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.
- \* NIMP (Norme internationale pour les mesures phytosanitaires, (2005) produit par le Secrétariat de la Convention internationale pour la protection des végétaux  
FAO ORGANISATION DES NATIONS UNIES POUR L'ALIMENTATION ET L'AGRICULTURE Rome, 2006. 27p.
- \*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.,(2017)- Species of *Metarhizium anisopliae* complex implicated in human infections: retrospective sequencing study. *Clin. Microbiol. Infect.*; 23: 994- 999.
- \*Ongena M. & Jacques P.,( 2008)- *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends Microbiol.*, 16(3), 115-125.
- \*Option Bio- Novembre Décembre., (2016)- n°553-554 page :27
- \*Osorio S, De la Camara R, Monteserin MC.,(2007)- Recurrent disseminated skin lesions due to *Metarhizium anisopliae* in an adult patient with acute myelogenous leukemia. *J. Clin Microbiol.* ; 45 : 651 – 655.
- \*Revankar SG, Sutton DA, Sanche SE, Rao J, Zervos M, Dashti F, Rinald MG.,(1999)- *Metarhizium anisopliae* as a cause of sinusitis in immunocompetent hosts. *J Clin Microbiol*; 37: 195–198.
- \* Roberts, D.W., St Leger, R.J., (2004)- *Metarhizium spp.*, cosmopolitan insect-pathogenic fungi: mycological aspects. *Adv. Appl. Microbiol.* 54, 1e70.
- \*Rosas-Garcia N.M., (2009)- Biopesticide production from *Bacillus thuringiensis*: an environmentally friendly alternative. *Recent Pat. Biotechnol.*, 3(1), 28-36.
- \*Petr J, Seamus J, Bennis R & Ivan M., (2008)- fonction de l'immunologie . De Boeck Ed .Bruscelle ,Paris .452p.
- \*Popp J., Petö K. & Nagy J., (2013)- Pesticide productivity and food security. A review. *Agron. Sustainable Dev.*, 33, 243-255.

## Références bibliographiques

---

- \* **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.
- \***Shaddock J.A., Roberts D.W., Lause S. (1982)**- Mammalian safety tests of *Metarhizium anisopliae*: preliminary results. *Environ. Entomol.* 80: 189–192.
- \***Shin, S. H., Ponikau, J. U., Sherris, D. A., Congdon, D., Frigas, E., and Homburger, H. A., (2004)**-Chronic rhinosinusitis: an enhanced immune response to ubiquitous airborne fungi. *J. Allergy Clin. Immunol.* 114, 1369–1375.
- \***Siegel JP.,(1997)**- Chapter VII-Testing the pathogenicity and infectivity of entomopathogens to mammals. In: Lacey LA. (Ed.) *Manual of Techniques in Insect Pathology*. Academic Press, San Diego ; 325–336 .
- \* **Stevens A., Lowe J., (1997)**- *Histologie humaine. Ed., De Boeck & Larcier, Belgique, 406p.*
- \***Suty L., (2010)**- *La lutte biologique vers de nouveau équilibre biologique. Ed. Educari., 192p.*
- \***Thakore Y., (2006)**-. The biopesticide market for global agriculture use. *Ind. Biotechnol.*, 2, 194-208.
- \***Toriello C, Perez-Torres A, Burciaga-Diaz A, Navarro-Barranco H, Perez-Mejia A, Lorenzana-Jimenez M, Mier T.,(2006)**- Lack of acute pathogenicity and toxicity in mice of an isolate of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* from spittle bugs. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* ; 65: 278-287.<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2005.07.016>.
- \***Vestergaard S., Cherry A., Keller S. & Goettel M. ,(2003)**- Safety of hyphomycete fungi as microbial control.
- \***Ward MDW, Chung YJ, Copeland LB, Doerfler DL(2011)**- Allergic Responses Induced by a Fungal Biopesticide *Metarhizium anisopliae* and House Dust Mite are compared in a mouse model p.16. <http://dx.doi.org/10.1155/2011/360805>.
- \***Ward MDW, Chung YJ, Haykal-Coates N, Copeland LB. ,(2009)**-Differential allergy responses to *Metarhizium anisopliae* fungal component extracts in BALB/c mice. *Journal of Immunotoxicology* ; 6: 62–73.
- \***Washburn J., Trudeau D., Wong J. & Volkman L., (2003)**- Early pathogenesis of *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus and *Helicoverpa zea* single nucleopolyhedrovirus in

## Références bibliographiques

---

*Heliothis virescens*: a comparison of the 'M' and 'S' strategies for establishing fatal infection. J. Gen. Virol., 84, 343-351.

**\*Wheater P. R., Young B., Heath J. W., (2004)-** Histologie fonctionnelle. Ed., De Boeck & Larcier, Espagne, 413p.

**\*Zimmermann G.,(2007)-** Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. Biocontrol Science and Technology ; 17: 879-920.

# Les annexes



# Annexe 1

## 1. Fiche technique de GREEN MUSCLE ®

### ➤ Information Générale

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

### ➤ Matière active

- **Matière active :** Matériel biologique
- **Nom scientifique de l'agent biologique :** *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* souche IMI 330189
- **Stade de développement :** Conidies (spores).
- **Nature de l'organisme :** un champignon pathogène appartenant au groupe des champignons mitosporiques, qui sont des anamorphes (stades asexués) de champignons dans l'embranchement Ascomycota. Il est très spécifique aux criquets. Parce que les criquets ont la capacité de détoxifier les toxines des autres champignons entomopathogènes, *M. acridum* a développé une autre stratégie pour tuer son hôte et dans le processus a perdu les gènes pour la synthèse de toxines.
- **Contenu en matière active :**  $\pm 5 \cdot 10^{10}$  spores sèches par g
- **Viabilité à l'issue de l'usine :** Au moins 90%
- **Impuretés :** moins d'1%
- **Contenu en eau :** moins de 6%
- **Taille des particules :** moins de 60  $\mu\text{m}$

### ➤ Formulation

- **Type de formulation:** TC
- **Liquide de mélange :** Gasoil ou une autre huile appropriée, par ex. 70% pétrole lampante plus 30% huile végétale.
- **Dose recommandée :** 50 g/ha dans 1 L (application aérienne) ou 2 L (application terrestre) de gasoil.
- **Doses appliquées :** 25 à 100 g/ha : selon la densité de la végétation et la viabilité des spores.



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

➤ Propriétés physico-chimiques

- **Apparence :** Poudre fine de couleur vert marin.
- **Odeur :** sans odeur particulière
- **Stabilité :** Durée de stockage > 5 ans à 4°C.
- **Incompatibilités :** Incompatible avec la plupart des fongicides
- **Compatibilité avec d'autres pesticides :** compatible avec certains pesticides utilisés dans la lutte antiacridienne, par ex. les pyréthriinoïdes.
- **Stabilité en stockage :** Des données expérimentales montrent que des conidies sèches ( $\leq 5\%$  contenu en eau) peuvent être stockées jusqu'à 2 ans à  $\pm 20^\circ\text{C}$  et pendant plus de 3 ans à  $< 10^\circ\text{C}$ . Des modèles de stockage indiquent qu'une viabilité des conidies de  $> 80\%$  peut être maintenue pendant  $> 10$  ans, si le matériel technique est stocké dans des sachets imperméables sous réfrigération ( $< 10^\circ\text{C}$ ). Sous des conditions de stockage tropicales, une durée de vie de  $> 2$  ans peut être attendue à des températures de nuit/jour de 20 - 30°C et approximativement 6 mois sous un régime de 30 - 40°C.

➤ Toxicité et pathogénicité

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

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



**Figure 17:** Le biopesticide Green Muscle (IMI 330139) (a), le manuel d'utilisateur (b) et la fiche technique (c) (Arkam, 2019).

## **2. Fiche technique du test de germination des spores de *M. anisopliae***

### Objectif du test:

Avant toute utilisation du biopesticide Green muscle il est recommandée de réaliser le test de germination pour vérifier la viabilité des spores (conidies) du champignon entomopathogène c'est à dire le pouvoir germinatif des spores après mise en culture.

### Protocole de la réalisation du test :

- Peser 0,2g des spores en poussière de Green muscle formulé
- Ajouter 1 ml de Tween 80, mélanger jusqu'à l'obtention d'une pâte
- diluer la pâte dans 99 ml de pétrole (a).
- Prélever 1 ml de (a) et diluer dans 9 ml de pétrole (b).
- Ensemencer avec trois gouttes de la solution (b) grâce à une pipette la boîte de pétri renfermant le milieu de culture PDA sous des conditions stériles.
- Étaler avec un étaleur préalablement stérilisé au bec benzène.
- Refermer les boîtes de pétri, les étiqueter et les placer à 28°C pendant 24 heures.
- Couper un morceau d'agar (max. 2×2cm), le placer sur une lame, ajouter une goutte d'huile d'immersion et poser une lamelle.

- Observer au microscope, grossissement 100. Compter si possible avec deux compteurs manuels, l'un pour les spores ayant germé et l'autre pour les spores n'ayant pas germé, jusqu'à 300 spore. Compter toutes les spores dans un champ de vue avant de faire bouger la lame. Evitez de compter les spores qui se trouvent en agrégats.
- Répéter l'opération de comptage trois fois et calculer le taux de germination (TG) avec la formule suivante :

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

a : nombre de spores ayant germé

b : nombre de spores n'ayant pas germée

**Tableau II:** Nombre de spores germés et non germés du test de germination

	Champ 1	Champ 2	Champ 3	Champ 4	Champ 5	Moyenne
Spores germées	228	230	239	242	240	235,8
Spores non germées	72	70	61	58	60	64,2

Les résultats illustrés dans le tableau ci-dessus montrent que le Green muscle possède une viabilité de spores de 78,33 % après 48 heures.

### 3. Fiche technique des colorations

- Le protocole de coloration à l'hématoxyline-éosine

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

#### ➤ Le protocole de coloration à Trichrome de Masson

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



**Figure 18** : Dissection des rats et prélèvement des organes (Originale)

## Annexe 2

lot	rats	Poids corporel (g) Début exp (J1)	Poids corporel (g) Fin exp (J15)	Aug relative du PC (%)
Témoin	1	160	176	10
	2	155	174	12,25
	3	150	167	11,33
	4	161	176	9,32
	5	170	188	10,59
	M ± ET	159,2 ± 7,46	176,2 ± 7,56	10,70 ± 1,14
D1= 200 mg de GM /kg /jr contenant environ 10 <sup>10</sup> spores /kg /jr (correspond à environ 1/10 DL50 GM)	1	150	162	8
	2	189	205	8,46
	3	192	210	9,375
	4	141	157	11,35
	5	140	158	12,86
	M ± ET	162,4 ± 25,96	178,4 ± 26,68	10,00 ± 2,04
D2= 20 mg de GM /kg/jr contenant environ 10 <sup>9</sup> spores /kg/jr (correspond à environ : 1/100 DL50 GM)	1	167	183	9,58
	2	152	169	11,18
	3	172	190	10,46
	4	155	172	10,97
	5	176	194	10,23
	M ± ET	164,4 ± 10,50	181,6 ± 10,92	10,48 ± 0,63
D3= 10 mg de GM /kg/jr contenant environ 5×10 <sup>8</sup> spores /kg/jr (correspond à environ : 1/200 DL50 GM)	1	173	190	9,83
	2	174	189	8,62
	3	163	182	11,66
	4	179	196	9,50
	5	175	189	8
	M ± ET	172,8 ± 5,93	189,2 ± 4,96	9,52 ± 1,39

**Tableau III :** Evolution du poids corporels (PC) et augmentation relative du PC chez les rats Wistar témoins et traités avec le biopesticide Green muscle (GM) pendant 15 jours par voie oral

-PC : poids corporel de rats Wistar en g; Jr :jour ; Sp : spores de *M. anisopliae* ;

-GM : le biopesticide Green Muscle® ; DL50 : dose létale 50

**Tableau IV :** Définition des groupes homogènes du paramètre Augmentation relative du poids

corporels chez les rats témoins et traités avec le Green muscle (d'après le test de Tukey). : **Analyse de variance (ANOVA) relative à l'augmentation du poids corporel entre début et fin de l'expérimentation pour chaque lot de rats**

		La somme des carrés	df	Le carré moyen	F	Signification
<b>D1= 200mg GM /Kg /jr</b>	Entre les groupes	640,000	1	640,00	,923	,365  <b>Différence non significative</b>
	Dans les groupes	5546,400	8	693,30		
	Total	6186,400	9			
<b>Témoin</b>	Entre les groupes	722,500	1	722,50	12,799	,007  <b>Différence Hautement significative</b>
	Dans les groupes	451,600	8	56,450		
	Total	1174,100	9			
<b>D2= 20 mg GM /Kg /jr</b>	Entre les groupes	739,600	1	739,60	6,443	,035  <b>Différence significative</b>
	Dans les groupes	918,400	8	114,80		
	Total	1658,000	9			
<b>D3= 10 mg GM/ Kg /jr</b>	Entre les groupes	672,400	1	672,40	22,451	,001  <b>Différence hautement significative</b>
	Dans les groupes	239,600	8	29,950		
	Total	912,000	9			

**Tableau V** : Analyse de la variance de l'augmentation relative des poids corporels chez les rats témoins et traités avec le green muscle

		La somme des carrés	df	Le carré moyen	F	Signification
Augmentation relative du poids corporels	Entre les groupes	4,116	3	1,372	,700	,566
	Dans les groupes	31,376	16	1,961		
	Total	35,492	19			<b>Non significative</b>

**Tableau VI** : Test de comparaison multiple du paramètre augmentation relative des poids corporels chez les rats témoins et traités avec le Green Muscle(d'après le test de Tukey).

Tukey HSD

Variable dépendante			Différence moyenne (I-J)	Std. erreur	Sig.	95% Intervalle de confiance	
						Limite inférieure	Limite supérieure
Augmentation relative du poids corporels	(I) lots de rats	(J) lots de rats					
	Témoin	-200 mg GM	,69000	,88566	,863	-1,8439	3,2239
		-20 mg GM	,21400	,88566	,995	-2,3199	2,7479
		10 mg GM	1,17600	,88566	,560	-1,3579	3,7099
	200 mg GM	Témoin	-,69000	,88566	,863	-3,2239	1,8439
		20 mg GM	-,47600	,88566	,949	-3,0099	2,0579
		10 mg GM	,48600	,88566	,946	-2,0479	3,0199
	20 mg GM	Témoin	-,21400	,88566	,995	-2,7479	2,3199
		200 mg GM	,47600	,88566	,949	-2,0579	3,0099
		10 mg GM	,96200	,88566	,703	-1,5719	3,4959
	10 mg GM	Témoin	-1,17600	,88566	,560	-3,7099	1,3579
		200 mg GM	-,48600	,88566	,946	-3,0199	2,0479
	20 mg GM	-,96200	,88566	,703	-3,4959	1,5719	

\*. La différencemoyenneest significative au niveau de 0,05.



**Tableau V** : Définition des groupes homogènes du paramètre Augmentation relative du poids corporels chez les rats témoins et traités avec le Green muscle (**d'après le test de Tukey**).

lots de rats	N	Sous-ensemble pour l'alpha = 0.05	
		1	
10 mg GM	5	9,5220	
200 mg GM	5	10,0080	
20 mg GM	5	10,4840	
Témoin	5	10,6980	
Signification		,560	

Les moyens des groupes dans des sous-ensembles homogènes sont affichés.

a. Utilise la taille moyenne harmonique de l'échantillon = 5, 000.

