

---

Soumis le : 30 Novembre 2010  
 Forme révisée acceptée le : 19 Juin 2011  
 Email de l'auteur correspondant :  
 bissaad@yahoo.com

---

## Activité biologique d'un biopesticide le Green muscle sur le tégument du criquet pèlerin *Schistocerca gregaria* (Forskål, 1775) (Orthoptera, Acrididae).

BISSAAD Fatima Zohra <sup>a</sup>, YOUCEF Mahmoud <sup>b</sup>, BOUNACERUR Farid <sup>b</sup> et DOUMANDJI-MITICHE Bahia <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université de M'hamed Bougara, BP35000 Boumerdès (Algérie)

<sup>b</sup> Département de Zoologie Agricole et Forestière, Institut National Agronomique, BP16200 Alger, (Algérie).

### Résumé

Des larves de 5<sup>ème</sup> stade (L5) de criquet pèlerin *Schistocerca gregaria* mâles et femelles ont été traitées par contact à la DL50= 31,74x106 spores/ml par un biopesticide le green muscle à base du champignon entomopathogène *Metarhizium anisopliae* var *acridum*. A différents temps après traitement (1, 3, 6 et 9 jours), nous avons déterminé le poids sec de la cuticule sternale abdominale, sa teneur en protéines et en chitine et des coupes histologiques ont été effectuées chez les individus témoins et traités. Les résultats ont montré que les larves L5 femelles présentent un poids sec de la cuticule, une teneur en protéines et en chitine supérieurs à ceux des L5 mâles. Le traitement par l'entomopathogène *M. anisopliae* var *acridum* entraîne une diminution des trois paramètres étudiés. Des perturbations histopathologiques sont apparues au niveau de la cuticule chez les individus traités. Nous avons noté une disparition complète de l'épicuticule et une nette diminution dans l'épaisseur de l'exocuticule et l'endocuticule.

*Mots clés* : *Schistocerca gregaria*, *Metarhizium anisopliae* var *acridum*, cuticule, chitine, protéines.

### 1. Introduction

Le Criquet pèlerin, *Schistocerca gregaria* (Forskål, 1775), est le ravageur majeur pour de nombreux pays d'Afrique, du Proche et Moyen-Orient. Depuis des siècles, les invasions se sont succédé à un rythme élevé. Depuis une quarantaine d'années, elles se font plus rares. Cette situation résulte largement d'une meilleure connaissance du problème associée à l'apparition de nouveaux moyens de surveillance et de lutte. La stratégie de prévention actuellement conduite par les pays repose sur la connaissance des foyers de grégarisation. C'est là que se forment les premiers rassemblements (bandes larvaires et essaims) qu'il convient d'éliminer précocement avant qu'ils ne se disséminent et ne soient à l'origine d'une invasion. Une connaissance précise de la localisation et du fonctionnement de ces foyers de grégarisation, pour la plupart situés en zones désertiques, est indispensable [1].

Pour combattre cet acridien, les 57 pays envahis, qui couvrent plus de 20 % des terres émergées, par ce ravageur ont mobilisé des moyens importants (avions, armée, véhicules etc...). Des opérations de lutte chimique intensive terrestre et aérienne ont été engagées dans les

zones infestées par l'utilisation de tout un arsenal d'insecticides. Des centaines de milliers de litres de pesticides ont été commandés et livrés pour combattre les criquets pèlerins. Cependant, l'utilisation intensive des produits chimiques dans la lutte anti-acridienne présente des risques réels pour la santé des populations, des animaux et pour l'environnement. En effet, les pesticides sont des substances toxiques utilisées pour tuer des êtres vivants «nuisibles» et donc dangereux aussi pour les êtres vivants que nous sommes et pour les animaux. Il est difficile d'arrêter une invasion acridienne généralisée une fois déclenchée, malgré l'utilisation de moyens de lutte intensive. Les opérations de lutte curative nécessitent des moyens énormes et des coûts élevés. Par ailleurs, les importantes quantités de pesticides utilisées ne peuvent rester sans effet sur la santé et l'environnement. Il est donc urgent d'explorer d'autres formes de lutte afin de mieux préserver la santé et l'environnement [2].

Le *Metarhizium anisopliae* var *acridum* (code IMI : 300189) dont le nom commercial est le Green Muscle retrouvé sur *Ornithacris cavroisi* (Finot, 1907) (Orthoptera, Cyrtacanthacridinae) au Niger s'est avéré le plus virulent [3]. Les traitements effectués par ce champignon en plein champ ont montré qu'il agit en 10 jours et que tous les stades de l'acridien sont sensibles [4].

Quand il est appliqué sur terrain, la mortalité des insectes peut atteindre 22 jours après traitement 100% [5].

Au laboratoire, l'application topique du Green Muscle chez les jeunes larves L5 de *S. gregaria* a permis de déterminer une DL50 estimée à  $31,74 \times 10^6$  spores/ml [6].

Lors de sa pénétration dans le corps de l'insecte, ce champignon secrète des enzymes microbiennes inhibitrices telles que les protéases et les chitinases. Ces dernières peuvent inhiber la formation de la cuticule en induisant une exuviation anormale et mortelle de l'acridien.

L'utilisation des biopesticides à base d'entomopathogènes dans le cadre de la lutte anti-acridienne a révélé des résultats encourageants, comme cela a été démontré lors des essais en laboratoire et en plein champ, cas de la wilaya d'El Oued au Nord-Est de l'Algérie. D'autres travaux ont été menés sur le plan national et international [2].

Par ailleurs, la plupart des études ont principalement focalisé sur le taux de mortalité et la diminution des réserves. Aucune étude n'a montré l'effet de traitement sur le fonctionnement histologique de criquet pèlerin. Dans ce cadre, nous avons jugé utile d'examiner l'effet de ce biopesticide sur la biochimie et la structure du tégment de cet acridien.

## 2. Matériel et méthodes

### 2.1. Matériel biologique

**Le criquet pèlerin** : Les individus de *S. gregaria* sont élevés dans des cages parallélépipédiques en bois de dimension : 21x45x77cm grillagées sur 2 cotés. Ils sont soumis à une température de  $30 \pm 5$  °C et à une photopériodique de 12 heures de lumière sur 12 heures d'obscurité et à une humidité relative de  $70 \pm 5\%$ . La nourriture est composée de gazon, d'avoine et de choux avec un complément de son de blé fourni à volonté.

**La souche fongique** : Les conidies de champignon *M. anisopliae* var *acridum* utilisées dans cette étude appartiennent à la souche IMI : 300189 obtenus à partir d'un biopesticide Green Muscle® en prévenance de l'Institut National de la Protection des Végétaux d'El Harrach, Alger. La multiplication de ce champignon a été réalisé sur un milieu de culture nutritif PDA (Potatos Dextrose Agar) dans des boîtes de Pétri incubées à une température de  $25 \pm 1$  °C.

### 2.2. Préparation de l'inoculum

Après 10 jours d'incubation du champignon, quelques fragments de culture prélevés sont introduits dans un Erlen Meyer contenant 100ml d'eau distillée stérile. Après 10mn d'agitation, la concentration de la suspension est déterminée en utilisant la cellule hématimétrique de

Malassez. Des dilutions sont réalisées dans de l'eau distillée jusqu'à l'obtention de la concentration voulue ( $DL50 = 31,74 \times 10^6$  spores/ml).

### 2.3. Traitement

Pour nos essais nous avons choisi des larves de 5<sup>ème</sup> stade (considérées les plus vulnérables) mâles et femelles âgées de 4 jours. Ces dernières sont réparties en deux lots : un 1<sup>er</sup> lot de traitées au *M. anisopliae* var *acridum* et un 2<sup>ème</sup> lot de témoins. Chaque lot contient 24 larves mâles et 24 larves femelles par répétition (3 répétitions sont effectuées). Le traitement des 2 lots est appliqué par contact direct sur le corps de l'insecte. Le traitement est effectué par une application topique de 5µl de *M. anisopliae* en utilisant une micro seringue ( $31,74 \times 10^6$  spores/ml) une solution est déposée au dessus du pronotum de tous les individus traités. Les témoins ont reçu uniquement de l'eau distillée stérile.

### 2.4. Détermination du taux de chitine - protéine cuticulaire

A partir de chaque lot (Traité et témoin), cinq individus sont sacrifiés au 1<sup>er</sup>, 3<sup>ème</sup>, 6<sup>ème</sup> et 9<sup>ème</sup> jour. L'abdomen est sectionné du reste du corps, ainsi que son extrémité postérieure. A l'aide de pinces fines, on enlève les viscères, les muscles et le tissu adipeux. Les sternites abdominaux sont ensuite déposés entre deux feuilles de papier filtre pour enlever le reste des tissus pouvant adhérer à la cuticule.

Pour la détermination de la teneur en chitine et en protéine nous sommes basé sur la technique de Bordereau et Anderson (1978) qui consiste à prélever les parois abdominales des criquets témoins et traités, puis les placer dans un mélange éther-chloroforme (V/V:1/1) à température ambiante pendant 24h qui permet d'éliminer toutes traces lipidiques. Ensuite, rincer à l'alcool 96°, et sécher à l'étuve à 60 °C pendant une heure jusqu'à obtention d'un poids sec P1 constant. Après, les échantillons sont traités par du NaOH (2N) à 100 °C pendant 2 heures, ce qui provoque une hydrolyse des protéines, et on obtient ainsi un résidu correspondant à la chitine. Celui-ci est récupéré et lavé à l'éthanol absolu, puis séché une 2<sup>ème</sup> fois à 60°C jusqu'à obtention d'un second poids sec P2 constant [7]. Les pesées sont réalisées grâce à une balance de précision à 0,1mg. Sachant que :

- P1 - P2 : la teneur en protéines totales cuticulaires.
- P1 : Poids sec de la cuticule (mg) sans les lipides.
- P2 : Quantité de la chitine (mg).

### 2.5. Etude histologique

Pour cette étude, nous nous sommes basé sur la technique de Martoja et Martoja-Pierson (1967). Les insectes sont sacrifiés sept jours après traitement. Après

dissection, on prélève les tubes digestifs et on les place dans un pilulier étiqueté et rempli d'un liquide fixateur, le Bouin de Hollande. Avant de passer à l'étape de déshydratation, les tubes digestifs sont lavés à l'eau courante pendant 24h afin d'éliminer l'excès de liquide fixateur.

Puisque la paraffine n'est pas miscible à l'eau, il faut d'abord extraire cette dernière des tissus en effectuant des passages successifs des tubes digestifs dans des bains d'alcool d'ordre croissant, soit : (70°, 95°, 100°) puis dans du butanol. L'imprégnation à la paraffine se déroule dans l'étuve à une température entre 58 à 60°C. Ensuite, les blocs sont confectionnés, puis coupés par le microtome à 7µm d'épaisseur. Avant de passer à l'observation, nous avons coloré nos coupes par la coloration différentielle à l'azan de Heidenhain. Le montage des coupes est effectué entre lame et lamelle en utilisant le baume de Canada. Les observations microscopiques ont été réalisées avec un objectif micrométrique et un dispositif de prise de photos au grossissement (x40) [8].

## 2.6. Analyse statistique

Les résultats sont rapportés sous forme de moyennes ± écarts types et comparées par le test two-way ANOVA (le logiciel XL. STAT version 6.0 - ANOVA-d'intervalle de confiance de 95%). Les différences entre les moyennes sont étudiées en utilisant le test de Newman et Keuls et sont considérées significatives à  $p < 0,05$ .

## 3. Résultats

Le mode d'action des champignons entomopathogènes se divise en quatre étapes distinctes qui sont l'adhésion, la germination, la différenciation et la pénétration. L'adhésion est caractérisée par un mécanisme de reconnaissance et de compatibilité des conidies avec les cellules tégumentaires de l'insecte. Cette phase se scinde en deux étapes distinctes, la première passive où

l'attachement à la cuticule est réalisé grâce à des forces hydrophobiques et électrostatiques et la seconde active caractérisée par la production d'un mucilage qui va engendrer une modification épicuticulaire aboutissant à la germination. La germination va être dépendante des conditions environnantes et aussi de la physiologie de l'hôte (composition biochimique de la cuticule) qui peut favoriser ou inhiber la germination. L'avant dernière phase est la différenciation, caractérisée par la production d'appressoria, structures terminales qui vont servir de point d'encrage, de ramollissement de la cuticule et favoriser la pénétration. La production des appressoria est très dépendante de la valeur nutritive de la cuticule de l'hôte. Une cuticule nutritive va stimuler la croissance myceliale plutôt que la pénétration. La dernière phase est la pénétration de l'hôte qui se fait par la combinaison de pression mécanique et enzymatique telles que les lipases, les protéases et les chitinases, la plus importante dans la pénétration étant les protéases.

### 3.1. Effet sur le poids sec de la cuticule

La durée de développement du stade L5 à l'imago est de 13 jours pour les larves témoins, alors que les larves traitées n'ont pas pu effectuer leurs mues imaginales et elles sont toutes mortes avant d'atteindre ce stade. D'après les résultats obtenus, nous avons remarqué que le poids sec de la cuticule sternale abdominale évolue dans le temps aussi bien chez les larves témoins que les larves traitées chez les deux sexes. Cependant, le traitement par *M. anisopliae* a significativement baissé le poids de la cuticule au cours du temps chez les individus traités comparativement aux témoins. En effet, au 9<sup>ème</sup> jour, le poids enregistré chez les mâles varie de 16,98±1,27mg à 13,93±1,48mg et pour les femelles de 24,39±7,03mg à 16,97±2,58mg respectivement chez les individus témoins et traités ( $P=0,005$ ) (Fig. 1 et 2).

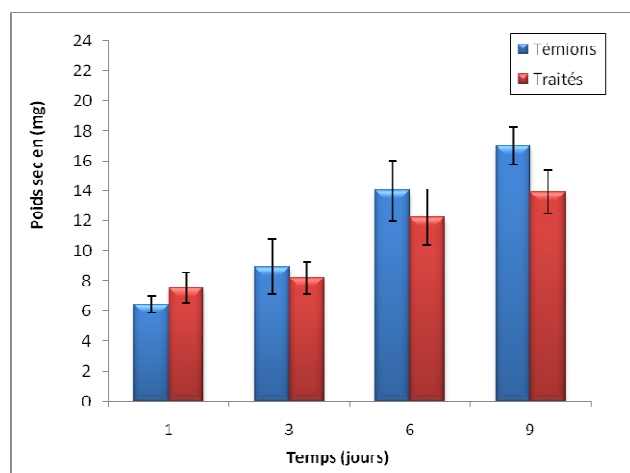


Figure 1. Evolution du poids sec de la cuticule abdominale des L5 mâles de *S. gregaria* témoins et traités au *M. anisopliae var acridum* à la DL50 avec application de 3 répétitions

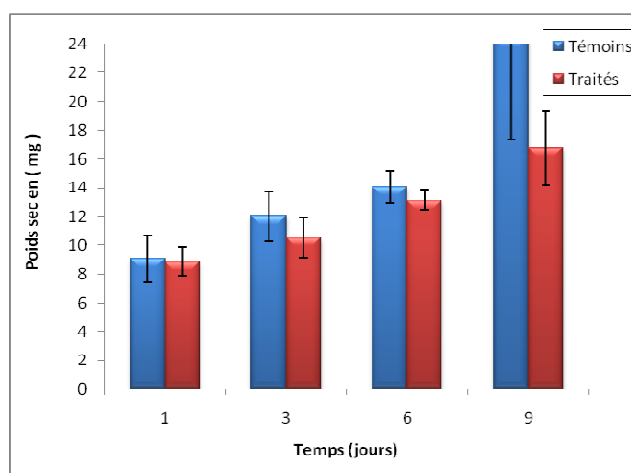


Figure 2. Evolution du poids sec de la cuticule abdominale des L5 femelles de *S. gregaria* témoins et traités au *M. anisopliae var acridum* à la DL50 avec application de 3 répétitions

### 3.2. Effet sur la quantité en protéines

Le traitement au *M. anisopliae* a significativement diminué ( $P=0,04$ ) la quantité des protéines contenues dans la cuticule sternale abdominale des L5 mâles de

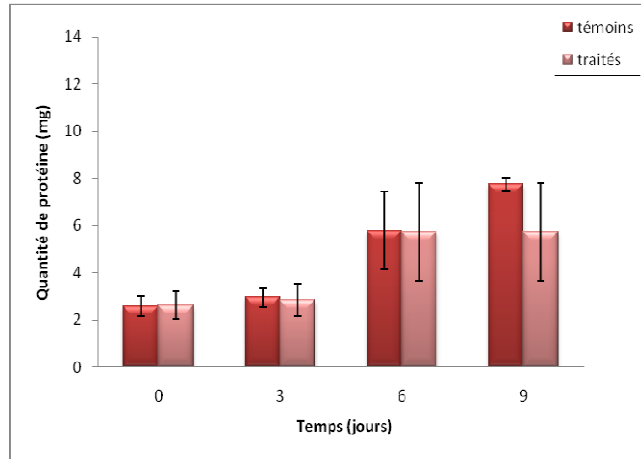


Figure 3. Evolution de la quantité de protéine cuticulaire des L5 mâles de *S. gregaria* témoins et traitées au *M. anisopliae var acridum* à la DL50 avec application de 3 répétitions

9,48±0,17mg à 820±0,60mg et des L5 femelles de *S. gregaria* de 13,92±4,34 à 9,01±2,35 chez les traitées par rapport aux témoins. La quantité des protéines de la cuticule des L5 femelles est significativement plus élevée à celle des L5 mâles avant et après traitement (fig. 3 et 4).

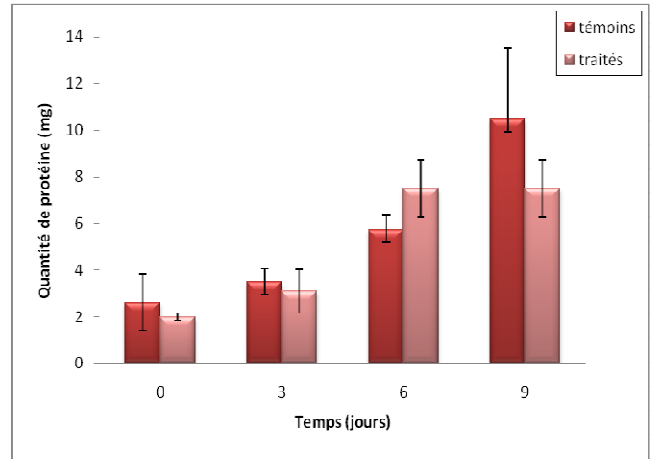


Figure 4. Evolution de la quantité de protéine cuticulaire des L5 femelles de *S. gregaria* témoins et traitées au *M. anisopliae var acridum* à la DL50 avec application de 3 répétitions

### 3.3. Effet sur la quantité de chitine

A travers les résultats montrés sur les figures 5 et 6, il ressort que le traitement au *M. anisopliae var acridum* a significativement diminué la quantité en chitine contenue dans la cuticule sternale abdominale des larves témoins par rapport aux traitées ( $P<0,05$ ). Aussi, nous avons

enregistré au 9<sup>ème</sup> jour de traitement une quantité de chitine de *S. gregaria* qui varie de 7,5±1,25mg à 5,72±2,08mg chez les L5 mâles et de 10,47±3,01mg à 7,75±0,26mg chez les L5 femelles de la série d'individus traités par rapport aux témoins. La quantité de chitine des larves L5 femelles est toujours plus élevée que celle des L5 mâles avant et après traitement.

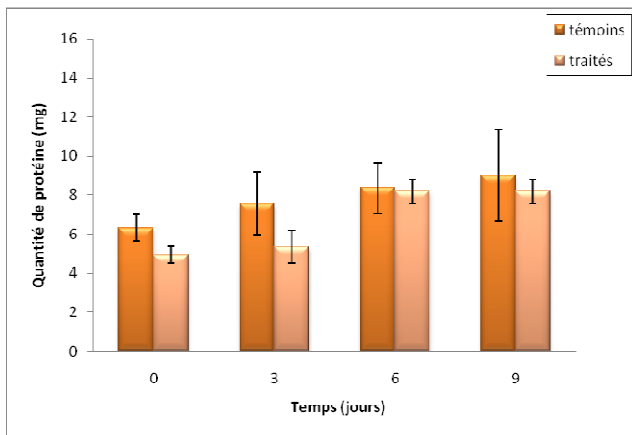


Figure 5. Evolution de la quantité de chitine cuticulaire des L5 mâles de *S. gregaria* témoins et traitées au *M. anisopliae var acridum* à la DL50 avec application de 3 répétitions

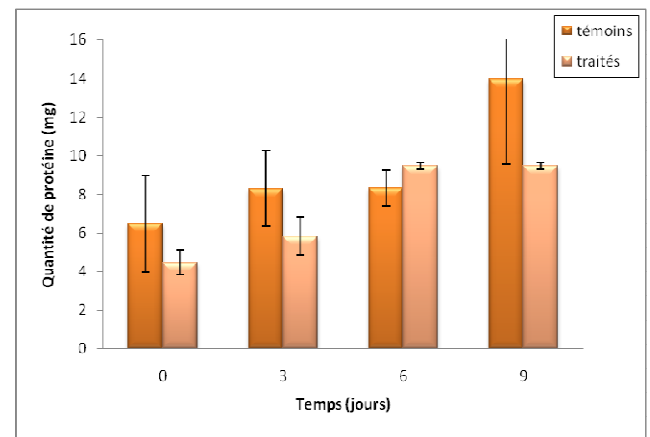


Figure 6. Evolution de la quantité de chitine cuticulaire des L5 femelles de *S. gregaria* témoins et traitées au *M. anisopliae var acridum* à la DL50 avec application de 3 répétitions

### 3.4. Effet sur la structure de la cuticule

Chez les L5 témoins, la structure de la cuticule montre l'existence de 3 couches : l'épicuticule, l'exocuticule et l'endocuticule. En effet, l'épicuticule est la couche la plus externe et est colorée en rouge, elle est très mince et d'une épaisseur faible. L'exocuticule représente la couche intermédiaire entre l'épicuticule et l'endocuticule plus épaisse que la première est colorée en orange. La troisième couche est l'endocuticule, c'est la couche la plus épaisse, elle présente une structure lamellaire et est colorée en bleu. L'application de *M.anisopliae* sur le tégument des larves de 5<sup>ème</sup> stade de *S.gregaria* a montré des perturbations apparentes au niveau de la structure de la cuticule. Au 6<sup>ème</sup> jour de traitement, on a pu observer une disparition complète de l'épicuticule et une nette régression dans l'épaisseur de l'exocuticule et l'endocuticule et ce comparativement à la cuticule des larves témoins où les trois couches sont bien distinctes et apparentes avec une épaisseur visiblement plus grande. Nos résultats montrent aussi que le champignon a engendré des altérations au niveau de la structure de la cuticule surtout du point de vue épaisseur des différentes couches qui la composent. En effet, l'épaisseur de la cuticule évolue toujours en fonction du temps, elle passe de  $13,92 \pm 0,76 \mu\text{m}$  au 1<sup>er</sup> jour à  $38,74 \pm 4,53 \mu\text{m}$  au 7<sup>ème</sup> jour. On a remarqué au 1<sup>er</sup> jour

que, l'épaisseur de la cuticule des larves témoins est semblable à celle des traitées ( $13,92 \pm 0,74 \mu\text{m}$ , et  $13,55 \pm 0,92 \mu\text{m}$  respectivement pour les témoins et les traitées au *M.anisopliae var acridum*), puis elle augmente légèrement dans les quatre premiers jours jusqu'à atteindre  $22,19 \pm 2,45 \mu\text{m}$  et  $19,16 \pm 0,74$  pour celles traitées au *M. anisopliae var acridum*. Ensuite, cette épaisseur diminue à  $15,36 \pm 0,67 \mu\text{m}$  pour les traitées au *M.anisopliae var acridum* au 7<sup>ème</sup> jour. Cette augmentation est due surtout au changement dans l'épaisseur de l'endocuticule. Pour *M. anisopliae var acridum*, cette évolution est moins importante. Elle varie du 1<sup>er</sup> jour au 7<sup>ème</sup> jour, de  $8,3 \pm 0,34 \mu\text{m}$  à  $11,13 \pm 0,37 \mu\text{m}$ . Les larves témoins présentent une importante évolution de cette partie, elle passe de  $8,6 \pm 0,25 \mu\text{m}$  au 1<sup>er</sup> jour à  $29,84 \pm 3,52 \mu\text{m}$  au 7<sup>ème</sup> jour. Nous avons remarqué aussi que l'exocuticule est affectée par le champignon. Chez les L5 traitées au *M.anisopliae var acridum*, l'augmentation de l'épaisseur de l'exocuticule a été enregistré seulement dans les 3 premiers jours et est de  $4,15 \pm 0,57 \mu\text{m}$  à  $4,87 \pm 0,52 \mu\text{m}$  puis elle régresse dans les autres jours jusqu'à atteindre  $4,23 \pm 0,33 \mu\text{m}$  au 7<sup>ème</sup> jour. Par contre, chez les larves témoins, l'épaisseur de l'épicuticule a augmenté d'épaisseur toujours en fonction du temps et passe de  $4,21 \pm 0,45 \mu\text{m}$  au 1<sup>er</sup> jour et atteint  $7,61 \pm 1,02 \mu\text{m}$  au 7<sup>ème</sup> jour.

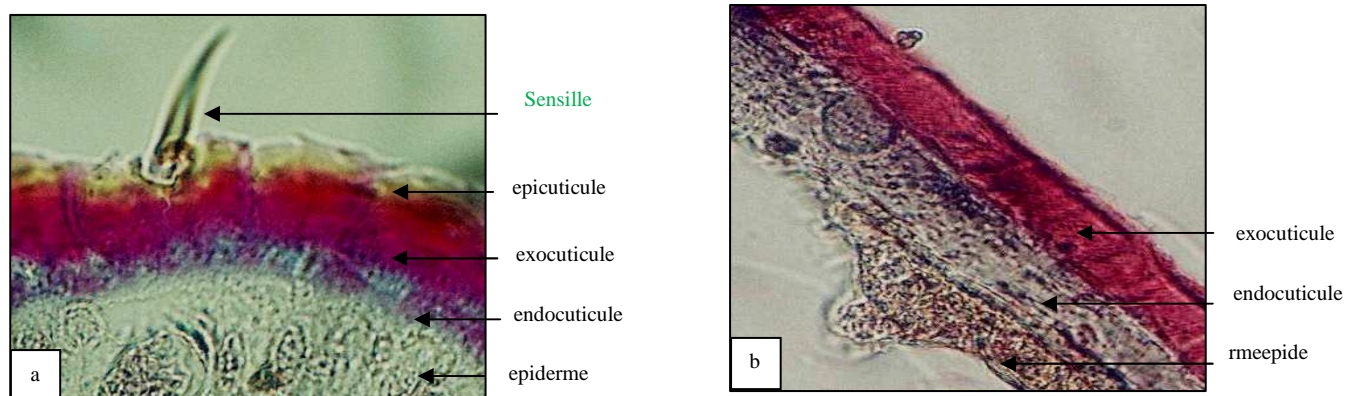


Fig. 5 . Structure de tégument des larves de 5<sup>ème</sup> stade de *S. gregaria* témoins (a) et traitées (b) au *M. anisopliae var acridum* à la DL50 de colorés par par la coloration différentielle à l'azan de Heidenhain (Gr. : x40)

## 4. Discussion

Au moment de l'exuviation, le poids de la cuticule des insectes correspond à celui de l'exocuticule. Toutefois, l'augmentation du poids qui se produit au cours de ce stade correspond au dépôt des nouvelles couches

endocuticulaires. Vers la fin du stade larvaire, le poids de la cuticule diminue suite à une dégradation graduelle des protéines et de la chitine pour préparer la mue suivante [9].

Il a par ailleurs été noté chez les individus de *S.gregaria* traités, une augmentation du poids sec de la cuticule sternale abdominale des larves de 5<sup>ème</sup> stade aussi bien chez les femelles que chez les mâles. Ceci est dû probablement au dimorphisme sexuel marqué chez ce

groupe d'insecte. Cette différence de poids sec cuticulaire est maintenue aussi après traitement au *M.anisopliae*.

Des résultats similaires ont été soulignés par de nombreux auteurs chez divers insectes et crustacés : chez les adultes de *S.gregaria* et *Locusta migratoria* traités par *Azadirachta indica* [10]; chez les larves de *Locusta migratoria* traitées à l'hexaflumuron [11]; chez *Panaeus kerthurus* (crustacés) soumis au DFB [12]; chez les larves de *Spodoptera littoralis* et *S.exigua* intoxiquées au diflubenzuron (DFB) [13] ; chez *Cedia pomonella* traité au diflubenzuron (DFB) [14].

La diminution de la quantité en protéines est provoquée par une enzyme la protéinase extracellulaire (trypsine) sécrétée par l'appressoria au moment de la pénétration de l'hyphe lors de l'infection de *Manduca sexta* par *M.anisopliae* [15].

Une diminution significative du taux des protéines cuticulaires est observée chez les larves et adultes de *S.gregaria* traitées au *M. anisopliae* [16]. Certains régulateurs de croissance des insectes comme le chlorfluazuron, la cyromazine ont aussi un effet inhibiteur de synthèse sur toutes les protéines cuticulaires [17]. Alors que d'autres produits comme le flucycloxyuron et le triflumuron n'ont aucun effet sur *Panaeus kerathurus* [18].

La teneur en chitine cuticulaire diffère d'une espèce à une autre et d'un stade à un autre. Les larves de *Tenebrio molitor* contiennent 21,7% de chitine par poids sec de cuticule. 22% sont extraites de la cuticule des fémurs d'imagos de *Locusta migratoria* [19] [20]. 11,5% et 11,6% du poids sec de la cuticule chez *Rhodnius prolixus* et *Triatoma phyllosoma pallidipenis* [21] et 48,4% du poids sec de la cuticule des larves de *Calliphora vomitoria* [22]. La teneur en chitine cuticulaire de 13,08% chez les L5 et 16,80 % chez les adultes du criquet pèlerin [23].

Notre étude a également montré que les quantités de chitine contenues dans la cuticule abdominale des L5 femelles sont nettement plus élevées que celles contenues dans la cuticule des L5 mâles.

Dans la nature, plusieurs organismes par le biais de leur équipement enzymatique peuvent dégrader la chitine, comme le cas de la bactérie *Bacillus chitinovor* et les champignons hyphomycètes *Metarhizium anisopliae* et *Beauveria bassiana* [24]. En effet, la présence des chitinases extracellulaires de type acétyl-b-D-glucosaminidases facteurs de virulence dans l'entomopathogénicité fongique élaborés par trois entomopathogènes *M. anisopliae* ; *M. flavoviride* et *Beauveria bassiana*, ces enzymes chitinolytiques sont induites lors de la pénétration primaire de l'hyphe dans la cuticule de *Manduca sexta* [25].

Dans le même sens, une réduction significative du contenu en chitine de la cuticule a été enregistrée chez le scarabé *Blaberus giganteus* traité par *M.anisopliae* [15]. Ce champignon a produit le même effet vis-à-vis des larves et des adultes de *S.gregaria* et de *Locusta migratoria* [16] [26]. En utilisant les régulateurs de croissance tels que le

Diflubenzuron, les mêmes effets sont observés sur les cuticules de fémur, de tergite et de la membrane intersegmentaire, des adultes de *Locusta migratoria migratorioides* causant une réduction significative de la teneur en chitine [19]. Cette réduction est complète dans la membrane intersegmentaire. Le dérivé SIR8514 de benzoyl phényl urée a empêché la synthèse de chitine dans les cellules de *Chironomus tentans* [13] et chez les larves L3 de *Lucilia cuprina*. Une diminution de la quantité de chitine a été observée chez les larves de *L. migratoria* traitées respectivement par le teflubenzuron et l'hexaflumuron [27] [11].

Les facteurs externes tels que les températures trop basses ou trop élevées provoquent l'inhibition de la synthèse de la chitine chez les insectes [28].

L'étude de la structure de tégument des L5 de *S. gregaria* a mis en évidence l'existence de trois couches cuticulaires. De pareilles structures avec de tels aspects ont été observées chez *Locusta migratoria* en utilisant la coloration différentielle à l'azan de Heidenhain [29]

La déstructuration des couches cuticulaires chez les larves traitées est due à leur dégradation par les enzymes protéolytiques et chitinolytiques de l'unité infectieuse de notre souche fongique.

La colonisation de l'hôte se fait lorsque le champignon parvient à surmonter les mécanismes immunitaires de défense de l'insecte et envahit l'hémolymphe

L'application de *M. anisopliae* a perturbé cette structure, on constate la dégénérescence de ces différentes parties. Cette déstructuration a engendré comme signes externes une mue perturbée et bloquée révélant un aspect froissé, onduleux et desséché.

Ces signes sont similaires à ceux observés avec d'autres inhibiteurs chez divers insectes exposés à différents traitements. Le chlorfluazuron, un inhibiteur de synthèse de chitine, sur *Choristoneura fumiferana* [30] et également l'hématoporphyrine (a photo-activated insecticide) sur *Culex pipiens* rendant difficile la distinction entre l'endocuticule et l'exocuticule [31].

Une perturbation de la synthèse de l'épicuticule est notée chez les jeunes de *Tetranychus urticae* exposés à *Bacillus thuringiensis* [2], chez les larves de *S. gregaria* traitées au *M.anisopliae* [12] et à l'analogue d'hormone juvénile (JH III) [32].

Toutefois, les inhibiteurs de croissance entraînent des perturbations physiologiques chez les insectes avec des modes différents. Beaucoup d'entre eux compromettent la synthèse et le dépôt de chitine dans la cuticule [17]. Cependant, c'est le manque de chitine dû à l'inhibition de sa biosynthèse qui est la cause de la forme amorphe de cette région de la cuticule.

Les microfibrilles rencontrées communément dans cette région se composent de protéines et de chitine et requièrent de la chitine pour son élaboration [33]. Son architecture principale vient des composants de chitine déposés et probablement orientés à la surface des cellules [34]. Chez

les inhibiteurs biologiques tels que les champignons entomopathogènes et précisément au cours du processus d'infection par *B. bassiana* au niveau du tégument des insectes, quatre étapes sont à distinguer : l'adhésion, la germination, la différenciation et la pénétration.

L'adhésion est caractérisée par un mécanisme de reconnaissance et de compatibilité des conidies avec des cellules tégumentaires de l'insecte [35]. Cette phase se scinde en deux étapes distinctes, la première passive où l'attachement à la cuticule est réalisé grâce à des forces hydrophobes et électrostatiques [36] et la seconde active caractérisée par la production d'un mucilage qui va engendrer une modification épicuticulaire aboutissant à la germination [24]. Après la phase d'adhésion, la germination va être dépendante des conditions environnantes et aussi de la physiologie de l'hôte (composition biochimique de la cuticule) qui peut favoriser ou inhiber la germination [37].

## 5. Conclusion

Au terme de notre expérimentation, il ressort de nos résultats que le traitement par le champignon entomopathogène *M. anisopliae* var *acidum* a provoqué une diminution significative du poids de la cuticule sternale abdominale des larves L5 futures mâles et femelles traitées comparativement aux témoins. Le champignon a agit aussi sur la biochimie de la cuticule à savoir sa teneur en protéines et en chitine qui ont significativement diminués. Ceci peut avoir une action négative sur la formation normale d'une nouvelle cuticule qui peut engendrer une exuviation anormale et mortelle de l'acridien traité par cet entomopathogène.

De ces résultats, il ressort que les larves L5 futures femelles ont un poids de la cuticule et une teneur en protéine et en chitine cuticulaire supérieur à ceux des larves L5 futures mâles aussi bien chez les individus de la série témoin et traitée.

L'étude histologique réalisée sur le tégument des larves L5 traitées a montré une perturbation de la structure de la cuticule chez les criquets traités par le champignon où nous avons remarqué une disparition complète de l'épicuticule et une nette régression dans l'épaisseur de l'exo et l'endocuticule et ce comparativement à la cuticule des larves témoins où les trois couches sont bien distinctes et apparentes.

A travers cette étude, il nous semble que notre champignon entomopathogène a agit négativement sur le poids, la biochimie et l'histologie du tégument des L5 mâles et femelles de *S. gregaria*. Donc il peut être un agent très prometteur dans la lutte biologique contre ce ravageur.

Il serait très intéressant dans l'avenir poursuivre cette étude dans le but d'approfondir les recherches sur d'autres paramètres biologiques et physiologiques de ce locuste et sur d'autres espèces acridiennes nuisibles telles que

*Doclostaurus maroccanus* et *Locusta migratoria*. En effet, il serait évident de penser à la mise en place d'un programme de lutte intégrée basé sur la combinaison de *M. anisopliae* var *acidum* avec des pesticides afin de les utiliser sur le terrain. Donc il serait indispensable de bien les maîtriser en tenant compte de leur efficacité dans les conditions environnementales.

## Références

- [1] J. F. Duranton, M. Lecoq, Le criquet pèlerin au Sahel. CIRAD-PRIFAS, collection Acridologie opérationnelle. 6. Montpellier, 1990, 183 p.
- [2] R. Vargas, C. Bruce, D.R. Penman., Effect of thuringiensin on cuticle development of immature stages of *tetranychus urticae* koch. (acarina: tetranychidae). Agricultura Técnica, Chile, vol. 62, 2 (2002) 201-211.
- [3] O. Zakaria, S.B. Sagnia., Lutte intégrée contre les sauteriaux et les locustes : importance du biopesticide Green Muscle. Bulletin trimestriel d'information du Centre Régional AGRHYMET, Niamey, Niger, vol. 5, 3 (2003) 16.
- [4] D.J. Greathead, C. Kooyman, M.H. Launois-Luong, G.B. Popov., Les ennemis naturels des criquets du Sahel. Ed. Cirad/Prifas, 'Collection Acridologie Opérationnelle, 8, Montpellier, 1994, 147.
- [5] G. Smaghe, M. Auda, K. Van Laecke, D. Degheele, . Significance of penetration and metabolism on topical toxicity of deflufenuron in *Spodoptera littoralis* and *Spodoptera exigua*. Entomol. Exp. & Appl., vol.82, 3 (1997) 255-260.
- [6] M. Youcef, . Efficacité de *Metarhizium anisopliae* var *acidum* vis-à-vis des larves de *Schistocerca gregaria* (Forsk. 1775) (Orthoptera. Cyrtacanthacridinae) et effet sur la cuticule. Mémoire d'ingénieur, Institut National Agronomique, El-Harrach, Algérie, 2007, 92.
- [7] C. Borderau, S.O. Andersen, Structural cuticular proteins in termite queens. Com. Bioch. Physiol., 60B (1978) 251-265.
- [8] R. Martoja, M. Martoja-Pierson., Techniques d'histologie animale. Ed. Masson et Cie, Paris, vol.V, 1967, 331.
- [9] C. Nøhr, S.O. Andersen, . Cuticular proteins from fifth instar nymphs of migratory locust *Locusta migratoria*. Insect Biochem. Molec. Biol., vol.23, 4 (1993) 521-531.
- [10] M. Nasiruddin, A.J. Mordue., The effect of azadirachtin on the midgut histology of the locust. *Schistocerca gregaria* and *Locusta migratoria*. Tissue and Cell., vol.25, 6 (1993) 875-884.
- [11] F. Allache., Activité biologique d'un dérégulateur de croissance des insectes : l'hexaflumuron sur la cuticule des larves de *Locusta migratoria* (linné. 1758) (orthoptera. oedipodinae). Thèse de Magister. Institut National Agronomique, El Harrach, Algérie, 2005, 186.
- [12] N. Soltani, S. Chebira, N. Pitoizet, J.P. Delbecque, J. Delachambre., Effect of Flucycloxuron, a novel benzoylphenylurea derivate, on the in vivo and in vitro, production of ecdysteroids in *Tenebrio molitor*. Med. Fac. Landbowi Univ. Gent., 607, (3b) (1995) 1017-1022.
- [13] M. Spindler-Barth, K.D. Spindler, M. Londershausen, H. Thomas., Inhibition of chitin synthesis in an insect cell line. Pest. Sci., 25 (1989) 115-121.

- [14] N. Soltani-Mazouni, N. Soltani, . Protein synthesis in the fat body of *Tenebrio molitor* (L.) during oocyte maturation: Effect of diflubenzuron, cycloheximide and starvation. *Journal of Stored Products Research*, vol.31, 2 (1992) 117-122.
- [15] J. Raymond, R. Stlege, I. Lokesh-Josh, J. Michael, M.J. Bidochka, W. Donald, Protein synthesis in *Metarhizium anisopliae* growing on host cuticule. *Mycol. Res.*, vol.99, 9 (1995) 1034-1040.
- [16] F. Halouane, A. Benzara, B. Doumandji-Mitiche, M. Bouhacein., Effet de deux entomopathogènes, *Beauveria bassiana* et *Metarhizium flavoviride* (Hyphomycètes, Deuteromycotina) sur l'hémogramme des larves de 5<sup>ème</sup> stade et des adultes de *Locusta migratoria migratorioides* (Orthoptera: Acrididae). *J. Orth. Res.*, vol.10, 2, (2001) 331-334.
- [17] A. Retnakaran, S.R. Pallis, W.L. Tomkins, M.J. Primavera, A. Brownwright, The regulation of chitin synthesis and deposition in an insect, the spruce budworm, at the biochemical and ultrastructural level. in Stevens W.F., Rao M.S. and Chandrakachang S., Chitin and Chitosan. Environmental friendly and versatile biomaterials. Ed. Asian Institute of technology., Bangkok., Thailand, 1996, 174-182.
- [18] S.M. Morsli, . Effet d'un dérivé de la diphenyl benzoyl urée, le Dimilin, sur la physiopathologie de *Penaeus kerathurus* (Crustacea, Decapoda): études structurales et biochimiques. Mémoire de Magister en Physiologie animale appliquée, option Ecotoxicologie. ISN, Université de Annaba, Algérie, 1994, 82.
- [19] J.F.V. Vincent, L. Clarke, . Effects of diflubenzuron on the stabilisation of protein within the cuticular matrix of the locust (Ensifera: Locustodae). *Entomol. Gener.*, . vol.11, (1/2) (1985) 15-24.
- [20] S.O. Andersen, . Characteristic properties of proteins from pre-ecdysial cuticle of larvae and pupae of mealworm *Tenebrio molitor*. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 32 (2002) 1077-1087.
- [21] J.E. Hillerton, P.P. Purslow, An investigation of some matrix protein components critical to the extensible properties of insect cuticle. *J. Materials Science*, 16 (1981) 1673-1679.
- [22] J.E. Hillerton, J.F.V. Vincent. The stabilization of insect cuticles. *J. Insect Physiol.* 25 (1979) pp: 957-963
- [23] S. Dhoub, Action de quelques substrats alimentaires sur la croissance. le développement et la structure de la cuticule chez le criquet pèlerin *Schistocerca gregaria* (Forsk. 1775) (Orthoptera. Acrididae). Mémoire d'ingénieur agronome, Institut National de Formation Agronomique Saharienne, Ouargla, Algérie, 1979, 50.
- [24] P. Ferron, J. Fargues, G. Riba, Les champignons agents de lutte microbiologiques contre les ravageurs. *Dost. Cell. Env.* , 5 (1991) 55-76.
- [25] K. Sun Chul, P. Sanggyu, L. Dong Gyu, Purification and characterisation of a noval chitinase from the entomopathogenic fungus. *Metarhizium anisopliae*. *J. Invert. Path.*, 73 (1998) : 267-281.
- [26] M. Bouhacein, Effet de deux entomopathogènes (Hyphomycètes. Deuteromycotina). *Beauveria bassiana* (Balasmo) Vuillemin et *Metarhizium flavoviride* Gams et Rozyspal sur les métabolites hémolympatiques, l'hémogramme et les protéines circulaires chez *Locusta migratoria* (Linné. 1758). Mémoire d'ingénieur agronome, Institut National Agronomique, El Harrach, Algérie, 1999, 121.
- [27] G. Dahoun. Activité biologique d'un dérégulateur de croissance le téflubenzuron sur le cinquième stade larvaire de *Locusta migratoria* (Linné. 1758) : Efficacité et effet sur la biochimie de la cuticule. l'hémolymphe et les ovaires. Mémoire d'ingénieur agronome, Institut National Agronomique, El Harrach, Algérie, 2000 ,175.
- [28] D.R. Chandler, R.G. King, P. Jewess, S.E. Reynolds, Temperature effects on the action of alocurea insecticides against tobacco hornworm (*Munduca sexta*) larvae. *Pestic. Sci.*, 31(1991) 295-304.
- [29] D. Povolny, F. Weyda, On the glandular character of larval integument in the genus *Zygaena* (Lepidoptera: Zygaenidae). *Acta Ent. Bohemoslov.*, 78 (1981) 273-279.
- [30] J. Percy-Cunningham, D. Nicholson, A. Retnakaran, The effect of ingested benzoylphenylurea on the ultrastructure of the cuticle deposited during the last larval instar of *Choristoneura fumiferana* Clem. (Lepidoptera: Tortricidae). *Can. J. Zool.*, 65 (1987) 2715-2723.
- [31] E.M. Salama, S. El-Sherbini, M.H. Abdel-Kader, G. Jori, Site of action of hematoporphyrin (a photo-activated insecticide) in *Culex pipiens* larvae. *Egypt. J. Biol.*, 4 (2002) 133-141.
- [32] H.S. Injeyan, S.S. Tobe, E. Rapport, The effects of exogenous juvenile hormone treatment on embryogenesis in *Schistocerca gregaria*. *Can. J. Zool.*, 57 (1979) 838-845.
- [33] S.E. Reynolds. The cuticle growth and moulting in insects: the essential background to the action of alocurea insecticides. *Pestic Sci.* ,20 (1978) 131-146.
- [34] M. Locke, The Wigglesworth lecture: Insects for studying fundamental problems in biology. *J. Insect Physiol.*, 47 (2001) 495-507.
- [35] A. Vey, F. Cavalier, B. Courtiade, Au secours de la protection des plantes contre les insectes : des substances produites par des champignons. *Phytoma*, 489 (1996) 16-20.
- [36] J. Fargues, D. Rodriguez-Rueda, Sensibilité des larves de *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae) aux hyphomycètes entomopathogènes *Nomuraea rileyi* et *Paecilomyces fumosoroseus*. *Entomopahga*, 25 (1980) 43-54.
- [37] L. Amouriq, Elément sur la relation entre les insectes et les champignons. Ed. Harman, Paris, 1973, 135.