

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REpubLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
المدرسة الوطنية العليا للفلاحة بالحراش
ECOLE NATIONALE SUPERIEURE AGRONOMIQUE EL HARRACH-ALGER

THESE

En vue de l'obtention du Diplôme de

Doctorat

en Sciences Agronomiques

Spécialité : Protection des végétaux-Zoophytatrie

Option : Entomologie appliquée

THEME

Evaluation de l'impact biologique de quelques souches locales de *Bacillus sp.* et *Pseudomonas spp.* fluorescents vis a vis du criquet migrateur *Locusta migratoria cinerascens* (Orthoptera: Acrididae)

Présentée par : M^{me} OULEBSIR- MOHANDKACI Hakima

Devant le jury :

Président : M. DOUMANDJI S.

Professeur (E.N.S.A. d'El Harrach)

Directeur de thèse : M^{me} DOUMANDJ-MITICHE B.

Professeur (E.N.S.A. d'El Harrach)

Examineurs : M^{me} MOUHOUCHE F.

Professeur (E.N.S.A. d'El Harrach)

M^{me} GUENDOZ- BENRIMA A. Professeur (U.S.D. de Blida)

M^{me} ALLAL-BENFEKIH L.

Professeur (U.S.D. de Blida)

M^{me} GANA-KEBOUCHE S. Maitre de conférences (U.M.B.de Boumerdes)

Soutenue le 20 / 12 / 2012

A la mémoire de mon père

III

Remerciements

Il est toujours délicat de remercier l'ensemble des personnes qui ont contribué à l'aboutissement de ce travail de recherche. Que ceux qui ne sont pas mentionnés ne m'en tiennent pas rigueur.

Je tiens à remercier tout d'abord mon directeur de thèse, *M^{me} DOUMANDJ-MITICHE B.*, Professeur à l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique d'El Harrach, je la remercie pour la qualité de ses conseils. Je salue aussi sa souplesse et l'ouverture d'esprit car elle a su me laisser une large marge de liberté pour mener à bien ce travail de recherche.

Je tiens à remercier *M. DOUMANDJI S.*, Professeur à l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique d'El Harrach, de m'avoir honoré en acceptant de présider mon jury.

Je remercie tout particulièrement; *M^{me} MOUHOUCHE F.* Professeur à INSA d'El Harrach, *M^{me} GUENDOZ-BENRIMA A.* Professeur à USD de Blida, ainsi que *M^{me} ALLAL-BENFEKIH L.* Professeur à USD de Blida, et *M^{me} GANA-KEBOUCHE S.* Maître de conférences à UMBB de Boumerdes ; d'avoir apporté leur regard sur mon travail et d'en être examinateurs.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à mon frère et ami *M. ARAB K.* pour sa disponibilité et son aide précieuse.

Mes remerciements vont aussi à *M^{me} HALOUANE F.* pour son aide et ses conseils qui m'ont été très utiles.

Je souhaite remercier *M. MOHAMMEDI A.* pour sa confiance et son soutien.

De même, je remercie *M^{elle} HALLADJ*, *M^{me} BENZINA*, *M^{me} HADDADJ* et *M^{elle} KHEMILI* pour leurs conseils techniques et pratiques, Je leur souhaite un bon achèvement de leurs travaux de thèse.

Un grand merci aussi à mon amie *M^{me} BISSAAD F.Z.* pour ses conseils et son aide précieuse

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à tout *le personnel de la station d'INRA d'Adrar et d'INPV de Touggourt* pour leur accueil chaleureux et pour m'avoir facilité mes déplacements sur le terrain.

Mes remerciements vont tout particulièrement à mon **MARI** pour ses conseils et sa compréhension et à mes enfants **YACINE ET MAISSA** pour leur sourire qui m'a toujours accompagné.

Je remercie chaleureusement **MA MERE** ainsi que toute ma famille, qui m'a toujours soutenue dans mes études.

Je voudrais aussi remercier tous mes collègues de travail au département de biologie de l'université de Boumerdes.

Je clos enfin ces remerciements en dédiant cette thèse de doctorat à mes amies que j'ai eu la chance d'avoir à mes côtés, et qui m'ont soutenue tout au long de ces années de travail ; **Sabrina, Nassima, Fatma, Ouahida, Hayet, Nora, Fahima, Karima, Belaid, Guettaf, Akila, Amel et Rabia.**

Liste des tableaux

Texte

Tableau 1: Caractérisation de certaines bactéries du genre <i>Bacillus</i> (Guiraud, 2003)	33
Tableau 2 : Lecture de la galerie miniaturisée Api 20 ^E	44
Tableau 3: La gamme d'étalonnage de BSA pour le calcul des concentrations bactériennes.....	47
Tableau 4: Densités optiques (DO) et concentrations des dilutions décimales de <i>Bacillus sp.</i> (HE799656).....	48
Tableau 5 : Densités optiques (DO) et concentrations des dilutions décimales de <i>Bacillus sp.</i> (HE805963).....	48
Tableau 6 : Densités optiques (DO) et concentrations des dilutions décimales de <i>B. sphaericus</i>	48
Tableau 7 : Densités optiques (DO) et concentration des dilutions décimales de <i>P. fluorescens</i> III.....	48
Tableau 8 : La gamme étalonnage de BSA pour dosage des protéines.....	52
Tableau 9 : La gamme d'étalonnage de glucose pour le dosage des glucides.....	55
Tableau 10: Caractérisation des souches isolées appartenant au genre <i>Bacillus</i> selon la clé de Guiraud (2003)	73
Tableau 11 : La classification des souches bactériennes isolées appartenant au genre <i>Bacillu</i> selon Guiraud (1998, 2003).....	74
Tableau 12 : Caractères physiologiques et biochimiques des souches bactériennes du groupe <i>Pseudomonas spp.</i> fluorescents.....	75
Tableau 13 : La classification des souches bactériennes du groupe <i>Pseudomonas spp.</i> fluorescents selon la clé dichotomique d'identification proposée par Jaques (1994).....	76
Tableau 14: Pourcentage d'identité des séquences ADNr 16S des souches Strain-B1 et Strain-B2 avec quelques espèces apparentées.....	78
Tableau 15 : Equations des droites de régression, coefficients de corrélation et les valeurs des TL ₅₀ des larves L5 de <i>L. migratoria</i> traitées au <i>Bacillus sp.</i> (HE799656) ..	83
Tableau 16: Equations des droites de régression, coefficients de corrélation et les valeurs des TL ₅₀ des larves L5 de <i>L. migratoria</i> traitées au <i>Bacillus sp.</i> (HE805963) ...	86
Tableau 17 : Equations des droites de régression, coefficients de corrélation et les	

valeurs des TL ₅₀ des larves L5 de <i>L. migratoria</i> traitées au <i>B. sphaericus</i>	86
Tableau 18 : Equations des droites de régression, coefficients de corrélation et les valeurs des TL ₅₀ des larves L5 de <i>L. migratoria</i> traitées au <i>P.fluorescens</i> bvIII.....	86
Tableau 19 : Probits des pourcentages de mortalité corrigée et logarithmes décimaux des concentrations chez les L5 de <i>L. migratoria</i> traitées par <i>Bacillus sp.</i> (HE799656)..	88
Tableau 20 : Probits des pourcentages de mortalité corrigée et logarithmes décimaux des concentrations chez les L5 de <i>L. migratoria</i> traitées par <i>Bacillus sp.</i> (HE805963)..	88
Tableau 21 : Probits des pourcentages de mortalité corrigée et logarithmes décimaux des concentrations chez les L5 de <i>L. migratoria</i> traitées par <i>P.fluorescens</i> bvIII.....	88
Tableau 22 : Probits des pourcentages de mortalité corrigée et logarithmes décimaux des concentrations chez les L5 de <i>L. migratoria</i> traitées par <i>B. sphaericus</i>	89
Tableau 23 : Equations des droites de régression, coefficients de corrélation et les valeurs des CL ₅₀ des larves L5 de <i>L. migratoria</i> traitées au <i>Bacillus sp.</i> (HE799656) ..	93
Tableau 24 : Equations des droites de régression, coefficients de corrélation et les valeurs des CL ₅₀ des larves L5 de <i>L. migratoria</i> traitées au <i>Bacillus sp.</i> (HE805963)..	93
Tableau 25 : Equations des droites de régression, coefficients de corrélation et les valeurs des CL ₅₀ des larves L5 de <i>L. migratoria</i> traitées au <i>P.fluorescens</i> bvIII	93
Tableau 26 : Equations des droites de régression, coefficients de corrélation et les valeurs des CL ₅₀ des larves L5 de <i>L. migratoria</i> traitées au <i>B. sphaericus</i>	94
Tableau 27 : Les concentrations(C) en protéines hémolympatiques chez les individus traités par <i>Bacillus sp.</i> (HE799656), <i>Bacillus sp.</i> (HE805963), <i>B. sphaericus</i> et <i>Pseudomonas fluorescens</i> bvIII	97
Tableau 28 : Poids moléculaires (PM) et les mobilités relatives (Rf) des protéines hémolympatiques des larves L ₅ de <i>Locusta migratoria</i> traitées au <i>P. fluorescens</i> bvIII et <i>Bacillus sp.</i> (HE799656).....	100
Tableau 29 : Les concentrations(C) des échantillons en glucides chez les individus traités par <i>Bacillus sp.</i> (HE799656), <i>Bacillus sp.</i> (HE805963) et <i>B. sphaericus</i> et par <i>Pseudomonas fluorescens</i> bvIII.....	101
Tableau 30 : Evolution de nombre des colonies de <i>Bacillus sp.</i> (HE799656) sur le feuillage et dans le sol.....	120
Tableau 31 : Evolution de nombre de colonies de <i>P. fluorescens</i> bv III sur le feuillage et dans le sol.....	120

Annexes

Tableau I : Poids moléculaires (PM) et mobilités relatives (Rf) des marqueurs Bisrad Prestained SDS-PAGE Standards Low Rang, catalog 161- 0305.....	165
Tableau II : Taux de mortalité journalière cumulée des larves L5 de <i>L.migratoria</i> traitées par <i>Bacillus sp.</i> (HE799656)	168
Tableau III : Taux de mortalité journalière cumulée des larves L5 de <i>L.migratoria</i> traitées par <i>Bacillus sphaericus</i>	169
Tableau IV : Taux de mortalité journalière cumulée des larves L5 de <i>L.migratoria</i> traitées par <i>Bacillus sp.</i> (HE805963)	170
Tableau V : Taux de mortalité journalière cumulée des larves L5, traitées par <i>P. fluorescens</i> bv III.....	171
Tableau VI : Analyse de la variance relative à l'effet de traitement par <i>Bacillus sp.</i> (HE799656) sur la mortalité des L5 de <i>L. migratoria</i>	172
Tableau VII : Test de Tukey (HSD) chez les L5 de <i>L. migratoria</i> traitées par <i>Bacillus sp.</i> (HE799656).....	172
Tableau VIII: Analyse de la variance relative à l'effet de traitement par <i>Bacillus sp.</i> (HE805963) sur la mortalité des L5 de <i>L. migratoria</i>	172
Tableau IX : Test de Tukey (HSD) chez les L5 de <i>L. migratoria</i> traitées par <i>Bacillus sp.</i> (HE805963)	172
Tableau X: Analyse de la variance relative à l'effet de traitement par <i>B. sphaericus</i> sur la mortalité des L5 de <i>L. migratoria</i>	172
Tableau XI: Classement des groupes non significativement différents par le test de Tukey (HSD) chez les L5 de <i>L. migratoria</i> traitées par <i>B. sphaericus</i>	173
Tableau XII: Analyse de la variance relative à l'effet de traitement par <i>P.fluorescens</i> bvIII sur la mortalité des L5 de <i>L. migratoria</i>	173
Tableau XIII: Classement des groupes non significativement différents par le test de Tukey (HSD) chez les L5 de <i>L. migratoria</i> traitées par <i>P.fluorescens</i> bvIII.....	173
Tableau XIV : Probits des pourcentages des mortalités corrigées et logarithmes décimaux des temps chez les L5 de <i>L. migratoria</i> traitées par <i>Bacillus sp.</i> (HE799656)...	174
Tableau XV: Probits des pourcentages des mortalités corrigées et logarithmes décimaux des temps chez les L5 de <i>L. migratoria</i> traitées par <i>Bacillus sp.</i> (HE805963).....	174
Tableau XVI: Probits des pourcentages de mortalités corrigées (MC%) et logarithmes	

décimaux des temps chez les L5 de <i>L. migratoria</i> traitées par <i>B. sphaericus</i>	175
Tableau XVII : Probits des pourcentages de mortalités corrigées (MC%) et logarithmes décimaux des temps chez les L5 de <i>L. migratoria</i> traitées par <i>P. fluorescens</i> bv III....	176
Tableau XVIII: Durées moyennes de développement larvaire chez les L5 de <i>L. migratoria</i> traitées par les bactéries <i>Bacillus sp.</i> (HE799656), <i>Bacillus sp.</i> (HE805963), <i>B. sphaericus</i> et <i>P.fluorescens</i> bvIII	177
Tableau XIX: Analyse de la variance relative à l'effet de <i>Bacillus sp.</i> (HE805963) sur la durée moyenne du développement larvaire chez les L5 de <i>L. migratoria</i>	178
Tableau XX: Classement des groupes non significativement différents par le test de Tukey (HSD).....	178
Tableau XXI: Analyse de la variance relative à l'effet de <i>B. sphaericus</i> sur la durée moyenne du développement larvaire chez les L5 de <i>L. migratoria</i>	178
Tableau XXII: Classement des groupes non significativement différents par le test de Tukey (HSD).....	178
Tableau XXIII : Les concentrations(C) des échantillons en protéines et glucides chez les individus traités par <i>Bacillus sp.</i> (HE799656), <i>Bacillus sp.</i> (HE805963) et <i>B. sphaericus</i> et par <i>Pseudomonas fluorescens</i> III.....	179
Tableau XXIV : Les concentrations(C) des échantillons en protéines et glucides chez les individus témoins.....	179
Tableau XXV: Analyse de la variance relative à l'effet de <i>Bacillus sp.</i> (HE805963) sur les concentrations(C) en protéines hémolymphatiques des L5 de <i>L. migratoria</i>	180
Tableau XXVI: Test de Tukey (HSD) relatif à l'effet de <i>Bacillus sp.</i> (HE805963) sur les concentrations(C) en protéines hémolymphatiques des L5 de <i>L. migratoria</i>	180
Tableau XXVII Analyse de la variance relative à l'effet de <i>Bacillus sp.</i> (HE799656) sur les concentrations(C) en protéines hémolymphatiques des L5 de <i>L. migratoria</i>	180
Tableau XXVIII: Test de Tukey (HSD) relatif à l'effet de <i>Bacillus sp.</i> (HE799656) sur les concentrations(C) en protéines hémolymphatiques des L5 de <i>L. migratoria</i>	180
Tableau XXIX: Analyse de la variance relative à l'effet de <i>B. sphaericus</i> sur les concentrations(C) en protéines hémolymphatiques des L5 de <i>L. migratoria</i>	180
Tableau XXX : Test de Tukey (HSD) relatif à l'effet de <i>B. sphaericus</i> sur les concentrations(C) en protéines hémolymphatiques des L5 de <i>L. migratoria</i>	181
Tableau XXXI: Analyse de la variance relative à l'effet de <i>Pseudomonas fluorescens</i> III sur les concentrations(C) en protéines hémolymphatiques des L5 de <i>L. migratoria</i>	181

Tableau XXXII: Test de Tukey (HSD) relatif à l'effet de <i>Pseudomonas fluorescens</i> III sur les concentrations(C) en protéines hémolympatiques des L5 de <i>L. migratoria</i> ...	181
Tableau XXXIII: Analyse de la variance relative à l'effet de <i>Bacillus sp.</i> (HE805963) sur les concentrations(C) en glucides hémolympatiques des L5 de <i>L. migratoria</i>	182
Tableau XXXIV: Test de Tukey (HSD) relatif à l'effet de <i>Bacillus sp.</i> (HE805963) sur les concentrations(C) en glucides hémolympatiques des L5 de <i>L. migratoria</i>	182
Tableau XXXV: Analyse de la variance relative à l'effet de <i>Bacillus sp.</i> (HE799656) sur les concentrations(C) en glucides hémolympatiques des L5 de <i>L. migratoria</i>	182
Tableau XXXVI: Test de Tukey (HSD) relatif à l'effet de <i>Bacillus sp.</i> (HE799656) sur les concentrations(C) en glucides hémolympatiques des L5 de <i>L. migratoria</i>	182
Tableau XXXVII: Analyse de la variance relative à l'effet de <i>B. sphaericus</i> sur les concentrations(C) en glucides hémolympatiques des L5 de <i>L. migratoria</i>	182
Tableau XXXVIII: Test de Tukey (HSD) relatif à l'effet de <i>B. sphaericus</i> sur les concentrations(C) en glucides hémolympatiques des L5 de <i>L. migratoria</i>	183
Tableau XXXIX: Analyse de la variance relative à l'effet de <i>Pseudomonas fluorescens</i> III sur les concentrations(C) en glucides hémolympatiques des L5 de <i>L. migratoria</i>	183
Tableau XL: Test de Tukey (HSD) relatif à l'effet de <i>fluorescens</i> III sur les concentrations(C) en glucides hémolympatiques des L5 de <i>L. migratoria</i>	183
Tableau XLI : Evolution pondérale s des souris traitées par <i>Bacillus sp.</i> (HE799656)...	184
Tableau XLII : Evolution pondérale des souris traitées par <i>Bacillus sp.</i> (HE805963)..	184
Tableau XLIII : Evolution pondérale des souris traitées par <i>Bacillus sphaericus</i>	185
Tableau XLIV : Evolution pondérale des souris traitées par <i>P. fluorescens</i> bvIII.....	185
Tableau XLV : Effet inflammatoire de <i>Bacillus sp.</i> (HE799656), <i>Bacillus sp.</i> (HE805963), <i>B. sphaericus</i> et <i>P.fluorescens</i> bvIII sur les souris blanches.....	186
Tableau XLVII : Analyse de la variance relative à l'évolution de nombre des colonies de <i>Bacillus sp.</i> (HE799656) sur le feuillage.....	187
Tableau XLVIII : Analyse de la variance relative à l'évolution de nombre des colonies de <i>Bacillus sp.</i> (HE799656) dans le sol.....	187
Tableau XLIX : Analyse de la variance relative à l'évolution de nombre des colonies de <i>P.fluorescens</i> bvIII dans le sol.....	187

Liste des figures

Figure 1: Cycle biologique de <i>Locusta migratoria</i>	12
Figure 2 : Schéma de l'appareil digestif du criquet migrateur en vue dorsale (Modifier selon Beaumont et Cassier, 1970).....	16
Figure 3: Distribution géographique des sous-espèces de <i>Locusta migratoria</i> . (Albretch, 1967 ; Uvarov, 1977 ; Fishelson, 1985, Kang <i>et al.</i> , 1989, Grichanov et Saulich, 2003)...	18
Figure 4: Situation géographique du site de prélèvement (Google Maps, 2012).....	31
Figure 5 : La clé dichotomique proposée par Jacques, (1994) pour l'identification des <i>Pseudomonas spp.</i> fluorescents.....	35
Figure 6 : Courbe d'étalonnage de BSA pour le calcul des concentrations bactériennes.....	47
Figure 7 : Prélèvement de l'hémolymphe.....	51
Figure 8 : Courbe d'étalonnage exprimant les absorbances à 595 nm en fonction des concentrations de BSA en mg/ml.....	53
Figure 9 : Courbe d'étalonnage exprimant les absorbances à 625 nm en fonction des concentrations de glucose en mg/ml.....	56
Figure 10: Prélèvement du tube digestif.....	57
Figure 11 : Elevage des souris blanches.....	60
Figure 12 : Traitement des souris.....	61
Figure 13: Répartition des lots destinés à l'étude de la persistance des bactéries sur le feuillage.....	63
Figure 14 : Pulvérisation des suspensions bactériennes sur la plante.....	63
Figure 15 : Répartition des lots destinés à l'étude de la persistance des bactéries dans le sol.....	65
Figure 16 : Aspect macroscopique de la souche S1.....	69
Figure 17 : Résultats de l'observation à l'état frais (à gauche) et la coloration simple au Bleu de méthylène (à droite) de la souche B2 (Obj×100).....	70
Figure 18: Aspect microscopique de la souche S1 après coloration simple au Bleu de méthylène (Obj×100).....	70
Figure 19 : Résultats de la coloration de Gram de de la souche B1 (Obj×100).....	71
Figure 20 : Aspect microscopique de la souche S1 après coloration de Gram (Obj× 100)	71
Figure 21 : Résultat de coloration de la spore bactérienne de la souche B1 (Obj × 100)	72
Figure 22 : Résultat de la coloration de spore de de la souche B2 (Obj×100).....	72

Figure 23: Arbre phylogénique tracé par la méthode de Neighbor-Joining montrant la position phylogénétique des souches Strain-B1 et Strain-B2 et les représentants de certains autres taxons liés sur la base de séquences d'ADNr 16S.....	77
Figure 24 : Symptômes observés chez les individus traités par différentes concentrations des suspensions bactériennes testées.....	79
Figure 25: Taux de mortalité journalière cumulée des larves L5 de <i>L.migratoria</i> traitées par <i>Bacillus sp.</i> (HE799656) aux doses D1= 1,6 mg/ml, D2=0,59 mg/ml, D3=0,33 mg/ml	80
Figure 26: Taux de mortalité journalière cumulée des larves L5 de <i>L.migratoria</i> traitées par <i>Bacillus sp.</i> (HE805963) aux doses D1= 1,67 mg/ml, D2=0,62 mg/ml, D3=0,35 mg/ml	81
Figure 27: Taux de mortalité journalière cumulée des larves L5 de <i>L.migratoria</i> traitées par <i>B. sphaericus</i> aux doses D1= 1,72 mg/ml, D2=0,75 mg/ml, D3=0,28 mg/ml.....	81
Figure 28 : Taux de mortalité journalière cumulée des larves L5 de <i>L.migratoria</i> traitées par <i>P.fluorescens</i> bv III aux doses D1= 1,7 mg/ml, D2=0,65 mg/ml, D3=0,31 mg/ml	82
Figure 29: Droites de régressions exprimant le taux de mortalités des larves L5 traitées par trois doses de <i>Bacillus sp.</i> (HE799656) et <i>Bacillus sp.</i> (HE805963).....	84
Figure 30: Droites de régressions exprimant le taux de mortalités des larves L5 traitées par trois doses de <i>B. sphaericus</i> et <i>P.fluorescens</i> bv III.....	85
Figure 31 : TL ₅₀ obtenus pour les larves L5 de <i>L.migratoria</i> traitées par 3 concentrations de <i>Bacillus sp.</i> (HE799656), <i>Bacillus sp.</i> (HE805963), <i>B. sphaericus</i> et <i>P.fluorescens</i> bvIII.....	87
Figure 32 : Droites de régressions exprimant le taux de mortalités des larves L5 traitées par <i>Bacillus sp.</i> (HE799656) en fonction des concentrations.....	90
Figure 33 : Droites de régressions exprimant le taux de mortalités des larves L5 traitées par <i>Bacillus sp.</i> (HE805963) en fonction des concentrations.....	91
Figure 34 : Droites de régressions exprimant le taux de mortalités des larves L5 traitées par <i>P.fluorescens</i> bvIII en fonction des concentrations.....	92
Figure 35 : Droites de régressions exprimant le taux de mortalités des larves L5 traitées par <i>Bacillus sphaericus</i> en fonction des concentrations.....	93
Figure 36 : CL ₅₀ obtenus pour les larves L5 de <i>L.migratoria</i> traitées par 3 concentrations de <i>Bacillus sp.</i> (HE799656), <i>Bacillus sp.</i> (HE805963), <i>P.fluorescens</i> bvIII	

et <i>B. sphaericus</i>	95
Figure 37 : Durées moyennes de développement larvaire chez les L5 de <i>L. migratoria</i> traitées par les bactéries <i>Bacillus sp.</i> (HE799656), <i>Bacillus sp.</i> (HE805963), <i>B. sphaericus</i> et <i>P.fluorescens</i> bvIII.....	96
Figure 38 : Profil électrophorétique des protéines hémolymphatiques des larves L5 de <i>L. migratoria</i> traitées par 2 souches bactériennes.....	99
Figure 39 : Courbe de référence exprimant le logarithme décimal du poids moléculaires (PM) en fonction de la mobilité relative (Rf) des protéines marqueurs	99
Figure 40 : Coupes histologiques transversales du jabot chez les L5 de <i>L. migratoria</i> témoins et traitées (coloration de Mallory) (Obj. X 40).....	104
Figure 41 : Coupes histologiques transversales du gésier chez les L5 de <i>L. migratoria</i> témoins et traitées (coloration de Mallory) (Obj. X 40).....	106
Figure 42 : Coupes histologiques transversales de l'intestin moyen chez les L5 de <i>L. migratoria</i> témoins et traitées (coloration de Mallory) (Obj. X 40).....	108
Figure 43 : Coupes histologiques transversales du Caecum gastrique chez les L5 de <i>L. migratoria</i> témoins et traitées (coloration de Mallory) (Obj. X 40).....	110
Figure 44 : Coupes histologiques transversales du colon chez les L5 de <i>L. migratoria</i> témoins et traitées (coloration de Mallory) (Obj. X 40).....	112
Figure 45 : Les nouveaux nés âgés de 24h issus des parents traités par <i>Pseudomonas fluorescens</i> bvIII.....	115
Figure 46 : Evolution des poids moyens des souris traitées par <i>Bacillus sp.</i> (HE799656) aux doses D1= 1,6 mg/ml, D2=0,59 mg/ml, D3=0,33 mg/ml.....	116
Figure 47 : Evolution des poids moyens des souris traitées par <i>Bacillus sp.</i> (HE805963) aux doses D1= 1,67 mg/ml, D2=0,62 mg/ml, D3=0,35 mg/ml.....	117
Figure 48 : Evolution des poids moyens des souris traitées par <i>B. sphaericus</i> aux doses D1= 1,72 mg/ml, D2=0,75 mg/ml, D3=0,28 mg/ml.....	117
Figure 49 : Evolution des poids moyens des souris traitées par et <i>P.fluorescens</i> bvIII aux doses D1= 1,7 mg/ml, D2=0,65 mg/ml, D3=0,31 mg/ml	118
Figure 50 : Effet inflammatoire de <i>Bacillus sp.</i> (HE799656), <i>Bacillus sp.</i> (HE805963), <i>B. sphaericus</i> et <i>P.fluorescens</i> bvIII sur les souris blanches.....	119
Figure 51 : Résultats des tests de compatibilité.....	122

Liste des abréviations

B. Bacillus

BSA : Sérum Albumine Bovine

bv : Biovar

C : Concentration

CL₅₀ : Concentration létale pour 50 % des individus

DO : Densité optique

ET : Ecart type

GN : Gélose Nutritive

Ind : individus

I.N.P.V. : Institut National de la Protection des végétaux

J : Jours

KB : King B

L. Locusta

L₅ : Larve de cinquième stade

M : moyenne

m : mue

MC : Mortalité corrigée

MI : mue imaginale

Obj. : Objectif

P. Pseudomonas

R : Répétition

Rf. : Mobilité relative

S. : Souche

T : Témoin

TL₅₀ : Temps létale pour 50 % des individus

PM. : Poids moléculaire

Sommaire

Introduction	5
Chapitre I : Synthèse bibliographique	9
1. Le criquet migrateur <i>Locusta migratoria</i>	9
1.1. Position systématique	9
1.2. Caractères morphologiques	9
1.3. Cycle biologique	10
1.4. Rappel sur l'hémolymphe des acridiens.....	13
1.5. Rappel anatomique sur le tube digestif des acridiens	15
1.6. Polymorphisme phasaire	16
1.7. Aire de répartition de <i>Locusta migratoria</i>	17
1.8. Dégâts et importance économique des acridiens.....	18
1.9. Les différentes techniques de lutte contre les acridiens.....	19
2. Les bactéries entomopathogènes	23
2.1. Aperçu et position systématique	23
2.2. Utilisation des bactéries entomopathogènes dans la lutte contre les acridiens...	25
2.3. Principaux caractères du genre <i>Bacillus</i>	25
2.3.1. Classification	25
2.3.2. Description et caractères cultureux.....	26
2.3.3. Habitat	26
2.3.4. Molécules produites par le genre <i>Bacillus</i>	26
2.4. Principaux caractères du groupe <i>Pseudomonas spp.</i> fluorescents.....	27
2.4.1. Taxonomie	27
2.4.2. Caractères morphologiques et physiologiques	28
2.4.3. Ecologie	28
2.4.4. Molécules produites par <i>Pseudomonas spp.</i> fluorescents	28
Chapitre II : Matériel et méthodes	30
1. Matériel.....	30
1.1. Matériel biologique.....	30
1.1.1. Les criquets	30
1.1.2. Les bactéries entomopathogènes.....	30

1.2. Milieux de culture utilisés	30
2. Méthodes.....	30
2.1. Isolement, identification et caractérisation des souches bactériennes.....	30
2.1.1. Echantillonnage du sol	30
2.1.2. Isolement.....	31
2.1.3. Technique d'ensemencement.....	31
2.1.4. Purification des isolats	32
2.1.5. Conservation des isolats	32
2.1.6. Identification et caractérisation taxonomique des bactéries isolées	32
2.1.6.1. Critères d'identification du genre <i>Bacillus</i>	32
2.1.6.2. Critères d'identification des <i>Pseudomonas spp.</i> fluorescents.....	34
2.1.6.3. Présentation des caractères généraux d'identification	36
2.1.7. Identification moléculaire	45
2.1.7.1. Extraction de l'ADN, PCR et séquençage de l'ARN 16S.....	45
2.1.7.2. Analyse phylogénétique et alignement.....	46
2.2. Préparation des suspensions bactériennes et application des traitements biologiques.....	46
2.2.1. Préparations des solutions mères.....	46
2.2.2. Préparations des dilutions.....	46
2.2.3. Méthode de détermination des concentrations bactériennes.....	47
2.2.4. Modes d'application des différents traitements biologiques	48
2.3. Etude de l'effet des bactéries sur les larves L5 de <i>L. migratoria</i>	49
2.3.1. Evaluation de la toxicité des bactéries sur les larves L5 de <i>L. migratoria</i> ...	49
2.3.1.1. Calcul des pourcentages de mortalités.....	49
2.3.1.2. Calcul des TL ₅₀	49
2.3.1.3. Calcul des CL ₅₀	50
2.3.2. Effet des bactéries sur le développement larvaire	51
2.3.3. Effet des bactéries sur la composition hémolympatique.....	51
2.3.3.1. Prélèvement de l'hémolymphe.....	51
2.3.3.2. Dosage quantitatif des protéines.....	52
2.3.3.3. Dosage qualitatif des protéines	53
2.3.3.4. Dosage des glucides	55
2.3.4. Effet des bactéries sur l'histologie de l'appareil digestif	56

2.4. Etude de l'effet des bactéries sur les souris blanches de laboratoire.....	59
2.5. Etude de la persistance des bactéries sur le feuillage du blé tendre d'hiver et dans le sol	62
2.6. Etude <i>in vitro</i> de la compatibilité des bactéries entomopathogènes avec les pesticides chimiques	66
3. Analyse statistique	68
Chapitre III : Résultats	69
1. Purification et identification taxonomique des isolats bactériens.....	69
1.1. Résultats des tests d'identification des bactéries du genre <i>Bacillus</i>	69
1.1.1. Tests culturaux et morphologiques	69
1.1.2. Caractérisation physiologique et biochimique	73
1.1.3. Identification préliminaire taxonomique des isolats.....	74
1.2. Résultats des tests d'identification des bactéries du groupe <i>Pseudomonas</i> spp.fluorescents.....	74
1.2.1. Tests culturaux et morphologiques.....	74
1.2.2. Caractérisation physiologique et biochimique	75
1.2.3. Identification préliminaire taxonomique des isolats.....	75
1.3. Analyse phylogénétique et alignement.....	76
2. Evaluation de la toxicité des bactéries sur les larves L5 de <i>L. migratoria</i>	79
2.1. Les symptômes.....	79
2.2. Effet sur la mortalité	80
2.3. TL ₅₀	83
2.4. CL ₅₀	87
3. Effet des bactéries sur le développement larvaire des larves L5 de <i>L. migratoria</i> ...	95
4. Effet des bactéries sur la composition hémolympatique des larves L5 de <i>L.</i> <i>migratoria</i>	97
4.1. Effet des bactéries sur les protéines hémolympatiques.....	97
4.1.1. Analyse quantitative.....	97
4.1.2. Aspect qualitative : Profit électrophoretique des protéines.....	98
4.2. Effet des bactéries sur les glucides hémolympatiques.....	100
5. Effet des bactéries sur l'histologie de l'appareil digestif des larves L5 de <i>L.</i> <i>migratoria</i>	102

6. Etude de l'effet des bactéries sur les souris blanches de laboratoire	115
6.1. Effet des bactéries sur les taux de mortalités	115
6.2. Effet des bactéries sur l'évolution pondérale	116
6.3. Etude de l'effet inflammatoire des bactéries sur les souris blanches de laboratoire.....	119
7. Etude de la persistance des bactéries sur le feuillage du blé tendre d'hiver et dans le sol.....	120
8. Etude <i>in vitro</i> de la compatibilité des bactéries entomopathogènes avec les pesticides chimiques	121
Chapitre IV : Discussion.....	121
1. Purification et identification taxonomique des isolats bactériens	121
2. Evaluation de la toxicité des bactéries sur les larves L5 de <i>L. migratoria</i>	123
2.1. Symptômes	123
2.2. Taux de mortalités	124
2.3. TL ₅₀	125
2.4. CL ₅₀	126
3. Effet des bactéries sur le développement larvaire chez les L5 de <i>L. migratoria</i>	127
4. Effet des bactéries sur les métabolites hemolympatiques	129
4.1. Effet sur les protéines hemolympatiques.....	129
4.2. Effet sur les glucides hemolympatiques.....	131
5. Effet des bactéries sur l'histologie de l'appareil digestif	132
6. Effet des bactéries entomopathogènes sur les souris blanches de laboratoire.....	134
7. Etude de la persistance des bactéries sur le feuillage du blé tendre d'hiver et dans le sol.....	136
8. Etude <i>in vitro</i> de la compatibilité des bactéries entomopathogènes avec les pesticides chimiques.....	139
Conclusion	142
Références bibliographiques.....	146
Annexe.....	159

Introduction

Les acridiens sont connus depuis longtemps comme de grands ravageurs, ils occupent une place très importante parmi les insectes nuisibles pour l'agriculture (Uvarov, 1977 ; Popov, 1980).

Ils constituent souvent en régions chaudes, la biomasse la plus importante de l'entomofaune des cultures, des friches, des jachères ainsi que des pâturages. On trouve couramment 10 à 15 espèces dans chaque type de biotope (Launois- Luong *et al.*, 1988).

Il existe au moins 12 000 espèces d'acridiens, dont les principales susceptibles de revêtir une importance économique par l'ampleur des dégâts qu'elles peuvent occasionner aux cultures sont d'environ 500 espèces (Ould El Hadj, 1992).

Parmi les criquets ennemis des cultures sahéliennes, le criquet migrateur *Locusta migratoria* (Linné, 1758) constitue un ravageur majeur en période d'invasion. Les dégâts sont essentiellement limités aux graminées (mil, maïs, riz, canne à sucre, blé...) (Launois – Luong et Lecoq, 1989) ; accroissant ainsi le risque d'érosion sociale et de pauvreté (Zakaria et Sagnia, 2003).

Le criquet migrateur occupe une très grande extension géographique. De nombreuses sous espèces plus ou moins nettes ont été décrites principalement en Afrique, à Madagascar, en Asie orientale, en Australie et en région méditerranéenne (Duranton *et al.*, 1982).

En Algérie, le développement de l'agriculture saharienne avec l'intensification des périmètres de mise en valeur en irrigué, à partir des années 1980, a entraîné de profondes modifications du peuplement acridien (Ould El Hadj, 2002), notamment dans la wilaya d'Adrar, induisant la colonisation de ces biotopes favorables de création récente, par le criquet migrateur. Ce sont les céréales d'hiver et les maraîchages qui constituent les principales cultures où l'on rencontre cette locuste en début de campagne vers la 2ème quinzaine de février. Ainsi la présence des pivots dans cette région entraîne l'apparition d'un ensemble de biotopes constituant une zone de reproduction de solitaires de *L. migratoria cinerascens* (Allal-Benfkih, 2006). Sidi Amar (2008) ajoute que cette orthoptère ne s'est jamais présenté par la forme grégaire, cependant des populations de la phase typiquement *transiens* sont présents en proportion considérable dans la région d'Adrar.

La lutte antiacridienne demeure l'une des préoccupations majeures dans les stratégies de protection des cultures (Zakaria et Sagnia, 2003). Les mesures préventives ont déjà donné

quelques résultats positifs ce qui est très encourageant (Duranton et Lecoq, 1990).

Cependant, les méthodes actuelles de lutte curative utilisent des produits insecticides liquides dont les matières actives appartiennent à la famille des organophosphorés, des pyréthriinoïdes et des carbamates de synthèse. Ces préparations se sont révélées à la fois très efficaces sur le criquet mais aussi néfastes sur de nombreuses autres espèces animales du biotope. Les insecticides provoquent une accumulation significative de matière active dans les écosystèmes traités, ils sont d'emploi délicat pour la santé de l'homme et contribuent au développement d'insectes résistants (De Visscher, 1991 ; Lecoq, 1991; Rachadi, 1991; Abbassi *et al.*, 2005; Mamadou *et al.*, 2005)..

Comme dans de nombreux cas, une pullulation massive ne peut être empêchée, il s'avère judicieux de trouver d'autres méthodes d'intervention.

En effet, de nouvelles mesures préventives ainsi que de nouveaux produits sont continuellement recherchés pour assurer d'une part une protection efficace de la production agricole et d'autre part contribuer à une gestion durable de l'environnement (Barbouche *et al.*, 2001).

Dans cette optique, l'utilisation de micro organismes entomopathogènes dotées d'effets insecticides offre certaines potentialités (Joung et Côté, 2000).

La lutte microbiologique est une alternative très prometteuse pour assurer une protection phytosanitaire performante par l'ubiquité naturelle des agents microbiologiques dans les écosystèmes, leur grande variété, leur dissémination facile, leur spécificité d'action et aussi leur persistance dans l'environnement (Kouassi, 2001).

Des communautés de bactéries se développent partout, dans notre environnement comme dans notre corps. Certaines sont inoffensives, voire bénéfiques, d'autres sont pathogènes et déclenchent des maladies plus ou moins graves. On trouve toujours des bactéries dans les insectes morts. Dans la plupart des cas, il s'agit de saprophages qui se développent dans le cadavre mais certaines bactéries peuvent tuer des insectes.

Les bactéries les plus importantes qui provoquent des maladies chez les insectes sains appartiennent aux familles des *Bacillaceae*, *Pseudomonadaceae* et *Enterobacteriaceae*.

Normalement elles entrent dans leurs hôtes par la bouche, parfois par les blessures ou encore sont libérées dans l'hémocoèle par les nématodes avec lesquels elles vivent en symbiose (Greathead *et al.*, 1994).

En effet, de multiples recherches récentes ont fait l'objet de résultats prometteurs pour trouver des produits à base de bactéries entomopathogènes qui stoppent la croissance des larves.

Dans le cadre d'évaluer l'effet des bactéries entomopathogènes sur les acridiens, des études sont réalisées par Paillot (1933); Greathead *et al.* (1994); Lazare *et al.* (1996); Zelazny *et al.* (1997), Quesada-Moraga et Santiago-Alvarez (2001), Mcneill et Hurst (2008) et Yan *et al.* (2011).

En Algérie, il n'existe que peu d'études rigoureuses sur l'emploi des bactéries dans la lutte antiacridienne, Celles qui existent concernent surtout des bactéries fournies par des laboratoires étrangers testées dans un cadre limité, citant ceux de Tail(1998), Allal-Benfkih (2006) et Mohand Kaci et Doumandji-Mitiche, (2006). Il en ressort que, malgré l'utilité reconnue de ces agents de lutte biologique, ces derniers ne peuvent être employés. Pourtant, ils semblent offrir les meilleures perspectives en lutte biologique, en particulier ceux qui peuvent être multipliés et formulés pour être épandus comme biopesticides, notamment au cours des campagnes de lutte antiacridienne où ils aident à réduire l'importance des pullulations.

C'est dans ce concept que ce travail s'inscrit et notre objectif essentiel est d'isoler, purifier, identifier et caractériser des souches de bactéries entomopathogènes autochtones du genre *Bacillus* et *Pseudomonas spp.* fluorescents (isolées a partir du sol au sud Algérien) d'une part et d'étudier les incidences biologiques de ces bactéries sur le criquet migrateur d'une autre part.

Pour cela, notre travail consiste dans un premier temps, à la purification et l'identification taxonomique des bactéries entomopathogènes notamment du genre *Bacillus* et *Pseudomonas spp.* fluorescents et cela suivant leurs caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques.

Cette étude vise dans un deuxième temps à la caractérisation moléculaire par extraction d'ADN, PCR et séquençage de l'ARN 16S suivie d'une analyse phylogénétique et alignement.

Nous nous proposons par la suite d'étudier, la toxicité des bactéries sur les larves L₅ de *L.migratoria*. Il nous a paru intéressant après cela de déterminer leurs effets sur la composition biochimique de l'hémolymphe, l'histologie du tube digestif, la croissance pondérale, et la durée du développement des larves du 5^{ème} stade de *Locusta migratoria*.

Dans le but de préserver les agents de lutte biologique dans les agro-écosystèmes ou de les utiliser en combinaison avec des produits chimiques dans le cadre de la lutte intégrée, on a jugé nécessaire de déterminer la persistance des bactéries utilisées dans l'environnement et de connaître l'action de ces pesticides chimiques sur les micro-organismes, puis de déterminer leur compatibilité.

Enfin, ce travail a pour but d'évaluer la toxicité des bactéries utilisées sur les souris blanches de laboratoire.

Pour mener à bien notre étude, il a semblé nécessaire de présenter dans un premier chapitre le criquet migrateur *Locusta migratoria* ; sa morphologie, biologie, distribution géographique, dégâts et moyens de lutte. Les bactéries entomopathogènes ont été présentées en rappelant leur classification et leurs principaux caractères morphologiques et culturels. Leur utilisation dans la lutte biologique est également traitée dans ce chapitre.

Nous avons présenté dans le second chapitre le matériel et la méthodologie adoptée pour notre étude.

Enfin, le troisième chapitre comprend les résultats, l'analyse statistique et les discussions relatives à chaque paramètre étudié.

Chapitre I : Synthèse bibliographique

1. Le criquet migrateur *Locusta migratoria*

1.1. Position systématique

Selon Louveaux et Ben Halima (1986), la classification du criquet migrateur est la suivante :

Emb : Arthropodes

S/Emb : Antennates

Classe : Insectes

S/Classe : Ptérygotes

Section : Néoptères

S/Section : Néoptères exoptérygogènes

Ordre : Orthoptères

S/Ordre : Caelifères

Super famille : Acridoideae

Famille : Acrididae

S/Famille : Oedipodinae

Genre : *Locusta*

Espèce : *Locusta migratoria* (Linné, 1758)

1.2. Caractères morphologiques

1.2.1. L'oothèque

L'oothèque de criquet migrateur est grande, longue légèrement courbe et enrobée dans la matière spumeuse, sa longueur totale est de 6 à 8,6 cm. Elle est composée d'une masse d'œufs à orientation bilatérale (Popov *et al.*, 1990). Les œufs sont de forme allongée, un peu incurvés, à chorion blanchâtre, d'une taille qui varie de 5,5 à 7 mm, leur nombre allant d'une dizaine à près de 100 (Grassè, 1949).

1.2.2. La larve

Au sein des populations solitaires, les formes larvaires possèdent une teinte vert pâle (Doumandji et Doumandji-Mitiche, 1994), alors que les larves grégaires sont noires au cours des premiers stades puis deviennent jaunes/noires quant elles sont plus âgées (Masson, 1989 ; Cressman, 2001).

1.2.3. L'adulte

Les criquets migrants passent par deux phases alternatives : une phase solitaire sédentaire et une phase grégaire migratrice (Robert, 1972).

Le criquet migrant, sous sa forme solitaire mesure 29 à 46 mm chez le mâle et 37 à 60 mm chez la femelle. La couleur est plus variable, verte et brune (Balachowsky et Mesnil, 1936). Les ailes atteignent en moyenne la double longueur des fémurs (Bellmann et Luquet, 1995).

Sous sa forme grégaire, le criquet migrant mesure 40 à 50 mm chez les mâles et 46 à 56 mm chez la femelle, la couleur générale est brune, parfois légèrement verdâtre (Balachowsky et Mesnil, 1936). Les organes de vol atteignent d'ordinaire plus du double de la longueur des fémurs postérieurs (Bellman et Luquet, 1995).

L. migratoria présente une tête arrondie, le sommet du vertex est large, convexe, les favéoles temporales sont petites et triangulaires, les antennes sont filiformes un peu plus longues que la tête. Le pronotum chez la forme solitaire est long et présente une carène médiane convexe et forme un angle aigu à l'arrière. Ce dernier est court et arrondi à la partie postérieure, il présente une carène médiane concave ou droite chez la forme grégaire (Bonnemaison, 1961).

1.3. Cycle biologique

Comme tous les acridiens, *Locusta migratoria* passe toujours par trois états biologiques au cours de sa vie : état embryonnaire, état larvaire et état imaginaire (Appert et Deuse, 1982). L'ensemble correspond à une génération. Ces trois états biologiques se succèdent dans le temps, mais les durées qui les séparent changent beaucoup selon les conditions ambiantes de développement et de croissance (Duranton *et al.*, 1982) (figure 1).

1.3.1. Ponte

La majorité des criquets déposent leurs œufs dans le sol. L'ensemble des processus qui préparent et conduisent au dépôt des œufs constitue la ponte ou l'oviposition. Elle se déroule en quatre étapes :

- la recherche d'un site de ponte
- le forage de trou de ponte
- le dépôt des œufs et de la matière spumeuse (oothèque)
- le damage et le balayage du sol

La ponte a lieu généralement de jour et dure une heure et plus (Popov *et al.*, 1990).

1.3.2. Développement embryonnaire

Le développement embryonnaire passe par différents stades : peu de temps après la ponte, les œufs s'hydratent, augmentent de taille et deviennent turgescents (Duranton *et al.*, 1982). Ils évoluent en un temps très variable mais en rapport direct avec les conditions extérieures, la température en particulier (Chopard, 1932). Chez *Locusta migratoria*, l'embryogenèse dure 18 jours à 27°C et 10 jours à 33°C (Duranton *et al.*, 1982).

1.3.3. Éclosion et développement larvaire

A l'éclosion, la première forme larvaire, dite larve vermiforme, progresse vers la surface du sol par reptation. Dès sa sortie à l'air libre, cette larve vermiforme se débarrasse de sa cuticule post-embryonnaire au cours de la mue intermédiaire et devient alors une larve de premier stade (Duranton et Lecoq, 1990). Le développement larvaire passe par 5 stades et dure environ 3 semaines (Launois- Luong et Lecoq, 1989).

Afin de poursuivre leur croissance, les larves doivent subir des mues. Les 3 premiers stades se ressemblent avec bien sûr une augmentation de taille. Les larves de 4^{ème} et 5^{ème} stade se distinguent par leur taille et la grandeur de leurs ébauches alaires qui sont dirigées vers le haut et qui restent différentes de celles des 3 premiers stades qui sont dirigées vers le bas (Bellmann et Luquet, 1995).

1.3.4. Développement imaginal et maturité sexuelle

L'état imaginal se caractérise essentiellement par l'existence d'ailes fonctionnelles (Joly, 2005).

Les sauterelles qui viennent d'effectuer leur cinquième mue (mue imaginale) sont entrées dans le stade adulte mais n'ont pas cependant encore atteint la maturité sexuelle (Gry, *et al.*, 1963). La première phase de vie imaginale est donc la phase de durcissement cuticulaire. Après, le jeune imago se consacre surtout à la recherche d'un biotope favorable à l'alimentation. Il ya une augmentation progressive de poids par accumulation de corps gras.

Avec le début de la maturation sexuelle, on note une modification de la coloration des individus (Duranton et Lecoq, 1990). Les mâles sont alors jaunes brillants et les femelles brunes foncées ; les accouplements se produisent fréquemment et les femelles commencent à pondre (Gry, *et al.*, 1963).

1.3.5. Accouplement

L'époque à laquelle a lieu l'accouplement est naturellement liée au moment où l'insecte devient adulte (Chopard, 1938). Les préliminaires de l'accouplement comportent de

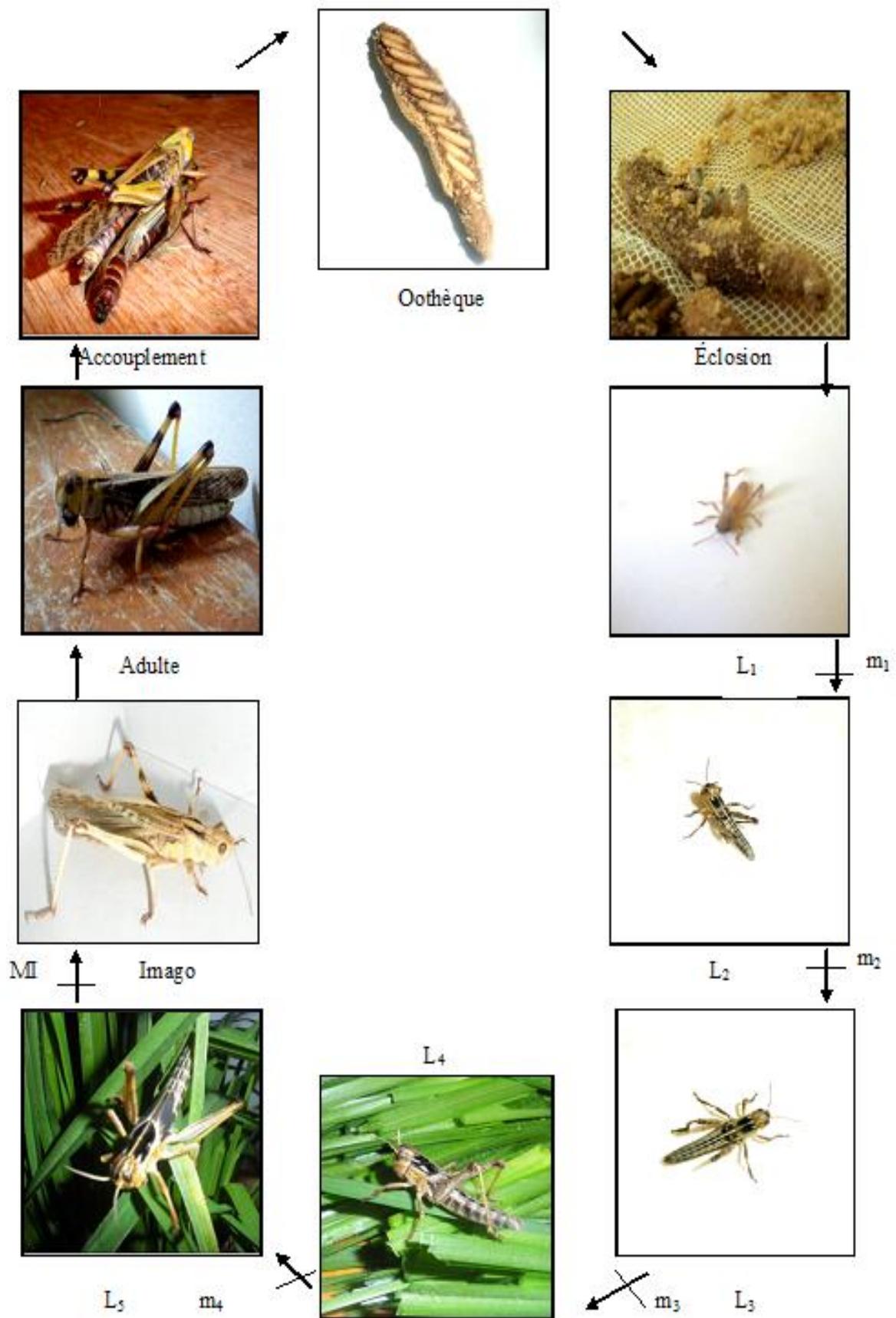


Figure 1: Cycle biologique de *Locusta migratoria*

curieuses parades ; ils consistent en une stridulation spéciale que le mâle fait entendre à la femelle (Grasse, 1949 ; Duranton *et al.*, 1982). Pour s'accoupler, le mâle grimpe sur la femelle, l'extrémité de son abdomen tordue sur le côté (Chopard, 1938), le spermatophore est introduit dans la spermathèque de la femelle, le sperme se trouve transféré dans les organes femelles (Grasse, 1949).

L'accouplement dure assez longtemps, de vingt minutes à plusieurs heures (Bellman et Luquet, 1995).

1.3.6. Nombre de générations

Le criquet migrateur se reproduit en continu et effectue quatre à cinq générations par an dans sa phase solitaire et trois générations par an lorsqu'il est en phase grégaire (Launois-Luong et Lecoq, 1989).

1.4. Rappel sur l'hémolymphe des acridiens

L'hémolymphe est le seul liquide extracellulaire qui circule dans le corps de l'insecte, son volume représente 10 à 45% du poids total de l'insecte. Ce liquide a un pH qui varie de 6 à 7,5. Il est généralement jaune ou vert chez les criquets. Il ne sert pratiquement pas aux échanges gazeux ; il assure certaines fonctions du métabolisme intermédiaire et transporte des substances chimiques nutritives ou porteuses d'information (Duranton *et al.*, 1982).

Selon Raccaud-Schoeller (1980), l'augmentation en volume de l'hémolymphe à la fin de l'inter mue favorise la rupture de la vieille cuticule. Peu après la mue, le volume de l'hémolymphe diminue nettement. L'hémolymphe comprend le plasma et les différents types d'hémocytes.

- **Le plasma**

Le plasma est un mélange d'eau, de protéines, de glucide et d'acide urique, il contient quelques éléments non organiques ; potassium, sodium, magnésium, calcium et plus rarement de cuivre. La concentration en protéines est comparable à celle observée chez les vertébrés. Les protéines de l'hémolymphe sont essentiellement synthétisées par le corps gras, sous le contrôle des cellules neurosécrétrices de la pars intercerebralis et des corpora allata. Chez les femelles, les protéines serviront lors de la vitellogenèse, étant absorbées par les ovocytes et incorporées dans le vitellus. Il faut noter parmi les protéines de l'hémolymphe, une forte proportion de protéines enzymatiques : amylases, estérases, enzymes protéolytiques et oxydoréductases. Pour la composition glucidique de l'hémolymphe, elle est présentée par de faibles quantités de sucres réducteurs, mais par contre des quantités importantes de tréhalose,

dimère non réducteur de l' α - glucose. Le tréhalose est synthétisé au niveau de tissu adipeux à partir de glucose d'origine alimentaire ou à partir du glycogène stocké dans le corps gras (Raccaud-Schoeller, 1980).

- **Les hémocytes**

Les hémocytes sont les principales cellules en suspension dans le plasma dont certaines ont un rôle dans la coagulation de l'hémolymphe en cas de blessure, la lutte contre l'infection bactérienne ou certains parasites internes.

Les hémocytes ne sont pas distribués au hasard mais assemblés pour l'essentiel en agrégats en particulier sur le diaphragme dorsal pour l'essentiel. Elles renferment une variété de substances nutritives comme le glycogène, les lipides et les protéines (Duranton *et al.*, 1982).

D'après Raccaud-Schoeller (1980), Plusieurs types d'hémocytes ont été décrits, mais leur classification reste difficile vu que les hémocytes libres peuvent prendre différents aspects. On considère qu'il existe chez les insectes 3 types d'hémocytes bien définis notamment chez les orthoptères et qui sont :

Le prohémocytes ou proleucocytes : Ce sont de petites cellules rondes ou ellipsoïdales à noyau relativement large occupant toute la cellule. Elles représentent les cellules souches de toutes les hémocytes.

Les plasmocytes ou phagocytes : Cellules très polymorphes, caractérisées par leur grand noyau rond ou ovoïde au centre d'un cytoplasme finement granuleux. Les plasmocytes sont doués de phagocytose.

Les granulocytes : Ce sont des cellules compactes, polymorphes, avec un noyau relativement petit dans un cytoplasme abondant. Ces cellules sont remplies de grosses inclusions. Elles interviennent dans le métabolisme intermédiaire (Raccaud-Schoeller, 1980).

1.5. Rappel anatomique sur le tube digestif des acridiens

D'après Chauvin (1956), le tube digestif est composé de trois parties ; l'intestin antérieur ou Stomodeum, l'intestin moyen ou Mesenteron et l'intestin postérieur Proctodeum (Figure 2).

Selon Beaumont et Cassier (1970), les portions antérieures et postérieures sont doublées intérieurement d'une intima cuticulaire; Elles n'ont qu'un rôle mécanique dans la digestion. Cependant l'intestin moyen est caractérisé par des cellules exposées librement, ses parois transparentes ne présentent aucun revêtement cuticulaire. Les aliments y sont enfermés dans

une fine membrane péritrophique, il assume les principales fonctions digestives : assimilation et absorption.

- **Stomodeum (Intestin antérieur)**

L'intestin antérieur présente une pigmentation noire, brunâtre et uniforme. Il comprend la cavité buccale, le pharynx, l'œsophage et deux poches qui sont le jabot et le gésier. L'œsophage est très étroit et court, il se poursuit par un jabot beaucoup plus volumineux et continu et en arrière par un gésier de même taille que le jabot mais à paroi plus épaisse.

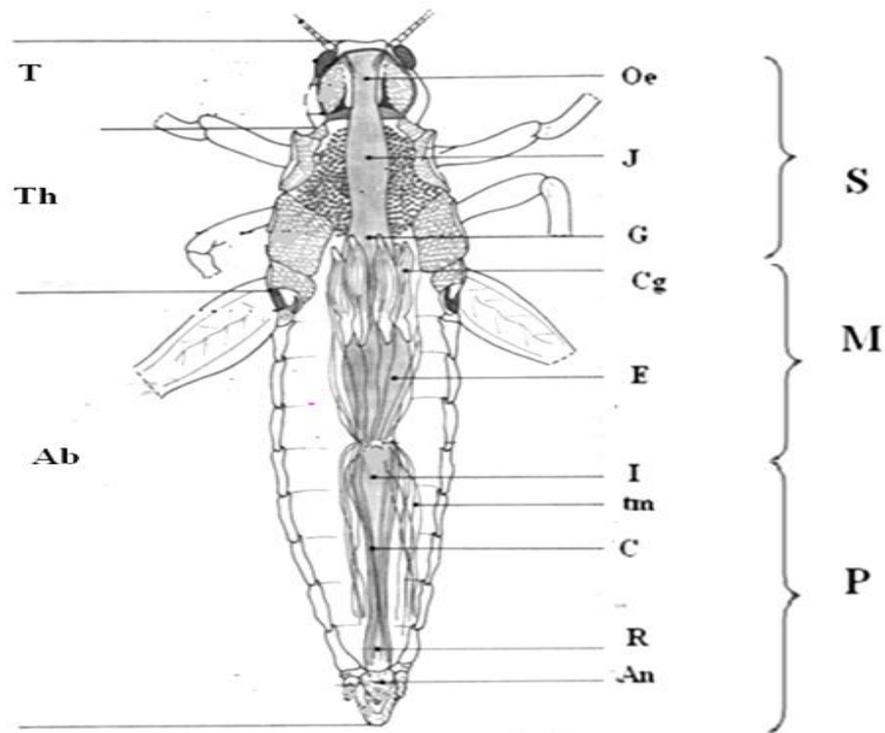
Le gésier assure la trituration des aliments et régularise le transit de la nourriture vers l'intestin moyen, tandis que le jabot assure le stockage des aliments. La limite antérieure du gésier est constituée par un léger étranglement, plus ou moins marqué, qui le sépare du jabot (Chauvin, 1956).

- **Mésenteron (Intestin moyen)**

L'intestin moyen est blanchâtre, toujours plus clair que l'intestin antérieur, il comprend six caecums gastriques allongés parallèlement au tube digestif. Chaque caecum comporte un segment antérieur plus développé que la partie postérieure, ces deux segments ont la même forme cylindro-conique. Entre l'intestin moyen et l'intestin postérieur s'insèrent de nombreux tubes de Malpighi (Chauvin, 1956).

- **Proctodeum (Intestin postérieur)**

L'intestin postérieur commence à partir du pylore où s'insèrent les tubes de Malpighi, il comporte un iléon suivi d'un colon très rétréci qui s'élargit dans sa région distale formant l'ampoule rectale (Chauvin, 1956).



**Figure 2 : Schéma de l'appareil digestif du criquet migrateur en vue dorsale
(Modifier selon Beaumont et Cassier, 1970)**

T: tête, Th: thorax, Ab : abdomen, An: anus, C : colon, Cg: ceacum gastrique, E: estomac, G : gésier, J: jabot, I: iléon, M: mesenteron, Oe: œsophage, P: proctodeum , S: stomodeum , Tm : tubes de malpighi

1.6. Polymorphisme phasaire

Les locustes ont la particularité de pouvoir se présenter sous deux états, appelés phases : la phase solitaire inoffensive pour les cultures, et la phase grégaire durant laquelle les insectes sont en nombre considérable et forment des bandes larvaires et des essaims (Launois-Luong Et Lecoq, 1993).

Le polymorphisme phasaire s'exprime par des différences morphologiques, anatomiques, physiologiques, écologiques et comportementales (Fescemyer, 1993).

La transformation phasaire, dans les deux sens, se produit aisément et fréquemment. Le passage des individus grégariptes d'une phase à l'autre constitue une phase transitoire, on parle de transiens congrégans pour désigner le passage des solitaires aux grégaires et transiens dissocians pour le passage inverse des grégaires aux solitaires (Duranton *et al.*, 1982 ; Popov *et al.*, 1991).

L'expression du polymorphisme phasaire est liée essentiellement aux conditions de l'environnement social de chaque acridien grégariapte mis en présence ou au contraire isolé de ses congénères. Le principal facteur déclenchant étant la densité, le seuil critique est estimé

à 2000 ailés/hectare. En plus de la densité, d'autres facteurs semblent intervenir dans l'expression du polymorphisme phasaire tels que la photopériode, la température, la sécheresse, la pauvreté en alimentation ; le dessèchement progressif de la végétation qui réduit les espaces favorables et qui conduit les criquets à se rassembler vers les taches de végétation qui persistent dans les zones d'accumulation des eaux se traduit par une concentration (Appert et Deusse, 1982).

1.7. Aire de répartition de *Locusta migratoria*

L'espèce *L. migratoria* comprend plusieurs sous-espèces, Il n'existe pas de critère absolu pour les différencier morphologiquement, il est nécessaire de tenir compte de l'origine géographique du spécimen récolté (Harz, 1975).

Ces sous-espèces se rencontrent en Afrique au sud du Sahara, à Madagascar, dans la péninsule Arabique et Indo-Pakistanaise, une grande partie de l'Europe et sur le pourtour méditerranéen, en Asie orientale et en Australie (Duranton *et al.*, 1982). Par contre, l'espèce est inconnue sur le continent américain.

Chacune des sous-espèces de *L. migratoria* possède des particularités bioécologiques liées aux caractéristiques écoclimatiques de leur domaine d'existence (Figure 3), On distingue :

- La sous-espèce *burmana* (Ramme, 1951) —→ Chine d'Ouest et Burmanie.
- La sous-espèce *capito* (Saussure, 1884) —→ Madagascar et les îles adjacentes.
- La sous-espèce *cinerascens* (Fabricius, 1781) —→ La région méditerranéenne.
- La sous-espèce *manilensis* (Meyen, 1835) —→ La région pacifique, l'Asie du Sud et dans le Sud et l'Est de la Chine.
- La sous-espèce *migratoria* (Linnaeus, 1758) —→ La partie orientale de l'Europe et l'Asie.
- La sous-espèce *migratorioides* (Reiche et Fairmaire, 1850) —→ Afrique du Sud et tropicale.

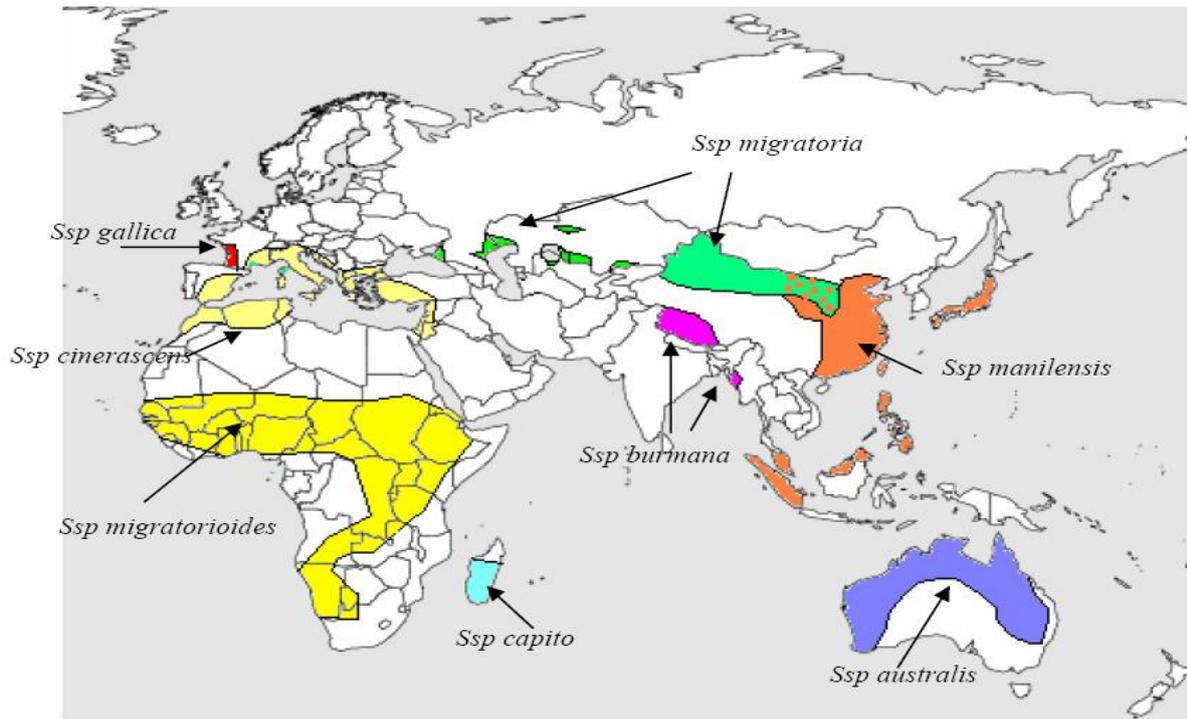


Figure 3 : Répartition géographique des sous-espèces de *Locusta migratoria*.
 (Albretch, 1967; Uvarov, 1977; Defaut, 2005 ; Allal-Benfekih, 2006)

En Algérie, la sous-espèce *cinerascens* est un taxon caractéristique des zones littorales et des plaines de l'Atlas Tellien ainsi qu'au Sud de l'Atlas Saharien (Chopard, 1943). L'invasion et la grégarisation de la sous-espèce *migratorioides* est renforcée par les pays limitotrophes qui renferment les conditions de transformation phasaire, on note essentiellement la cuvette de Mali, le lac du Tchad ainsi que le Delta Central du Niger (Batten, 1966).

Enfin, la présence des pivots dans les régions anthropisées d'Adrar entraîne l'apparition d'un ensemble de biotopes constituant une zone de reproduction de solitaires et de transiens de *L. migratoria cinerascens* (Allal-Benfekih, 2006 ; Oudjiane, 2009).

1.8. Dégâts et importance économique des acridiens

La production agricole des pays du Sahel, déjà sérieusement éprouvée par les sécheresses périodiques, l'érosion des sols, la désertification accélérée, doit aussi faire face depuis un certain temps, à un autre fléau très grave : l'invasion des acridiens (Abou Thiam, 1991).

Depuis la plus haute antiquité les pullulations de criquets sont à l'origine de famines sévères dans les zones arides de la Mauritanie aux Indes, en passant par le Sahel et la Péninsule Arabique (Essaid, 1991).

En période d'invasion, au point de vue quantitatif les dégâts réels occasionnés par les criquets sont difficiles à apprécier. Cependant selon les estimations des spécialistes, en 1974, 368000 tonnes de céréales dans le Sahel auraient été perdues du fait des sautereaux. Quand on sait que les céréales constituent la base de l'alimentation dans le pays de Sahel et qu'elles sont des cultures particulièrement vulnérables aux acridiens, on peut avoir une idée de l'ampleur des dégâts occasionnés par les criquets et les sautereaux. Un Km² d'essaime, qui peut renfermer plus de 50 millions d'individus consommerait près de 100 tonnes de matière végétale fraîche par jour, les dégâts sur les pâturages sont importants certes mais moins spectaculaires (Abou Thiam, 1991).

La sécheresse favorise les pullulations de *Locusta migratoria* en augmentant la surface des biotopes de multiplications, en accélérant le métabolisme du criquet, en l'incitant à former des bandes larvaires et à engager la transformation phasaire lui permettant de passer d'une forme solitaire à une forme grégaire (Zibin liu *et al.*, 1996).

Cependant, il faut noter qu'il existe quelques cas où les acridiens sont considérés comme utiles par les populations pour différentes raisons :

- destruction sélectives de certaines plantes non appréciées par le bétail.
- Manne pour de nombreux gibiers, oiseaux et mammifères (Appert et Deuse, 1982)
- Beaucoup d'acridiens sont comestibles et les gens en consomment volontiers en faisant même commerce sur le marché .Il s'agit d'une source de protéines non négligeable (Launois-Luong, *et al.*, 1988).

1.9. Différentes techniques de lutte contre les acridiens

1.9.1. Mesures préventives

La lutte préventive est la lutte la plus efficace et la moins onéreuse que la lutte curative. En effet l'invasion une fois déclenchée est très difficile à arrêter, même avec des opérations intensives de lutte curative (Launois-Luong et Lecoq 1989, Duranton et Lecoq 1990).

La stratégie de lutte préventive comporte trois étapes essentielles (Duranton et Lecoq, 1990) :

- La surveillance des conditions écologiques dans les aires potentielles de reproduction et de grégarisation.
- L'organisation de prospections aériennes et terrestre dans les aires devenues potentiellement favorables à la suite de précipitations abondantes.
- La lutte contre toutes les populations des acridiens dépassant un certain seuil de nuisibilité.

Cependant d'après Lecoq (1991); pour des raisons diverses, la surveillance des Criquets reste très insuffisante en toutes circonstances. Certaines régions sont naturellement difficiles d'accès, d'autres sont interdites pour raisons militaires,...L'utilisation des techniques de télédétection spatiale et de biomodélisation constitue alors le meilleur moyen pour améliorer la surveillance de l'environnement de cet acridien et détecter rapidement toute zone potentiellement favorable à des débuts de grégarisation.

1.9.2. La lutte mécanique

Les procédés mécaniques sont les plus anciens, simples en eux-mêmes, ils sont cependant de moins en moins employés car ils exigent une main d'œuvre abondante (Mallamaire, 1963). Ces méthodes sont essentiellement :

- rabattages des insectes dans des fossés.
- barrages métalliques placés le long des trajets des bandes larvaires pour les canaliser vers des fossés.
- Destruction des larves en les écrasant ou en les brûlant.
- Ramassage et destruction des oothèques (Latchininsky et Launois-Luong, 1992).
- Le labourage des champs infestés d'oothèque (Rowley, 1993).

1.9.3. La lutte écologique

La lutte écologique consiste à modifier l'environnement au désavantage de l'acridien et si possible au bénéfice de l'homme. Les suggestions de lutte écologique sont nombreuses, mais les applications à grande échelle sont encore très rares car on prend toujours le risque de remplacer un problème par un autre (Duranton *et al.*, 1982). Les moyens utilisés sont par exemple :

- l'inondation temporaire de certains sites de reproduction.
- La reforestation de clairières.
- Le labourage de sols indurés.
- Les semis de plantes répulsives.
- La suppression des jachères.

1.9.4. La lutte chimique

Selon Duranton *et al.* (1982), la lutte chimique consiste à atteindre les acridiens ravageurs directement ou indirectement (par la végétation) au moyen de substance active naturelle ou de synthèse, pour les tuer.

L'intoxication des insectes par les insecticides de synthèse provoque de profondes perturbations physiologiques. Celles-ci se traduisent principalement par une perte d'eau intense, un accroissement des échanges respiratoires, une déperdition de divers métabolites (glucides, métabolites intermédiaires du cycle de Krebs et lipides) et surtout par des troubles des systèmes nerveux central et périphérique (Moreteau, 1991).

Selon Launois-Luong *et al.* (1988) et Rachadi (1991) ; les principaux pesticides utilisés dans la lutte antiacridienne sont :

- Les organophosphorés (féntrothion, parathion méthyl, diazinon, etc.).
- Les carbamates (bendiocarbe).
- Les pyréthriinoïdes (deltamethrine, lambda- cyhalothrine) qui ont une action létale significative atteinte dans les vingt quatre heures qui suivent l'application.
- La dieldrine capable de tuer les larves plusieurs semaines après l'application.
- Les régulateurs de croissance (diflubenzuron, le triflumuron, le teflubenzuron) qui agissent sur le mécanisme hormonal ou de synthèse de la cuticule et les larves meurent au moment de la mue.

Les régulateurs de croissance pourraient constituer une alternative réaliste. Il faudrait toutefois multiplier les essais en conditions réelles et comparer entre elles les différentes molécules de ce type, afin de confirmer leur persistance d'action, d'établir les préférences et les limites d'utilisation.

1.9.5. La lutte biologique

On a donné le nom de la lutte biologique aux méthodes qui consistent à détruire les insectes nuisibles par l'utilisation rationnelle de leurs ennemis naturels appartenant soit au règne animal, soit au règne végétal (Doumandji-Mitiche et Doumandji, 1993), soit par l'utilisation des microorganismes entomopathogènes (Mathias, 2001) plutôt que des produits toxiques dérivés de ses organismes (Ammadou, 2003).

Les ennemis naturels des acridiens agissent sur la mortalité immédiate (prédateurs) ou différée (parasitoïdes, champignons pathogènes, bactéries, virus), la fécondité des femelles (nématodes), le temps de développement, les capacités de vol et les activités alimentaires de l'acridien (champignons) (Greathead *et al.*, 1994).

❖ Les extraits végétaux

Les extraits provenant de deux méliacées, *Azadirachta indica* (margousier ou neem) et *Melia volkensii*, connus depuis longtemps pour leurs effets répulsifs et antiappétants contre les

insectes, présentent également des propriétés antiacridiennes intéressantes. Des extraits de fruits, de feuillages ou d'écorce protègent efficacement les cultures des attaques d'acridiens. (Diop Et Wilps, 1997 ; Rembold, 1997). Ces produits sont biodégradables et ne sont pas nocifs pour l'homme et l'environnement. Par ailleurs, les plantes-sources sont communes, peu exigeantes sur la qualité des sols (Luong-Skormand et *al.*, 1999).

❖ Les champignons entomopathogènes

Sur plusieurs centaines d'espèces de champignons entomopathogènes, deux genres sont particulièrement prometteurs et affectent sensiblement les acridiens : *Beauveria* et *Metarhizium* dont *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* et *Beauveria bassiana* sont les 2 espèces les plus citées dans la littérature (Zimmerman et *al.*, 1994; Meinzingen, 1997; Stephan et *al.*, 1997; Lomer et *al.*, 2001).

Ces champignons se trouvent communément dans le sol. Grâce à la germination des spores à travers la cuticule externe ou à travers le tube digestif, ils peuvent envahir la cavité générale de l'hôte. La contamination se fait donc par contact ou par ingestion de la plante traitée par le myco-insecticide (Fargues et Goettel, 1996). Les champignons peuvent tuer très rapidement en l'espace de quelques heures par l'intermédiaire de toxines, ou plus lentement par épuisement de l'hôte dont ils prélèvent l'eau et les nutriments pour se développer (Luong-Skormand et *al.*, 1999).

❖ Les virus

La plupart des virus isolés à partir de criquets malades appartiennent à la famille des *Poxviridae*, plus particulièrement des virus entomopox (*Entomopoxvirinae*). D'autres familles de virus ont été trouvées chez les orthoptères. Elles appartiennent aux *Baculoviridae*, aux *Iridoviridae*, aux *Parvoviridae* et aux *Picornaviridae* (Greathead et *al.*, 1994).

Une autre stratégie qui peut être envisagée, et qui est en cours de développement extrêmement rapide, est l'usage de Baculovirus génétiquement modifiés. Ces virus se multiplient uniquement dans des espèces d'insectes très spécifiques. Ils ne peuvent pas attaquer des vertébrés et ils sont assez stables dans l'environnement (De loof, 1991).

❖ Les protozoaires acridopathogènes

Parmi les protozoaires pathogènes qui causent des maladies, à quelques degrés de gravité que ce soit, chez les orthoptéroïdes, il y en a peu qui semblent jouer un rôle important dans la régulation des populations de ces derniers (Keith et Kevan, 1992).

Nosema acridophagus et *N. cuneatum* semblent avoir un effet plus néfaste sur leurs hôtes que *N. locustae* car ils sont capables de les tuer. Avant de mourir, les criquets restent couchés à terre, agités de mouvements désordonnés (Greathead *et al.*, 1994).

❖ Les prédateurs et les parasites des œufs

Les oothèques d'acridiens constituent une source de nourriture pour de nombreux insectes dont les larves prédatrices se développent dans le sol. Des écureuils (*Xerus spp.*) et quelques autres rongeurs, ainsi que des renards (*Vulpes spp.*) et des Oryctéropes (*Orycteropus afer*) ont été observés dans le Sahel en train de déterrer des oothèques de criquets.

Parmi les parasitoïdes d'œufs d'acridiens, les hyménoptères scélionides sont les seuls connus, parasitoïdes vrais d'embryons de locustes et de sauteriaux (Greathead *et al.*, 1994).

❖ Les prédateurs et les parasites des larves et des imagos

Les acridiens, en particulier les locustes grégaires, constituent une source attrayante de nourriture pour les prédateurs non spécialisés, vertébrés et invertébrés (oiseaux, lézards, scorpions et araignées).

Parmi les oiseaux, Duranton *et al.* (1982) citent la cigogne, le faucon et l'aigle.

Les parasites des larves et des imagos d'acridiens ayant un impact sur la physiologie et la survie de l'hôte sont surtout des nématodes. Certains d'entre eux sont des vecteurs d'agents pathogènes, ce qui suscite un intérêt dans la recherche de leur utilisation en lutte biologique (Greathead *et al.*, 1994).

2. Les bactéries entomopathogènes

2.1. Aperçu et position systématique

L'utilisation des bactéries entomopathogènes dans la lutte biologique contre les insectes est très ancienne (Lecadet, 1996).

Selon Starnes *et al.*, 1993 ; plus d'une centaine de bactéries ont été identifiées comme ayant un potentiel d'utilisation en lutte biologique. Ces bactéries entomopathogènes appartiennent surtout à trois grandes familles qui sont les Bacillaceae (*Bacillus*), Enterobacteriaceae (*Serratia* et *Xenorhabdus*) et Pseudomonaceae (*Pseudomonas*) (Greathead *et al.*, 1994).

À l'heure actuelle, *Bacillus thuringiensis* et *B. sphaericus* sont les espèces les plus utilisées en lutte contre les ravageurs (Kouassi, 2001 ; Riba et Silvy, 1989 ; Keith et Kevan (1992); Lacey *et al.*, 2001).

B. popillae est efficace contre les Scarabaeidae et a été utilisé avec succès contre le scarabée japonais *Popillia japonica*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Serratia marcescens* sont des agents potentiels de lutte (Kouassi, 2001). Dans la lutte biologique, *Bacillus subtilis* est utilisée comme insecticide, bactéricide et biofongicide dans l'agriculture (Suty, 2010). Son activité insecticide a été décrite sur des larves d'*Anopheles culicifacies*, vecteur de la malaria en Inde et sur *Drosophila melanogaster* (Gupta et Vyas, 1989; Lazare *et al.*, 1996). *Bacillus sphaericus* a une activité insecticide, elle est attribuable à deux types distincts de toxines : la toxine binaire (Btx) et la toxine (Mtx) (Charle *et al.*, 1996).

L'utilisation en agriculture, de la bactérie *Bacillus thuringiensis* comme insecticide microbien apporta un nouveau départ à la lutte biologique des insectes. La pathogénicité de cette espèce était due à une toxine présente dans la forme sporulée du bacille. Récemment, le gène de cette toxine a été introduit dans un certain nombre de plantes cultivées, de sorte qu'elle devient elle-même toxique pour les insectes ravageurs qui les agressent (Dedet, 2007).

Castella (2008) ajoute que les toxines entomopathogènes synthétisées par la bactérie sont incluses dans des inclusions cristallines qui, après ingestion par l'insecte, se fixent spécifiquement sur les cellules de l'épithélium intestinal et le détruisent ce qui présente un grand intérêt dans la lutte contre les ravageurs. Cependant, les mécanismes induits par cette fixation sont encore mal élucidés.

Par ailleurs, l'insecte infecté par une bactérie peut mourir par inanition (Cloutier et Cloutier, 1992) ou par une septicémie provoquée par la multiplication de la bactérie dans l'hémolymphe et les tissus.

Les bactéries entomopathogènes sont naturellement présentes dans l'environnement (sol, air, eau) et infectent généralement leur hôte soit par ingestion, par la cuticule ou par les orifices (Klier, 2007), parfois par les blessures ou encore sont libérées dans l'hémocoèle par les nématodes avec lesquels elles vivent en symbiose (Greathead *et al.*, 1994).

En effet, des bactéries agissent en symbiose avec les nématodes entomopathogènes des familles des Steinernematidae et Heterorhabditidae, lesquelles sont libérées rapidement dans la cavité abdominale de l'hôte. Les bactéries liquéfient les tissus afin de rendre disponible les nutriments nécessaires au développement du nématode, elles agissent d'abord en libérant une endotoxine qui s'attaque aux cellules haemocytaires des insectes. Pendant la multiplication des cellules bactériennes, on observe également la sécrétion d'une exotoxine qui accentuerait la toxicité sur l'insecte. Parmi ces bactéries symbiotiques, on trouve *Xenorhabdus spp* et *P. fluorescens* (Simard, 2001).

2.2. Utilisation des bactéries entomopathogènes dans la lutte contre les acridiens

C'est en 1911 que d'Hérelle décrivait l'efficacité de la bactérie *Coccobacillus acridiorum* pour lutter contre les criquets. On considère maintenant que cet organisme est simplement une forme (*var.acridiorum*) de *Aerobacter aerogenes* (Keith et Kevan, 1992).

Selon Zelazny *et al.* (1997), deux autres bactéries sont impliquées dans des maladies chez des populations naturelles et des élevages de locustes et de sautériaux. *Serratia marcesens* et *Pseudomonas aeruginosa* infectent durablement ces insectes et se répandent dans les élevages lorsque ces bactéries sont ingérées avec la nourriture.

Ils ajoutent que, parmi 393 isolats de *B. thuringiensis* données à *Locusta migratoria* et/ou à *Schistocerca gregaria*, aucune pathogénicité n'a été détectée chez ces insectes. Une nouvelle souche de *B. thuringiensis* est découverte récemment. Elle est active contre divers ravageurs. Elle possède des propriétés d'une bactérie génératrice de spores qui satisfont les conditions d'un agent microbien de lutte (Zelazny *et al.*, 1997). De même ; Song *et al.* (2005) ont comparé l'activité toxique de 600 souches de *B.t* isolées à partir du sol et d'insectes morts en Chine. Ils ont pu détecter 3 souches dotées d'une grande efficacité contre *L. migratoria manilensis*.

Le développement de *Serratia entomophila* comme agent de lutte biologique est prometteur pour combattre les larves (Zelazny *et al.*, 1997).

Duranton *et al.* (1982) notent que l'acridien infecté cesse de s'alimenter et de s'agiter. Il cherche refuge dans les buissons. Le contenu intestinal se liquéfie, devient jaune puis noir, des diarrhées surviennent et entraînent rapidement la mort de l'insecte.

Enfin ; des résultats récents trouvés par Allal- Benfkih (2006), la bactérie *B.subtilis* perturbe le métabolisme de *L. migratoria* puisque les larves traitées montrent une perte de poids. De plus, la vitellogenèse est inhibée lors de la maturation des ovocytes terminaux dans la phase pré-reproductive. Ce dernier note également que la toxine Cry1C de *B. thuringiensis* a un effet négatif sur la croissance des larves de *L. migratoria*.

2.3. Principaux caractères du genre *Bacillus*

2.3.1. Classification

Selon la classification de Bergy (2001) in Gerard *et al.* (2003), le genre *Bacillus* appartient au :

Domaine : Bacteria

Phylum : Firmicutes

Classe : Bacilli

Ordre : Bacillales

Famille : Bacillaceae

Genre : *Bacillus*

Les espèces du genre *Bacillus* sont classées selon leurs morphologies et la position de leurs spores. Cette classification divise le genre *Bacillus* en trois groupes :

- Groupe I : Bacilles à spores ne déformant pas le corps microbien.
- Groupe II : Bacilles à spores déformantes, ovales.
- Groupe III : Bacilles à spores déformantes, rondes.

A l'intérieur de ces groupes, les espèces et les variétés se distinguent par des caractères morphologiques et physiologiques (Toma, 1985).

2.3.2. Description et caractères cultureux

Le genre *Bacillus* sont des bacilles de grande taille à Gram positif mais facilement décolorables pour certaines espèces (Brossard et Terry, 1984), aérobies ou anaérobies facultatifs (Singleton, 2005).

Les cellules se présentent sous forme de bâtonnets isolés ou en chaînes, à extrémité carrés ou arrondies et de taille variable (de $0.5 \times 10 \mu\text{m}$ jusqu'à $2.5 \times 10 \mu\text{m}$), généralement mobiles par flagelle péritriche, elles sont caractérisées par l'aptitude à la sporulation comme forme de résistance lorsque les conditions deviennent défavorables (Guiraud, 1998).

Ces bactéries regroupent des espèces dont le pourcentage de cytosine (C) et guanine (G) varie entre 32 et 69% (Larpent, 1997). La majorité se développe mieux à 30°C jusqu'à 37°C (Brossard et Terry, 1984).

2.3.3. Habitat

Le genre *Bacillus* regroupe un grand nombre d'espèces très répandues dans la nature, la majorité de ces bactéries vivent sur les végétaux et dans le sol où elles persistent grâce à leurs spores (Brossard et Terry, 1984).

Guiraud, (1998), note que certains bactéries du genre *Bacillus* contaminent de nombreux produits alimentaires et sont souvent protéolytiques, et peuvent être des agents de dégradation de conserves alimentaires.

2.3.4. Molécules produites par le genre *Bacillus*

Selon Larpent et Gourgaud (1997), le genre *Bacillus* produit une gamme assez variée de molécules qui peuvent être groupées en trois classes ; les antibiotiques, les enzymes et les toxines.

- ✓ **Les antibiotiques :** Les bactéries de genre *Bacillus* produisent divers antibiotiques tels que :

-Bacitracine : inhibe la synthèse de la paroi bactérienne

-Subtiline : c'est un dérivé de peptide synthétisé sur les ribosomes de *Bacillus subtilis*, cet antibiotique rentre dans la composition de certains médicaments.

-polymixine, et gramicidine : sont des oligopeptides cycliques ou linéaires qui interfèrent avec les fonctions de la membrane de l'hôte.

- ✓ **Les enzymes :** Le genre *Bacillus* produit de nombreux enzymes, on a pris comme exemples :

α -amylase : sont des enzymes sécrétés par plusieurs espèces de *Bacillus*

β -amylase : sont utilisés pour produire des sirops de maltose employés dans les biscuiteries

Ces enzymes ressemblent au β -amylase des plantes, ils sont thermolabiles.

✓ **Toxines :** En même temps que la spore, apparaît un cristal protéique codé par un plasmide soluble en milieu alcalin. Quand une larve ingère un tel cristal, celui-ci se dissout dans la cavité digestive dont le pH est alcalin, et des protéases transforment cette protoxine en petites molécules toxiques actives.

Riba et Silvy (1989) notent que généralement chez les bactéries, la pathogénèse est intégralement induite par la toxine contenue dans le cristal endosporal.

2.4. Principaux caractères du groupe *Pseudomonas spp. fluorescents*

2.4.1. Taxonomie

La classification en genre et espèce à l'intérieur de la famille des *Pseudomonadaceae* à longtemp reposé sur des caractères phénotypiques simples d'orientation. La simplification de cette classification a été réalisée par Stanier qui a étudié principalement l'assimilation des substrats carbonés (auxanogramme) et par Palleroni qui a classé les espèces de *Pseudomonas* en 5 groupes génomiques (Denis. *et al.*, 2007).

Selon Palleroni(1984), la classification de *Pseudomonas spp. fluorescents* est comme suit :

Règne : Eubacteria

Classe : Proteobacteriaceae

Sous-classe : Proteobacteria

Ordre : Pseudomonadales

Sous-ordre : Pseudomonadineae

Famille : Pseudomonadaceae

Tribu : Pseudomonadoidea

Genre : *Pseudomonas*

Espèce : *Pseudomonas sp.*

2.4.2. Caractères morphologiques et physiologiques

Pseudomonas est un genre très important composé de bacilles à Gram négatif (Gerard *et al.*, 2003), droit ou faiblement incurvé de 0,5 à 1,0 µm de diamètre sur 1,5 à 5,0 µm de long. Ils sont aérobies et leur métabolisme respiratoire utilise l'O₂ (et parfois des nitrates) comme accepteur d'électron (Prescott *et al.*, 2003), Ils sont mobiles avec un ou plusieurs flagelles polaires (Schaechter *et al.*, 1999).

(Durand et Tourmanoff, 1967). Ces bactéries ne se développent pas à pH inférieur à 4,5, n'exigent pas de facteurs de croissance organiques, elles sont catalase et oxydase positives et chimioorganotrophes pour la plupart bien que certaines espèces soient chimiolithotrophes. (Larpen et Sanglier, 1989).

Cette bactérie sécrète un pigment jaune à fluorescence verte qui s'accumule dans le milieu de culture (Greppin et Horn, 1969). Les espèces pigmentés sont : *P. aeruginosa*, *P. putida*, *P. fluorescens* et *P. syringae* (Meyer et Abdallah, 1978).

2.4.3. Ecologie

Pseudomonas spp fluorescents sont des bactéries ubiquistes retrouvée dans la plupart des niches écologiques ; le sol, l'eau et les végétaux (Paulsen et al, 2005). Ces bactéries peuvent vivre en commensales dans le tube digestif de l'homme et de divers animaux (Eyquem, 2002).

2.4.4. Molécules produites par *Pseudomonas spp.* fluorescents

Les *Pseudomonas* fluorescents produisent un grand nombre de métabolites secondaires (Leisinger et Margraf, 1979), qui pourraient jouer un rôle dans l'effet antagoniste dans le sol. Ces agents inhibiteurs sont : les antibiotiques, les siderophores, et l'acide cyanhydrique (HCN) (Philippe *et al.*, 1993).

✓ **Les antibiotiques** : Selon Larpen et Sanglier (1989), le genre *Pseudomonas* est le groupe microbien producteur d'antibiotiques le plus important parmi les microorganismes non filamenteux et non sporogènes. La plupart des antibiotiques isolés de *Pseudomonas* sont : phenazine-1- carboxylate, qui est active *in vitro* contre *Gaeumannomyces graminis* et autres champignons des racines pathogènes (Thomashow et Weller, 1988), des dérivés phénoliques tels que le 2,4- diacétylphloroglucinol, actif contre *Thielaviopsis basicola*, le pyrrolnitrine

comme inhibiteur de la croissance de pathogène de cotonnier tels *Verticillium dahliae* (Philippe, 2003).

✓ **Siderophores** : Siderophores (en grec « transporteur de fer ») sont définis comme des molécules de faible poids moléculaire chelatrice de fer (Neilands, 1995).

Pseudomonas fluorescents secrètent des siderophores appelés pyoverdines ou pseudobactines (Lamont et Martin, 2003) comprenant une chaîne polypeptidique contenant un groupe hydroxamale lié à un chromophore fluorescent responsable de la fluorescence jaune-verte de ces souches (Phillippe, 2003).

L'activité antagoniste exercée par la pyoverdine est effectivement liée à la compétition pour le fer puisqu'elle est annulée lors de l'apport de fer (Lemanceau, 1992).

✓ **L'acide cyanhydrique (HCN)** : En collaboration avec la pyoverdine, *Pseudomonas fluorescens* produit l'acide salicylique (Meyer et Abdallah, 1978) ; une métabolite secondaire qui contribue sensiblement à la capacité de lutte biologique de cette souche (Caroline et Dieler, 2000). La contribution de cyanure à la suppression de plusieurs champignons pathogènes terricoles, a été démontrée à l'aide des mutants défectueux (Schippers, *et al.*, 1990).

Chapitre II : Matériel et méthodes

1. Matériel

1.1. Matériel biologique

1.1.1. Les criquets : L'étude est effectuée sur des larves de 5^{ème} stade de l'espèce *Locusta migratoria*. Les individus sont issus d'un élevage en masse mené au laboratoire.

1.1.2. Les bactéries entomopathogènes: Nous avons utilisé des souches autochtones, ces dernières sont isolées à partir d'un sol cultivé au Sahara Algérien (Adrar). Après purification, elles sont identifiées suivant leurs caractères physiologiques, biochimiques et génétiques.

1.2. Milieux de culture utilisés

✓ **Gélose nutritive :** La gélose nutritive est un milieu solide d'usage général utilisé pour la croissance des micro-organismes non exigeants. **Il est** essentiellement utilisé pour vérifier la pureté des souches.

✓ **Milieu de King B :** La gélose King B permet la production de fluorescéine (ou pyoverdine), pigment jaune vert fluorescent sous lumière ultra-violette, par certains *Pseudomonas*. Le milieu a été décrit par King, Ward et Raney en 1954, puis la formule a été modifiée selon les recommandations de la Pharmacopée américaine (**Annexe 1**).

2. Méthodes

2.1. Isolement, identification et caractérisation des souches bactériennes

2.1.1. Echantillonnage du sol

Des échantillons de sol ont été prélevés à partir d'un sol cultivé dans la région de Zaouiet Kounta, wilaya d'Adrar le 3 janvier 2008 (Figure 4).

Les échantillons sont prélevés au niveau de la couche rhizosphérique sur un rayon de 1 mètre autour des racines et à une profondeur de 50 cm, ils sont ensuite mis dans des sachets en papier kraft portant des indications de lieu et de date de prélèvement et transportés par voie aérienne jusqu'au laboratoire pour subir les différentes analyses.

souches de *Pseudomonas* et le milieu gélose nutritive (GN) pour les souches de *Bacillus*. L'incubation est effectuée pendant 24 à 72 heures à une température de 30°C.

2.1.4. Purification des isolats

La technique de purification consiste à ensemencer la culture bactérienne par des stries sur une gélose ordinaire ou King B selon le genre recherché, afin de disperser les bactéries à la surface du milieu de culture et d'obtenir des colonies bien isolées, après incubation de 24h à 30°C, on prend la colonie qui nous semble répondre au critères de la souche visée tels que la forme, l'aspect et la couleur et on effectue des repiquages successifs jusqu'à l'obtention d'une culture pure. La pureté est vérifiée après chaque repiquage par examen microscopique d'un frottis coloré au bleu de méthylène.

2.1.5. Conservation des isolats

Les souches purifiées sont conservées à 4°C dans des petits tubes contenant un milieu conservateur ou gélose incliné après incubation à 30°C pendant 24h.

2.1.5.1. Conservation par lyophilisation

La lyophilisation, ou la cryodessiccation est un procédé de conservation qui s'accompagne d'une transformation de la substance à conserver ; celle-ci contient au début de l'opération une concentration élevée en eau. Le procédé comporte plusieurs étapes : congélation puis passage sous un vide très poussé qui supprime l'eau (elle passe ainsi directement de l'état solide à l'état de vapeur sans passer par la forme liquide) (Kamoun, 1997 ; Marin et Rénie, 2000).

2.1.5. 2. La cryoconservation

La cryoconservation ou la cryofixation est employée pour maintenir la forme existante, la structure, et la composition chimique de tous les éléments constitutifs des spécimens. Les souches isolées et purifiées sont conservées en suspension dans un congélateur à -20°C dans des tubes contenant l'eau- glycérol.

2.1.6. Identification et caractérisation taxonomique des bactéries isolées

Les bactéries sont identifiées suivants leurs caractères morphologiques, physiologiques, biochimiques et génétiques.

2.1.6.1. Critères d'identification du genre *Bacillus*

Le tableau 1 résume quelques caractères biochimiques de certains bacilles.

Tableau 1: Caractérisation de certaines bactéries du genre *Bacillus* (Guiraud, 2003)

V : Variable C : Centrale
 + : Positive T : Terminale
 - : négative

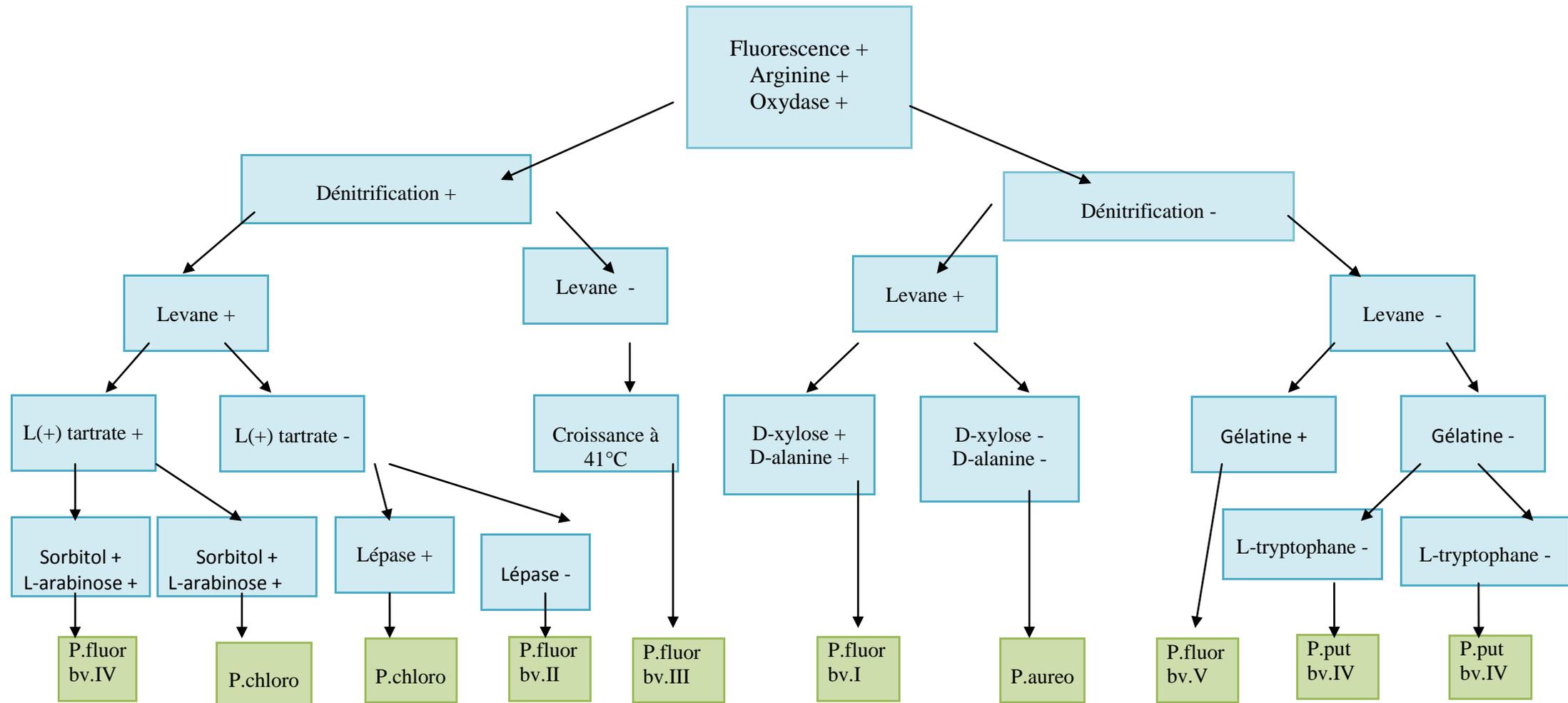
Test \ Souches	Groupe selon priest	Morphologie sporale	Position de la spore	Culture anaérobie	Acide sur glucose	Gaz sur glucose	Mobilité	Retard sur glucose	Acitoine	Indole	Citrate	Amidon	Caséine	Gélatine	Lécithine	Uréase	Nitrate	Culture à 45 °C	Culture à 55 °C	Culture à 65 °C	VP	Catalase
<i>B. avel</i>	I	2	C/T	+	+	-	V	-	+	+	-	+	+	+	V	-	-	V	-	-	+	+
<i>B. circulans</i>	I	2	C/T	V	+	-	V	-	-	-	V	+	V	V	-	V	+	+	-	-	-	+
<i>B. macerans</i>	I	2	T	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	V	-	+	+	-	-	-	+
<i>B. polymyxa</i>	I	2	C/T	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	V	-	+	V	-	-	+	+
<i>B. anthracis</i>	II	1	C	+	+	-	-	-	+	-	V	+	+	+	+	V	+	-	-	-	+	+
<i>B. cereus</i>	II	1	C	+	+	-	V	-	+	-	V	+	+	+	+	V	-	V	-	-	+	+
<i>B. fimus</i>	II	1	C	-	+	-	V	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	V	-	-	-	+
<i>B. lentus</i>	II	1	C	-	+	-	V	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+
<i>B. licheniformis</i>	II	1	C	+	+	V	+	-	+	-	V	+	+	+	-	-	V	+	+	-	+	+
<i>B. megaterium</i>	II	1	C	-	+	-	V	-	-	-	+	+	+	+	-	V	V	V	-	-	-	+
<i>B. panthothenicus</i>	II	1/2	T	+	+	-	-	-	-	-	V	+	+	+	V	-	-	+	-	-	-	+
<i>B. subtilis</i>	II	1	C	-	+	-	+	-	+	-	V	+	+	+	-	-	+	+	V	-	+	+
<i>B. thuringiensis</i>	II	1	C	+	+	-	V	-	+	-	V	+	+	+	+	V	+	+	-	-	+	+
<i>B. pasteurii</i>	IV	3	T	-	-	-	+	-	-	V	-	-	V	V	-	+	-	-	-	-	-	+
<i>B. sphaericus</i>	IV		T	-	-	-	+	-	-	-	V	-	V	V	-	V	V	V	-	-	-	+
<i>B. coagulans</i>	V	1/2	C/T	+	+	-	+	-	V	-	-	+	V	-	-	-	V	+	+	-	+	+
<i>B. stearothermophilus</i>	V	2	T	-	+	-	+	-	-	-	-	+	V	+	V	V	V	V	+	+	-	V

2.1.6.2. Critères d'identification des *Pseudomonas spp.* fluorescents

L'identification taxonomique des *Pseudomonas spp.* fluorescents a été réalisée selon la clé dichotomique proposée par Jacques (1994), représentée dans la figure 5.

Figure 5 : La clé dichotomique proposée par Jacques (1994) pour l'identification des *Pseudomonas spp.* fluorescents.

Abréviations : P. fluo : *Pseudomonas fluorescens*. P.chloro : *Pseudomonas chlororaphis*. P. aureo : *Pseudomonas aureofaciens*



2.1.6.3. Présentation des caractères généraux d'identification

2.1.6.3.1. Tests classiques d'identification

✓ Tests morphologiques

➤ Coloration simple au bleu de méthylène

La coloration simple permet de déterminer la forme et le mode de groupement des cellules ; elle s'effectue en recouvrant le frottis par quelques gouttes de colorant Bleu de méthylène .On laisse agir pendant 1 minute, puis on rince à l'eau.

L'examen est réalisé généralement à l'immersion après séchage à la flamme du bec (Guiraud, 1998).

➤ Coloration de Gram

Selon Prescott *et al.*, (2003), la coloration de Gram développée en 1884 par un médecin danois Christian Gram, c'est la méthode de coloration la plus utilisée en bactériologie. Ce procédé de coloration différentielle divise les bactéries en deux groupes : Gram positives (Gram +) qui possèdent une paroi rudimentaire, contenant une faible proportion de lipides et Gram négatives (Gram-) présentent une structure plus complexe et une forte proportion de lipides.

Cette coloration des cellules bactériennes permet à la fois de connaître la morphologie des bactéries et de les classer en deux groupes en fonction de leur capacité ou non à retenir la coloration violette de cristal violet dans les conditions opératoire (Larpen, 1997).

Elle consiste à préparer un frottis par étalement d'un fragment bactérien jeune, à froid, sur une lame de verre puis séché et fixé à la flamme. La préparation est colorée par une solution de violet de Gentiane pendant une minute. La coloration est suivie d'un lavage à l'eau puis subie deux bains de lugol pendant 45 secondes pour chaque bain. La préparation est soumise à une décoloration par l'éthanol 85° pendant 30 secondes.

Après lavage à l'eau, le frottis est à nouveau coloré par la fuschine pendant 1 minute. Après rinçage à l'eau, il est séché à la flamme.

Enfin, on passe à l'observation microscopique à (G×40). Les bactéries Gram⁺ sont colorées en violet, alors que les bactéries Gram⁻ sont décolorées, mais la fuschine les a recolorées en rose (Prevot, 1977).

➤ **Coloration de la spore**

Les spores ou endospores bactériennes sont des formes de résistance que prennent certaines espèces quand les conditions du milieu deviennent défavorables (manque de nutriments, pH et températures extrêmes).

La solution aqueuse de vert de malachite à la propriété de traverser avec facilité après chauffage la paroi de la spore et de colorer essentiellement et sélectivement ces substances propres.

Le frottis est recouvert d'un papier filtre sur lequel la solution de vert de malachite est appliquée. La coloration se fait par chauffage pendant dix minutes (sans jamais laisser évaporer complètement le colorant), à froid la coloration n'aura jamais lieu. Le rinçage se fait à l'eau de robinet après retrait du papier filtre, suivi d'une coloration à la fuschine pendant cinq minutes.

L'examen au microscope a lieu après séchage, à l'objectif à l'immersion. Les spores apparaissent colorées en vert, les corps bactériens en rose, la forme de la spore ainsi que sa position dans le corps bactérien sont bien déterminées (Guiraud, 2003).

✓ **Tests biochimiques**

➤ **Etude du type respiratoire**

Le type respiratoire est mis en évidence sur milieu " Viande Foie " (VF) ayant un gradient de concentration en oxygène dissous élevé en surface et en profondeur.

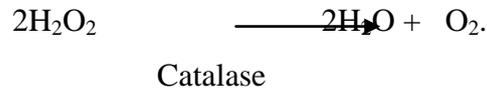
Le milieu de culture est solide : on le fait chauffer à 80°C pendant trente minutes au bain Marie, et le maintenir en surfusion à 45°C. Le milieu estensemencé à l'aide d'une pipette Pasteur plongée au fond du tube et remontée en décrivant des tours de spires très serrées. Après refroidissement et solidification, le milieu est incubé à 30°C à l'étuve pendant 24 heures, le résultat se traduit par une poussée bactérienne, présentant quatre cas :

- Une poussée en surface ➡ Aérobie strictes.
- Une poussée au fond du tube ➡ Anaérobie strictes.
- Une poussée tout le long du tube ➡ Aéro-anaérobie facultatifs.
- Une poussée à proximité de la surface ➡ Micro-aérophiles.

➤ **Test de la catalase**

La catalase est une enzyme contenant de fer, qui catalyse la décomposition de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en eau et en oxygène (Singleton, 2005).

La mise en évidence de cette enzyme consiste à mettre sur une lame propre et sèche le prélèvement bactérien en contact avec quelques gouttes d'eau oxygénée. Un dégagement gazeux abondant sous forme de mousse ou de bulle d'air traduit le test positif de la catalase (Lambin et German, 1969).



➤ **Test de nitrate réductase (NR)**

Selon Guiraud (1998), certaines bactéries peuvent assimiler les nitrates comme source d'azote, d'autres peuvent les utiliser comme accepteur final de protons et d'électrons (respiration nitratée).

La nitrate réductase peut être mise en évidence par culture sur bouillon nutritif additionné de nitrate de sodium à 1%.

Après ensemencement et incubation à 30° pendant 5 à 7 jours, les nitrites sont recherchés par l'adjonction de 3 ou 4 gouttes de réactif de Griess. La réaction est instantanée, d'après Larpent et Gourgaud (1975), une coloration rouge (NR+) montre la décomposition des nitrates en nitrites.

Dans le cas d'absence de coloration, on ajoute au milieu un peu de poudre de Zinc (catalyseur minéral de la décomposition de nitrates en nitrites).

Une coloration rouge traduit la présence de nitrates dans le milieu; qui sont réduits par le Zinc donc (NR-), la coloration jaune indique l'absence de nitrates dans le milieu qui ont été transformés par la bactérie jusqu'au stade N₂ donc (NR+).

➤ **Réaction de Voges Proskauer (VP)**

Cette réaction consiste à mettre en évidence l'acétoïne. La culture bactérienne est ensemencée sur milieu Clark et Lubs. Après 48 h d'incubation, on ajoute quelques gouttes de réactif VP1 et VP2.

Une coloration rouge (VP+) signifie la formation d'acétoïne (Guiraud, 1998).

➤ **Réaction au rouge de méthyle (RM)**

Cette réaction permet de mettre en évidence les fermentations acides, en particulier la fermentation des acides mixtes.

La culture bactérienne est ensemencée sur le milieu Clark et Lubs. Après incubation, on ajoute quelques gouttes de réactif au rouge de méthyle (RM).

Le milieu devient rouge lorsque le pH est inférieur à 5 qui se traduit par la production d'acide (RM+), dans le cas contraire : il vire au jaune (RM-) (Guiraud, 1998).

➤ **Test du citrate ou milieu de citrate de Simmons**

Le citrate est le premier composé intervenant dans le cycle de Krebs. Ce test permet de déterminer la capacité d'un microorganisme à utiliser le citrate comme seule source de carbone ; l'ensemencement se fait par stries sur une gélose inclinée de Simmons ; contenant un indicateur coloré en vert (bleu de bromothymol); l'alcalinisation de milieu se traduit par le virage au bleu de l'indicateur (Guiraud, 1998).

➤ **Test du mannitol-mobilité**

D'après Marchal *et al.* (1982), le milieu mannitol mobilité permet de rechercher simultanément la fermentation de mannitol (dégradation du D-mannose en fructose) et la mobilité des bactéries.

La mobilité des bactéries peut être recherchée par ensemencement d'un milieu de culture semi-solide en culot, le milieu utilisé est le mannitol- mobilité contenant du mannitol et un indicateur coloré par le virage de la couleur du rouge au jaune.

L'ensemencement est réalisé par piqûre au fil droit. Après incubation à 30°C pendant 24h, la mobilité du germe se traduit par l'envahissement plus ou moins grand de la totalité du milieu à partir de la piqûre. La fermentation de mannitol entraîne le virage au jaune de milieu. (Guiraud, 1998).

➤ **Etude du milieu TSI**

Le test TSI permet de mettre en évidence la fermentation de certains sucres avec ou sans production de gaz

Le milieu utilisé pour ce test est le milieu Kligler ou TSI contenant du glucose, du lactose, du saccharose, de peptone, un sel de fer et un indicateur de pH le rouge de Phénol.

La gélose est répartie en tubes à essai sous forme semi -inclinée avec un haut culot (zone anaérobie) et une petite tranche en pente (zone aérobie).

L'ensemencement s'effectue à l'aide d'une anse de platine à fil droit par piqûre profonde du culot et par stries sur la pente.

Après incubation, l'apparition de la coloration jaune (pH acide) dans le culot traduit la fermentation du glucose. La coloration jaune (pH acide) de la pente indique l'utilisation du lactose et/ou du saccharose par les bactéries après épuisement du glucose.

La fermentation de glucose peut s'accompagner de l'apparition de poches d'air qui montrent la production du gaz et la formation d'un précipité noir qui révèle la production d'H₂S (Guiraud, 1998).

➤ **Test de l'uréase**

Les micro-organismes possèdent une uréase transformant l'urée en ammoniac et en carbonate d'ammonium.

La recherche de cette enzyme s'effectue sur milieu liquide de Fergusson (urée-indole). Le milieu est ensemencé et incubé 24h à 30°C. La lecture se fait par le virage de la couleur du milieu qui est jaune orangé vers le rouge (Uréase positif).

➤ **Production d'indole**

L'indole est issu de l'hydrolyse du tryptophane par action de la tryptophanase. Après incubation, la lecture se fait après addition de quelques gouttes du réactif de Kovacs, induisant ainsi la formation d'un anneau rouge en surface.

✓ **Résistance à 41°C, 55°C et 65°C**

L'ensemencement se fait par des stries sur des milieux gélosés par une culture bactérienne jeune, âgée de 24h. L'incubation des boîtes est réalisée à 41°C, 55°C et d'autres à 65°C pendant 24 heures. Le résultat se traduit par la croissance ou non de la culture bactérienne.

❖ **Caractères sélectifs d'identification pour *Pseudomonas spp* fluorescents**

➤ **Production de pigment fluorescent**

Ce caractère est étudié sur milieu de King B (Guiraud, 1998). Une culture bactérienne âgée de 24h est ensemencée par strie sur le milieu King B en boîte. 3 à 5 jours après incubation à 30°C, la culture est examinée sous UV à une longueur d'onde 365 nm. L'observation de couleur jaune-vert indique la production de pigment fluorescent.

➤ **Test de l'oxydase**

Ce test détecte un type particulier de chaîne respiratoire qui comporte en fin de chaîne un cytochrome C et l'oxydase associée. Les bactéries qui possèdent une telle chaîne peuvent oxyder des composés chimiques comme le réactif de l'oxydase (dihydro-chlorure de tétraméthyl-p-phénylénédiamine 1%). Les électrons sont transférés de ce réactif au

cytochrome C et de là, via l'oxydase, à l'oxygène. Ainsi oxydé, le réactif développe une couleur violette intense (Singleton, 2005).

Pour effectuer ce test, on humecte un disque d'oxydase, placé dans une boîte de Pétri, par une goutte d'eau distillé stérile et on étale un fragment de la colonie bactérienne au moyen d'une anse de platine.

➤ **Test d'arginine dihydrolase**

Certaines *Pseudomonas* sont capables de vivre en anaérobiose en tirant leur énergie de l'hydrolyse de l'arginine (Larpent et Gourgaud, 1985).

L'arginine dihydrolase (ADH) est un enzyme induit par un pH acide et des conditions d'anaérobiose



La recherche de cet enzyme est effectuée sur le milieu Moeller additionné de 10g d'arginine et répartie dans des tubes à raison de 5 ml.

Le milieu estensemencé par piqure centrale et recouvert par une couche d'huile de vaseline stérile puis incubé à 30 °C et examiné quotidiennement pendant 3 jours.

Tout d'abord le milieu s'acidifié (devient jaune) suite à la métabolisation du glucose. Si la décarboxylase n'est pas synthétisée, le milieu reste jaune. Par contre la décarboxylation de l'acide aminé donne naissance à un produit alcalin, le pH s'élève donc et le milieu devient pourpre (Singleton, 2005).

➤ **Test de levane sucrase**

Levane sucrase est un exoenzyme qui catalyse la synthèse de levane par transfructosilation pendant qu'il libère le glucose (Hettwer *et al*, 1995).

Le milieu levane est coulé dans des boîtes de Pétri puisensemencé par des stries droites à l'aide d'une pipette boutonnée chargée d'une culture bactérienne jeune. Après incubation à 30°C pendant 3 jours un résultat positif se traduit par l'apparition de colonies blanches et mucoides.

➤ **Utilisation de tartrate**

L'utilisation de tartrate est déterminée sur le milieu minéral de base ARJ additionné d'une solution de tartrate à 5%. Les tubes à essais sontensemencés avec une colonie bactérienne âgée de 24h par piqure centrale, et incubés pendant 3 à 5 jours à 28°C. (Gardan et Luisetti,

1981). L'utilisation de tartrate se traduit par l'alcalinisation de milieu qui devient rouge foncée.

➤ **Hydrolyse de la gélatine**

Dans des tubes à essais contenant 5 ml de milieu gélatine, on ensemence par piqure centrale une culture bactérienne âgée de 24h puis on incube pendant 3 à 10 jours à 30°C.

Pour l'observation des résultats, il faut refroidir le témoin et le tube de la culture pendant 10 minutes à 4°C.

Si la bactérie est gélatine positive le milieu est liquéfié même après le refroidissement (Larpen, 1975).

➤ **Recherche de lipase**

L'activité lipolytique des microorganismes peut être détectée par utilisation de Tween 80 (Rhodes, 1959).

Dans des boîtes de Pétri contenant une goutte de la suspension bactérienne, on verse le milieu lipase puis on ajoute dans chaque boîte 10 gouttes de Tween 80 préalablement autoclavé.

D'après Guiraud (1998), l'activité lipasique se traduit par un halo opaque autour des colonies dû à la précipitation d'oléate de calcium.

➤ **Utilisation des hydrates de carbone**

Le milieu d'étude à base d'ARJ (Ayers, Rupp et Joeston) renferme un indicateur coloré de pH le rouge de phénol et additionné après autoclavage du sucre testé à raison de 5 % à savoir : sorbitol et arabinose.

Le milieu est ensemencé par piqure centrale puis recouvert par une couche de l'huile de vaseline stérile et incubé à 30°C pendant 3 à 5 jours. Une réponse positive se traduit par un virage de couleur du rouge au jaune.

2.1.6.3.2. Utilisation de la Galerie Api 20E

✓ **Principe**

La galerie API 20E comporte 20 microtubes contenant des substrats sous forme déshydratée.

Les tests sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les milieux. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.

Les galeries API utilisent plusieurs types de tests : étude de la fermentation de divers glucides, auxanogramme, recherche directe d'une enzyme. Chaque tubule contient un substrat différent sur lequel le micro-organisme considéré va réagir. Ils sont remplis d'une suspension

bactérienne calibrée (de densité différente selon la galerie). Pour les substrats dont le sigle est encadré, la cupule doit aussi être remplie de manière à créer un ménisque. Pour les substrats dont le sigle est souligné, la cupule doit être remplie d'huile de paraffine soit pour créer l'anaérobiose (absence d'oxygène), soit pour maintenir en solution les ions volatils produits par la réaction et ainsi assurer le virage de l'indicateur coloré de pH.

Les creux du support de la galerie doivent être remplis d'eau pour former une chambre humide, puis la galerie est posée dans le support et le couvercle par dessus. L'ensemble est incubé à une température adaptée pendant 24 à 48h.

La lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de lecture et l'identification est obtenue à l'aide du tableau d'identification (voir ci-après) (Guide de la galerie api^R 20E).

✓ **Technique**

➤ **Préparation de la galerie**

Pour la préparation de la galerie, on commence par la répartition de l'eau dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide. Après cela, on dépose stérilement la galerie dans la boîte d'incubation.

➤ **Préparation de l'inoculum**

Une suspension bactérienne d'opacité légère est préparée dans un tube d'eau distillée stérile, avec une seule colonie prélevée à partir d'une culture jeune et pure sur un milieu gélosé.

➤ **Inoculation de la galerie**

Un volume de 150 µl de la suspension bactérienne préalablement préparée est déposé soigneusement dans chaque cupule de la galerie en utilisant une micropipette.

On remplit les tubes et les cupules des tests avec la suspension bactérienne.

Après inoculation, on doit créer une anaérobiose dans les tests : ADH, LDC, ODC, URE, H₂S en remplissant leur cupule d'huile de paraffine. Après cela on referme la boîte d'incubation et on la place à 30°C pendant 18 à 24 heures.

✓ **Lecture**

Après incubation, la lecture de la galerie doit se faire en se référant au tableau de Lecture (Tableau 2).

Tableau 2 : Lecture de la galerie miniaturisée Api 20^E

Tests	Substrat	Caractère recherché	Résultats	
			Négatif	Positif
ONPG	Ortho-nitro-phenyl-galactoside	Beta-galactosidase	incolore	Jaune
ADH	Arginine	Arginine dihydrolase	Jaune	Rouge/orangé
LDC	Lysine	Lysine décarboxylase	Jaune	Orangé
ODC	Ornithine	Ornithine décarboxylase	Jaune	Rouge/orangé
CIT	Citrate de sodium	Utilisation du citrate	Vert pâle/jaune	Bleu-vert/vert
H₂S	Thiosulfate de	Production d'H ₂ S	Incolore/grisâtre	Dépôt noir/ fin liseré
URE	Urée	Uréase	Jaune	Rouge/orangé
TDA	Tryptophane	Tryptophane désaminase	TDA / Immédiat	
			jaune	Marron foncé
IND	Tryptophane	Production d'indole	IND / 2 mn, maxi	
			jaune	Anneau rouge
VP	Pyruvate de sodium	Production d'acétoïne	VP 1 + VP 2 / 10 mn	
			incolore	Rosé-rouge
GEL	Gélatine de Kohn	Gélatinase	Non diffusion	Diffusion du pigment noir
GLU	Glucose	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
MAN	Mannitol	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
INO	Inositol	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
SOR	Sorbitol	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
RHA	Rhamnose	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
SAC	Saccharose	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
MEL	Melibiose	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
AMY	Amygdaline	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
ARA	Arabinose	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
Ox	Sur papier filtre	Cytochrome-oxydase	Ox / 5-10 mn	
			incolore	Anneau violet
NO₃-NO₂	Tube GLU	Production de NO ₂	NIT 1 + NIT 2 / 2-3 mn	
		Réduction au stade N ₂	Jaune	Rouge
			Zn	
			Rouge	Jaune
MOB	Microscope	Mobilité	Immobile	Mobile
MAC	Milieu de	Culture sur	Absence	Présence
OF	Glucose	Fermentation : sous huile	Vert	Jaune
		Oxydation : à l'air	Vert	Jaune
CAT		Possession d'une catalase	H₂O₂ / 1-2 mn (Bulles)	

2.1.7. Identification moléculaire

2.1.7.1. Extraction de l'ADN, PCR et séquençage de l'ARN 16S

Cette partie a été réalisée uniquement pour deux souches Strain-B1 et Strain-B2 potentiellement intéressantes pour notre étude. Elle a été faite dans le laboratoire Beckman Cloutier genomics en France.

L'extraction de l'ADN a été réalisée selon la méthode décrite par Ausubel *et al.*(1988). L'ADN extrait subit une électrophorèse sur gel d'agarose à 1% durant 30 mn sous un courant électrique de 100V. L'ADN a été par la suite récupéré à partir du gel d'agarose et purifié en utilisant le kit de gel d'extraction Jetsorb (Genomic DNA purification system-PROM, EGA). L'ADN purifié est amplifié par une PCR Hot Start (94°C) en utilisant des amorces spécifiques d'eubactéries 16S rDNA primers (forward primer 5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3' (*Escherichia coli* positions 8–27) et reverse primer 5'ACGGCTACCTTGTACGACTT3' (*E. coli* positions 1494–1513) (Weisburg *et al.*,1991). Chaque 50 µl de volume réactionnel est composé de 2µl de tampon PCR, chacune des amorces est à une concentration de 0.5 µM, 1.5 mM MgCl₂ ainsi que chaque desoxynucleoside triphosphate qui est à une concentration de 50 µM, ainsi que 1-µl de Taq polymerase.

Les échantillons analysés sont déposés dans les puits des plaques PCR de 50 µl, installés dans un thermocycler de type Mastercycler Personal (Eppendorf, Germany). Le programme suivant a été utilisé : 95°C durant 1 mn, suivie de 40 cycles de dénaturation (1 min à 95 °C), hybridation (1 min à 55 °C) et polymérisation (2 min à 72 °C) pendant 5 min.

Les produits d'amplification sont purifiés en utilisant le Kit GFXTM PCR DNA et le Gel Band Purification kit (Amersham Biosciences) ensuite clonés dans un vecteur en se basant sur les instructions de manufacturer's instruction (InsT/AcloneTM PCR Product Cloning Kit, MBI Fermentas). Les clones transformés sont sélectionnés sur milieu LB contenant de l'ampicilline (100 µg /ml) et le X-gal (80 µg/ml).

La première étape de l'analyse phylogénétique consiste à aligner la séquence à comparer. Pour cela, nous avons utilisé la méthode du Neighbor-Joining (NJ) disponible dans le package Geneious Pro 4.8.5, dans laquelle une matrice initiale est construite en groupant deux à deux les espèces les plus proches avec la banque de gènes EMBL (Saitou et Nei, 1987). Cette matrice de distances servira de base à la construction de l'arbre phylogénétique. Les matrices de distance évolutionnaire ont été calculées avec l'algorithme tamura-nei pour la méthode Neighbor-Joining, ainsi que les branches de l'arbre ont été transformées par la méthode cladogram disponible comme option dans l'outil Geneious. Une analyse Bootstrap (100

réplications) a été exécutée pour évaluer la stabilité de l'arbre phylogénétique produit par la méthode Neighbor-Joining toujours dans le package Geneious.

2.1.7. 2. Analyse phylogénétique des séquences et alignement

Cette partie a été réalisée au laboratoire de bioinformatique de l'université Mhamed Bougara de Boumerdes.

Les séquences des gènes des ARNr 16S obtenues après séquençage ont été soumises à une recherche de similarité de séquences déposées dans la banque de donnée Genbank (sur le site de NCBI National Centre for Biotechnology Information) en utilisant le programme BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

L'alignement multiple de séquences est réalisé grâce au logiciel CLUSTAL W 1.8 (Thompson *et al.*, 1994). L'homologie des séquences a aussi été évaluée et l'arbre phylogénétique a été tracé par la méthode de Neighbor-Joining (Saitou & Nei, 1987) du logiciel MEGA 5 (Tamura, *et al.*, 2011). Les niveaux de confiance de la topologie de l'arbre phylogénétique obtenu, ont été estimés par la méthode des analyses de rééchantillonnage des données (bootstrap) avec 1000 répliques.

2.2. Préparation des suspensions bactériennes et application des traitements biologiques.

Afin de mettre en évidence leur pouvoir entomopathogène vis-à-vis du criquet migrateur ; 4 bactéries ont été choisies pour les traitements biologiques; *Bacillus sp.*(HE799656), *Bacillus sp.*(HE805963), *Bacillus sphaericus* et *Pseudomonas fluorescens* bvIII.

2.2.1. Préparations des solutions mères

Pour la préparation de la solution mère des bactéries ; on procède à un ensemencement sur gélose nutritive, après incubation à 30°C pendant 24 heures, la solution mère est préparée en prélevant quelques colonies et les inoculant dans un tube contenant 5 ml de bouillon nutritif.

2.2.2. Préparation des dilutions

Des dilutions successives sont ensuite préparées, en prélevant 1 ml de la suspension mère et en l'introduisant dans un tube contenant 9 ml d'eau physiologique et ainsi de suite jusqu'à la dilution 10^{-5}

2.2.3. Méthode de détermination des concentrations bactériennes

Pour déterminer la concentration des dilutions bactériennes utilisées dans nos traitements biologiques, on a suivie la méthode de la turbidimétrie.

La turbidimétrie est une méthode comparative simple, elle consiste à comparer la turbidité de la suspension bactérienne avec celle d'une gamme d'étalon d'albumine.

La turbidité de la suspension bactérienne consiste à mesurer la densité optique (DO) des dilutions à la même longueur d'onde (620 nm). On remplit la cuve spectrale par la suspension bactérienne puis on la place dans l'appareil, lorsque le faisceau lumineux traverse la solution, la densité optique est obtenue. Puis on déduit la concentration des dilutions utilisées à l'aide de la courbe d'étalonnage de BSA (Guiraud, 2003).

✓ Préparation de la gamme d'étalonnage

À partir de la poudre de BSA, on prépare des solutions à volume identique (5 ml) qui contiennent des quantités croissantes et connues de la protéine de référence (1 mg, 2 mg, 3 mg, 4 mg, 5 mg). Par la suite, on mesure la densité optique (DO) des solutions à l'aide d'une spectrophotométrie à une longueur d'onde 620 nm.

Les résultats sont présentés dans le tableau 3 et illustrés sur la figure 6

Tableau 3 : La gamme d'étalonnage de BSA pour le calcul des concentrations bactériennes

Concentration (mg/ml)	0,2	0,4	0,6	0,8	1
DO (620nm)	0,05	0,06	0,09	0,15	0,20

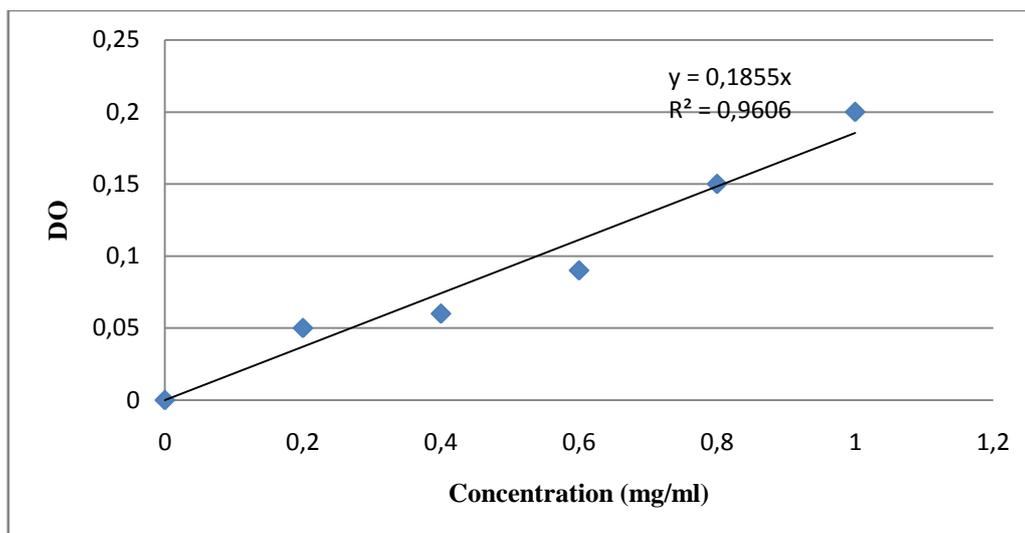


Figure 6 : Courbe d'étalonnage de BSA pour le calcul des concentrations bactériennes.

Les concentrations bactériennes en mg/ml sont présentées sur les tableaux suivants :

Tableau 4 : Densités optiques (DO) et concentrations des dilutions décimales de *Bacillus sp.*(HE799656)

Dilution	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
DO (620 nm)	0,296	0,110	0,085	0,062	0,018
Concentration (mg/ml)	1,60	0,59	0,458	0,33	0,097

Tableau 5 : Densités optiques (DO) et concentrations des dilutions décimales de *Bacillus sp.*(HE805963)

Dilution	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
DO (620 nm)	0,310	0,115	0,081	0,065	0,019
Concentration (mg/ml)	1,67	0,62	0,44	0,35	0,10

Tableau 6 : Densités optiques (DO) et concentrations des dilutions décimales de *B. sphaericus*

Dilution	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
DO 620 nm	0,32	0,14	0,092	0,052	0,014
Concentration (mg/ml)	1,72	0,75	0,49	0,28	0,075

Tableau 7 : Densités optiques (DO) et concentrations des dilutions décimales de *P. fluorescens* bvIII

Dilution	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
DO à 620 nm	0,316	0,12	0,079	0,058	0,016
Concentration (mg/ml)	1,7	0,65	0,43	0,31	0,09

2.2.4. Modes d'application des différents traitements biologiques

2.2.4.1. Par ingestion

Pour l'application des traitements biologiques, les larves du 5^{ème} stade de *Locusta migratoria* âgées de 48h sont traitées par voie buccale à l'aide d'une micropipette en

prelevant 20 µl de la suspension bactérienne et en l'introduisant directement dans l'appareil buccal de la larve. Les témoins reçoivent le même volume d'eau physiologique stérile.

2.2.4.2. Par injection

L'application des traitements biologiques a eu lieu sur des L5 âgées de 48 heures après un jeûne de 12 heures. En effet, les individus ont reçu par injection, 20 µl de la suspension bactérienne sous la patte métathoracique. Les témoins ont reçu le même volume d'eau physiologique stérile.

2.3. Etude de l'effet des bactéries sur les larves L5 de *L. migratoria*

2.3.1. Evaluation de la toxicité des bactéries sur les larves L5 de *L. migratoria*

Le traitement des larves L5 de *L. migratoria* a été administré par ingestion. Les larves sont traitées par 4 souches en utilisant 3 concentrations pour chacune ; *Bacillus sp.*(HE799656) (1,60 mg/ml ; 0,59 mg/ml et 0,33 mg/ml), *Bacillus sp.*(HE805963) (1,67 mg/ml ; 0,62 mg/ml et 0,35 mg/ml.), *Bacillus sphaericus* (1,72 mg/ml ; 0,75 mg/ml et 0,28 mg/ml) et *Pseudomonas fluorescens* bvIII (1,7 mg/ml ; 0,65 mg/ml et 0,31 mg/ml) à raison de 30 individus par concentration répartis en 3 lots contenant chacun 10 individus; Les témoins ont reçus de l'eau physiologique. On signale que les concentrations utilisées correspondent aux dilutions 10^{-1} , 10^{-2} , et 10^{-4}

Afin d'évaluer l'effet des bactéries sur les larves de *L. migratoria*, nous avons procédé au calcul journalier du nombre de mortalité au niveau des lots traités et témoins.

2.3.1.1. Calcul des pourcentages de mortalités

Le pourcentage de mortalité observée chez les larves L5 témoins et traitées par les bactéries est calculé à l'aide de la formule suivante :

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

2.3.1.2. Calcul des TL₅₀

Avant de calculer les TL₅₀, le pourcentage de mortalité observée est corrigé par rapport au témoin selon la formule d'ABBOT (1925).

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

M1 : Pourcentage de mortalité chez les témoins.

M2 : Pourcentage de mortalité chez les traitées.

MC% : Pourcentage de mortalité corrigée.

Pour calculer les TL₅₀ (temps létal pour 50% des individus) pour chaque concentration D1 ; D2 et D3, on a transformé le temps en logarithmes décimaux et les valeurs de mortalité corrigée en probits en se servant de la table des probits (Annexe 2).

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

$$Y = ax + b$$

Y : Probit de mortalité corrigée.

X : Logarithme décimal du temps.

a : La pente.

Le TL₅₀ sera égale à anti-Log₁₀, avec **x**= **Log₁₀** de temps correspondant au probit 5 sur le graphe, ou bien à partir des équations en remplaçant **Y** par le probit de 50 qui égale à 5.

2.3.1.3. Calcul des CL₅₀

Pour calculer les CL₅₀ (concentration nécessaire pour tuer la moitié d'une population) pour chaque bactérie, on a transformé les concentrations utilisées (D1; D2 et D3), en logarithmes décimaux et les valeurs de pourcentages de mortalité en probits en se servant de la table des probits. Ceci nous permet d'obtenir des équations de droites de régression de type :

$$Y = ax + b$$

Y : Probit de mortalité corrigée

X : Logarithme décimal de la concentration

A : La pente

A partir de ces équations, on a pu déterminer les CL₅₀.

2.3.2. Effet des bactéries sur le développement larvaire

Les larves sont traitées par les souches; *Bacillus sp.*(HE799656) (1,60 mg/ml ; 0,59 mg/ml et 0,33 mg/ml), *Bacillus sp.*(HE805963) (1,67 mg/ml ; 0,62 mg/ml et 0,35 mg/ml.), *Bacillus sphaericus* (1,72 mg/ml ; 0,75 mg/ml et 0,28 mg/ml) et *Pseudomonas fluorescens* bvIII (1,7 mg/ml, 0,65 mg/ml et 0,31 mg/ml) à raison de 30 individus par concentration répartis en 3 lots contenant chacun 10 individus; Les témoins ont reçus de l'eau physiologique. Le traitement des larves a été administré par ingestion.

2.3.3. Effet des bactéries sur la composition hemolymphatique

Les larves sont traitées par les souches *Bacillus sp.*(HE799656) (1,60 mg/ml ; 0,59 mg/ml et 0,33 mg/ml), *Bacillus sp.*(HE805963) (1,67 mg/ml ; 0,62 mg/ml et 0,35 mg/ml.), *Bacillus sphaericus* (1,72 mg/ml ; 0,75 mg/ml et 0,28 mg/ml) et *Pseudomonas fluorescens* bvIII (1,7 mg/ml, 0,65 mg/ml et 0,31 mg/ml) à raison de 5 individus par concentration; Les témoins ont reçus de l'eau physiologique. Le traitement des larves L5 de *L. migratoria* a eu lieu par injection. Les individus traités par la forte concentration sont tous morts avant d'effectuer les prélèvements de l'hémolymph.

2.3.3.1. Prélèvement de l' hémolymph

Le prélèvement de l'hémolymph a eu lieu 72h après l'application de traitement à proximité de bec Bunsen pour éviter la coagulation de l'hémolymph ; En effet un volume de 15µl est prélevé par une pipette Pasteur suite à une blessure provoquée après une légère piqure appliquée sous le pronotum de l'insecte, 5 µl utilisé pour le dosage des protéines, 5 µl pour le dosage des glucides et 5 µl pour l'électrophorèse. L'hémolymph prélevée est conservée dans des tubes Eppendorff à -20°C jusqu'à son utilisation (figure 7).



Figure 7 : Prélèvement de l' hémolymph

2.3.3.2. Dosage quantitatif des protéines

✓ Principe de la méthode de Bradford

Le dosage des protéines est effectué selon la méthode de Bradford (1976), dont le principe est basé sur l'utilisation d'un colorant, le bleu de Coomassie brillant G-250, qui forme un complexe coloré, présentant un maximum d'absorption à 595 nm. La fixation de ce colorant aux protéines s'effectue très rapidement et le complexe protéine-colorant reste stable pendant une heure environ. Il faut souligner que la réaction n'est linéaire que dans une certaine gamme de concentration (Bertrand, 2007)

✓ Technique de dosage

a) préparation de réactif de Bradford (BBC)

On dissout 10 mg de bleue de Coomassie G-250 dans 5 ml d'éthanol à 95° et on le laisse agiter pendant 2h. Après agitation, on ajoute 10 ml d'acide orthophosphorique à 85% et on complète à 100 ml avec de l'eau distillé. On note que la préparation de ce réactif doit être effectué dans un flacon enveloppé avec du papier aluminium pour éviter sa détérioration suite à son contacte avec la lumière.

b)- Gamme étalon

Pour la préparation de la solution mère de sérum albumine bovine (BSA) de 1g/l, on dissout un gramme de BSA dans un litre d'eau distillée et c'est à partir de cette solution mère que des dilutions à volume identique (100 ml) mais qui contiennent des concentrations croissantes et connues sont préparées afin de réaliser la courbe de référence (annexe 3).

Tableau 8: La gamme étalonnage de BSA pour le dosage de protéines

BSA(µl)	0	20	40	60	80	100
Eau distillée (µl)	100	80	60	40	20	0
BBC(ml)	4	4	4	4	4	4

.c)- l'échantillon à doser :

Nos échantillons sont congelés, dès leur sortie du congélateur, on les places dans des récipients contenant de l'eau fraîche afin de les décongélés puis, dans une autre série de tube, un volume de 5 µl de l'hémolymphe est versé, puis on complète le volume à 100 µl par addition de 95 µl de l'eau distillé.

Par la suite, un volume de 4 ml de réactif de Bradford (BBC) est ajouté dans les deux séries de tubes qui seront après mélangées au vortex et incubées pendant 10 minutes à l'obscurité.

On procède à la mesure de l'absorbance à 595 nm et en fin on trace la courbe d'étalonnage DO F [BSA] et on déduit la concentration des protéines de chaque échantillon à partir de l'équation de la courbe d'étalonnage (Figure 8)

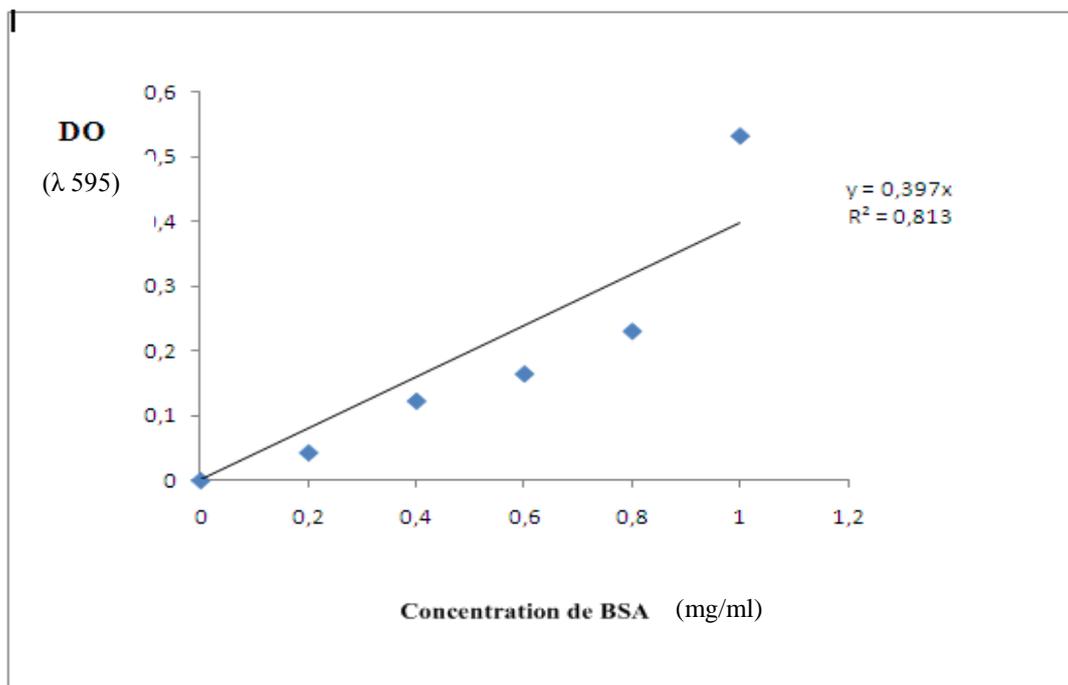


Figure 8 : Courbe d'étalonnage exprimant les absorbances à 595 nm en fonction des concentrations de BSA en mg/ml

2.3.3.3. Dosage qualitatif des protéines

✓ Etude électrophorétique

L'analyse électrophorétique des protéines de l'hémolymphe a été réalisée sur gel de polyacrylamide de SDS-PAGE (Sodium Dodécyl Sulfate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis).

a) Principe

La technique d'électrophorèse en conditions dénaturantes est utilisée pour déterminer le nombre de sous unités polypeptidiques.

L'agent utilisé est le dodécyl sulfate de sodium (SDS), détergent anionique qui dénature les protéines et en sépare les chaînes polypeptidiques. Le SDS se fixe sur la protéine, il leur

confère une forte charge négative ; l'effet de charge est alors supprimé et les chaînes polypeptidiques migrent et se séparent uniquement selon leur poids moléculaire ((Weber et Osborn, 1969 in Fediere, 1982).

b) Préparation des solutions : Voir annexe 4 et 5.

c) L'écoulement des gels et préparation des puits

Après la préparation des gels et les différentes solutions nécessaires à l'électrophorèse, on passe à l'écoulement des gels, qui s'effectue entre deux plaques en verre.

Le gel de séparation est coulé en premier entre les deux plaques à l'aide d'une seringue. Après la polymérisation de ce gel, le gel de concentration est coulé au-dessus du premier gel.

Après l'écoulement du gel de concentration, un peigne est immédiatement introduit entre les deux plaques afin de créer les puits dans lesquels seront placés les différents échantillons.

d) Préparation des échantillons

Dès leur sortie du congélateur, 5 µl de l'échantillon (hémolymphe) sont mélangés à 5 µl de tampon de dénaturation. Le mélange est porté à 100°C dans un bain-marie pendant 10 minutes.

e) Dépôt des échantillons protéiques et migration

Après avoir retiré le peigne, les marqueurs de poids moléculaires (PM) sont déposés dans le premier puits et les autres réparations sont déposées dans le reste des puits avec un volume de 10 µl à l'aide d'une micropipette.

Les deux plaques sont placées dans la cuve d'électrophorèse qui est remplie avec le tampon de migration puis reliée au générateur électrique.

La migration des fractions protéiques est réalisée sous une tension constante de 90 Volts pour le gel de concentration et de 120 Volts pour le gel de séparation.

La migration est arrêtée lorsque le front de migration atteint l'extrémité inférieure des deux plaques.

f) Coloration des bandes protéiques

Après migration, les gels sont retirés et plongés dans la solution de coloration au bleu de Coomassie pendant 24h sous agitation.

La révélation des bandes se fait par une série de bains dans une solution de décoloration.

2.3.3.4. Dosage des glucides

Le dosage des glucides a pour but de mesurer la teneur en glucides de l'hémolymphe des larves L5 de *L. migratoria* témoins et traitées aux bactéries entomopathogènes.

✓ Principe

La méthode colorimétrique de dosage des glucides par l'antrone repose sur le principe suivant : dissoute en milieu sulfurique concentré, l'antrone apparaît de couleur jaune claire et donne avec les solutions de glucides selon leur concentration une gamme assez lumineuse allant de vert au bleu-vert (Bachelier et Gavinelli, 1966).

✓ Technique de dosage

a)- préparation des solutions

Pour cela il faut dissoudre 0.15g d'antrone dans 75 ml d'acide sulfurique, puis ajouter 25 ml de l'eau distillé et en suite préparer une solution mère de glucose (1g/l) comme standard.

b)- Gamme d'étalonnage

- Calculer les volumes à prélever de la solution mère de glucose et d'eau distillée pour faire une gamme étalon de 0, 20, 40, 60, 80, et 100 µl de glucose.

Tableau 9 : La gamme d'étalonnage de glucose pour le dosage des glucides

Glucose (µl)	0	20	40	60	80	100
Eau distillée (µl)	100	80	60	40	20	0
Antrone (ml)	4	4	4	4	4	4

c)- Echantillon à doser :

- Dans une autre série de tubes : on verse 5 µl de l'hémolymphe et on complète par 95 µl d'eau distillé.
- On ajoute 4 ml d'antrone dans les deux séries de tubes.
- Agiter au vortex.
- Incuber 10 minutes au bain marie à 80°C.
- Mesurer l'absorbance à 625 nm.

Etablir la courbe d'étalonnage DO f [glucose] et déduire la concentration des glucides de chaque échantillon à partir de l'équation de la courbe d'étalonnage (figure 9).

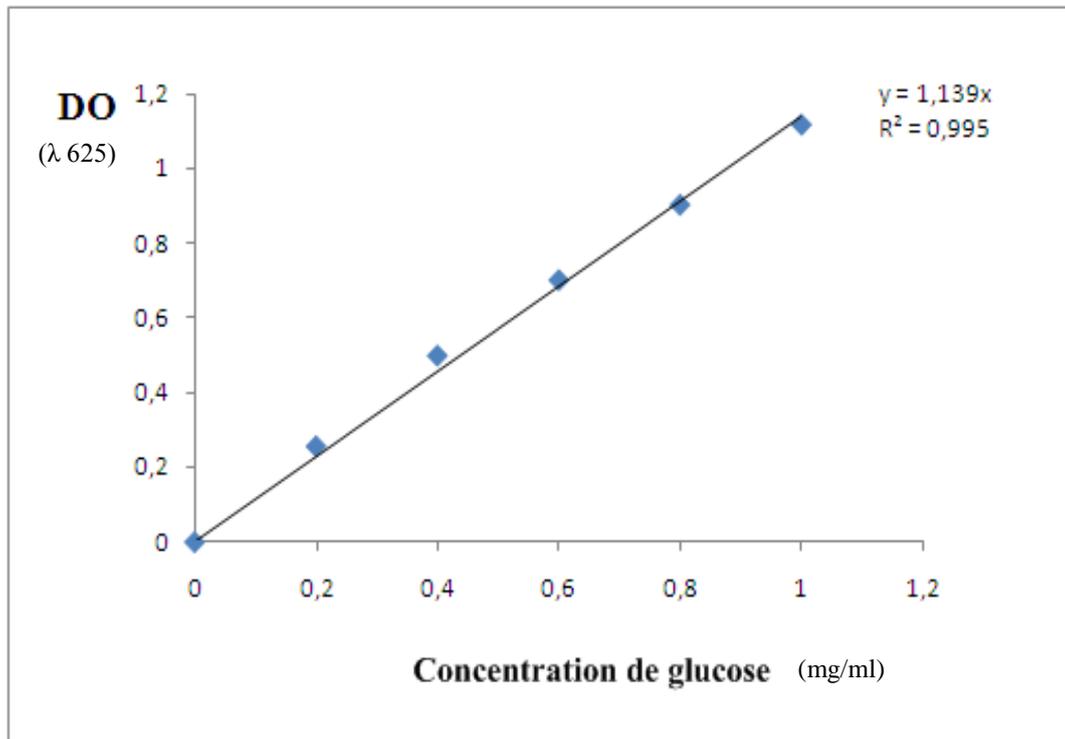


Figure 9 : Courbe d'étalonnage exprimant les absorbances à 625 nm en fonction des concentrations de glucose en mg/ml

2.3.4. Effet des bactéries sur l'histologie de l'appareil digestif

Pour l'application des traitements biologiques, les larves du 5^{ème} stade de *Locusta migratoria* ont reçu par ingestion un volume de 20 μ l de chaque bactérie ; *Bacillus sp.*(HE799656) (1,60 mg/ml), *Bacillus sp.*(HE805963) (1,67 mg/ml), *Bacillus sphaericus* (1,72 mg/ml) et *Pseudomonas fluorescens* bvIII (1,7 mg/ml). Les témoins sont traités par de l'eau physiologique. Le nombre d'individus utilisés est de 5 par traitement.

Après cela, nous avons réalisé les coupes histologiques qui comportent plusieurs opérations. La méthode la plus utilisée est celle de l'inclusion sur paraffine qui donne des coupes très fines et observables au microscope photonique.

- **Technique histologique**

Selon Martoja et Martoja-Pierson (1967) et Bensalem-Bendjelloul (1998), cette technique passe par 7 étapes :

a) Prélèvement des pièces

La dissection des criquets se fait 72h après le traitement. Ils sont anesthésiés par l'éther, fixés par des épingles sur leur face dorsale, puis disséqués de la tête jusqu'à l'extrémité abdominale. Le tube digestif est prélevé par la suite et placé dans une boîte de Pétri rempli d'eau durant quelques secondes (Figure 10).

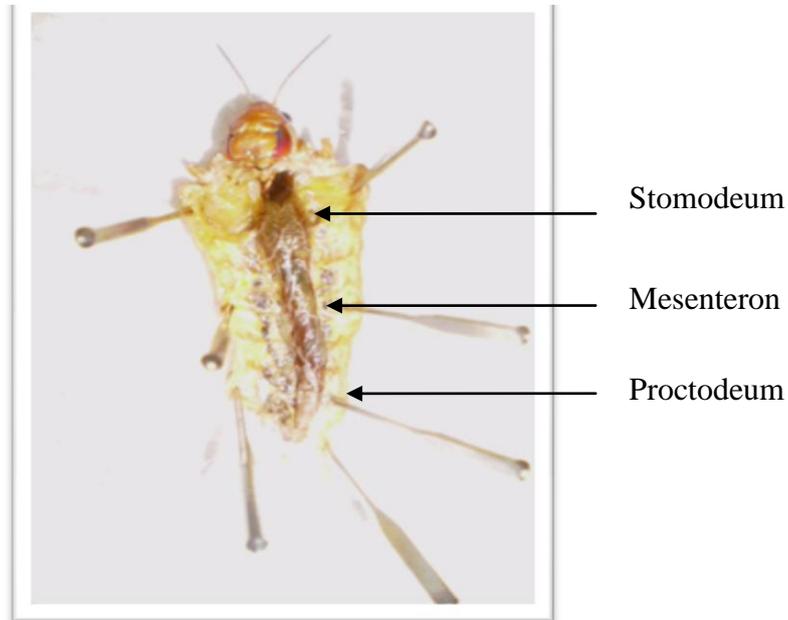


Figure 10 : prélèvement du tube digestif

b) Fixation des pièces

Cette étape consiste à mettre le tube digestif prélevé dans un liquide fixateur préparé auparavant (Annexe 6), qui est le Bouin de Hollande durant une période allant de cinq à huit jours, ayant pour rôle de durcir convenablement l'organe et d'immobiliser ses structures.

c) Lavage, déshydratation et imprégnation à la paraffine

✓ Lavage

Avant de passer à l'étape de déshydratation, il faut passer par l'étape de lavage qui consiste à laver les tubes digestifs à l'eau courante pendant au moins 12h afin d'éliminer tout l'excès du liquide fixateur.

✓ Déshydratation

Puisque la paraffine n'est pas miscible à l'eau, il faut tout d'abord extraire l'eau des tissus en effectuant des passages successifs des tubes digestifs dans des bains d'alcool d'ordre croissant comme suit :

- Deux bains d'alcool 70° pendant 30 minutes chacun, afin d'inhiber l'action du liquide fixateur.
- Deux bains d'alcool 95° pendant 30 minutes chacun.
- Deux bains d'alcool 98° pendant 30 minutes chacun.
- Deux bains de toluène pendant 15 minutes chacun.

✓ **Imprégnation à la paraffine**

Cette étape se déroule essentiellement dans l'étuve à une température entre 58°C et 60°C.

L'imprégnation se fait dans trois bains successifs d'une heure pour chacun, soit :

- Un premier bain fait de mélange homogène moitié paraffine, moitié butanol durant une heure.
- Un deuxième et troisième bain fait de paraffine pure filtrée, une heure pour chaque bain.

d) Inclusion dans la paraffine et réalisation des blocs

La confection des blocs est réalisée dans un moule constitué de deux barres de Leuckart correctement agencées sur une plaque de verre. L'organe est introduit et orienté délicatement dans la paraffine déjà coulée. Une étiquette est installée dans la paraffine en voie de solidification pour la référence et l'orientation.

e) Microtomisation et étalement des coupes

Le bloc obtenu est taillé au scalpel afin d'éliminer l'excès de paraffine environnant l'organe. Le bloc est taillé d'une façon à obtenir une forme d'un trapèze ou d'un rectangle pour l'obtention de parfaites coupes.

Un ruban des coupes de 5µm est obtenu à l'aide d'un microtome. Les portions de ruban des coupes sont étalées sur des lames contenant de l'eau gélatinée préalablement préparée. Les lames sont par la suite mises sur une plaque chauffante afin d'étaler les coupes. Les lames sont séchées avant d'être colorées.

f) Coloration des coupes

✓ **Déparaffinage et réhydratation**

Avant la coloration, les coupes doivent être débarrassées de la paraffine qui les couvre et réhydratées. Les lames sont donc mises sur une plaque chauffante puis elles sont plongées dans des bains d'alcool à des degrés décroissants pendant quelques secondes :

- Un bain de toluène.
- Un bain d'alcool 98°.

- Un bain d'alcool 95°.
- Un bain d'alcool 70°.
- Un bain à l'eau distillée.
- ✓ **Coloration**

La coloration est destinée à rendre visible et distinguable la structure cellulaire et ses différents constituants. L'existence de constituants qui retiennent certains colorants plus que d'autres fait que deux colorants sont utilisés pour l'étude histologique, la coloration de Mallory est constituée de :

- Une solution de fuschine acide (pendant 3 minutes).
- Une solution de Mallory (pendant 5 minutes).
- ✓ **Déshydratation**

Après rinçage à l'eau distillée, les coupes sont déshydratées successivement dans différents bains d'alcool de concentrations croissantes pendant quelques secondes :

- Un bain d'alcool 70°.
- Un bain d'alcool 95°.
- Un bain d'alcool 98°.
- Un bain de toluène.

g) Montage des coupes

Le montage des coupes est réalisé entre lame et lamelle avec une résine collante appelée Baume de Canada. L'observation microscopique permet de reconnaître toutes les parties de l'organe étudié.

2.4. Etude de l'effet des bactéries sur les souris blanches de laboratoire

La souris commune a été et continue à être beaucoup utilisée comme organisme modèle en biologie, que ce soit en génétique, en embryologie, en pharmacologie ou en toxicologie. Elle a en effet plusieurs avantages tel qu'un cycle de vie court, un élevage facile à faible coût, une faible taille, le fait que cela soit un mammifère avec un génome proche de celui de l'homme (Leblanc et Samson, 2006).

2.4.1. Conditions d'élevage

L'élevage est réalisé dans des conditions de température, d'humidité et d'éclairage naturel. Les animaux sont abrités dans des cages en plastique de 30×20×15 cm, avec un couvercle grillagé. Chaque cage est munie d'un biberon rempli de l'eau potable et un espace

réservé à la nourriture. La nourriture granulée est composée de maïs, son, soja et de complexe minéral vitaminé (CMV).

Les cages contiennent une couche de sciure déposée au fond des cages et renouvelée tout les deux jours (figure 11).



Figure 11 : Elevage des souris blanches

2.4.2. Reproduction

Le mode de reproduction chez les souris est la polygamie. Un mâle est mis avec 4 à 6 femelles. Les femelles gestantes sont ensuite isolées dans des cages à part tout en assurant leurs besoins en eau et en aliment. Les nouveaux nés restent avec leurs mères dans la même cage jusqu'à l'âge de sevrage qui varie entre 21 et 28 jours où ils commencent à se nourrir seuls. A ce moment, les petites souris sont prélevées pour être traitées.

2.4.3. Répartition des lots

Pour réaliser le traitement, les individus sont répartis en 4 lots, chacun est constitué de 3 cages (3 répétitions par lot) contenant 18 souris à raison de 6 individus par cage.

Nous avons utilisé alors 3 concentrations pour chaque bactérie et chacune est répétée 3 fois avec un lot témoins qui est répété 3 fois aussi.

Les bactéries testées sont; *Bacillus sp.*(HE799656) (1,60 mg/ml, 0,59 mg/ml et 0,33 mg/ml), *Bacillus sp.*(HE805963) (1,67 mg/ml, 0,62 mg/ml et 0,35 mg/ml.), *Bacillus sphaericus* (1,72 mg/ml, 0,75 mg/ml et 0,28 mg/ml) et *Pseudomonas fluorescens* bvIII (1,7 mg/ml, 0,65 mg/ml et 0,31 mg/ml). Les témoins sont traités par l'eau physiologique.

2.4.4. Technique de traitement

Avant d'appliquer le traitement, les souris sont mises à jeûner pendant 24h puis sont pesées.

L'administration des doses se fait par gavage à l'aide d'une micropipette à raison de 20 μ l par individu (figure 12).

En outre, pour l'étude de l'effet inflammatoire des bactéries, l'administration des suspensions bactériennes se fait par injection.



a) par gavage



b) par Injection

Figure 12 : Traitement des souris.

2.4.5. Paramètres étudiés

Après traitement, le suivie des individus dure 15 jours et les paramètres étudiés sont :

- ✓ **Le taux de mortalité journalière** : Le nombre de souris mortes est noté quotidiennement
- ✓ **L'évolution pondérale** : Les souris sont pesées quotidiennement durant toute la période de l'étude. En parallèle tout changement de comportement, morphologique et physiologique des souris est noté, durant et après les 15 jours.
- ✓ **L'effet inflammatoire sur les souris blanches** : Pour évaluer l'activité inflammatoire, on a appliqué le test de Levy cité par Halouane (2007). Le traitement biologique des individus se fait par l'injection d'un volume de 20 μ l de la suspension bactérienne au niveau intramusculaire de la patte arrière gauche (nous avons utilisé pour ce paramètre uniquement la forte concentration).

24 heures après, les animaux sont sacrifiés par décapitation, les pattes postérieures sont coupées à hauteur de l'articulation et pesées sur une balance.

L'augmentation du poids de la patte gauche traitée par rapport à la patte droite correspond à l'intensité de l'inflammation ou œdème.

2.5. Etude de la persistance des bactéries sur le feuillage du blé tendre d'hiver et dans le sol.

La persistance des microorganismes entomopathogènes dans l'environnement est importante tant du point de vue écologique que commercial.

2.5.1. La culture de blé

Dans des pots de même volume (10 Kg) plein de sol sec, on sème les grains de blé selon une technique qui consiste à prendre une quantité de graines correspondante à la surface linéaire de pot 75g/m soit 10g par pot et les déposer à la surface d'une façon à former des cercles de la périphérie vers le centre du pot en laissant entre chaque deux grains un espace de 2 cm. Après et à l'aide d'un objet gradué et fin on réalise une pression sur les grains afin de les approfondir jusqu'à 1 cm.

Par la suite, les pots sont déposés dans un endroit exposé au soleil et irrigués suffisamment chaque deux jours.

Le lever de la plante est marqué après 15 jours et le stade de 3 feuilles est atteint vers le 21^{ème} jour. A ce stade on ajoute l'urée azotée aux pots à raison de 3g /pot afin de couvrir la carence du sol en azote « N ». Le traitement par l'urée azotée est réalisé deux fois avec un intervalle de 15 jours entre le 1^{er} et le 2^{ème} apport (Barbottin, 2004).

2.5.2. Etude de la persistance sur le feuillage du blé tendre d'hiver

Dans le but d'étudier la persistance de 2 bactéries *Bacillus sp.*(HE799656) (1,6 mg/ml) et *Pseudomonas fluorescens* bvIII (1,7 mg /ml) sur le couvert végétal (le feuillage) du blé tendre d'hiver on a suivie différentes étapes (Fargues *et al.* 1988).

2.5.2.1. Constitution des lots et pulvérisation des suspensions bactériennes sur les feuilles

Trois mois après le semis, les plantes sont au stade de plein tallage. 9 pots sont choisis, ils sont répartis en 3 lots, dont chacun est constitué de 3 pots (3 répétitions par microorganisme). Les lots 1 et 2 sont traités par les suspensions bactériennes et le lot 3 est un lot témoin traité par l'eau physiologique (Figure 13).



Les plantes avant de subir le traitement.



Lot 1 : traité par *Bacillus* sp.(HE799656).



Lot 2 : traité par *Pseudomonas fluorescens*.

Figure 13 : Répartition des lots destinés à l'étude de la persistance des bactéries sur le feuillage

Les plantes sont par la suite traitées à l'aide d'un pulvérisateur, à raison de 20 ml pour chaque pot (Figure 14).



Figure 14 : Pulvérisation des suspensions bactériennes sur la plante

2.5.2.2. Prélèvement des feuilles et préparation des solutions

Le prélèvement des feuilles se fait aléatoirement à partir de chaque pot (3 feuilles pour chaque microorganisme); le 1^{er} jour, 3^{ème} jour, 6^{ème} jour et 9^{ème} jour après traitement.

Après le prélèvement des feuilles on découpe à l'aide d'une lame fine des portions calibrées d'une surface de 0,81 cm².

Par la suite, les portions obtenues sont mises dans des Béchers contenant de l'eau distillée stérile puis on agite à 700 t/mn pendant 10 mn afin de libérer le maximum des microorganismes adhérents à la portion.

A l'aide d'une pipette graduée, un volume de 1 ml de chaque suspension est déposé uniformément dans une boîte de Pétri à raison de 3 répétitions par suspension, puis 15 à 20 ml de milieu de culture fondu est coulé par-dessus. Après un mélange délicat, le milieu se solidifie puis est mis à incuber à l'étuve à une température de 30°C pendant 24h, puis les colonies présentes dans chaque boîte sont comptées. Uniquement celles qui correspondent aux caractères macroscopiques des 2 bactéries utilisées sont prises en considération.

2.5.3. Etude de la persistance dans le sol

L'étude de la persistance de *Bacillus sp.* (HE799656 (1,6 mg/ml) et *Pseudomonas fluorescens* bvIII (1,7 mg/ml) sur le sol a été réalisée en suivant les étapes ci-dessous (Fargues *et al.* 1988) :

2.5.3.1. Prélèvement des échantillons de sol

Des échantillons de sol sont prélevés aléatoirement de chaque pot. Le sol utilisé est prélevé de la couche rhizosphérique de la culture de blé utilisée dans l'étude de la persistance sur le feuillage.

Les analyses physico-chimiques et granulométriques du sol sont réalisées à l'ENSA d'El Harrach et sont illustrées dans l'annexe 7.

2.5.3.2. Stérilisation de sol

Pour éliminer tous les microorganismes, le sol a subi une stérilisation par autoclavage à une température de 120°C pendant une heure chaque jour et durant trois jours successifs.

2.5.3.3. Répartition des lots et pulvérisation de sol

Les échantillons du sol utilisé sont répartis dans 9 pots divisés en 3 lots dont chacun est constitué de 3 pots. 2 lots sont traités par les bactéries et le lot témoin est traité par l'eau physiologique. (Figure 15). Le traitement se fait par pulvérisation jusqu'au ruissellement.



Les échantillons du sol avant de subir le traitement.



Lot 1 : traité par *Bacillus sp.*(HE799656)



Lot 2 : traité par *Pseudomonas fluorescens* bvIII

Figure 15 : Répartition des lots destinés à l'étude de la persistance des bactéries dans le sol

2.5.3.4. Préparation des solutions

Le prélèvement de sol à partir des 9 pots se fait le 1^{er} jour, 3^{ème} jour, 6^{ème} jour et le 9^{ème} jour après traitement. En effet, 10 mg de chaque échantillon sont mis dans un Bécher contenant de l'eau distillée stérile, la solution est ensuite agitée pendant 10 mn.

Par la suite à l'aide d'une pipette graduée, 1 ml de chaque suspension est prélevé et déposé au centre d'une boîte de Pétri vide à raison de 3 répétitions par suspension, puis on coule les milieux de culture correspondant à chaque microorganisme.

Les cultures bactériennes sont en suite incubées à 30°C pendant 24h, puis on dénombre les colonies qui apparaissent dans chaque boîte. Uniquement celles qui correspondent aux caractères macroscopiques des 2 bactéries utilisées sont prises en considération.

2.6. Etude *in vitro* de la compatibilité des bactéries entomopathogènes avec les pesticides chimiques

L'objectif de la présente étude était d'évaluer la sensibilité des bactéries entomopathogènes (*Bacillus sp.*(HE799656), *Bacillus sp.*(HE805963), *B. sphaericus* et *P.fluoresens* bvIII) pour 3 différents produits agro-chimiques utilisées en Algérie dans la lutte antiacridienne (Selon INPV et Index Phytosanitaire, 2003).

Les produits chimiques testés sont la deltaméthrine, la lambda-cyhalothrine et le téflubenzuron.

2.6.1. Principe

L'antibiogramme repose sur le principe de la compétition entre la croissance d'une bactérie et la diffusion d'un bactéricide dans un milieu gélosé à partir d'un support de papier pré-imprégné (Denis et Ploy, 2007).

La méthode des disques imprégnés est adapté a toutes les substance bactéricides (Guiraud, 2003).

2.6.2. Préparation des suspensions bactériennes et des solutions tests

✓ Les suspensions bactériennes

On a utilisé des cultures bactériennesensemencées sur milieu liquide, les concentrations sont les suivantes:

Bacillus sp.(HE799656) : de 1,6 mg/ml

Bacillus sp. (HE805963) : 1,67 mg/ml

Bacillus sphaericus : 1,72 mg/ml

Pseudomonas fluorescens bvIII : 1,7 mg/ml

✓ Les solutions tests

La deltaméthrine et la lambda-cyhalothrine (Pyréthriinoïdes) sont des produits à action rapide (effet de choc au bout de quelques minutes), présentant des niveaux de rémanence variés et ayant un spectre large.

Le Téflubenzuron (Benzoyluree) c'est un inhibiteur de croissance (IGR) récemment apparus. Il agit sur la cuticule (Dobson, 2001)

Pour le calcul des concentrations des trois insecticides utilisées on s'est basé sur les doses appliquées sur terrain et qui sont données par l'index des produits phytosanitaires (2003).

Solution n°1 : 0,5 ml de Lambda dans 200 ml de l'eau distillé stérile.

Solution n°2 : 0,5 ml de Décis dans 200 ml de l'eau distillé stérile.

Solution n°3 : 0,5 ml de Tiflubenzurum dans 250 ml de l'eau distillé stérile.

2.6.3. Application de test de compatibilité

L'activité antibactérienne a été évaluée selon la méthode de disque sur gélose rapportée par (Meena et Sethi, 1994 ; Anoumou *et al.*, 2001; Guiraud, 2003 et Denis et Ploy, 2007).

Pour réaliser ce test, on utilise deux milieux de culture ; King B pour *Pseudomonas fluorescens* et Gélose Nutritive ordinaire pour le genre *Bacillus*.

Les souches testées sont préalablement ensemencées par étalement à l'aide d'un râteau étaleur, en partant d'une culture liquide à raison de 3 boites par bactérie.

D'autre part des disques de papier Wattman de 5 a 6 mm de diamètre sont stérilisés dans une boite de Pétri en verre. Ils sont par la suite imprégnés des divers échantillons (les solutions tests préalablement préparées) en les maniant stérilement à la pince et en les trempant dans un tube contenant l'échantillon. Après les avoir égouttés, on place les disques à la surface du milieu de culture ensemencé en appuyant légèrement pour assurer le contact. On signale que les disques témoins sont imprégnés par l'eau distillée stérile.

Les boites sont alors mises au réfrigérateur à 4°C pendant 24h pour assurer la diffusion des insecticides dans la gélose puis incubées à 30°C. Les observations de la croissance des colonies ont été effectuées 24 h après.

2.6.4. Lecture des résultats

Après 24h d'incubation, les boite de Pétri sont examinées en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition apparue autour des disques.

Les diamètres d'inhibition ont été comparés aux normes et l'interprétation se fait selon l'échelle d'estimation donnée par Meena et Sethi (1994) :

- Activité antibactérienne non inhibitrice : Diamètre < 7 mm
- Activité légèrement inhibitrice : 7 mm < Diamètre < 13 mm
- Activité modérément inhibitrice : 13 mm < Diamètre < 25 mm
- Activité fortement inhibitrice : Diamètre > 25 mm

3. Analyse statistique

Pour confirmer l'efficacité des traitements biologiques effectués, les résultats obtenus sont soumis aux tests de l'analyse de la variance. Les valeurs de $p \leq 0,05$ sont considérées statistiquement significatives. Nous avons appliqué en outre le test de Tuckey ou test de la différence franchement significative qui permet de vérifier la significativité de la variable d'intérêt entre toutes les combinaisons des modalités. Le Logiciel utilisé est le XLSTAT.

Chapitre III : Résultats

1. Purification et identification taxonomique des isolats bactériens

1.1. Résultats des tests d'identification des bactéries du genre *Bacillus*

1.1.1. Tests culturaux et morphologiques

La culture de la bactérie sur gélose nutritive nous a permis d'obtenir des colonies bien isolées. L'aspect des colonies obtenues sur milieu gélosé est très variable.

En général, les colonies sont larges, lisses, plates, fréquemment circulaires, avec des bords irréguliers, de couleur crème ou blanc ou encore jaunâtre.

S2, B1 et B2 donnent des colonies de grande taille (2 à 7 mm de diamètre), mates ou granuleuses et dont la forme est variable (circulaires ou non, à bords réguliers ou crénelés ou filamenteux).

S10 produit des colonies de formes irrégulières (contours ondulés ou pouvant être filamenteux), de consistance crémeuse et dont le diamètre est compris entre 2 et 4 mm. Dans les vieilles cultures, les colonies prennent un aspect sec, rugueux.

S4, S5, S6, S11 donnent des colonies qui envahissent les milieux gélosés.

Pour S7, S8 et S9 Les colonies présentent un aspect variable même au niveau de la même boîte.

S1 et S3 présentent des colonies plus lisses de taille moyenne avec un bord entier (voir figure 16)

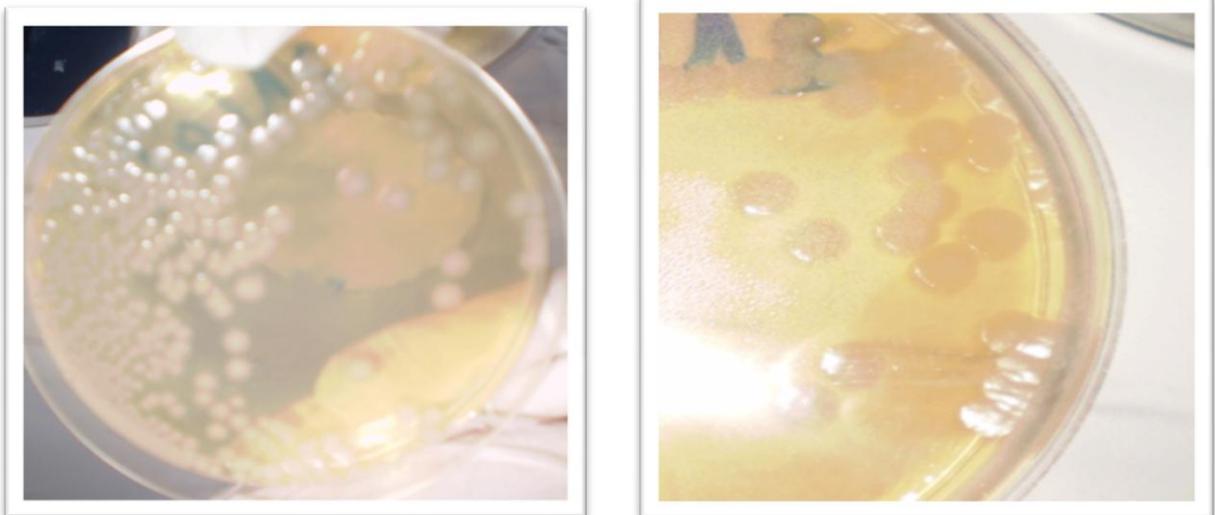


Figure 16 : Aspect macroscopique de la souche S1

L'observation au microscope photonique des cellules après coloration à l'état frais, coloration simple au Bleu de méthylène et coloration de Gram nous a montré que toutes les souches isolées ont la forme de bâtonnet long à extrémité arrondi ou carré, et sont à Gram positif (figure n° 17, 18, 19 et 20).

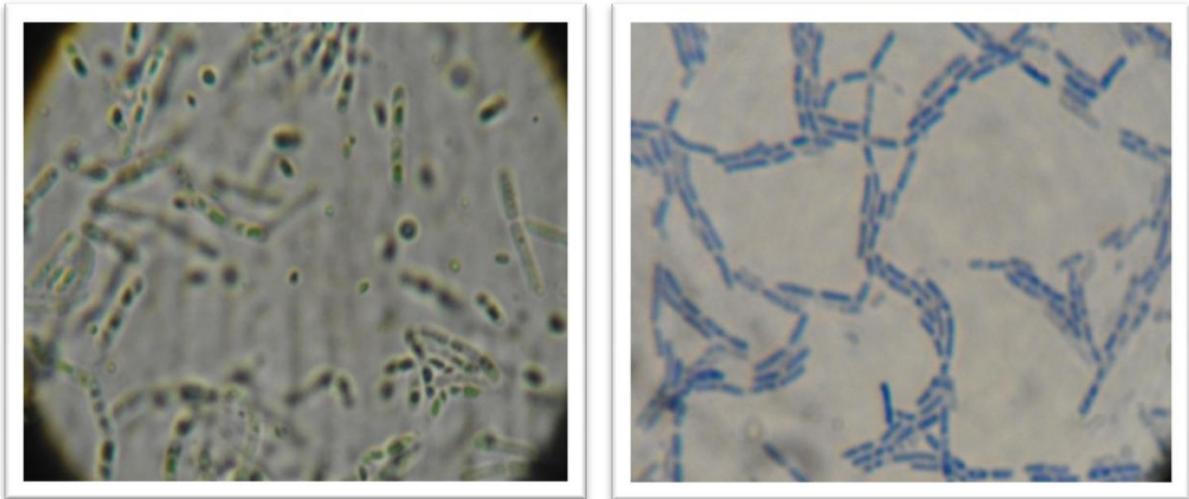


Figure 17 : Résultats de l'observation à l'état frais (à gauche) et la coloration simple au Bleu de méthylène (à droite) de la souche B2 (Obj×100).

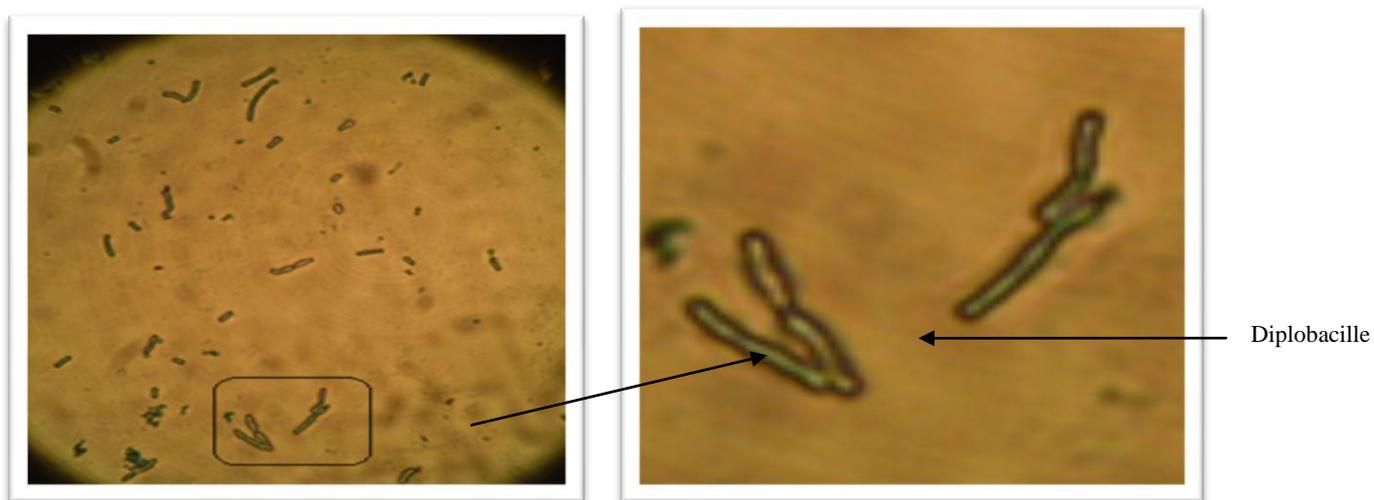


Figure 18: Aspect microscopique de la souche S1 après coloration simple au Bleu de méthylène (Obj×100).

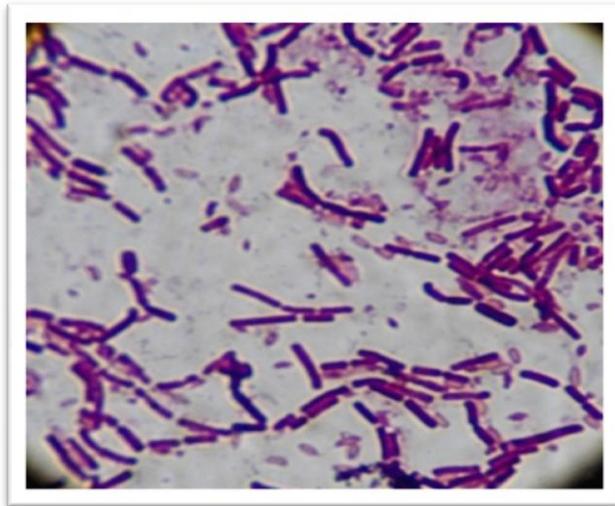


Figure 19 : Résultats de la coloration de Gram de de la souche B1 (Obj×100).

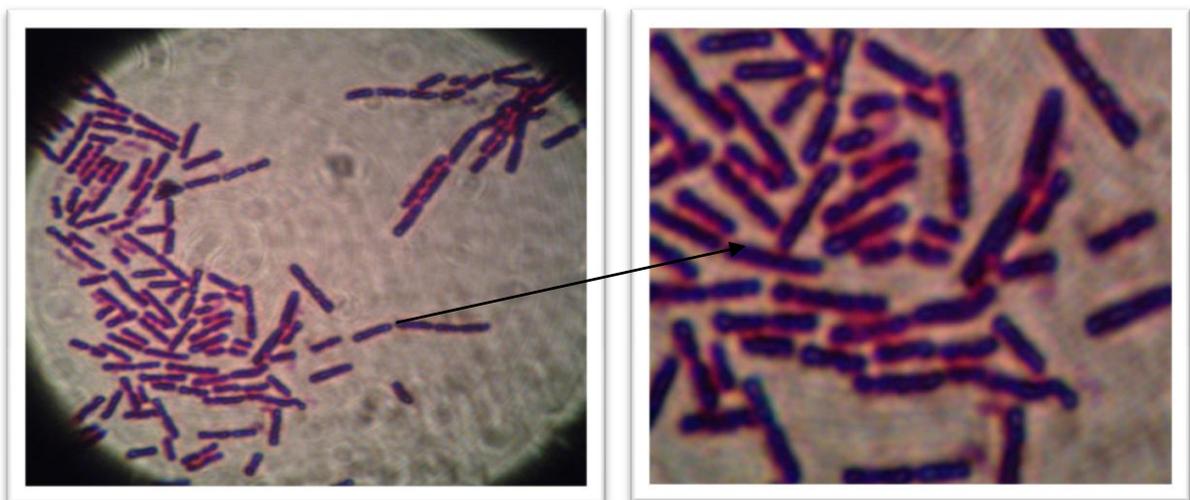


Figure 20 : Aspect microscopique de la souche S1 après coloration de Gram (Obj× 100)

En parallèle, après coloration au vert de malachite, il s'est révélé que toutes les souches de *Bacillus* isolées possèdent une forme sporale. La spore pour la majorité présente une forme ovale en position centrale ou terminale non déformante (figure n°21 et 22).

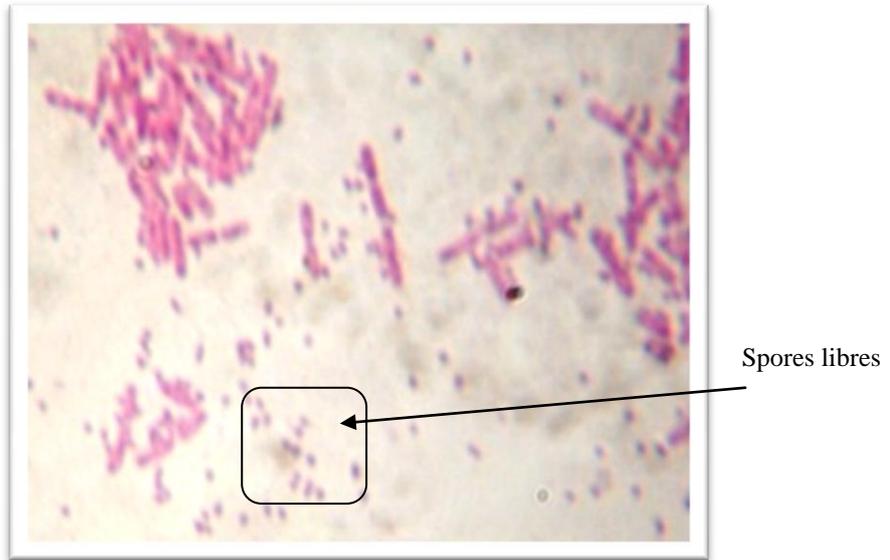


Figure 21 : Résultat de coloration de la spore bactérienne de la souche B1 (Obj × 100).

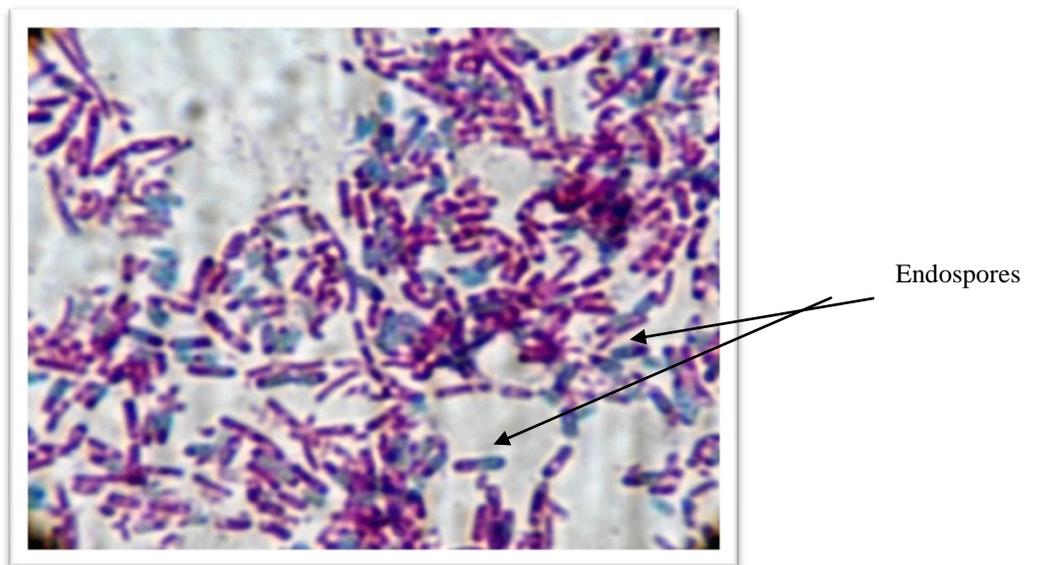


Figure 22 : Résultat de la coloration de spore de de la souche B2 (Obj×100).

1.1.2. Caractérisation physiologique et biochimique :

Les résultats des différents tests réalisés sont consignés sur le tableau 10 :

Tableau 10: Caractérisation des souches isolées selon la clé de Guiraud (2003)

Souche \ Test	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	B1	B2
Culture anarobiose	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nitrate	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
VP	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+
Mannitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mobilité	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Amidon	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Caseine	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+
Gélatine	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+
Uréase	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
Indole	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Citrate	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Acide sur Glucose	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Retard sur Glucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
Gaz sur Glucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Culture à 45°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Culture à 55°C	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-
Culture à 65°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Position sporale	T	C	T	C/T	C/T	C/T	C/T	C/T	C/T	C	C/T	C	C

- : Résultat négatif, + : Résultat positif, T : Terminale, C : Centrale

1.1.3. Identification préliminaire taxonomique des isolats

La classification spécifique des 13 souches bactériennes sélectionnées a été basée essentiellement sur des tests morphologiques, physiologiques et biochimiques proposés par Guiraud (1998, 2003).

Tableau11 : La classification des souches bactériennes selon Guiraud (1998, 2003)

	<i>B. circulans</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. thuringiensis</i>	<i>B. sphaericus</i>	<i>B. coagulans</i>
Souches	S ₄ , S ₅ , S ₆ , S ₁₁	S ₁₀	S ₂ , B ₁ , B ₂	S ₁ , S ₃	S ₇ , S ₈ , S ₉

B. Bacillus

Cette classification spécifique a permis d'affilier les souches bactériennes en 5 espèces :

B. circulans avec 4 souches

B. subtilis avec 1 souche

B. thuringiensis avec 3 souches

B. sphaericus avec 2 souches

B. coagulans avec 3 souches

1.2. Résultats des tests d'identification des bactéries du genre *Pseudomonas* spp. fluorescents

1.2.1. Tests cultureux et morphologiques

La coloration simple au bleu de méthylène et la coloration de Gram ont montré que les cellules de toutes les souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents isolées sont des bâtonnets de petite taille à Gram négatif.

Ainsi lors de passage des cultures bactériennes sous la lumière ultraviolette, une couleur jaune verte est émise, ce qui indique la production de pigments fluorescents par ces bactéries. Notons que la fluorescence est variable selon les souches bactériennes isolées, elle varie de la faible intensité détectable sous UV jusqu' à la fluorescence visible à l'œil nue.

Les caractères cultureux sur le milieu King B ont montré d'une manière générale des colonies bactériennes dont le contour est régulier avec une coloration souvent beige à crème. L'élévation est convexe pour l'ensemble des souches avec un aspect lisse et des diamètres variés de 1 à 2 mm après 24h de culture.

1.2.1. Caractérisation physiologique et biochimique

Les résultats du test de fluorescence sur le milieu KB, le test d'arginine et le test d'oxydase, nous ont permis de sélectionner 6 souches bactériennes fluorescentes dont les différents tests physiologiques et biochimiques sont résumés dans le tableau 12:

Tableau 12 : caractères physiologiques et biochimiques des souches bactériennes

Souche Test	S₁	S₂	S₃	S₄	S₅	S₆
Gram	-	-	-	-	-	-
Fluorescence	+	+	+	+	+	+
Oxydase	+	+	+	+	+	+
ADH	+	+	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	+	+	+
Nitrate réductase	+	+	-	+	-	-
Levane sucrase	-	+	-	+	+	-
Tartrate	ND	-	ND	+	ND	ND
Croissance à 41°C	+	ND	ND	ND	ND	ND
Gélatinase	ND	ND	+	ND	-	-
Lipase	ND	+	ND	ND	ND	ND
Sorbitol	ND	ND	ND	+	ND	ND
Arabinose	ND	ND	ND	+	ND	ND
Respiration	Aérobie	Aérobie	Aérobie	Aérobie	Aérobie	Aérobie
Mannitol	+	-	-	+	ND	ND
Mobilité	+	+	+	+	ND	ND

+ : Réponse positive, - : Réponse négative, ND : Non déterminé

1.2.3. Identification préliminaire taxonomique des isolats

La classification spécifique et intraspécifique des 6 souches bactériennes sélectionnées a été basée essentiellement sur des tests physiologiques et biochimiques proposés dans la clé dichotomique d'identification proposée par Jaques (1994). Les résultats sont portés sur le tableau 13 :

Tableau 13 : La classification des souches bactériennes selon la clé dichotomique d'identification proposée par Jaques (1994).

Souches	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄	S ₅	S ₆
	P.fluo bv III	P.chloro	P.fluo bv V	P.fluo bv IV	P.fluo bv I	P.putida

fluo: fluorescens, **chloro:** chlororaphis, **bv:** biovars

Cette classification spécifique a permis d'affilier les souches bactériennes probablement à 3 espèces : *Pseudomonas fluorescens* avec 4 souches

Pseudomonas chlororaphis avec 1 souche

Pseudomonas putida avec 1 souche

La classification intraspécifique de l'espèce *Pseudomonas fluorescens* a révélé l'existence des biovars I, III, V, IV.

1.3. Analyse phylogénétique et alignement

La position phylogénétique des deux souches (Strain-B1 et Strain-B2) est représentée dans la figure 23. Les séquences d'ADNr 16S de ces deux souches ont été obtenues avec 1504 et 760 nucléotides et enregistrées dans la banque de donnée EMBL/EBI sous les numéros d'accessions HE799656 et HE805963 respectivement. L'analyse de séquences de ces deux souches montre qu'elles sont apparentées à des organismes cultivés de la famille des *Bacillaceae*. Elles sont affiliées au genre *Bacillus* (Tableau 14) en présentant des similarités très élevées (99%) avec les souches *Bacillus thuringiensis* (NR_043403.0), *Bacillus cereus* (JQ435684.1), *Bacillus weihenstephanensis* (NR_024697.1) et *Bacillus mycoides* (NR_036880.1). Nos deux souches se trouvent dans le même cluster avec *Bacillus thuringiensis* (NR_043403.0) et *Bacillus cereus* (JQ435684.1) mais cette étroite parenté ne peut pas confirmer l'inclusion de ces souches dans les espèces déjà décrites. Il est connu que des espèces peuvent avoir des séquences des ARNr 16S très proches et être différentes par hybridation ADN-ADN (Dijkshoorn *et al.*, 2007). Pour une étude d'identification plus poussée, il serait donc nécessaire d'effectuer une étude d'homologie ADN-ADN afin d'établir la position taxonomique exacte de ces souches.

Les 2 souches sont identifiées alors comme *Bacillus sp.*(HE799656) et *Bacillus sp.*(HE805963) (Annexe).

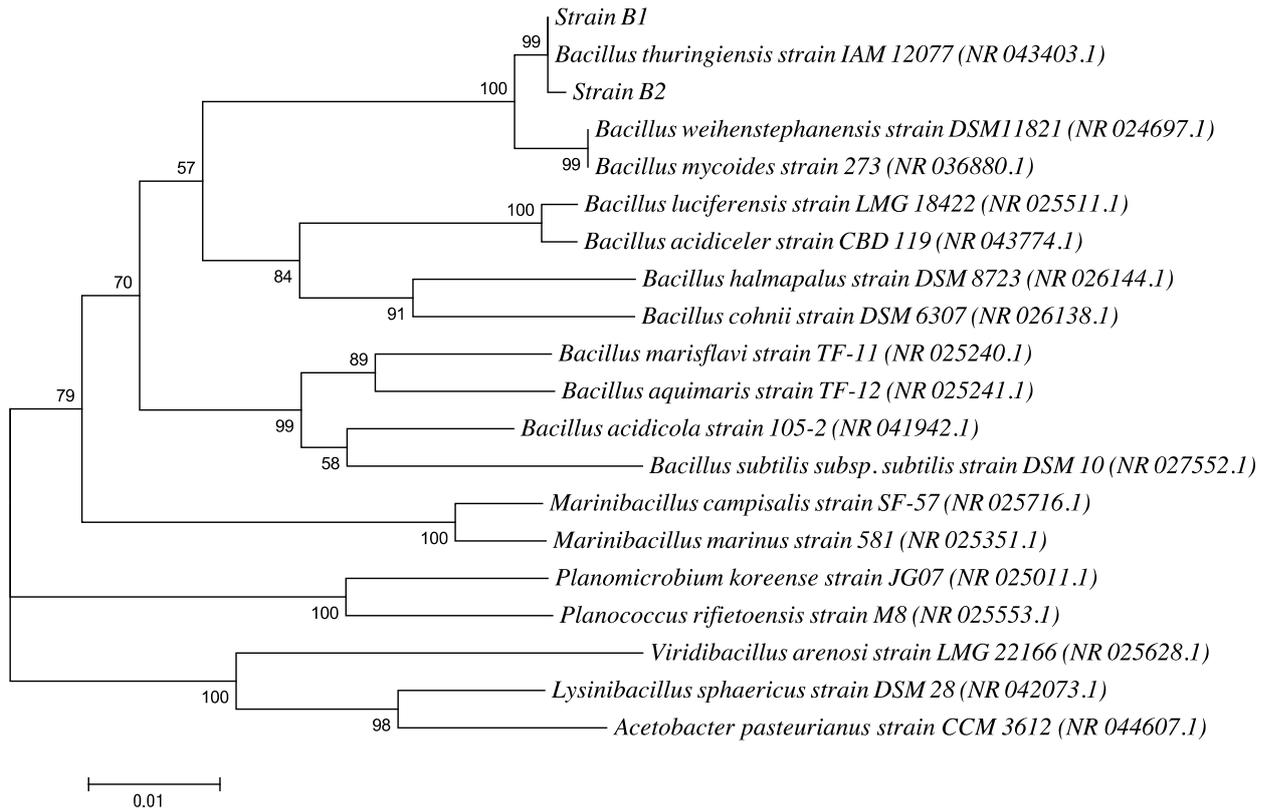


Figure 23: Arbre phylogénique tracé par la méthode de Neighbor-Joining montrant la position phylogénétique des souches Strain-B1 et Strain-B2 et les représentants de certains autres taxons liés sur la base de séquences d'ADNr 16S. Les numéros d'accessions dans la banque de donnée Genbank sont donnés devant le nom de chaque souche. La barre représente 1 substitution par 100 nucléotides. Les valeurs aux niveaux des noeuds indiquent les probabilités calculées par bootstrap.

>Strain_B1

GATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAATGGATTGAGAGCTTGCTCTCAAG
AAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCATAAGACTGGGATAACTCCGGG
AAACCGGGGCTAATACCGGATAAYATTTTGAACYGCATGGTTTCGAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCT
GTCACCTTATGGATGGACCCGCGTCGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGA
TGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGG
GAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAT
GAAGGCTTTCGGGTCGTA AAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCAC
CTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGT
GGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAA
AGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTG
GAATCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTT
CTGGTCTGTA ACTGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAG
TCCACGCCGTA AACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTT TAGTGCTGAAGTTAACGC
ATTAAGCACTCCGCCTGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCG
CACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCC
TCTGAAAACCTAGAGATAGGGCTTCTCCTTCGGGAGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGT
CAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAT
CATTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAA
ATCATCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAAAGAGCTGCAAGA
CCGCGAGGTGGAGCTAATCTCATAAAACCGTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACA

TGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTAC
 ACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAAACACCCGAAGTCGGTGGGGTAACCTTTTTGGAGCCA
 GCCGCCTAAGGTGGGACAGATGATTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTATCGGAAGG

>Strain_B2

GATGGACGCTGGCGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAATGGATTGAGAGCTTGCTCTCAAG
 AAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCATAAGACTGGGATAACTCCGGG
 AAACCGGGGCTAATACCGGATAACATTTGAACTGCATGGTTGAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCT
 GTCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGA
 TGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGG
 GAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAT
 GAAGGCTTTCGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCAC
 CTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGT
 GGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAA
 AGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCAATTGGAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTG
 GAATCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTT
 CTGGTCTGTAACCTGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAG

Tableau 14: Pourcentage d'identité des séquences ADNr 16S des souches Strain-B1 et Strain-B2 avec quelques espèces apparentées

Espèces bactériennes (code d'accession dans Genbank)	Pourcentage d'identité avec la souche Strain-B1 (%)	Pourcentage d'identité avec la souche Strain-B2 (%)
<i>Bacillus thuringiensis</i> strain IAM 12077 (NR_043403.0)	99	99
<i>Bacillus cereus</i> strain AM7 (JQ435684.1)	99	99
<i>Bacillus weihenstephanensis</i> strain DSM11821 (NR_024697.1)	99	99
<i>Bacillus mycoides</i> strain 273 16S ribosomal RNA, partial sequence (NR_036880.1)	99	99
<i>Bacillus luciferensis</i> strain LMG 18422 (NR_025511.1)	95	94
<i>Bacillus acidiceler</i> strain CBD 119 (NR_043774.1)	95	93

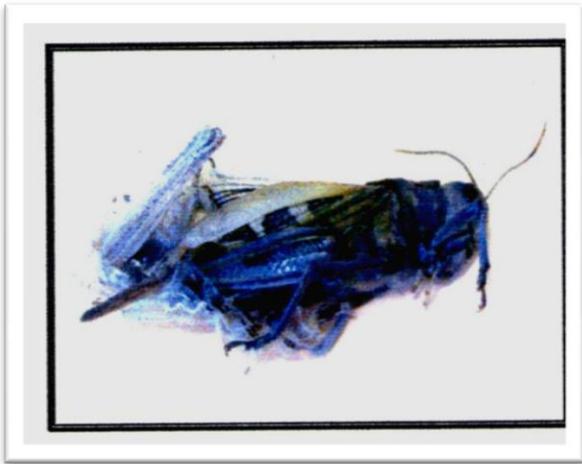
2. Evaluation de la toxicité des bactéries sur les larves L5 de *L. migratoria*

2.1. Les symptômes

Les individus traités par différentes concentrations des 4 bactéries ; *Bacillus sp.*(HE799656), *Bacillus sp.*(HE805963), *B. sphaericus* et *Pseudomonas fluorescens* bvIII ont montré des symptômes et comportements très remarquables (Figure 24).



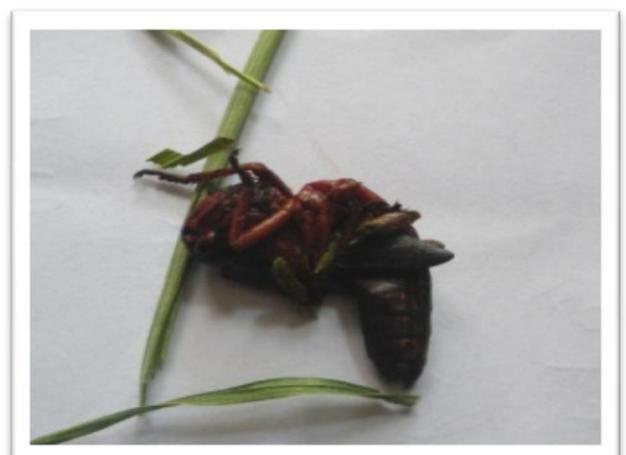
- A -



- B -



- D -



- E -

Figure 24 : Symptômes observés chez les individus traités par différentes concentrations des 4 bactéries

- A, B et C : Difficulté de la mue et déformations après la mue imaginale
- D : Noircissement de corps après la mort
- E : Corps mou après la mort

Parmi les signes remarquables chez l'acridien infecté avant sa mort ; perte d'appétit et diarrhée. Après la mort, le corps de l'insecte prend une teinte noirâtre et devient mou avec des difficultés de la mue imaginale et des déformations morphologiques chez les L5 survivants après traitement.

2.2. Effet sur la mortalité

Les résultats des taux de mortalité journalière cumulée des larves L5, témoins et traitées par les 4 bactéries sont portés respectivement sur les figures 25, 26, 27 et 28.

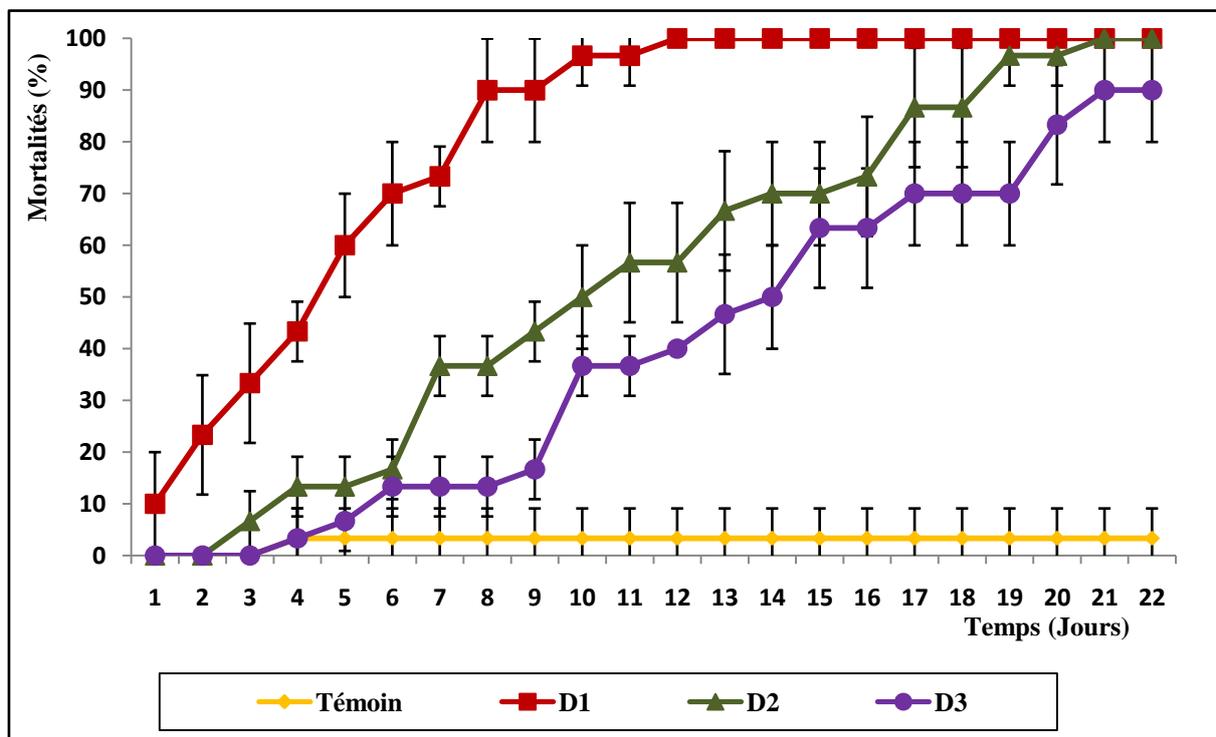


Figure 25 : Taux de mortalité journalière cumulée des larves L5 de *L.migratoria* traitées par *Bacillus sp.*(HE799656) aux doses D1= 1,6 mg/ml, D2=0,59 mg/ml, D3=0,33 mg/ml

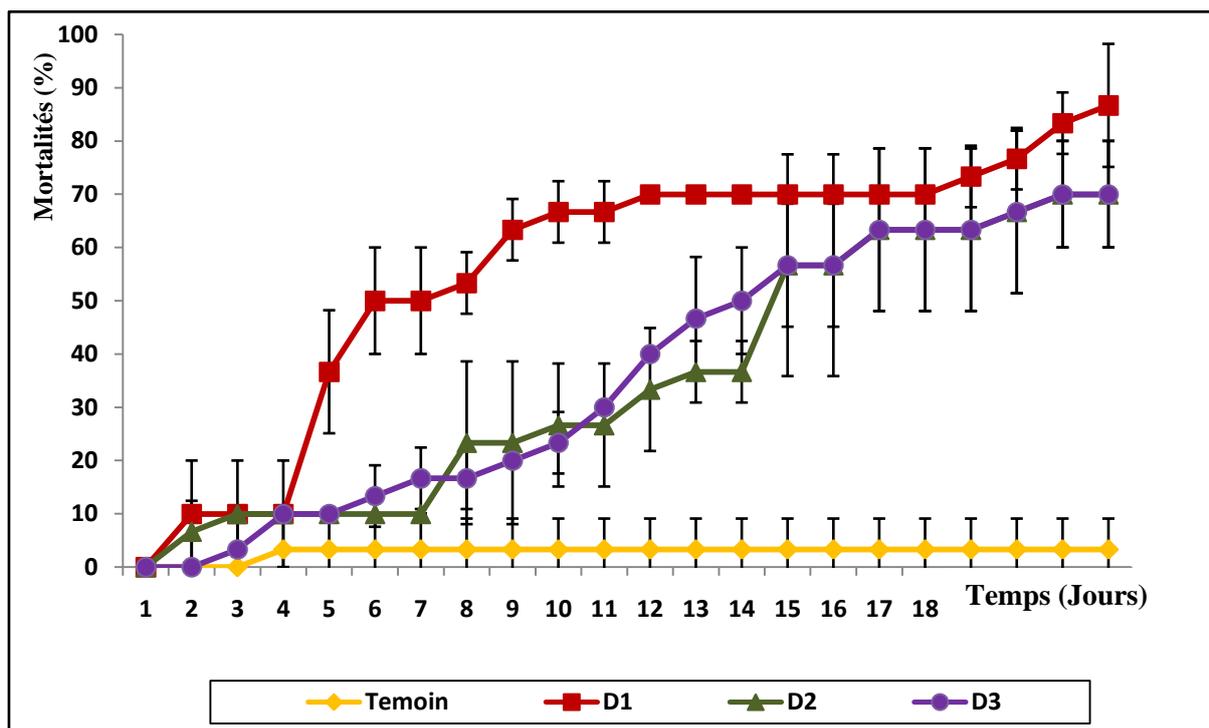


Figure 26 : Taux de mortalité journalière cumulée des larves L5 de *L.migratoria* traitées par *Bacillus sp.*(HE805963) aux doses D1= 1,67 mg/ml, D2=0,62 mg/ml, D3=0,35 mg/ml

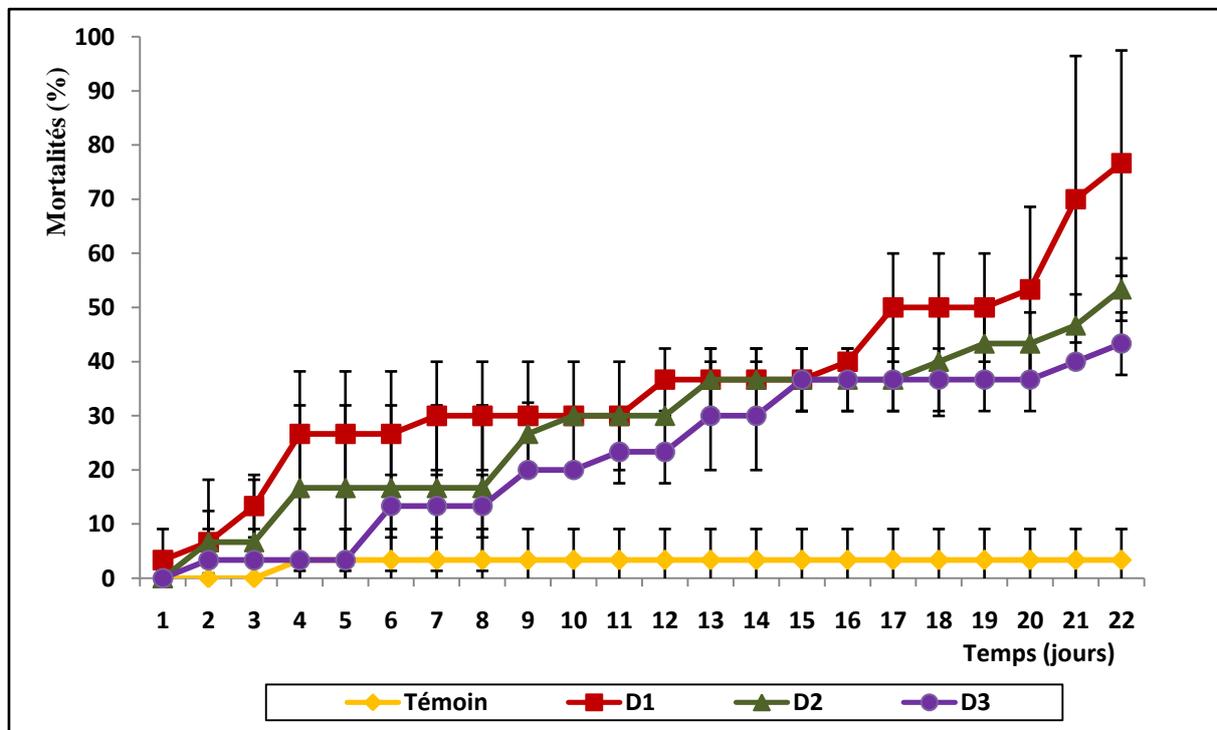


Figure 27: Taux de mortalité journalière cumulée des larves L5 de *L.migratoria* traitées par *B. sphaericus* aux doses D1= 1,72 mg/ml, D2=0,75 mg/ml, D3=0,28 mg/ml.

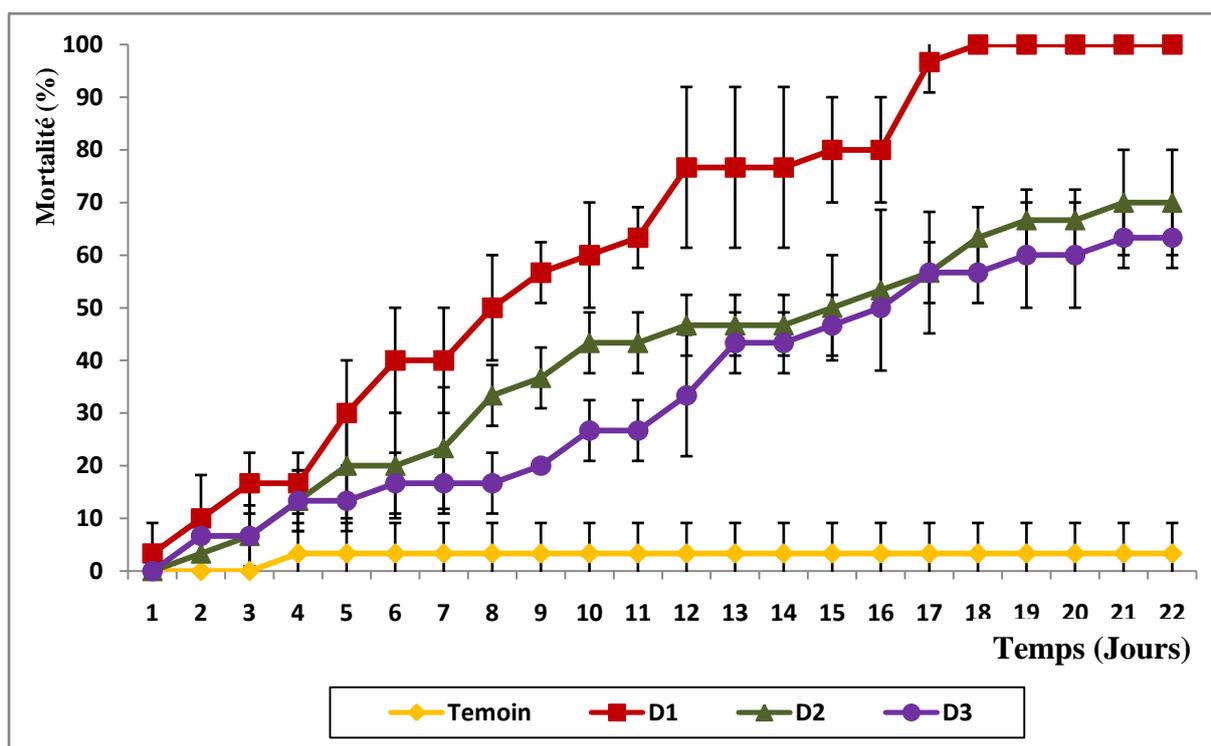


Figure 28 : Taux de mortalité journalière cumulée des larves L5 de *L.migratoria* traitées par *P.fluorescens* bvIII aux doses D1= 1,7 mg/ml, D2=0,65 mg/ml, D3=0,31 mg/ml.

Chez les larves L5 témoins, on a enregistré une seule mortalité soit un taux de 3,33% stable durant tout le stade de développement. Par contre chez les larves traitées par *Bacillus sp.*(HE799656), le taux de mortalité atteint 100% au bout de 12 jours après traitement à la D1 et au bout de 21 jours après traitement à la D2 avec 90% de mortalité obtenue le même jour après traitement à la D3.

De même, des taux de mortalité allant de 86,67% après traitement à la forte dose à 70% après traitement à la moyenne et faible dose de *Bacillus sp.*(HE805963) sont atteints au bout de 22 jours.

En ce qui concerne les individus traités par *B. sphaericus*, des mortalités de 76,67%, 53,33% et 43,33% sont obtenues respectivement pour les concentrations D1, D2 et D3 le 22^{ème} jour.

L'étude de l'effet de *P. fluorescens* sur la mortalité des larves L5 de *L. migratoria*, nous a permis d'enregistrer un taux de mortalité finale de 100% atteint le 18^{ème} jour pour la concentration D1 contre 70% et 63,33% respectivement pour les concentrations D2 et D3 atteints le 22^{ème} jour après le traitement.

On note également que chez la plupart des individus traités, la mort survient au moment de la mue imaginale et donc ces dernières n'arrivent pas à atteindre le stade imago.

➤ Analyse statistique

On a fait appel à l'analyse de la variance à 3 critères de classification suivie du test de Tukey pour la comparaison des moyennes.

Le facteur 1 : dose avec 3 niveaux (D1, D2 et D3)

Le facteur 2 : traitement avec 2 niveaux (témoin et traités)

Le facteur 3 : temps avec 22 niveaux

Les résultats de l'analyse de la variance et le test de Tucky relatif à chaque bactérie sont portés respectivement sur l'annexe 9

L'analyse de la variance révèle une différence très hautement significative au seuil de 5% ($P < 0,0001$) entre le lot témoin et les lots traités par les 4 bactéries testées. De même l'application du test de Tuckey montre pour les 4 bactéries une différence significative pour toutes les combinaisons (T, D1), (T, D2) et (T, D3), (D1, D2), et (D1, D3), sauf pour la combinaison (D2, D3) chez les individus traités par *Bacillus sp.*(HE805963). Les 2 doses appartiennent au même groupe, leurs effets ne sont pas statistiquement différents.

2.4. Calcul des TL₅₀

Nous avons procédé au calcul des temps létaux au bout desquels 50% des individus de *L.migratoria* sont morts (TL₅₀) pour les 4 bactéries testées ; *Bacillus sp.*(HE799656), *Bacillus sp.*(HE805963), *B. sphaericus* et *P.fluorescens* bvIII.

Pour cela nous avons transformé en probits les valeurs des pourcentages de mortalité corrigée et les jours en logarithmes décimaux (Annexe 10). Ces valeurs nous permettent de tracer les droites de régression (fig. 29 et 30).

Par la suite les équations des droites de régression obtenues sont utilisées pour le calcul des TL₅₀ (Tableaux 15, 16, 17 et 18).

Tableau 15 : Equations des droites de régression, coefficients de corrélation et les valeurs des TL₅₀ des larves L5 de *L. migratoria* traitées au *Bacillus sp.*(HE799656)

Doses	L'équation de la droite de régression	Coefficient de Corrélation R ²	TL ₅₀
D1= 1,6 mg/ml	$y = 4,073x + 2,879$	0,91	3,32 Jours
D2= 1,59 mg/ml	$y = 5,302x - 0,09$	0,89	9,12 Jours
D3= 0,33 mg/ml	$y = 5,557x - 1,258$	0,89	13,37 Jours

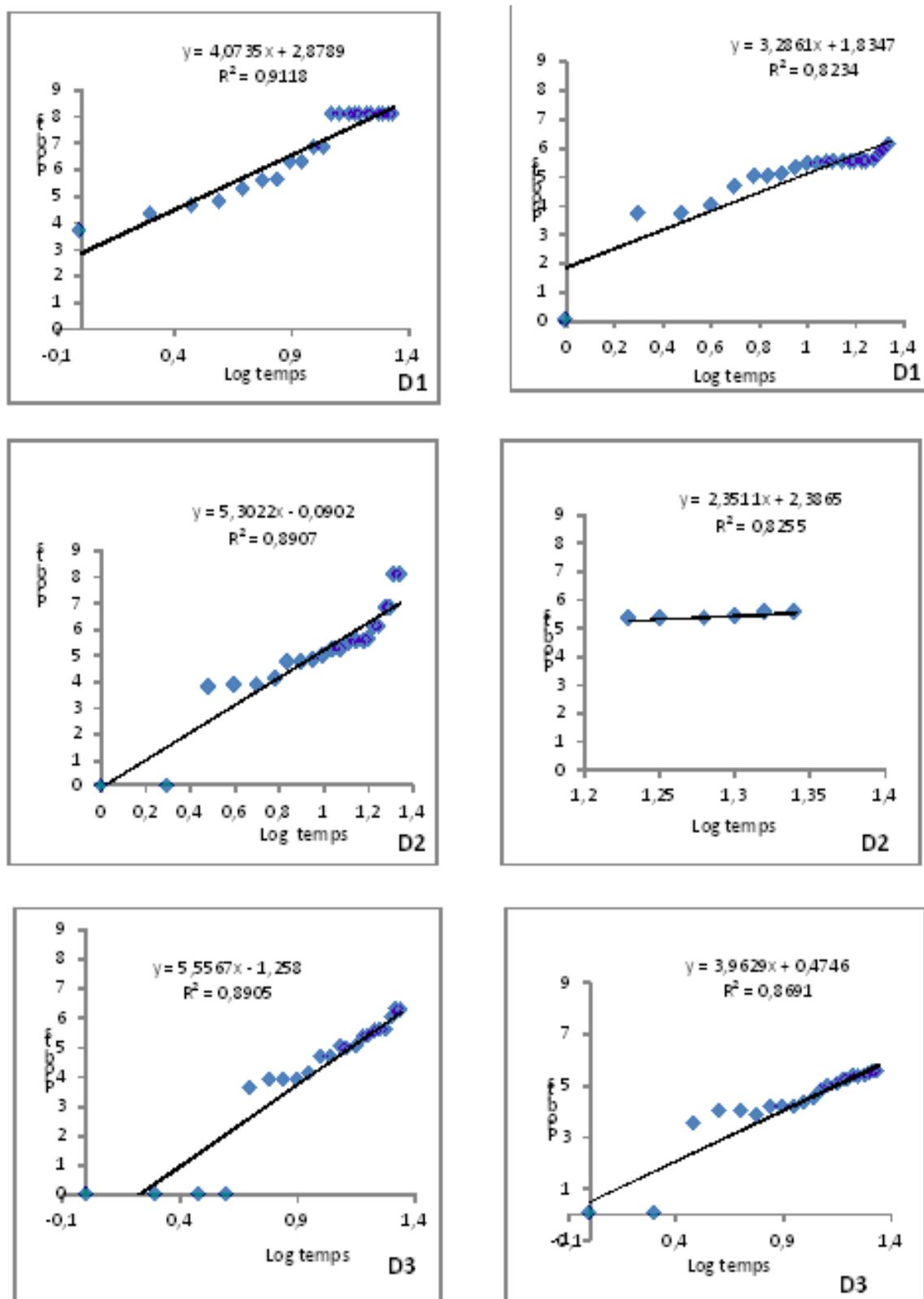


Figure 29 : Droites de régressions exprimant l'évolution des taux de mortalités des larves L5 traitées par trois doses de *Bacillus sp.*(HE 799656) et *Bacillus sp.*(HE 805963) dans le temps

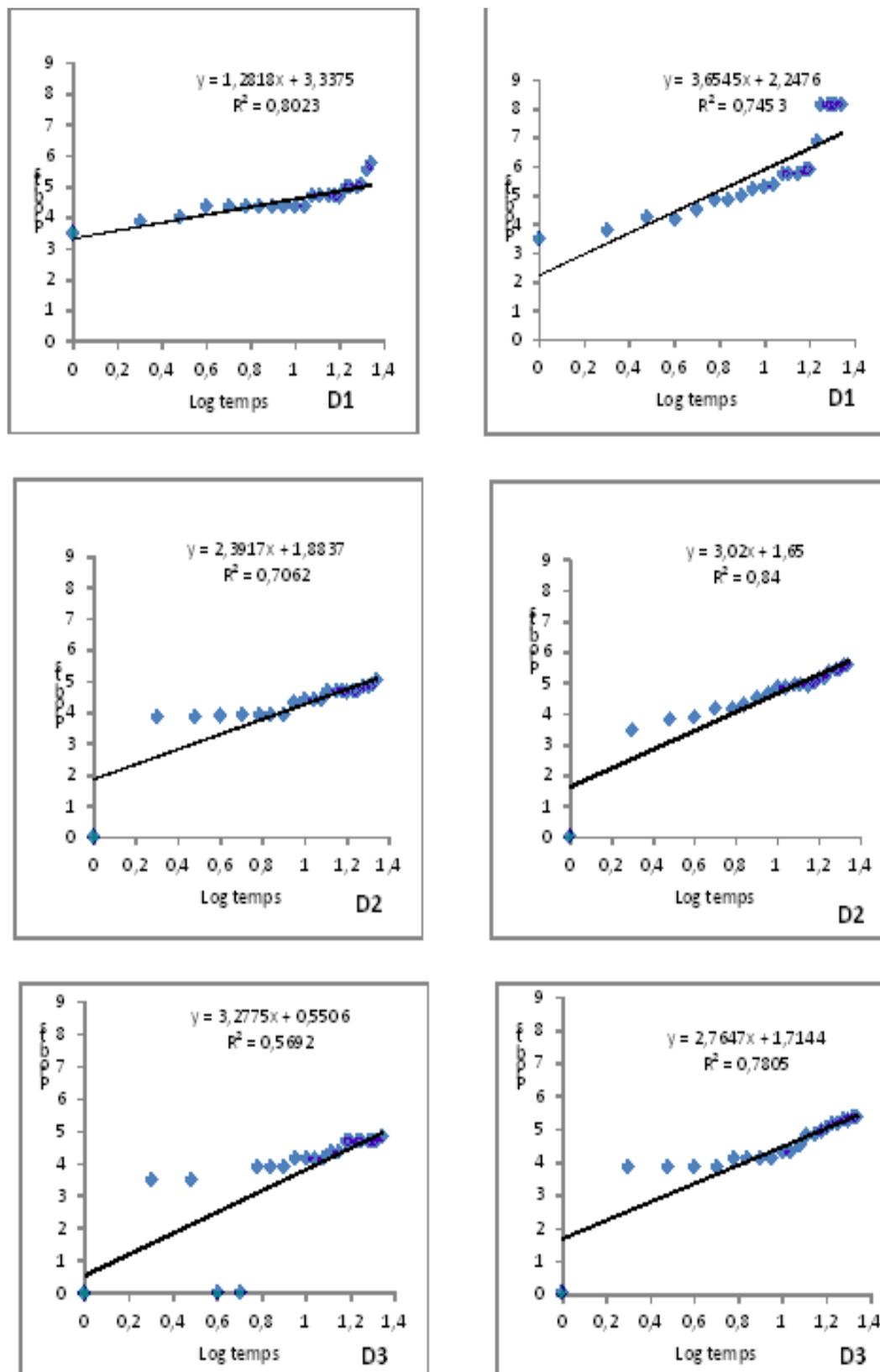


Figure 30 : Droites de régressions exprimant l'évolution des taux de mortalités des larves L5 traitées par trois doses de *B. sphaericus* et *P. fluorescens bvIII* dans le temps.

Tableau 16 : Equations des droites de régression, coefficients de corrélation et les valeurs des TL₅₀ des larves L5 de *L. migratoria* traitées au *Bacillus sp.*(HE805963)

Doses	L'équation de la droite de régression	Coefficient de Corrélation R ²	TL ₅₀
D1= 1,67 mg/ml	y= 3,286x + 1,835	0,82	9,19 Jours
D2= 0,62mg/ml	y= 2,351x +2,386	0,82	12,94 Jours
D3= 0,35mg/ml	y= 3,963x +0,475	0,87	13,87 Jours

Tableau 17 : Equations des droites de régression, coefficients de corrélation et les valeurs des TL₅₀ des larves L5 de *L. migratoria* traitées au *B. sphaericus*

Doses	L'équation de la droite de régression	Coefficient de Corrélation R ²	TL ₅₀
D1= 1,72 mg/ml	y= 1,281x + 3,337	0,80	19,87 Jours
D2= 0,75 mg/ml	y= 2,391x + 1,883	0,71	20,12 Jours
D3= 0,28 mg/ml	y= 3,277x +0,550	0,57	22,8 Jours

Tableau 18 : Equations des droites de régression, coefficients de corrélation et les valeurs des TL₅₀ des larves L5 de *L. migratoria* traitées au *P.fluorescens* bvIII

Doses	L'équation de la droite de régression	Coefficient de Corrélation R ²	TL ₅₀
D1=1,7 mg/ml	y= 3,654x + 2,476	0,74	4,91 Jours
D2= 0,65 mg/ml	y= 3,016x +1,651	0,89	12,90 Jours
D3= 0,31 mg/ml	y= 2,765x +1,714	0,79	15,43 Jours

D'après les tableaux ci-dessus, on remarque que les valeurs de R² sont toutes comprises entre 0 et 1 (0<R²<1), donc la corrélation est dite positive, ces valeurs sont proches de 1 ce qui signifie que la mortalité et le temps sont fortement corrélés (Held, 2010).

En effet, les temps létaux pour 50% des individus varient en fonction des bactéries et des concentrations appliquées (figure 31).

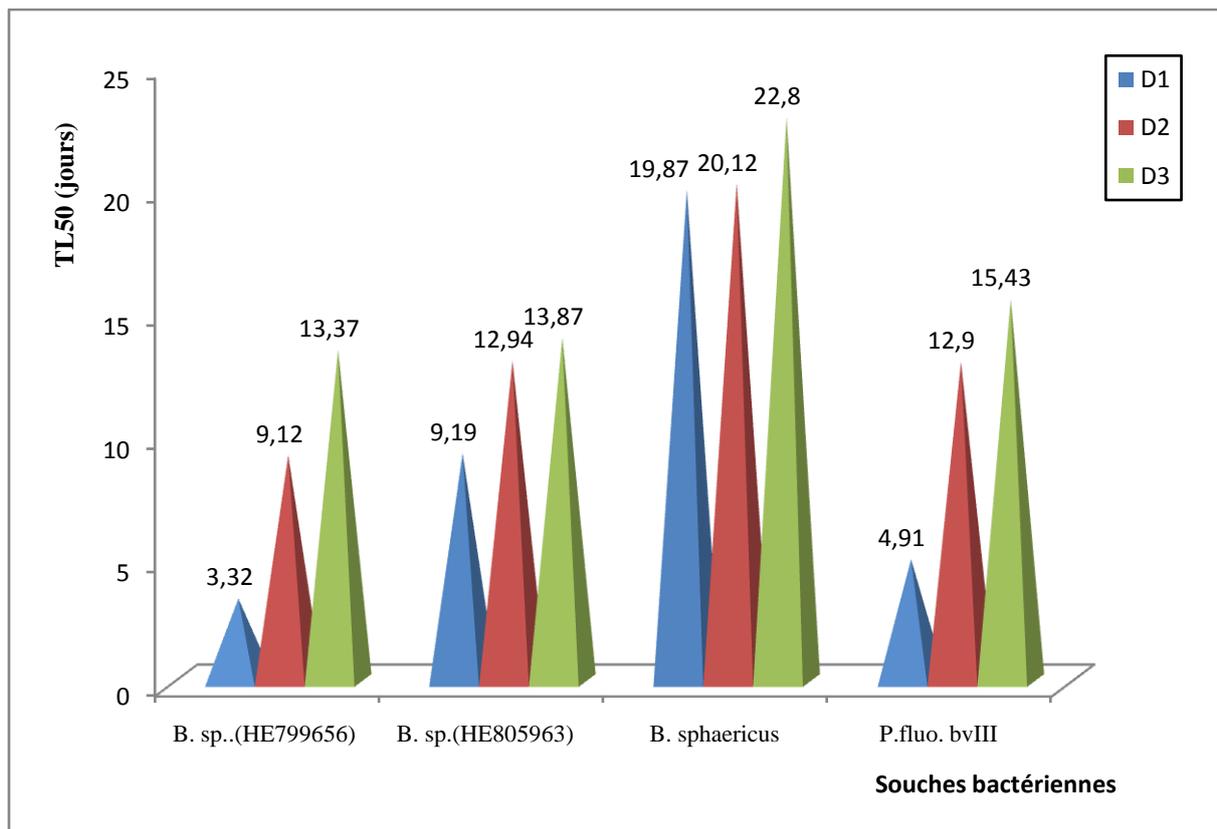


Figure 31 : TL₅₀ obtenus pour les larves L5 de *L.migratoria* traitées par 3 concentrations de *Bacillus sp.*(HE799656), *Bacillus sp.*(HE805963), *B. sphaericus* et *P.fluorescens* bvIII.

L'examen des TL₅₀ montre que les larves L5 de *L. migratoria* traitées par *Bacillus sp.*(HE799656) présente les TL₅₀ les plus faibles avec une valeur de 3,32 jours seulement enregistrée avec la forte dose ; 9,12 jours pour la dose moyenne et 13,37 jours pour la faible dose. Elles sont suivies des L5 traitées par *P. fluorescens* et ensuite celles traitées par *Bacillus sp.*(HE805963) avec respectivement 4,91 jours et 9,19 jours pour la forte dose, 12,90 jours et 12,94 jours pour la dose intermédiaire et 15,43 jours et 13,87 jours pour la faible dose . Enfin, les larves traitées par *B. sphaericus* présentent les TL₅₀ les plus élevés avec des valeurs allant de 19,87 à 22,8 jours pour les 3 doses utilisées.

2.5. Calcul des CL₅₀

Nous avons procédé au calcul des concentrations qui tuent 50% des individus de *L.migratoria* (CL₅₀) pour les 4 bactéries testées ; *Bacillus sp.*(HE799656), *Bacillus sp.*(HE805963), *Pseudomonas fluorescens* bvIII et *Bacillus sphaericus* après des délais entre fin de traitement et observation des mortalités.

Pour cela, nous avons transformé en probit les valeurs des pourcentages de mortalité corrigée et les concentrations en logarithmes décimaux (tableaux 19, 20, 21 et 22).

Tableau 19 : Probits des pourcentages de mortalité corrigée et logarithmes décimaux des concentrations chez les L5 de *L. migratoria* traitées par *Bacillus sp.*(HE799656)

		Probits		
Doses (mg/ml)		D1=1,6	D2= 0,59	D3= 0,33
	Log (dose*10)	1,20	0,77	0,52
	Temps			
	5 jours	5,25	3,85	3,59
	7 jours	5,61	4,73	3,84
	14 jours	8,09	5,52	4,98

Tableau 20 : Probits des pourcentages de mortalité corrigée et logarithmes décimaux des concentrations chez les L5 de *L. migratoria* traitées par *Bacillus sp.*(HE805963)

		Probits		
Doses (mg/ml)		D1=1,67	D2=0,62	D3= 0,35
	Log (dose*10)	1,22	0,79	0,54
	Temps			
	5 jours	4,73	3,96	3,84
	7 jours	4,98	3,96	4,10
	14 jours	5,54	4,65	4,98

Tableau 21 : Probits des pourcentages de mortalité corrigée et logarithmes décimaux des concentrations chez les L5 de *L. migratoria* traitées par *P. fluorescens* bvIII

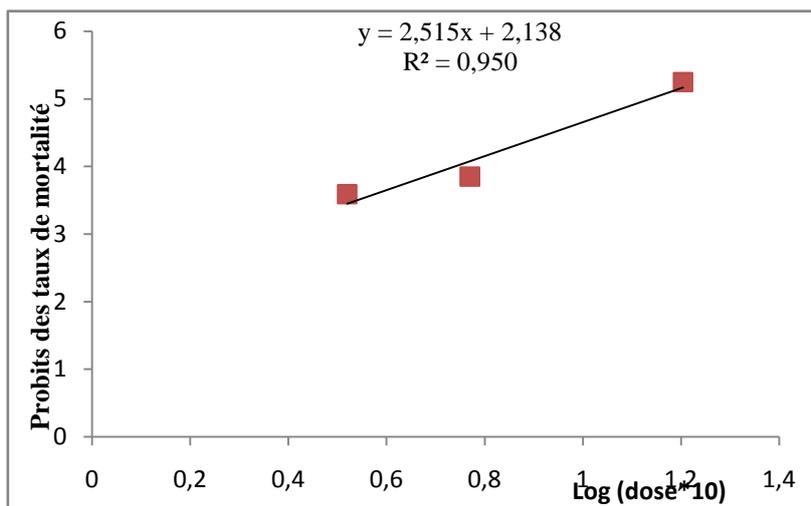
		Probits		
Doses (mg/ml)		D1=1,7	D2= 0,65	D3=0,31
	Log (dose*10)	1,23	0,813	0,491
	Temps			
	5 jours	4,98	4,11	3,85
	7 jours	4,98	4,30	4,11
	14 jours	5,73	4,94	4,81

Tableau 22 : Probits des pourcentages de mortalité corrigée et logarithmes décimaux des concentrations chez les L5 de *L. migratoria* traitées par *B. sphaericus*

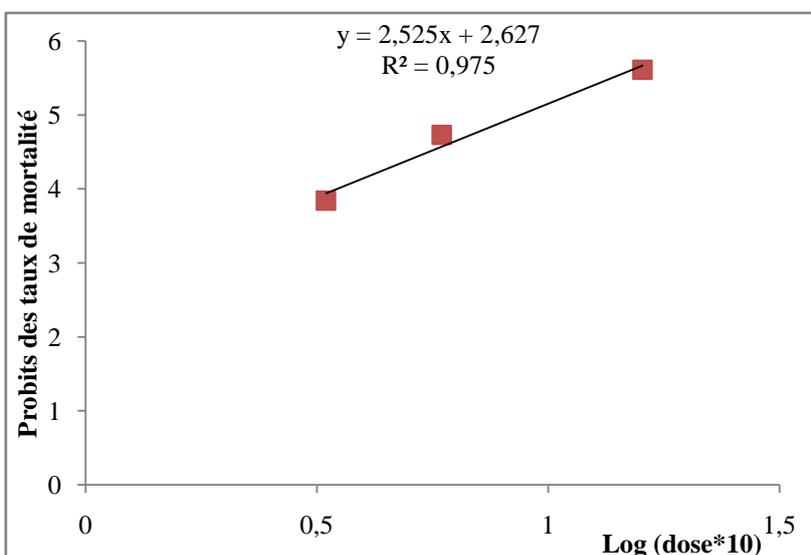
	Probits		
Doses (mg/ml)	D1=1,72	D2=0,75	D3= 0,28
Log (dose*10)	1,235	0,875	0,45
Temps			
5 jours	4,31	3,86	0
7 jours	4,35	3,86	0
14 jours	4,98	4,65	4,13

Ces valeurs nous permettent de tracer les droites de régression pour les 3 temps 5 jours ; 7 jours et 14 jours Chez les L5 de *L. migratoria* traitées par *Bacillus sp.*(HE799656), *Bacillus sp.*(HE805963) et *P. fluorescens bvIII*. Chez les larves traitées par *B. sphaericus*, les valeurs obtenues nous permettent de tracer la droite de régression uniquement pour le 14^{ème} jour (figures 32, 33, 34 et 35).

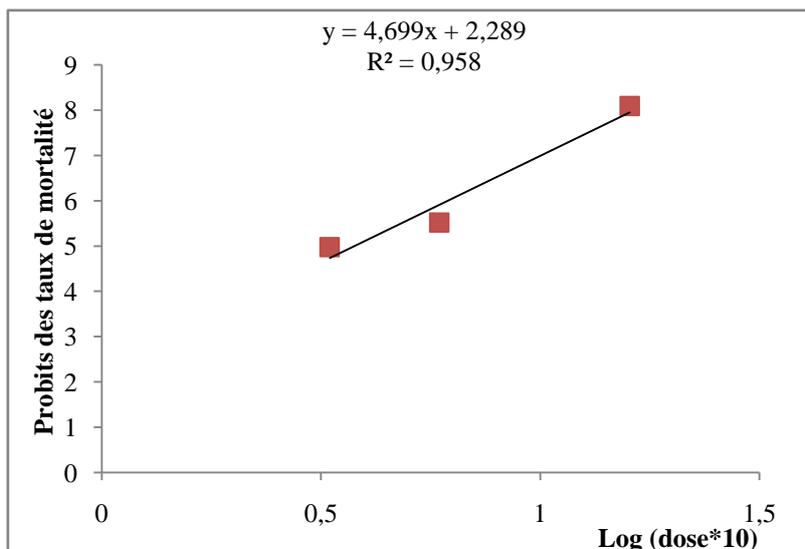
Par la suite les équations des droites de régression obtenues sont utilisées pour le calcul des CL₅₀ (Tableaux 23, 24 et 25 et 26).



J5

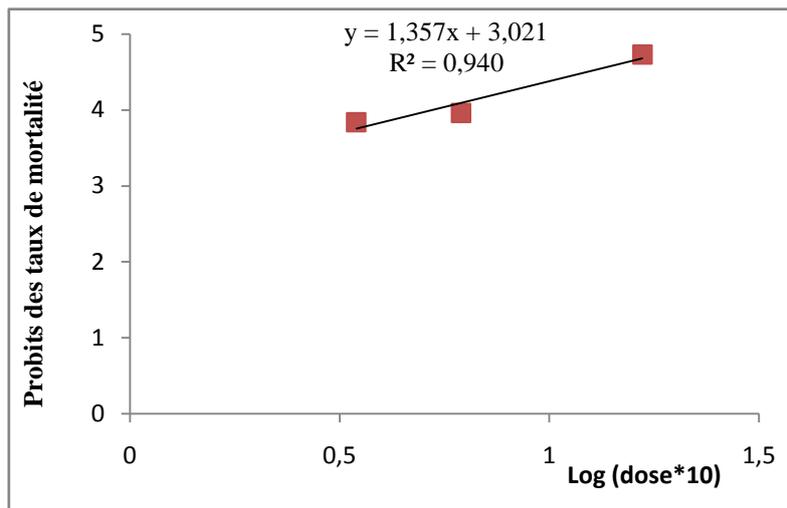


J7

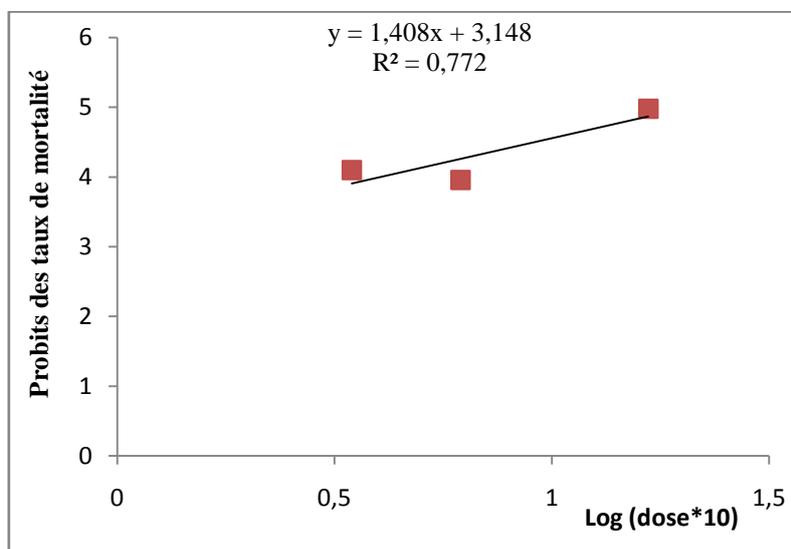


J14

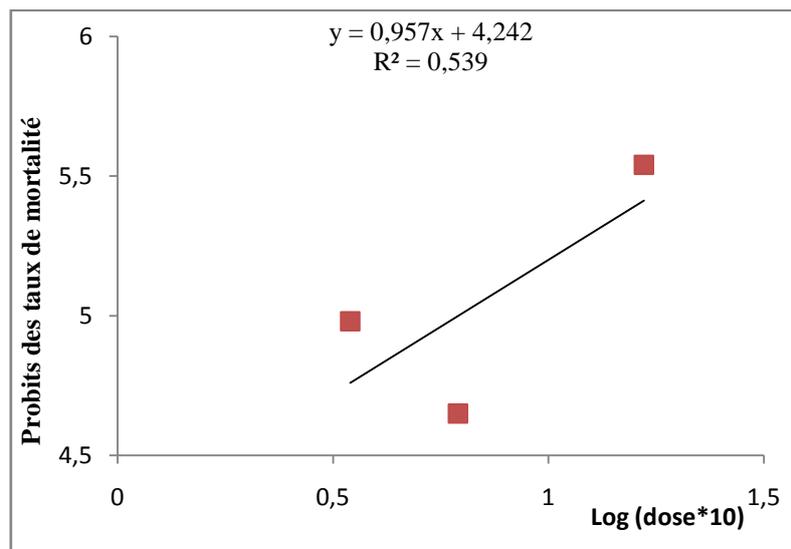
Figure 32 : Droites de régressions exprimant le taux de mortalités des larves L5 traitées par *Bacillus sp.*(HE799656) en fonction des concentrations



J5



J7



J14

Figure 33 : Droites de régressions exprimant le taux de mortalités des larves L5 traitées par *Bacillus sp.*(HE805963) en fonction des concentrations

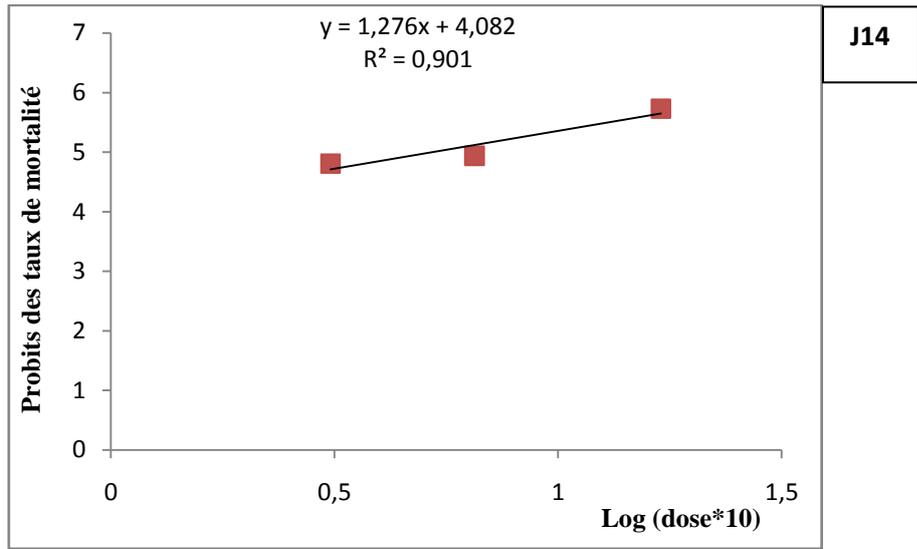
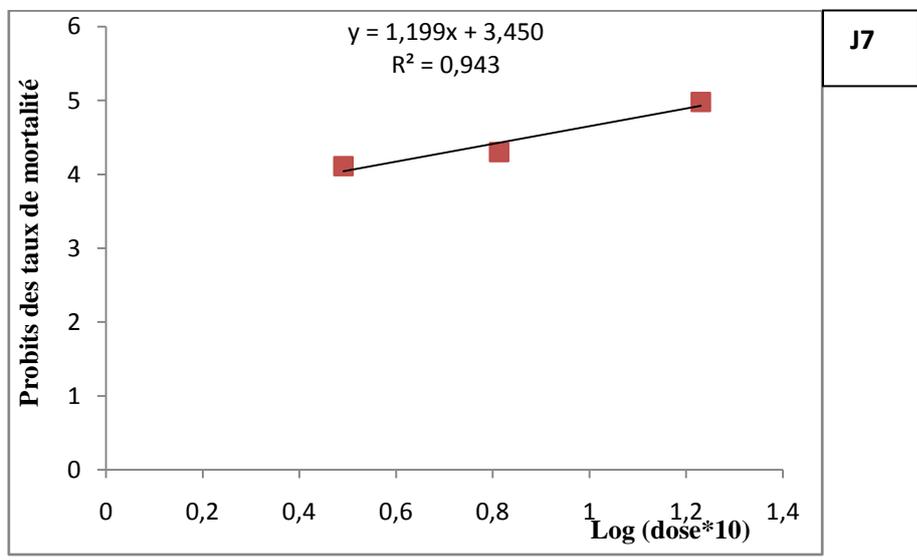
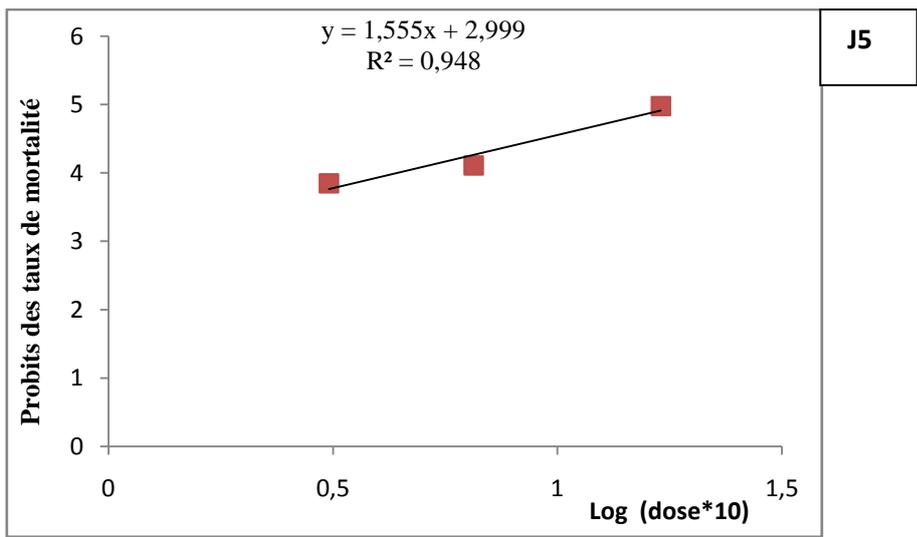


Figure 34 : Droites de régressions exprimant le taux de mortalités des larves L5 traitées par *P.fluorescens* bvIII en fonction des concentrations

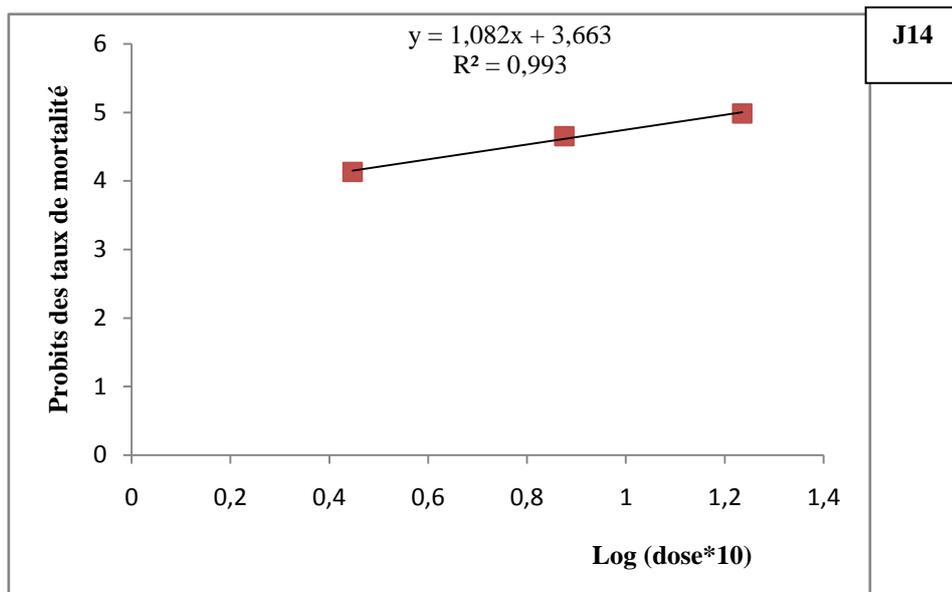


Figure 35 : Droites de régressions exprimant le taux de mortalités des larves L5 traitées par *Bacillus sphaericus* en fonction des concentrations

Tableau 23 : Equations des droites de régression, coefficients de corrélation et les valeurs des CL₅₀ des larves L5 de *L. migratoria* traitées au *Bacillus sp.*(HE799656)

Temps	L'équation de la droite de régression	Coefficient de Corrélation R ²	CL ₅₀ (mg/ml)
5 jours	y= 2,517x+ 2,1386	0,95	1,37
7 jours	y= 2,5255x + 2,6271	0,97	0,87
14 jours	y= 4,6995x+ 2,2898	0,96	0,38

Tableau 24 : Equations des droites de régression, coefficients de corrélation et les valeurs des CL₅₀ des larves L5 de *L. migratoria* traitées au *Bacillus sp.*(HE805963)

Temps	L'équation de la droite de régression	Coefficient de Corrélation R ²	CL ₅₀ (mg/ml)
5 jours	y= 1,3575x + 3,0219	0,94	2,86
7 jours	y= 1,4082x + 3,1488	0,77	2,06
14 jours	y= 0,9575x + 4,2421	0,54	0,62

Tableau 25 : Equations des droites de régression, coefficients de corrélation et les valeurs des CL₅₀ des larves L5 de *L. migratoria* traitées au *B. sphaericus*

Temps	L'équation de la droite de régression	Coefficient de Corrélation R ²	CL ₅₀ (mg/ml)
5 jours	-	-	-
7 jours	-	-	-
14 jours	y= 1,0829x + 3,6637	0,99	1,71

Tableau 26 : Equations des droites de régression, coefficients de corrélation et les valeurs des CL₅₀ des larves L5 de *L. migratoria* traitées au *P. fluorescens* bvIII

Temps	L'équation de la droite de régression	Coefficient de Corrélation R ²	CL ₅₀ (mg/ml)
5 jours	y= 1,5559x+ 2,9991	0,95	1,93
7 jours	y= 1,1991x + 3,4505	0,94	1,95
14 jours	y= 1,2762x + 4,0821	0,90	0,52

D'après les résultats obtenus, on remarque que les valeurs de R² sont toutes comprises entre 0 et 1, la corrélation est donc positive, ces valeurs sont presque toutes proches de 1 se qui signifie que la mortalité et les concentrations sont fortement corrélés (Held, 2010).

Il se révèle aussi selon les tableaux ci-dessus, que les concentrations létales pour 50% des individus varient dans le temps en fonction des bactéries.

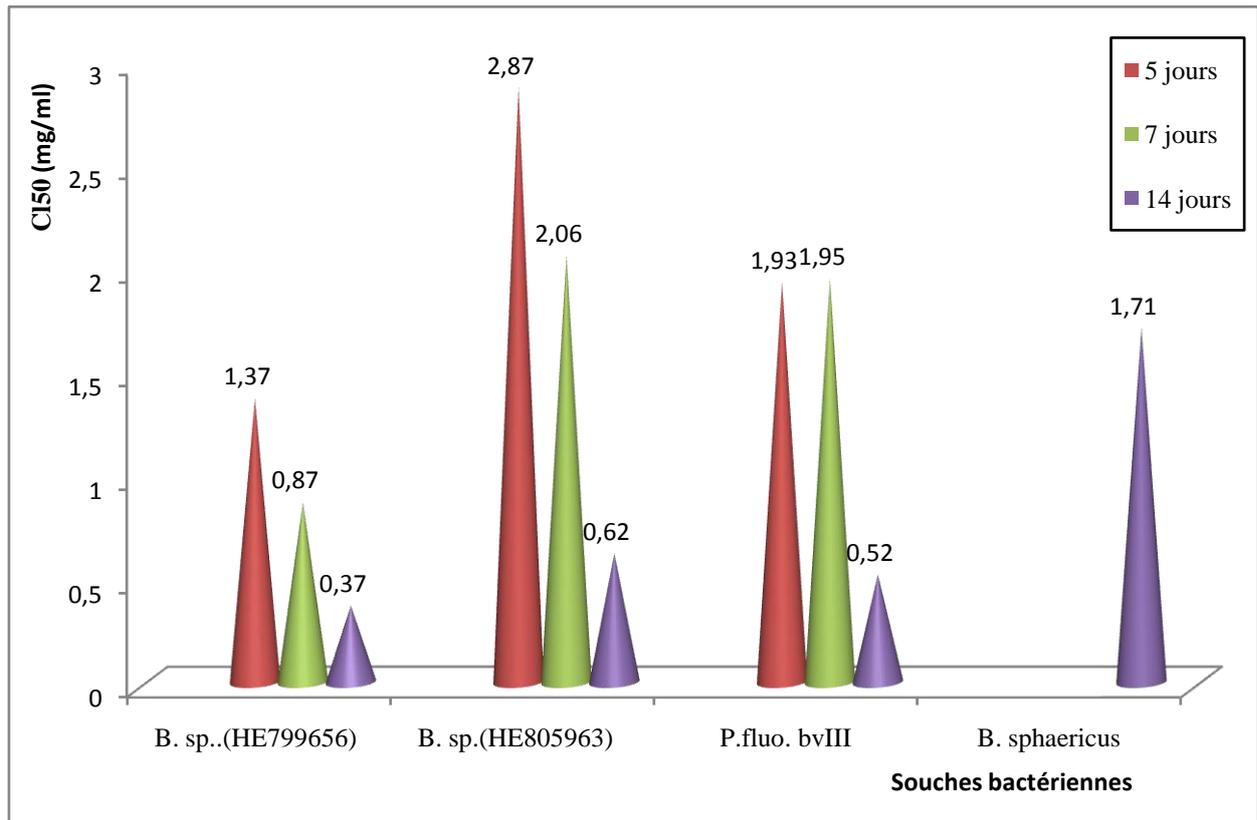


Figure 36 : CL₅₀ obtenus pour les larves L5 de *L.migratoria* traitées par 3 concentrations de *Bacillus sp.*(HE799656), *Bacillus sp.*(HE805963), *P.fluorescens bvIII* et *B. sphaericus*.

On constate d'après la figure 36 que plus le temps augmente, la CL₅₀ diminue. En effet, les CL₅₀ les plus faibles sont obtenues le 14^{ème} jour avec 0,37mg/ml, 0,52 mg/ml, 0,62 mg/ml et 1,71 mg/ml respectivement pour les souches *Bacillus sp.*(HE799656), *P. fluorescens* bv III, *Bacillus sp.*(HE805963) et *B. sphaericus*.

Les CL₅₀, les plus élevées sont enregistrées le 5^{ème} jour et la souche *Bacillus sp.*(HE799656) présente les CL₅₀, les plus faibles dans tous les temps (5, 7 et 14 jours après traitement).

3. Effet des bactéries sur le développement larvaire de *L. migratoria*

La durée de développement larvaire a été calculée en tenant compte des mues larvaires depuis la 4^{ème} mue jusqu'au stade imaginal. Les résultats de la durée de développement des L5 de *L. migratoria* témoins et traitées par *Bacillus sp.*(HE799656) (1,60 mg/ml, 0,59 mg/ml et 0,33 mg/ml), *Bacillus sp.*(HE805963) (1,67 mg/ml, 0,62 mg/ml et 0,35 mg/ml.), *Bacillus sphaericus* (1,72 mg/ml, 0,75 mg/ml et 0,28 mg/ml) et *Pseudomonas fluorescens* bvIII (1,7 mg/ml, 0,65 mg/ml et 0,31 mg/ml) sont illustrés sur la figure 37.

D₁ correspond à la forte concentration, D₂ et D₃ correspondent à la moyenne et faible concentrations.

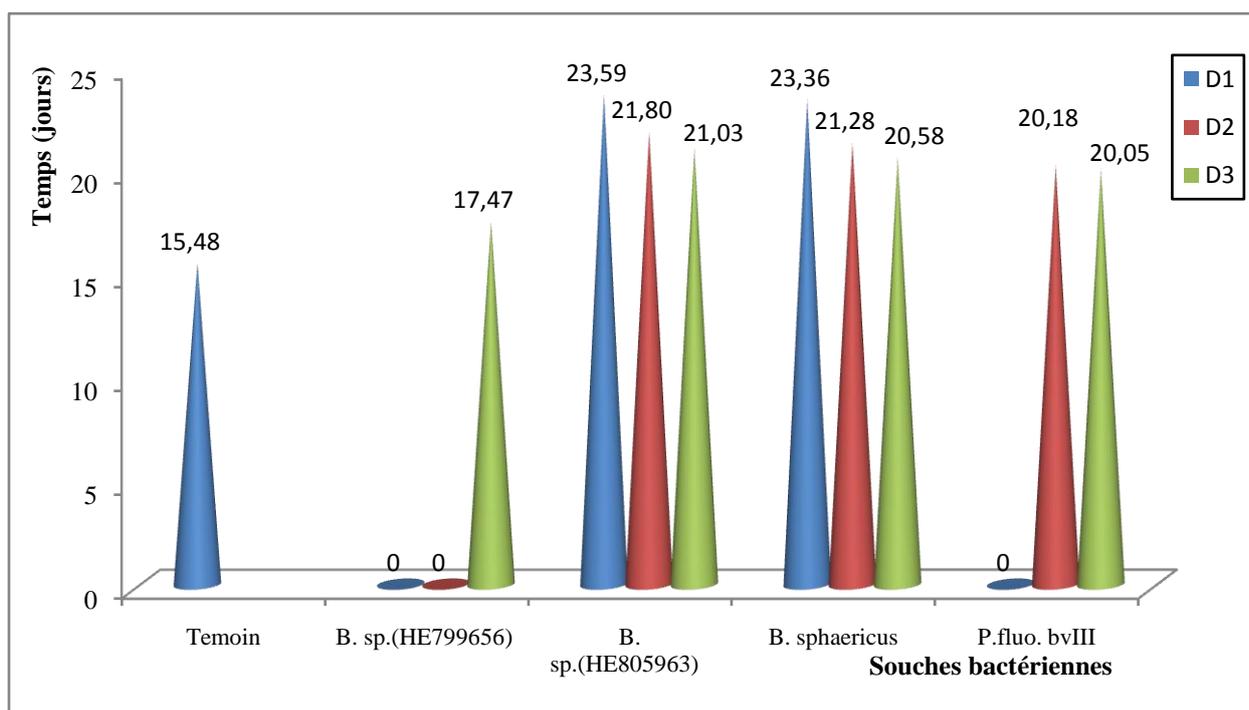


Figure 37 : Durées moyennes de développement larvaire chez les L5 de *L. migratoria* traitées par les bactéries *Bacillus sp.*(HE799656), *Bacillus sp.*(HE805963), *B. sphaericus* et *P.fluorescens* bvIII.

Il s'avère d'après les résultats obtenus que la durée moyenne de développement des larves L5 est de 15,48 pour les individus témoins. La durée du 5^{ème} stade larvaire chez les individus traités par la D3 de *Bacillus sp.* (HE799656) est de 20,56 jours avec la mort de l'ensemble des larves traitées par les D1 et D2 avant l'achèvement du 5^{ème} stade et le passage au stade imago. Quant à la souche bactérienne *Bacillus sp.*(HE805963), les durées de développement enregistrées sont de 23,59 ; 21,80 et 21,03 respectivement pour les larves traitées par D1, D2 et D3 contre 23,36 ; 21,28 et 20,58 jours chez les larves traitées par les dose D1, D2 et D3 de la bactérie *B.sphaericus*.

Enfin le stade L₅ dure 20.18 et 20,05 respectivement chez les larves traitées par les D2 et D3 de *P. fluorescens* bvIII avec la mort de l'ensemble des larves traitées par la dose D1 de la même bactérie.

Les témoins présentent donc, les durées les plus courtes, les individus traités par les doses D3 et D2 ont les durées de développement intermédiaires alors que ceux traités par la dose D1 ont enregistré les durées les plus longues. Nous signalons aussi des mortalités des difficultés de la mue imaginale et des malformations chez les survivants.

➤ Analyse statistique

On a fait appel à l'analyse de la variance à 2 critères de classification suivie du test de Tucky pour la comparaison des moyennes.

Le facteur 1 : dose avec 3 niveaux (D1, D2 et D3)

Le facteur 2 : traitement avec 2 niveaux (témoin et traités)

Les résultats de cette analyse sont portés sur l'annexe 12

L'ANOVA indique une différence très hautement significative au seuil de 5% ($P < 0,0001$) entre le lot témoin et les lots traités par les 2 bactéries *Bacillus sp.*(HE805963) et *B.sphaericus*, de même l'application du test de Tuky montre pour les 2 bactéries une différence significative pour les combinaisons (T, D1), (T, D2) et (T, D3) et (D1, D3), néanmoins ; les effets des deux doses (D1, D2) et (D2, D3) ne sont pas statistiquement différents.

4. Effet des bactéries sur la composition hémolympatique de *L.migratoria*

4.1. Effet sur les protéines hémolympatiques

4.1.1. Analyse quantitative

Le tableau 27 porte l'ensemble des résultats relatifs à l'effet des bactéries *Bacillus sp.*(HE799656) (0,59 mg/ml et 0,33 mg/ml), *Bacillus sp.*(HE805963) (0,62 mg/ml et 0,35 mg/ml.), *Bacillus sphaericus* (0,75 mg/ml et 0,28 mg/ml) et *Pseudomonas fluorescens* bvIII (0,65 mg/ml et 0,31 mg/ml) sur les protéines hémolympatiques. (D1 c'est la forte concentration et D2 c'est la faible concentration bactérienne utilisée).

Tableau 27 : Les concentrations(C) en protéines hémolympatiques chez les individus traités par *Bacillus sp.*(HE799656), *Bacillus sp.*(HE805963), *B. sphaericus* et *Pseudomonas fluorescens* III.

Individus	Témoin	<i>Bacillus sp.</i> (HE799656)		<i>Bacillus sp.</i> (HE805963)		<i>B. sphaericus</i>		<i>Pseudomonas fluorescens</i> III	
		D1	D2	D1	D2	D1	D2	D1	D2
C (mg/ml)	0,466 ± 0,044	1,073 ± 0,253	1,318 ± 0,267	1,611 ± 0,219	1,665 ± 0,268	0,109 ± 0,017	0,141 ± 0,039	0,083 ± 0,016	0,141 ± 0,035

D'après les résultats obtenus sur le tableau n°27, on constate que le taux des protéines est élevé chez les individus traités par *Bacillus sp.*(HE799656) et *Bacillus sp.*(HE805963) comparativement aux témoins.

En effet, on a enregistré un taux de protéines de 1,611 mg/ml et 1,665 mg/ml respectivement chez les individus traités par les doses D1 et D2 de *Bacillus sp.*(HE805963). Chez ceux traités par *Bacillus sp.*(HE799656) ; la concentration des protéines est de 1,073 mg/ml et 1,318 mg/ml pour la faible et la forte dose respectivement, contre un taux de 0,467 mg/ml enregistré chez les témoins.

En revanche, on constate une nette diminution de la concentration des protéines chez les individus traités par les 2 doses de *B. sphaericus* et *Pseudomonas fluorescens* III par rapport aux témoins. Notons également que plus la dose est élevée, plus la concentration en protéines diminue.

En effet ; chez les larves traitées par *B. sphaericus*, les concentrations enregistrées sont de 0,109 mg/ml et 0,141 mg/ml pour les doses D1 et D2 respectivement contre 0,466 mg/ml pour les témoins. De même ; d'après les résultats obtenus chez les larves traitées par la bactérie *Pseudomonas fluorescens* III ; les concentrations enregistrées sont de 0,083 mg/ml et 0,141 mg/ml pour les doses D1 et D2 respectivement.

➤ Analyse statistique

On a fait appel à l'analyse de la variance suivie du test de Tukey pour la comparaison des moyennes. Les résultats de cette analyse sont portés sur l'annexe 14.

L'analyse de la variance révèle une différence hautement significative ($P < 0,0001$) entre les teneurs en protéine chez les individus traités par *Bacillus sp.*(HE805963) et les témoins ; ainsi pour la souche *Bacillus sp.*(HE799656), *B. sphaericus* et *P. fluorescens* bv III et les témoins.

Selon le test de Tukey appliqué pour l'ensemble des bactéries testées ; les teneurs enregistrées diffèrent significativement pour les combinaisons ; (D0, D1) et (D0, D2), cependant les 2 doses utilisées ; D1 et D2 ne montrent pas de différence significative.

4.1.2. Aspect qualitative : Profil électrophorétique des protéines

Pour mieux comprendre la diminution du taux des protéines hémolympatiques enregistrée chez les larves L₅ de *Locusta migratoria* traitées par *P. fluorescens* bv III, nous avons procédé à une étude qualitative par un profil électrophorétique de l'hémolymphe chez les larves traitées par *P. fluorescens* bv III (1,7 mg/ml) comparées avec d'autres que nous avons traité par *Bacillus sp.*(HE799656) (0,59 mg/ml), les résultats sont comme suit :

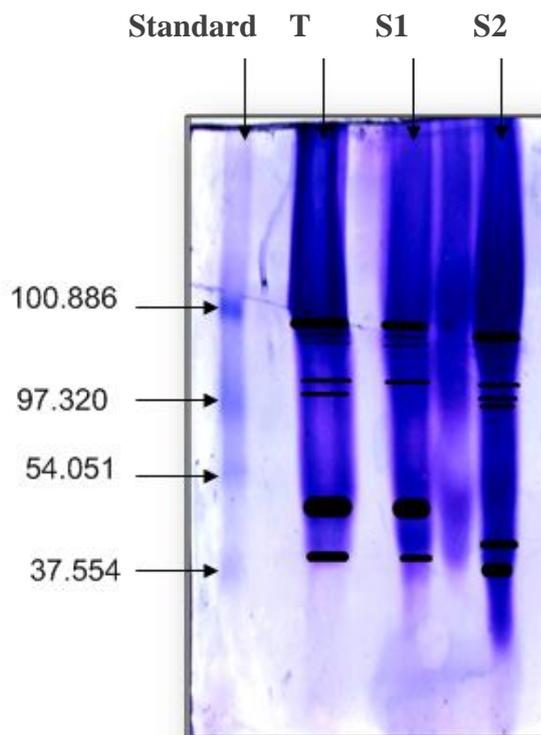


Figure 38: Profil électrophorétique des protéines hémolympathiques des larves L5 de *L. migratoria* traitées par 2 souches bactériennes
T: témoin. *S1* : *P. fluorescens* bvIII. *S2* : *Bacillus* sp.(HE799656)

Afin de déduire les poids moléculaires des protéines hémolympathiques, nous avons d'abord tracé la courbe logarithme décimal du poids moléculaires (PM) en fonction de la mobilité relative (Rf) des marqueurs Bisrad Prestained SDS-PAGE standards Low Rang (figure 39).

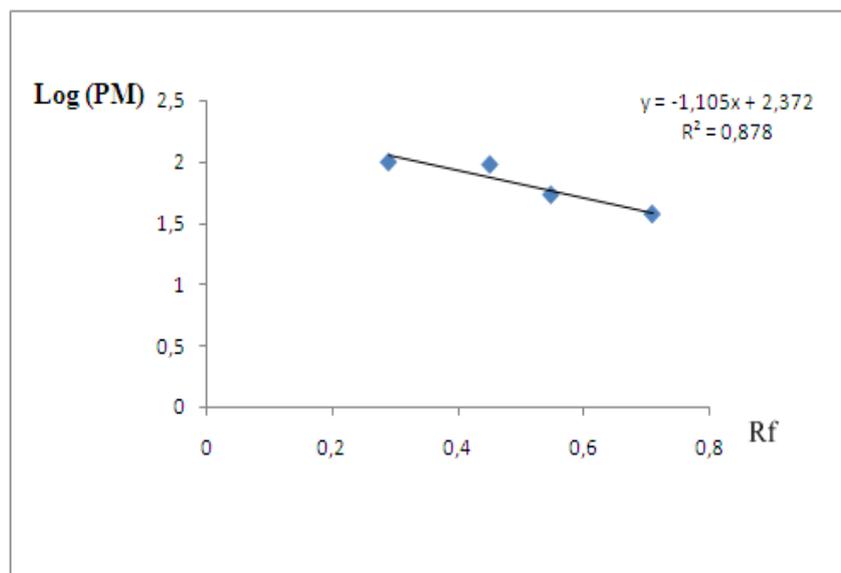


Figure 39 : Courbe de référence exprimant le logarithme décimal du poids moléculaires (PM) en fonction de la mobilité relative (Rf) des protéines marqueurs

Les poids moléculaires (PM) et les mobilités relatives (Rf) des protéines hémolympheiques sont consignés dans le tableau 28.

Tableau 28 : Poids moléculaires (PM) et les mobilités relatives (Rf) des protéines hémolympheiques des larves L₅ de *Locusta migratoria* traitées au *P. fluorescens* III et *Bacillus sp.*(HE799656)

N° de la bande	Témoins			<i>P. fluorescens</i> III			<i>Bacillus sp.</i> (HE799656)		
	Rf	Log(PM)	PM(Da)	Rf	Log(PM)	PM(Da)	Rf	Log(PM)	PM(Da)
1	0.317	2.02	105.127	0.317	2.02	105.127	0.349	1.98	96.906
2	0.333	2.00	100.933	0.333	2.00	100.933	0.380	1.95	89.557
3	0.349	1.98	96.906	0.357	1.97	94.954	0.412	1.91	82.554
4	0.380	1.95	89.557	0.380	1.95	89.557	0.428	1.89	79.261
5	0.412	1.91	82.544	-	-	-	0.507	1.81	64.828
6	0.587	1.72	52.888	0.587	1.72	52.888	0.587	1.72	52.888
7	0.650	1.65	45.055	0.650	1.65	54.055	0.682	1.61	41.532

Le profil électrophorétique met en évidence 7 fractions protéiques chez les témoins, ces fractions protéiques sont caractérisées par leurs mobilités relatives (Rf) et leurs poids moléculaires (PM) qui varient de 45,055 Da à 105,127 Da.

Le traitement avec *P. fluorescens* III a engendré une réduction de nombre des fractions protéiques (6 bandes) avec des poids moléculaires qui varient de 52,888 Da à 105,127 Da comparativement au témoin (7 bandes).

Par contre, après traitement par *Bacillus sp.*(HE799656), le nombre de bandes protéiques est le même en comparaison avec les témoins (7 bandes) avec un poids moléculaire qui varie de 41,532 Da à 96,906 Da.

4.2. Effet des bactéries sur les glucides hémolympheiques

Les valeurs des concentrations en glucides hémolympheiques des L₅ de *Locusta migratoria* témoins et traitées par *Bacillus sp.*(HE799656) (0,59 mg/ml et 0,33 mg/ml), *Bacillus sp.*(HE805963) (0,62 mg/ml et 0,35 mg/ml.), *Bacillus sphaericus* (0,75 mg/ml et 0,28 mg/ml) et *Pseudomonas fluorescens* bvIII (0,65 mg/ml et 0,31 mg/ml) sont consignées sur le tableau 29.

Tableau 29 : Les concentrations(C) des échantillons en glucides chez les individus traités par *Bacillus sp.*(HE799656), *Bacillus sp.*(HE805963) et *B. sphaericus* et par *Pseudomonas fluorescens* III

Individus	Témoin	<i>Bacillus sp.</i> (HE799656)		<i>Bacillus sp.</i> (HE805963)		<i>B. sphaericus</i>		<i>Pseudomonas fluorescens</i> III	
		D1	D2	D1	D2	D1	D2	D1	D2
C (mg/ml)	0.771 ± 0,037	0,471 ± 0,068	0,567 ± 0,132	0,671 ± 0,123	0,528 ± 0,179	0,133 ± 0,04	0,229 ± 0,032	1,242 ± 0,218	0,974 ± 0,180

D1 : la forte concentration bactérienne utilisée, D2 : la faible concentration bactérienne utilisée

L'examen comparatif des résultats obtenus pour le témoin et pour les L₅ traités à l'aide des bactéries *Bacillus sp.*(HE799656), *Bacillus sp.*(HE805963) et *B. sphaericus* conduit principalement à deux observations :

- Après injection des bactéries aux larves L₅ de *L. migratoria*, ces dernières ont montré une diminution importante de la teneur en glucides hémolympatiques comparativement aux témoins notamment avec la souche *B. sphaericus*.

- Plus la concentration bactérienne est élevée plus la teneur en glucides diminue ; la teneur en glucides est de 0,671 ; 0,471 et 0,133 mg/ml pour la forte dose D1 des 3 bactéries, tandis que pour la faible dose D2 ; elle est respectivement de 0,528 ; 0,567 et 0,229 mg/ml.

Par ailleurs ; les résultats de dosage nous montrent que la concentration en glucides est relativement élevée chez les larves traitées par *Pseudomonas fluorescens* III comparativement aux témoins. On note que plus la dose est élevée plus la concentration en glucides est élevée. Les concentrations enregistrées sont de 1,242 mg/ml et 0,974 mg/ml chez les larves traitées par *P. fluorescens* III avec les doses respectives D1 et D2.

➤ Analyse statistique

L'analyse de la variance suivie du test de Tukey pour la comparaison des moyennes est consignée sur l'annexe 15 :

L'ANOVA indique une différence hautement significative au seuil de 5% ($P < 0,0001$) entre le lot traité et le lot témoin pour la bactérie *B. sphaericus* ; significative pour la souche *Bacillus sp.*(HE799656), et non significative pour les 2 souches de *Bacillus sp.*(HE805963) et *Pseudomonas fluorescens* III

Le test de Tukey révèle une différence significative pour toutes les combinaisons (D0, D1), (D0, D2) et (D1, D2) concernant la bactérie de *B. sphaericus* ; cependant pour la souche bactérienne *Bacillus sp.*(HE799656) ; la différence est significative uniquement pour les combinaisons (D0, D1) et (D0, D2). Concernant la souche *Bacillus sp.*(HE805963) ; la différence est significative uniquement pour la combinaison (D0, D2). Enfin le traitement par *P.fluorescens* III a montré une différence non significative de la teneur en glucides pour toutes les combinaison.

5. Effet des bactéries sur l'histologie de l'appareil digestif de *Locusta migratoria*

L'observation à l'œil nu du tube digestif des individus traités par les 4 bactéries *Bacillus sp.*(HE799656) (1,60 mg/ml), *Bacillus sp.*(HE805963) (1,67 mg/ml), *Bacillus sphaericus* (1,72 mg/ml) et *Pseudomonas fluorescens* bvIII (1,7 mg/ml) ne montre pas de lésions ou de déformations morphologiques.

L'observation au microscope photonique a permis une meilleure comparaison entre les différents organes des individus témoins et traités ce qui a conduit donc à bien visualiser les modifications histologiques (voir figures 40, 41, 42, 43 et 44).

Figure 40 : Coupes histologiques transversales du jabot chez les L5 de *L. migratoria* témoins et traitées (coloration de Mallory) (Obj. X 40).

A : Chez les individus témoins de *L.migratoria*

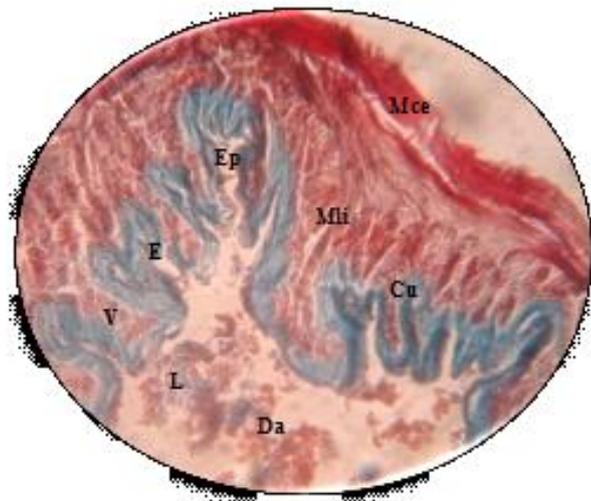
B: Chez les individus de *L.migratoria* traités par *Bacillus sp.*(HE799656)

C: Chez les individus de *L.migratoria* traités par *Bacillus sp.*(HE805963)

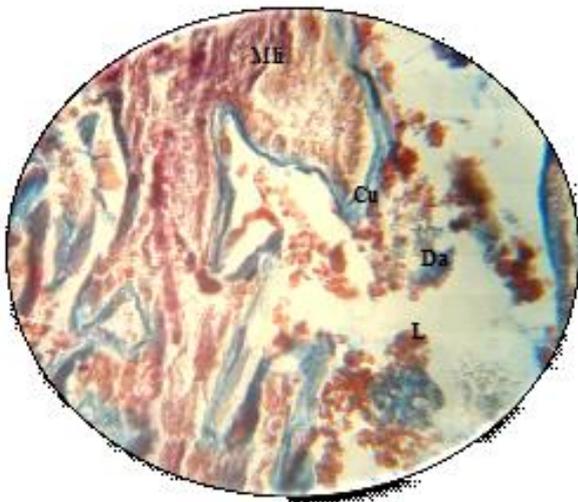
D : Chez les individus de *L.migratoria* traités par *B sphaericus*

E: Chez les individus de *L.migratoria* traités par *P. fluorescens* bv III

Cu : cuticule, *Da* : débris alimentaires, *E* : épithélium intestinale, *Ep* : épines, *L* : lumière intestinale, *Mce* : muscles circulaires externes, *Mli*: muscle longitudinale interne, *V* : Villosités



A



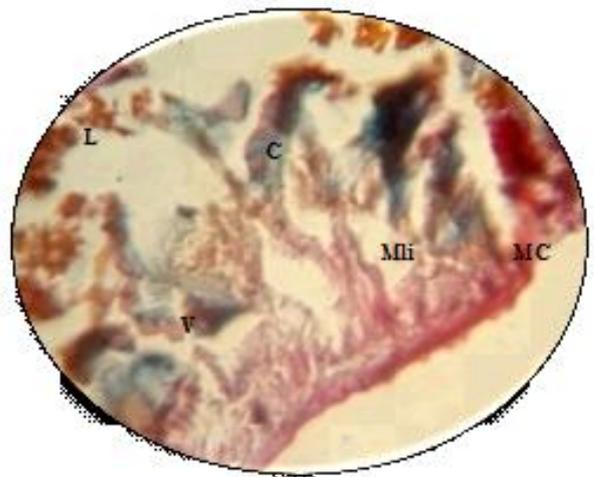
B



C



D



E

Figure 41 : Coupes histologiques transversales du gésier chez les L5 de *L. migratoria* témoins et traitées (coloration de Mallory) (Obj. X 40).

A : Chez les individus témoins de *L.migratoria*

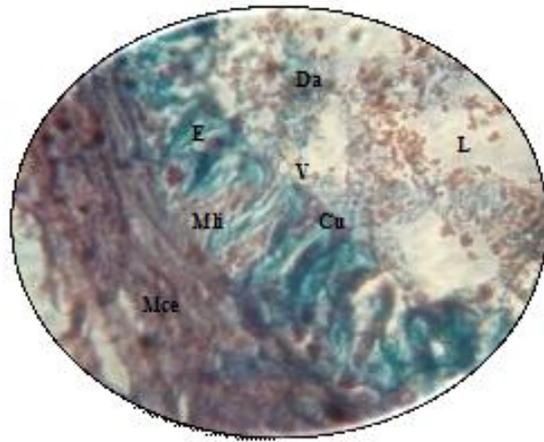
B: Chez les individus de *L.migratoria* traités par *Bacillus sp.*(HE799656)

C: Chez les individus de *L.migratoria* traités par *Bacillus sp.*(HE805963)

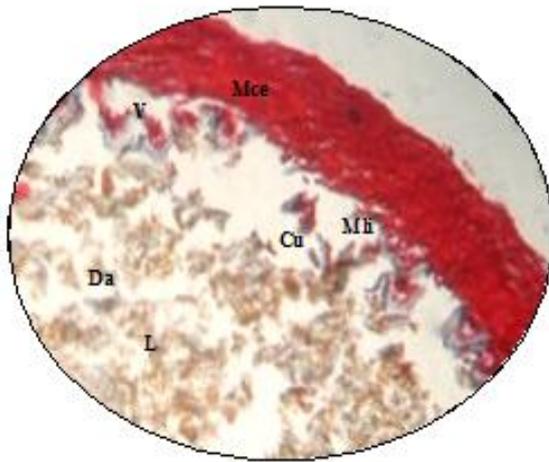
D: Chez les individus de *L.migratoria* traités par *B sphaericus*

E : Chez les individus de *L.migratoria* traités par *P. fluorescens* bv III

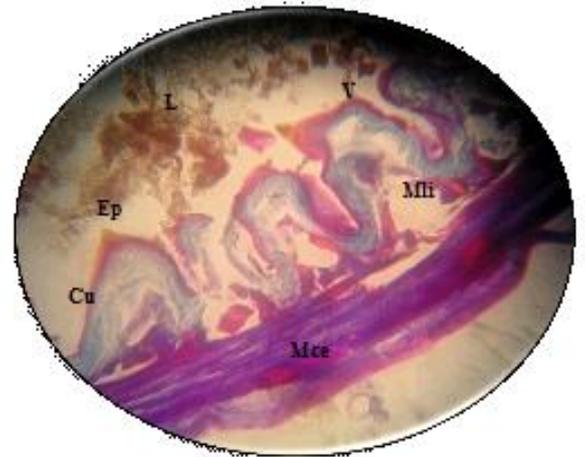
Cu : cuticule, ***Da*** : débris alimentaires, ***E*** : épithélium intestinale, ***Ep*** : épines, ***L*** : lumière intestinale, ***Mc Mce*** : muscles circulaires externes, ***Mli***: muscles longitudinaux internes, ***V*** : Villosités



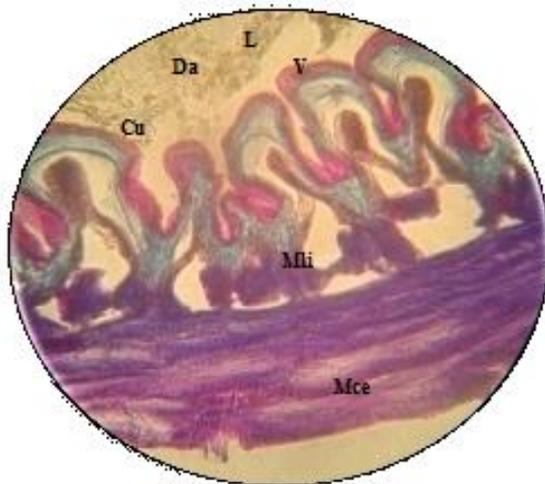
A



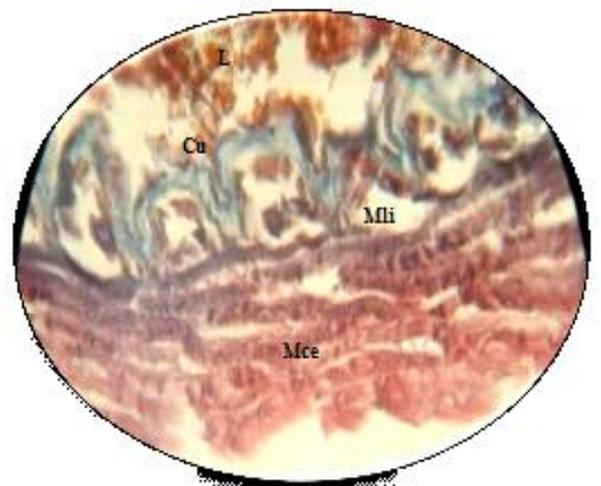
B



C



D



E

Figure 42 : Coupes histologiques transversales de l'intestin moyen chez les L5 de *L. migratoria* témoins et traitées (coloration de Mallory) (Obj. X 40).

A : Chez les individus témoins de *L. migratoria*

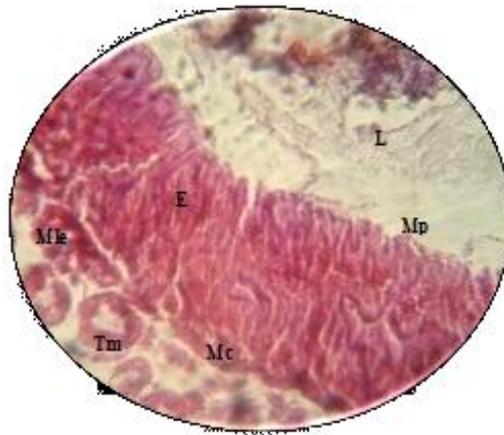
B : Chez les individus de *L. migratoria* traités par *Bacillus sp.*(HE799656)

C: Chez les individus de *L. migratoria* traités par *Bacillus sp.*(HE805963)

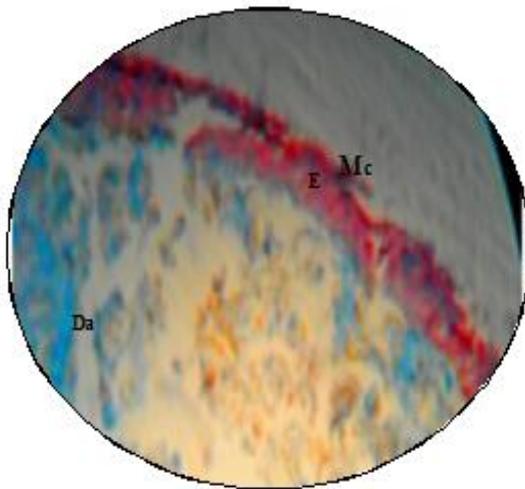
D : Chez les individus de *L. migratoria* traités par *B. sphaericus*

E : Chez les individus de *L. migratoria* traités par *P. fluorescens* bv III

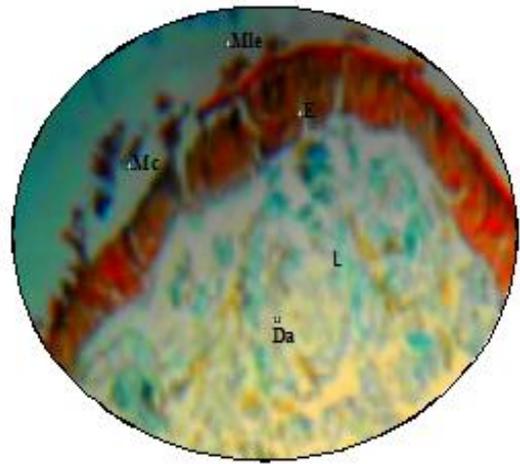
Da : débris alimentaires, **E** : épithélium intestinale, **L** : lumière intestinale, **Mce** : muscles circulaires, **Mle**: muscles longitudinaux externes, **Mp** : membrane péritrophique, **Tm** : tubes de malpighie, **V** : Villosités



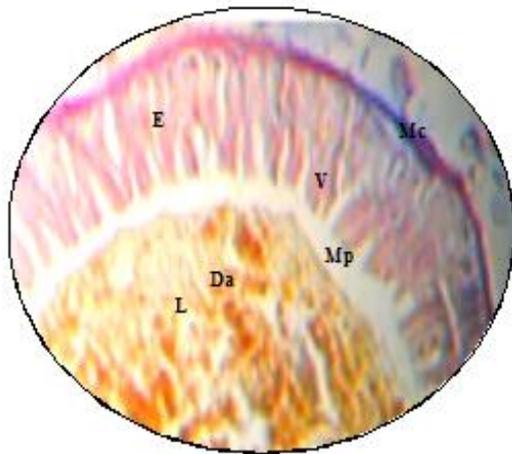
A



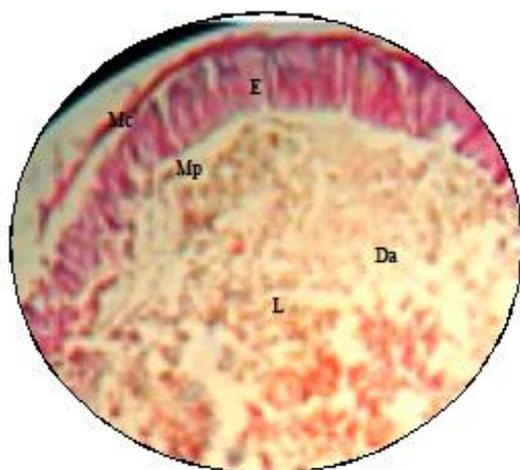
B



C



D



E

Figure 43 : Coupes histologiques transversales du Caecum gastrique chez les L5 de *L. migratoria* témoins et traitées (coloration de Mallory) (Obj. X 40).

A : Chez les individus témoins de *L.migratoria*

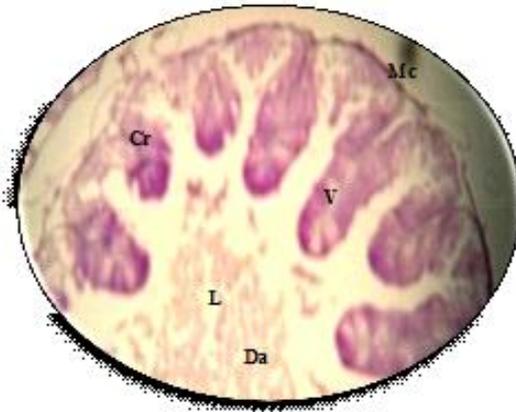
B: Chez les individus de *L.migratoria* traités par *Bacillus sp.*(HE799656)

C: Chez les individus de *L.migratoria* traités par *Bacillus sp.*(HE805963)

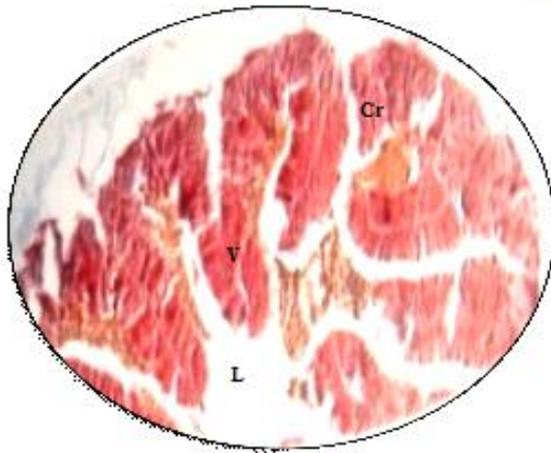
D : Chez les individus de *L.migratoria* traités par *B sphaericus*

E : Chez les individus de *L.migratoria* traités par *P. fluorescens* bv III

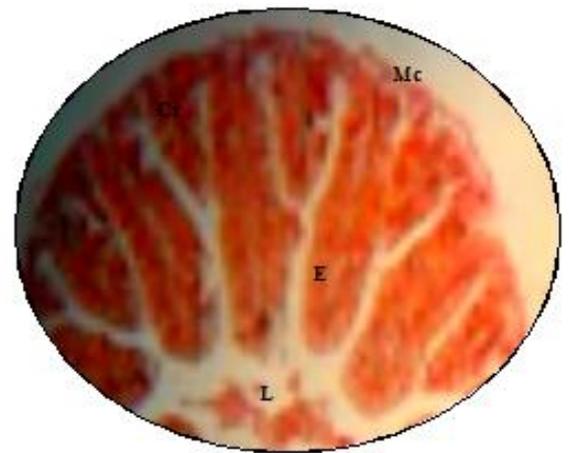
Cr : Cryptes de régénération, , **Da** : débris alimentaires, **E** : épithélium intestinale, **L** : lumière intestinale, **Mc** : muscle circulaires, **V** : Villosités.



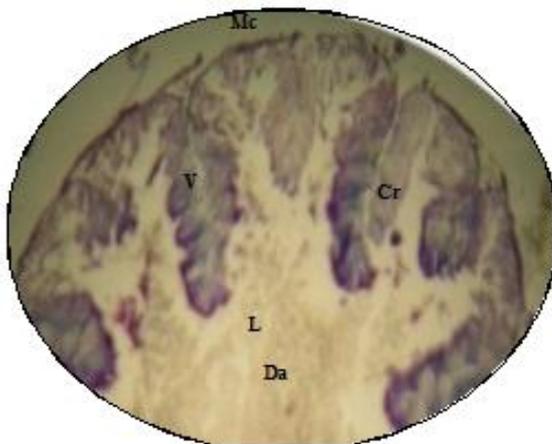
A



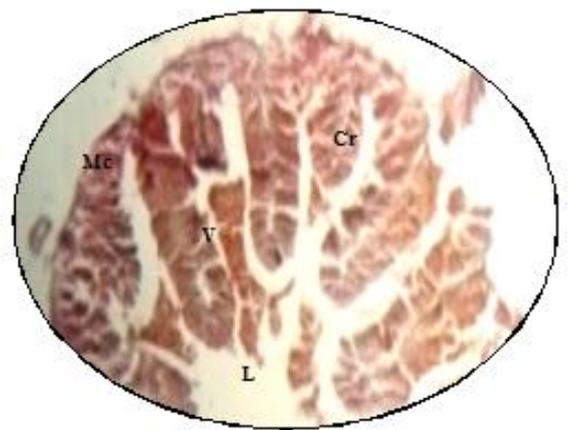
B



C



D



E

Figure 44 : Coupes histologiques transversales du Colon chez les L5 de *L. migratoria* témoins et traitées (coloration de Mallory) (Obj. X 40).

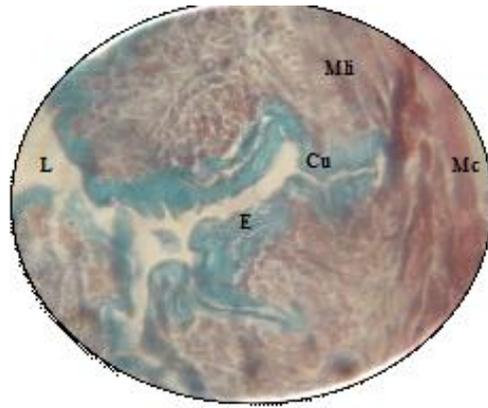
A : Chez les individus témoins de *L. migratoria*

B: Chez les individus de *L. migratoria* traités par *Bacillus sp.*(HE799656)

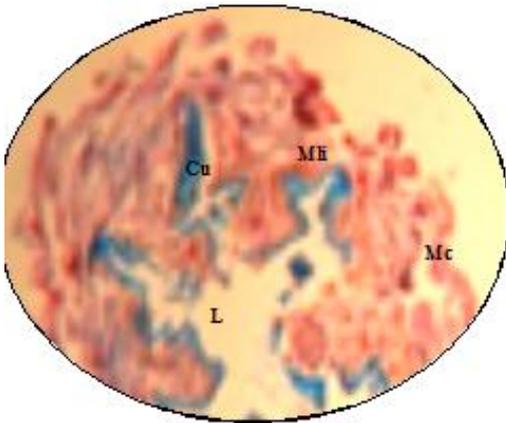
C : Chez les individus de *L. migratoria* traités par *Bacillus sp.*(HE805963)

D : Chez les individus de *L. migratoria* traités par *P. fluorescens* bv III

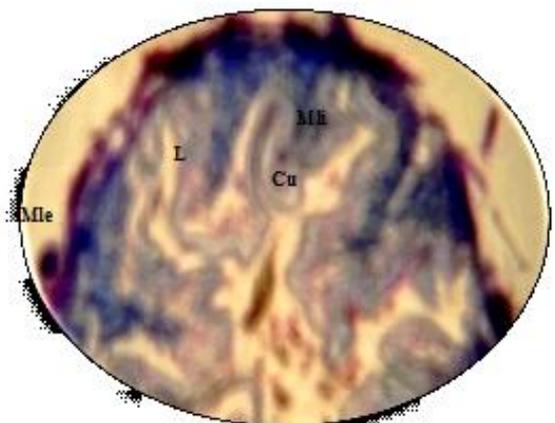
Cu : cuticule, *Da* : débris alimentaires, *E* : épithélium intestinale, *L* : lumière intestinale, *Mc* : muscles circulaires, *Mle* : muscles longitudinaux externes, *Mli*: muscles longitudinaux internes, *V* : Villosités.



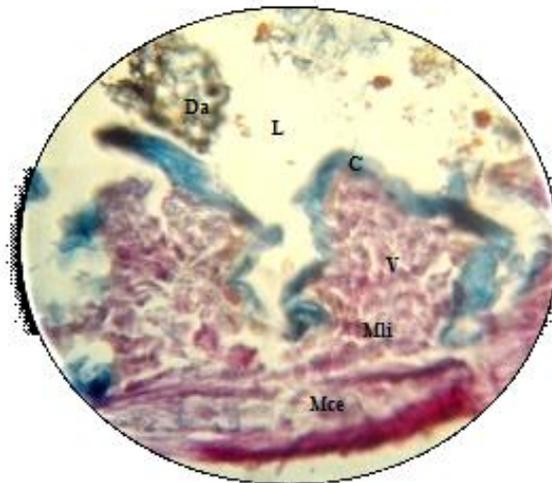
A



B



C



D

Résultats obtenus chez les individus témoins:

La région du Stomodeum est constituée d'un jabot tapissé par une couche intime cuticulaire, et formé d'un épithélium unistratifié cubique avec des noyaux arrondis, on observe dans le jabot de nombreuses villosités, sur lesquelles se dressent les épines. La musculature du jabot est constituée d'une couche de muscles circulaires externes bien développés qui entourent l'organe et des muscles longitudinaux internes (figure 40 : A et B).

Le gésier fait partie également du stomodeum, il est tapissé d'une intima cuticulaire, il présente de nombreuses petites villosités uniformes avec une large lumière et un épithélium unistratifié constitué de cellules cubiques avec des noyaux ronds. La musculature du gésier est constituée de muscles longitudinaux internes et de nombreuses couches de muscles circulaires externes (figure 41 :A).

Au niveau du Mesenteron, on trouve un intestin moyen qui présente un épithélium pseudostratifié palissadique avec une bordure en brosse et des cellules de régénération situées à la base de l'épithélium. Les muscles sont très réduits et forment une fine couche circulaire interne et quelques fibres longitudinales externes. De plus il présente une membrane péritrophique qui a la forme d'une mince couche enveloppant le bol alimentaire et empêche les aliments imparfaitement broyés de venir en contact avec la paroi intestinale (figure 42 : A).

La région du mésentéron est pourvue de six caecum gastriques disposés radialement autour de la lumière centrale du tube digestif. Le Caecum gastrique présente un épithélium unistratifié formant des villosités qui s'alternent avec les autres plus petites représentant les cryptes de régénération. La cuticule est absente à ce niveau comme dans l'intestin moyen, la musculature est très réduite et composée d'une seule couche de muscles circulaires très fine (figure 43 : A).

Enfin, dans le Proctodeum, notons le colon qui présente des replis épithéliaux développés emplissant presque toute la lumière de l'organe. Le revêtement chitineux est moins épais que dans l'intestin antérieur. La musculature est représentée par des couches longitudinales et circulaires (figure 44 : A).

Il se révèle enfin que, nos observations du tube digestif chez les témoins concordent avec la littérature (Chauvin, 1956; Grassé, 1976 et Raccaud- Schoeller, 1980).

Résultats obtenus chez les larves traitées:

Chez les individus traités par la souche bactérienne *Bacillus sp.*(HE799656), après la réalisation des coupes histologiques, l'examen des différentes parties du tube digestif a montré que le jabot ne présente aucune lésion (figure 40 : B). Le gésier présente un élargissement de la lumière intestinale et amincissement de la musculature circulaire. Ce qui donne une musculature moins développée du gésier comparativement aux témoins. On note aussi la destruction des villosités, de la cuticule et des muscles longitudinaux au niveau de gésier (figure 41 : B).

Au niveau de l'intestin moyen, le traitement a provoqué la destruction de la membrane péritrophique et les muscles circulaires ainsi qu'une diminution de l'épaisseur de l'épithélium avec élargissement de la lumière intestinale (figure 42: B). Au niveau du caecum gastrique, l'effet est marqué par un détachement des muscles circulaires de l'épithélium avec quelques déchirures des cellules épithéliales (figure 43 : B).

Le colon a montré une altération de la couche musculaire avec destruction de quelques cellules épithéliales (figure 44 : B).

Chez les individus traité par la souche de *Bacillus sp.*(HE805963), au niveau du jabot et du gésier (figure 40 : C et figure 41 : C), on a remarqué une légère destruction des muscles longitudinaux qui peut être due au traitement biologique. On note que la musculature circulaire et les villosités gardent la même structure que le témoin.

En comparant l'intestin moyen aux témoins (figure 42 : C), il présente une lyse de la membrane péritrophique. On a remarqué aussi un amincissement de la musculature ce qui a élargit la lumière intestinale avec diminution de la taille des villosités ainsi qu'un détachement des muscles circulaires de l'épithélium. Le ceacum gastrique et le colon ne présentent aucune destruction ou altération des cellules épithéliales (figure 43 : C, figure 44 : C).

Chez les individus traités par *B. sphaericus*, Au niveau du gésier (figure 41 : D), on a remarqué la destruction des muscles longitudinaux internes. La comparaison des autres parties aux témoins, nous a permis de noter que le jabot, l'intestin moyen et le ceacum gastrique sont restés intacts, ils ont gardé la même structure que les témoins (Figure 40 : D, Figure 42 : D et figure 43 : D).

Enfin, le traitement apporté par la bactérie *P.fluorescens* bv III sur des larves de cinquième stade de *L. migratoria*, montre après la réalisation des coupes histologiques, que cette bactérie a des effets toxiques certains sur les cellules épithéliales du tube digestif de

L. migratoria. L'effet de la bactérie s'est traduit par la destruction de la cuticule, des villosités et des muscles longitudinaux au niveau du jabot (figure 40 : E). Les effets sont moins importants au niveau du gésier, ils sont marqués par la destruction des muscles longitudinaux internes (figure 41 : E). Au niveau de mésentéron, on a décelé des modifications histologiques marquées notamment par la lyse de la membrane péritrophique et les muscles circulaires et longitudinaux avec une diminution de l'épaisseur de l'épithélium et élargissement de la lumière intestinale de l'intestin moyen (figure 42 : E), le ceacum gastrique a subi la lyse des muscles circulaires, une déchirure au niveau des cellules épithéliales est également observée (figure 43 : E). Enfin, la bactérie a provoqué la destruction des muscles du colon avec une lyse de la cuticule et de certaines cellules épithéliales (figure 44 : E).

6. Etude de l'effet des bactéries entomopathogènes sur les souris blanches de laboratoire

Le suivi des souris blanches traitées par différentes concentrations de *Bacillus sp.*(HE799656) (1,60 mg/ml, 0,59 mg/ml et 0,33 mg/ml), *Bacillus sp.*(HE805963) (1,67 mg/ml, 0,62 mg/ml et 0,35 mg/ml.), *Bacillus sphaericus* (1,72 mg/ml, 0,75 mg/ml et 0,28 mg/ml) et *Pseudomonas fluorescens* bvIII (1,7 mg/ml, 0,65 mg/ml et 0,31 mg/ml) a permis d'évaluer le taux de mortalité, la croissance pondérale et l'effet inflammatoire des bactéries durant 15 jours.

6.1. Taux de mortalité des souris blanches

Aucune mortalité n'est notée durant toute la période de suivie chez les souris blanches traitées par les différentes concentrations des 4 bactéries ainsi que chez les témoins. Cela signifie que les 4 bactéries entomopathogènes utilisées n'ont aucun effet toxique sur ce petit mammifère. Les souris se sont même reproduites de façon normale (figure 45).



Figure 45 : les nouveaux nés âgés de 24h issus des parents traités par *Pseudomonas fluorescens* bvIII (1,7 mg/ml).

6.2. L'évolution pondérale des souris blanches

Les résultats de l'évolution pondérale chez les souris traitées par 4 souches; *Bacillus sp.*(HE799656), *Bacillus sp.*(HE805963), *Bacillus sphaericus* et *Pseudomonas fluorescens* bvIII comparativement aux témoins sont portés respectivement sur les figures 46, 47, 48 et 49.

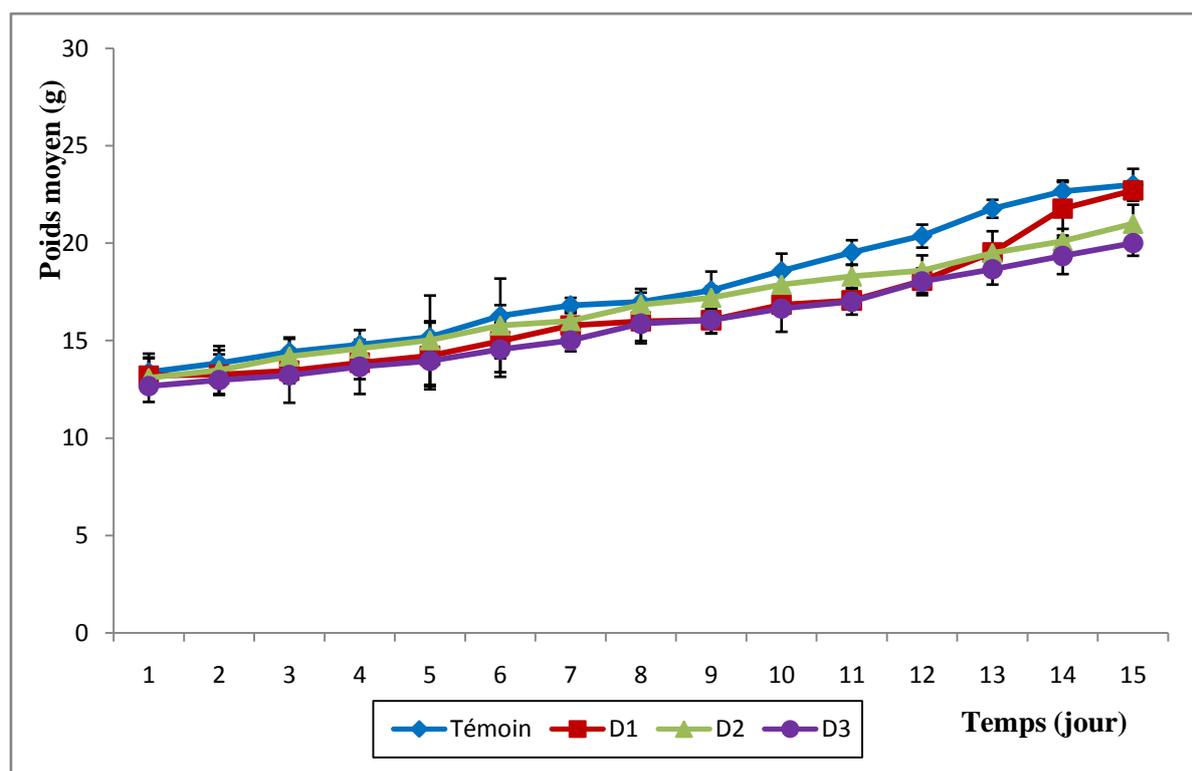


Figure 46 : Evolution des poids moyens des souris traitées par *Bacillus sp.*(HE799656) aux doses D1= 1,6 mg/ml, D2=0,59 mg/ml, D3=0,33 mg/ml

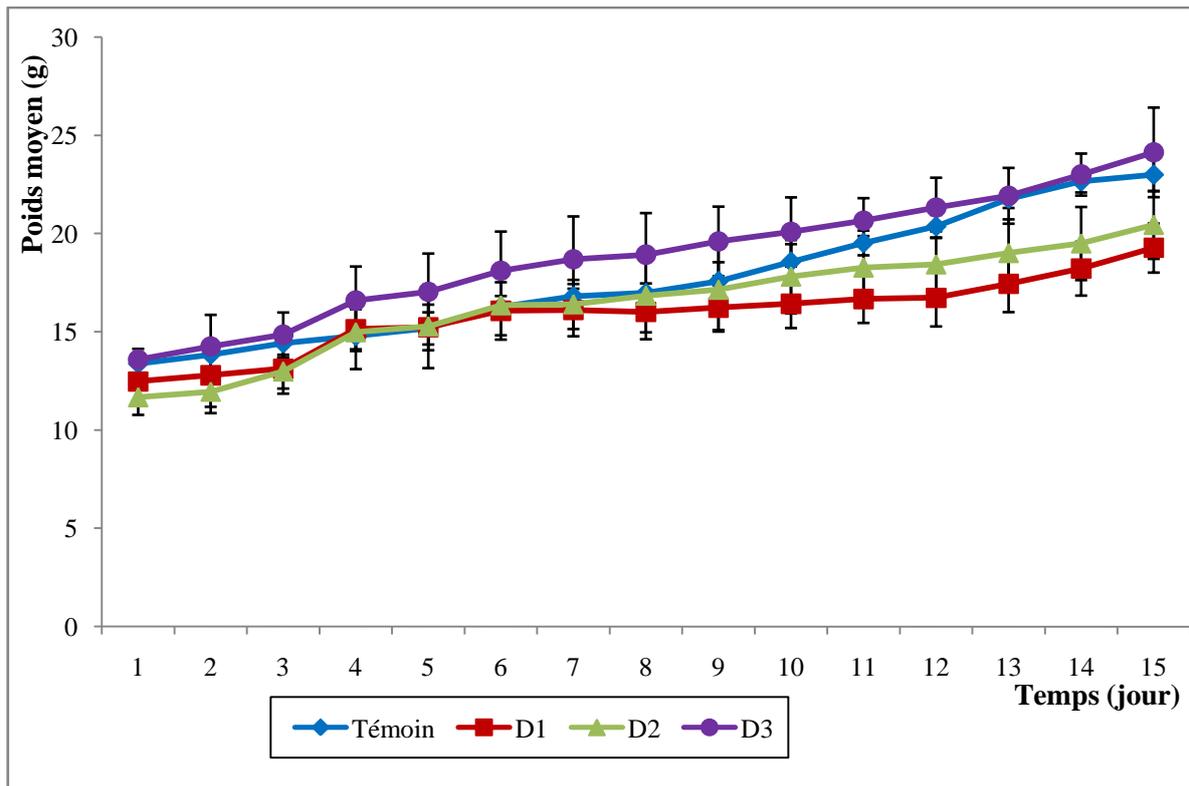


Figure 47 : Evolution pondérale des souris témoins et traitées par *Bacillus sp.*(HE805963) aux doses D1= 1,67 mg/ml, D2=0,62 mg/ml, D3=0,35 mg/ml

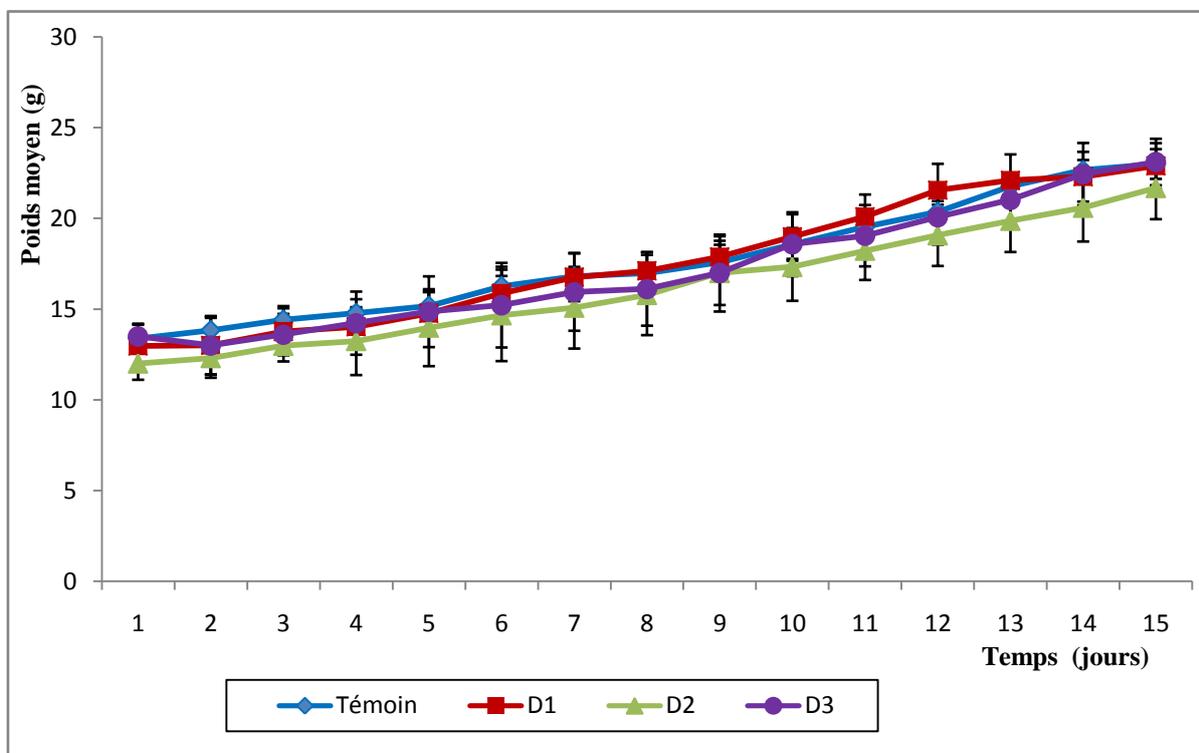


Figure 48 : Evolution des poids moyens des souris traitées par *Bacillus sphaericus* aux doses D1= 1,72 mg/ml, D2=0,75 mg/ml, D3=0,28 mg/ml.

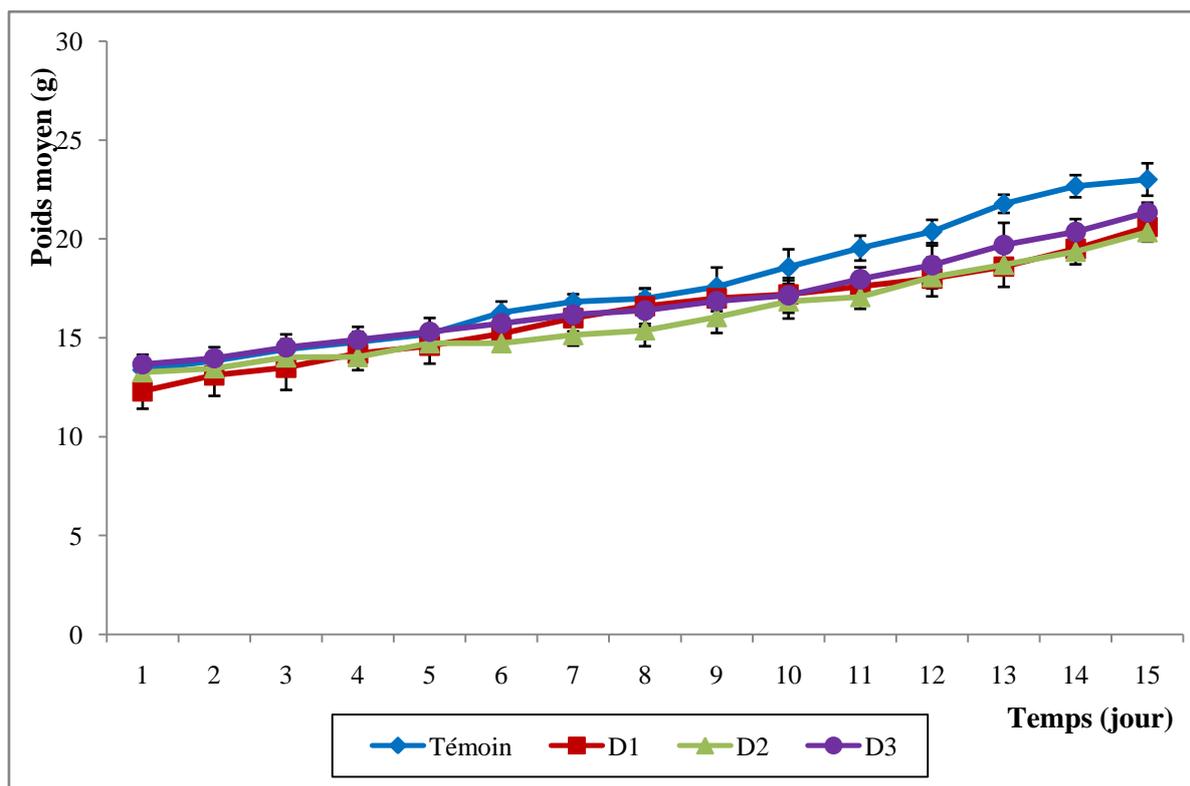


Figure 49 : Evolution pondérale des souris témoins et traitées par *Pseudomonas fluorescens* bvIII aux doses D1= 1,7 mg/ml, D2=0,65 mg/ml, D3=0,31 mg/ml

D'après les résultats obtenus, on remarque qu'il n'y a pas une différence distincte entre le poids moyen des souris traitées par les différentes suspensions bactériennes et les témoins, la croissance pondérale augmente au fil de temps. En outre, leur prise de nourriture est normale quotidiennement durant la période de suivie.

Pour les témoins, la croissance pondérale est passée de 13,38g à 23g au bout de 15 jours.

Concernant la souche *Bacillus sp.*(HE799656), on note au premier jour des poids moyens de 13,21g, 13,1g, 12,67g correspondant respectivement au souris traitées par les 3 concentrations D1, D2 et D3. Ces valeurs augmentent avec le temps jusqu'à atteindre au 15^{ème} jour ; 22,7 g, 21g et 20 g. Concernant la bactérie *Bacillus sp.*(HE805963), le poids moyen des souris traitées par les 3 concentrations D1, D2 et D3 est passé de 12,48g, 11,67g et 13,59g au premier jour jusqu'à atteindre au 15^{ème} jour les valeurs suivantes ; 19,27g, 20,44g et 24,14g.

Chez les souris traitées par *Bacillus sphaericus*, on a enregistré une croissance pondérale allant de 12,98 g, 12 g et 13,5g à 22,9 g, 21,68 g et 23,11g au bout de 15 jours après traitement par par les 3 concentrations D1, D2 et D3.

En ce qui concerne les résultats de l'évolution des poids après traitement par *Pseudomonas fluorescens* bv III, on a enregistré au premier jour des valeurs de 12,3g, 13,26g et 13,66g

correspondant respectivement aux souris traitées par les 3 concentrations D1, D2 et D3. Ces poids augmentent avec le temps jusqu'à atteindre au 15^{ème} jour les valeurs suivantes : 20,6g, 20,34g et 21,34.

Le poids a donc augmenté d'une façon presque identique au niveau des 04 lots témoins et traités par les 4 bactéries avec un gain de poids allant de 7g à 10 g durant 15 jours.

6.3. Etude de l'effet inflammatoire des bactéries sur les souris blanches de laboratoire.

Les résultats concernant l'effet inflammatoire de ; *Bacillus sp.*(HE799656), *Bacillus sp.*(HE805963), *Bacillus sphaericus* et *Pseudomonas fluorescens* bv III sur les souris blanches de laboratoire sont illustrés sur la figure 50.

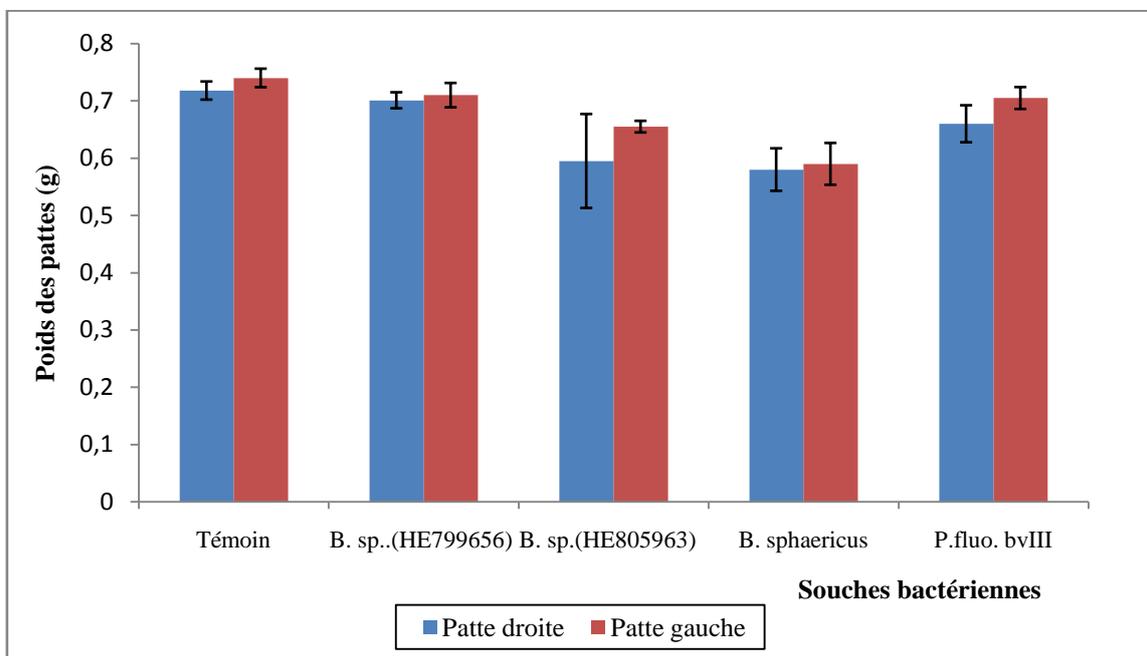


Figure 50 : Effet inflammatoire de *Bacillus sp.*(HE799656), *Bacillus sp.*(HE805963), *B. sphaericus* et *P.fluorescens* bvIII sur les souris blanches.

Les résultats affichés sur le graphique montrent l'effet inflammatoire de *Bacillus sp.*(HE799656), *Bacillus sp.*(HE805963), *B. sphaericus* et *P.fluorescens* bvIII traduit par l'augmentation du poids de la patte gauche traitée comparativement à la patte droite non traitée.

Une légère augmentation du poids des pattes gauches par rapport à la patte droite est constatée chez le lot témoin et tous les lots traités. En plus, cette augmentation du poids n'est pas accompagnée de sécrétion d'œdème (signe d'inflammation), ce qui nous laisse supposer qu'elle est due à la piqure et non pas à la bactérie.

7. Etude de la persistance des bactéries sur le feuillage du blé tendre d'hiver et dans le sol

Les résultats de l'étude de la persistance de *Bacillus sp.*(HE799656) (1,6 mg/ml) et *P. fluorescens* bvIII (1,7 mg/ml) sur le feuillage du blé tendre d'hiver et dans le sol sont donnés en nombre de colonies par unité de surface foliaire et/ou par 10 mg de sol durant 9 jours. Ces résultats sont portés sur le tableau 30 et le tableau 31 respectivement.

Tableau 30 : Evolution de nombre des colonies de *Bacillus sp.*(HE799656) sur le feuillage et dans le sol.

Nombre Jours	Nombre des colonies sur le feuillage				Nombre des colonies dans le sol			
	R1	R2	R3	M ±δ	R1	R2	R3	M ±δ
J1	44	51	52	49 ± 4,35	202,5	179	300	227,16±64,16
J3	37,5	55	40,5	44,33± 9,35	195	133,5	275	204,25±70,75
J6	16,5	22	18	18,33 ±2,84	210	125	300	211,66±87,51
J9	0	0	0	0	270	147,5	300	239,16± 80,79

R : Répétition, **M :** Moyenne, **δ :** Ecart type, **j :** jour.

Tableau 31 : Evolution de nombre de colonies de *P. fluorescens* bv III sur le feuillage et dans le sol.

Nombre Jours	Nombre des colonies sur le feuillage				Nombre des colonies dans le sol			
	R1	R2	R3	M ±δ	R1	R2	R3	M ±δ
J1	+	+	+	+	50	81	62	64,33± 15,63
J3	+	+	+	+	185	217,5	85	162,5± 69,05
J6	+	+	+	+	140	168,5	67,5	125,33± 52,07
J9	0	0	0	0	95	120	100	105± 13,22

R : Répétition, **M :** Moyenne, **δ :** Ecart type, **j :** jour, **+** : indénombrable.

D'après les résultats du tableau 62, on constate que le nombre de bactéries de *Bacillus sp.*(HE799656) persistant sur le feuillage diminue avec le temps jusqu'à la disparition totale le 9^{ème} jour. Par contre, la persistance de cette bactérie dans le sol est meilleure, elle reste stable durant toute la période de l'expérimentation avec un nombre moyen de 239 colonies enregistré le dernier jour.

Les résultats consignés sur le tableau 63 montrent que *P. fluorescens* a persisté sur le feuillage

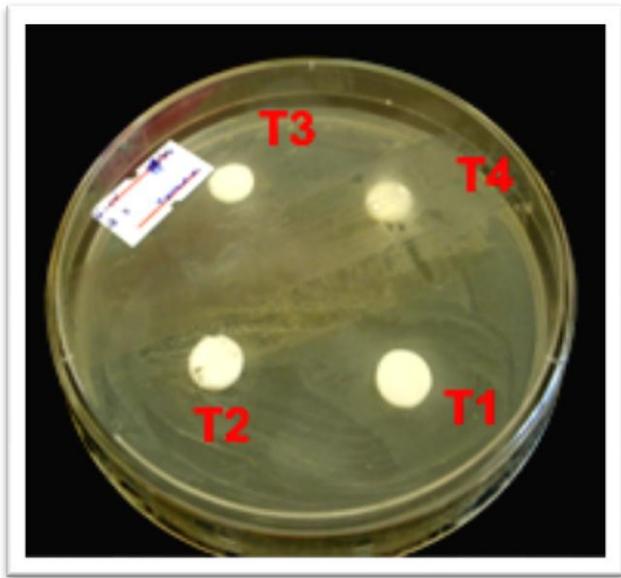
en grand nombre durant 6 jours pour disparaître totalement après ce temps, De même la persistance de cette bactérie dans le sol est en augmentation durant les premiers jours pour se stabiliser après.

Ces résultats ont été analysés statistiquement (Voir annexe 18).

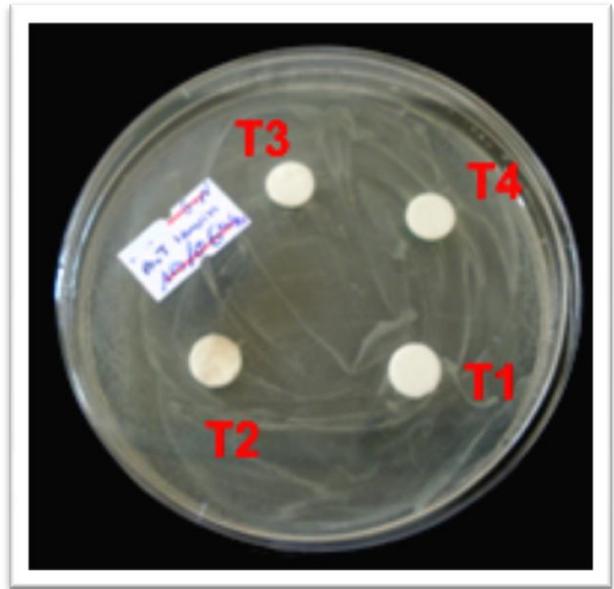
Une différence très hautement significative est enregistrée entre les nombres de colonies obtenues dans le temps pour la persistance de *Bacillus sp.*(HE799656) sur le feuillage. Par contre concernant la persistance des 2 bactéries dans le sol, on note pas de différence significative entre les nombres des colonies obtenus dans le temps. Les résultats relatifs à la persistance de *P. fluorescens* bv III sur le feuillage ne peuvent être analysés statistiquement car on a obtenu des colonies indénombrables.

8. Etude *in vitro* de la compatibilité des microorganismes entomopathogènes avec les pesticides chimiques

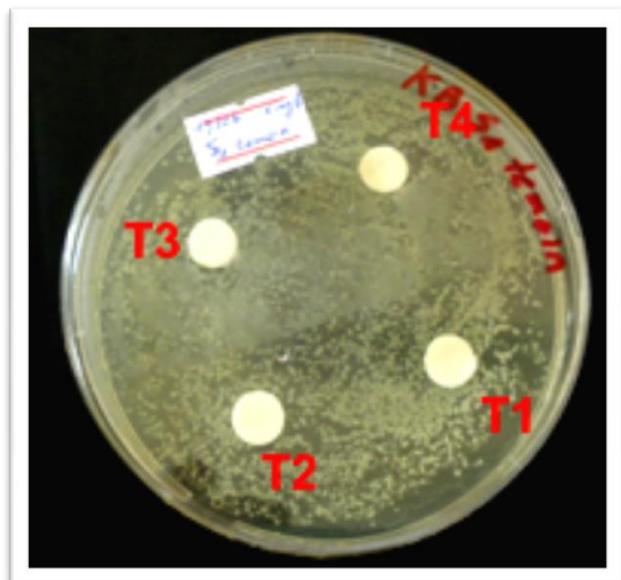
L'étude de la sensibilité des bactéries entomopathogènes (*Bacillus sp.*(HE799656), *Bacillus sp.*(HE805963), *B. sphaericus* et *P.fluoresens* bvIII) pour 3 différents insecticides chimiques utilisés dans la lutte antiacridienne (deltaméthrine, la lambda-cyhalothrine et le téflubenzuron), nous a permis d'obtenir les résultats illustrés sur la figure ci-après :



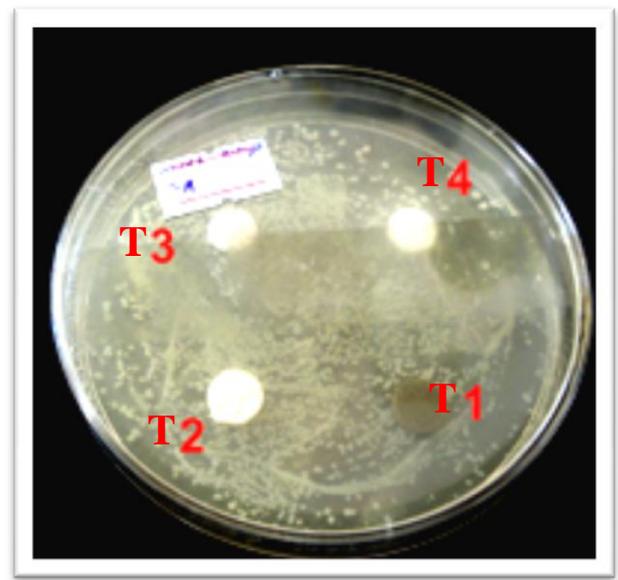
Bacillus sp.(HE799656)



Bacillus sp.(HE805963)



Pseudomonas fluorescens bv III



Bacillus sphaericus

Figure 51 : Résultats des tests de compatibilité

T₁ : Témoin (Eau distillée) T₂ : Lambda T₃ : Décis T₄ : Tiflubenzurum

Après réalisation des tests de compatibilité, on constate que les diamètres des zones d'inhibition sont nuls pour les trois insecticides deltaméthrine, lambda-cyhalothrine et Téflobenzurum par rapport aux 4 souches bactériennes testées (*P.fluorescens* bv III, *Bacillus sp.*(HE799656), *Bacillus sp.*(HE805963), et *B. sphaericus*).

Les 3 insecticides évalués n'ont pas inhibé la croissance bactérienne et aucun n'a eu des effets significatifs sur les bactéries testées.

Chapitre IV: Discussion

1- Purification et identification taxonomique des isolats bactériens

La classification spécifique a permis d'affilier les souches bactériennes isolées de la région d'Adrar) appartenant au genre *Bacillus* à 5 espèces selon la classification proposée par Guiraud (1998, 2003): *B. circulans* avec 4 souches, *B. subtilis* avec 1 souche, *B. thuringiensis* avec 3 souche, *B. sphaericus* avec 2 souches, *B. coagulans* avec 3 souches.

Brossard et Terry (1984) annoncent que la majorité des bactéries du genre *Bacillus* vivent dans le sol ou elles persistent grâce à leurs spores.

Ce sont des bactéries d'origine tellurique, elles tirent leurs besoins nutritifs de la matière organique, azotée et les sels minéraux présents dans sol (Davet, 1996, Ashnaei *et al.*, 2009).

Les souches appartenant au genre *Bacillus*, possèdent toutes les caractères cultureux décrits par (Euzéby, 2007) ; Les bactéries se développent bien sur la surface de la gélose. L'aspect des colonies obtenues sur milieu gélosé est extrêmement variable. En général, les colonies sont larges, lisses, plates, fréquemment circulaires, avec des bords irréguliers, de couleur crème ou blanc ou encore jaunâtre.

Toutes les souches isolées ont la forme de bâtonnet long à extrémité arrondie ou carrée, et sont à Gram positif. Elles possèdent une forme sporale. La spore pour la majorité présente une forme ovale en position centrale ou terminale non déformante (Brossard et Terry, 1984).

Concernant le groupe *Pseudomonas spp* fluorescents, après purification et réalisation du test de fluorescence sur le milieu KB, le test d'arginine et le test d'oxydase ; nous avons sélectionné 6 souches bactériennes fluorescentes. La classification spécifique et intraspécifique des 6 souches sélectionnées a été basée essentiellement sur des tests physiologiques et biochimiques proposés dans la clé dichotomique d'identification de Jacques (1994). Cette classification spécifique a permis d'affilier les souches bactériennes probablement à 3 espèces : *Pseudomonas fluorescens* avec 4 souches, *Pseudomonas chlororaphis* avec 1 souche, *Pseudomonas putida* avec 1 souche.

La classification intraspécifique de l'espèce *Pseudomonas fluorescens* a révélé l'existence des biovars I, III, V, IV.

Les caractères cultureux sur le milieu King B ont montré d'une manière générale des colonies bactériennes dont le contour est régulier avec une coloration souvent beige à crème, l'élévation est convexe pour l'ensemble des souches avec un aspect lisse et des diamètres

variés de 1 à 2 mm après 24h de culture. La coloration de Gram a montré que toutes les cellules bactériennes sont des bâtonnets à Gram négatifs (Palleroni, 1984).

En effet les mêmes espèces ont été isolées par Benzina (2004) dans le sol jordanien avec prédominance de l'espèce *P. fluorescens*. L'auteur précité note aussi que le biovar III a été dominant et il ajoute que la répartition des espèces et des biovars dans le sol est liée à l'endroit et la plante cultivée.

De même Lemanceau *et al.* (1995), notent la dominance du biovar III dans les sols de l'Est de France. Cependant selon une étude menée dans le sud Australien, Sands et Rovira (1971) ont constaté la dominance du biovar V dans la rhizosphère du blé.

La dominance de l'espèce *Pseudomonas fluorescens* au niveau de la rhizosphère parmi toutes les espèces qui ont été isolées, peut être expliquée par leur croissance rapide, leur facilité de culture *in vitro* et leur aptitude à produire des antibiotiques et des siderophores en cas de manque en fer (Mamoun et Olivier, 1989).

Enfin, nous signalons que la classification taxonomique de la même collection de souches par la clé dichotomique proposée par Jacques (1994), a été suivie également par Benchabane (2005), Benzina (2001 et 2004) et Mahmoud(2004).

Pour l'identification moléculaire des souches étudiées, nous avons procédé à l'extraction de l'ADN, PCR et séquençage de l'ARN 16S.

La position phylogénétique des deux souches choisies Strain-B1 et Strain-B2 est représentée dans un arbre phylogénique tracé par la méthode de Neighbor-Joining. Les séquences d'ADNr 16S de ces deux souches ont été enregistrées dans la banque de donnée EMBL/EBI sous les numéros d'accessions HE799656 et HE805963 respectivement. Ces souches sont identifiées alors comme *Bacillus sp.*(HE799656) et *Bacillus sp.*(HE805963).

Ces souches affiliées au genre *Bacillus* présentent des similarités très élevées (99%) avec les souches *Bacillus thuringiensis* (NR_043403.0), *Bacillus cereus* (JQ435684.1), *Bacillus weihenstephanensis* (NR_024697.1) et *Bacillus mycoides* (NR_036880.1). Cependant l'inclusion de ces souches dans les espèces déjà décrites ne peut être confirmée qu'après une étude d'homologie ADN-ADN afin d'établir leur position taxonomique exacte.

Enfin, les résultats obtenus montrent la richesse du sol Algérien en espèces bactériennes présentant un pouvoir entomopathogène, cela peut être exploité dans des programmes de lutte

intégrée contre les ravageurs des cultures notamment les acridiens d'autant plus que ces bactéries ont été isolées du même biotope que celui de ces derniers (Région d'Adrar).

2- Evaluation de la toxicité des bactéries sur les larves L5 de *L. migratoria*

2.1. Symptômes

Les individus traités par différentes concentrations de *Bacillus sp.*(HE799656), *Bacillus sp.*(HE805963), *B. sphaericus* et *Pseudomonas fluorescens* bvIII ; ont montré des symptômes et comportements très remarquables.

Le comportement des larves traitées a été suivi à partir de 1^{er} jour après traitement. Nous avons constaté que les criquets atteints perdent l'appétit et deviennent de moins en moins actifs avec une diarrhée remarquée.

Chez les L5 survivants après traitement, nous avons constaté des difficultés de la mue imaginaire et des déformations morphologiques.

Nos observations concordent avec les résultats obtenus par Greathead *et al.* (1994), et confirment ceux de Mohand Kaci (1998).

Juste après la mort, les criquets touchés commencent à se putréfier et prennent une coloration rougeâtre qui devient après noirâtre, les cadavres deviennent mous et dégagent une mauvaise odeur.

Nos résultats confirment ceux obtenus par Ould Ahmadou *et al.* (2001); Tail *et al.* (2006) ; Kemassi *et al.* (2010) et Outtar (2009) sur des acridiens traités par des extraits de plantes et un régulateur de croissance.

On note également un retard très remarquable de la maturité sexuelle chez les adultes issus des L₅ traitées. Cela a été enregistré également après traitement des L5 de *Schistocerca gregaria* par trois plantes acridifuges et une plante acridicide (Abbassi *et al.*, 2005; Ould el hadj *et al.*, 2006) Allal-Benfekih *et al.* (2007) ont constaté après utilisation de *B. subtilis* sur des individus de *L. migratoria* que la vitellogenèse est inhibée lors de la maturation des ovocytes terminaux dans la phase pré-reproductive avec augmentation de la résorption ovocytaire à la phase reproductive.

Enfin et contrairement à nos résultats ; Bouaïchi et Chihrane (2001) annoncent que le taux de résorption des ovocytes et le taux et la période de ponte ne sont pas affectés par le diflubenzuron.

Enfin, Duranton *et al.* (1982) notent que l'acridien infecté cesse de s'alimenter et de s'agiter. Il cherche refuge dans les buissons. Le contenu intestinal se liquéfie, devient jaune puis noir, des diarrhées surviennent et entraînent rapidement la mort de l'insecte.

2.2. Taux de mortalités

Après traitement des larves L5 de *L. migratoria* par *Bacillus sp.*(HE799656) (1,60 mg/ml, 0,59 mg/ml et 0,33 mg/ml), *Bacillus sp.*(HE805963) (1,67 mg/ml, 0,62 mg/ml et 0,35 mg/ml.), *Bacillus sphaericus* (1,72 mg/ml, 0,75 mg/ml et 0,28 mg/ml) et *Pseudomonas fluorescens* bvIII (1,7 mg/ml, 0,65 mg/ml et 0,31 mg/ml), on a enregistré chez les témoins, une seule mortalité soit un taux de 3,33% stable durant tout le stade de développement, Par contre chez les larves traitées par *Bacillus sp.*(HE799656), le taux de mortalité atteint 100% au bout de 12 jours après traitement à la D1 suivi de *P. fluorescens* avec un taux de mortalité finale de 100% atteint le 18^{ème} jour après traitement par la même concentration.

Par contre, 86,67% de mortalité sont obtenus après traitement à la forte dose de *Bacillus sp.*(HE805963) au bout de 22 jours. Enfin chez les individus traités par *B. sphaericus*, des mortalités de 76,67% sont obtenues pour la concentration D1 le 22^{ème} jour.

Nous signalons que Mohand Kaci (1998) a obtenu une mortalité totale pour les larves L5 de *S. gregaria* au bout du 21^{ème} jour à la forte dose de *B. subtilis* utilisée à la concentration de $7,3 \cdot 10^8$ spores/ml.

Haddadj *et al.* (1998) ont obtenu une mortalité totale chez *S. gregaria* après traitement au *Metarhizium anisopliae* dans un délai allant de 4 à 9 jours.

Berradj et Khoudi (2005) signalent que l'utilisation de *Bacillus larvae* et *Pseudomonas aeruginosa* contre les larves de *S. gregaria*, révèle qu'une mortalité de 70% est atteinte au bout de 16 jours pour les L4 traitées par *B. larvae*, et une mortalité totale atteinte au bout seulement de 4 jours pour les L4 traitées par *P. aeruginosa*.

Rahmani et Kais (2005) ayant étudié l'effet de *B. subtilis* et *B. thuringiensis* sur les larves de *S. gregaria*, ont enregistré une mortalité de 80% après traitement des L4 par *B. thuringiensis* au bout de dix-huit jours et un taux de 90% atteint au seizième jour après le traitement par *B. subtilis*.

Selon Ould El Hadj *et al.* (2005), l'étude de la toxicité des extraits de *Melia azedarach*, d'*Azadirachta indica* et d'*Eucalyptus globulus*, vis-à-vis des larves du cinquième stade (L5) et des adultes de *S. gregaria* révèle une mortalité de 100% au bout de 10 jours pour les L5 et 13 jours pour les adultes pour *A. indica*. Elle est pour *M. azerdarach* de 11 jours pour les L5 et

14 jours pour les adultes. Les individus traités à l'*Eucalyptus* meurent quelques jours plus tard. Les larves du cinquième stade s'avèrent être plus sensibles que les imagos à ces extraits. D'autre part, l'étude menée par Outtar (2009) sur l'utilisation de trois biopesticides contre les L5 de *L. migratoria*, révèle une mortalité de 91,67 % des larves traitées par *M. anisopliae* au bout de vingt deux jours, contre une mortalité de 96,67% pour *M. anisopliae* et le henné au bout de vingt et un jours après le traitement par ingestion.

Dans une étude récente, les effets de la toxicité aiguë due à l'application topique de trois régulateurs de croissance sur *Locusta migratoria var. manilensis* ont été évalués dans des conditions de laboratoire, les taux de mortalité enregistrée sont les suivants: flufenoxuron (97 %), l'azadirachtine (100 %), et le pyriproxifène (48 %) (Bi-Zhen *et al.*, 2012).

Nous concluons à la lumière de tous ces résultats que les bactéries agissent plus lentement que les autres agents de lutte biologique (champignons et extrait de plantes) ou chimiques utilisés contre les acridiens. Cela peut être attribué au mode d'action de la majorité des bactéries du genre *Bacillus* qui agissent par la libération de toxines qui demande des conditions particulières. Ou bien par les conditions du milieu intestinal des criquets qui ne conviennent pas parfaitement à la croissance et la multiplication bactérienne ce qui demande un temps d'adaptation relativement long (Greathead *et al.*, 1994 ; Keith et Kevan , 1992; Lacey *et al.*, 2001).

2.3. TL₅₀

Parallèlement aux résultats obtenus pour le taux de mortalité, l'examen des TL₅₀ montre que les larves L5 de *L. migratoria* traitées par *Bacillus sp.*(HE799656) présentent les TL₅₀ les plus faibles, suivies des L5 traitées par *P. fluorescens* et ensuite celles traitées par *Bacillus sp.*(HE805963). Enfin, les larves traitées par *B. sphaericus* présentent les TL₅₀ les plus élevés. Le TL₅₀ le plus faible est obtenu chez les larves traitées par *Bacillus sp.*(HE799656) avec une valeur de 3,32 jours seulement enregistrée avec la forte dose suivies des L5 traitées par *P. fluorescens* à la même dose avec 4,91 jours. Les larves traitées par *B. sphaericus* présentent les TL₅₀ les plus élevés avec des valeurs allant de 19,48 à 19,94 jours pour les 3 doses utilisées.

Nos résultats sont en accord avec ceux de Mohand Kaci (1998) qui a obtenu un TL₅₀ inférieur à une semaine (6,79 jours) chez les larves L5 de *S. gregaria* traitées à la dose de $7,3.10^8$ spores/ml de *B subtilis*.

De même, Halouane (1997) a enregistré 50% de mortalité après traitement des larves L5 de *S. gregaria* par *Metarhizium anisopliae* à la dose de $3,7 \cdot 10^2$ spores/ml au bout de 6,29 jours.

De plus, l'étude menée par Berradj Et Khoudi (2005) révèle 50% de mortalité au bout d'une durée inférieure à 3 jours après traitement des larves (L3 et L4) de *S. gregaria* par *P. aeruginosa* à la dose de $1,71 \cdot 10^9$ UFC/ml.

De même, Ould El Hadj *et al.*, (2005), ont enregistré un TL_{50} de 7,5 jours pour les larves L5 de *S. gregaria* par le neem, 8,2 jours pour le méliá et 10,4 jours pour l'eucalyptus.

En outre, la comparaison de la sensibilité de *Locusta migratoria migratoria* à un produit commercial et une souche locale de *Metarhizium*, a montré que cette dernière présente une plus forte activité pathogène avec un TL_{50} de 7,1 jours (Niassy *et al.*, 2011).

Dans une étude de l'activité biologique des extraits foliaires bruts d'*Euphorbia guyoniana* (Euphorbiaceae), vis-à-vis des larves L5 et des individus adultes de *Schistocerca gregaria*, les temps létaux 50 (TL_{50}) obtenus montrent que les larves sont plus sensibles à l'effet toxique d'*Euphorbia guyoniana* que les adultes. Le TL_{50} noté, est de 10,51 jours pour les larves, et 20,02 jours pour les adultes de ce locuste du désert (Kemassi *et al.*, 2010).

2.4. CL_{50}

On dit qu'un insecte est sensible à un insecticide donné s'il suffit, pour provoquer sa mort, d'administrer à l'insecte une faible dose de cet insecticide. Cependant, Chez les espèces d'acridiens que nous avons à combattre ; à l'égard d'un insecticide donné, certains insectes de la population se montreront très sensibles, ne tolérant que de très faibles doses de cet insecticide, tandis que d'autres seront beaucoup moins sensibles et toléreront des doses nettement plus élevées (Gry *et al.*, 1966). Les auteurs ajoutent que le calcul des doses létales (DL_{50} , DL_{90} , DL_{95} et DL_{99}) nous permis de déterminer la dose de l'insecticide qu'il faut appliquer à l'insecte pour obtenir le pourcentage de mortalité que l'on désire, ce qui permet de juger de façon précise le pouvoir insecticide d'un produit.

La comparaison des CL_{50} obtenues pour des délais d'observation des mortalités de 5, 7 et 14 jours, après traitement montre que la CL_{50} est en relation étroite avec le temps, et elle varie en fonction de la souche bactérienne testée. En effet, les CL_{50} les plus faibles sont obtenues le 14^{ème} jour avec 0,37mg/ml, 0,55mg/ml, 0,62 mg/ml, 1,71 mg/ml pour les souches *Bacillus sp.*(HE799656), *P. fluorescens* bv III, *Bacillus sp.*(HE805963) et *B. sphaericus* respectivement. Par ailleurs, Les CL_{50} les plus élevées sont enregistrées le 5^{ème} jour.

Si l'on compare les doses létales par ingestion des différentes souches testées, on peut constater que la souche *Bacillus sp.*(HE799656) se montre considérablement plus efficace et

plus rapide d'action que les autres. Elle présente les CL₅₀, les plus faibles dans tous les temps (5, 7 et 14 jours après traitement).

Les CL₅₀ augmentent aussi en fonction du stade de développement de l'acridien. En effet, Milat-Bissaad (2011) a constaté lors d'une étude réalisée sur des individus de différents stades de *S. gregaria* traités par *B. bassiana* et *M. anisopilae*, que les CL₅₀ chez les larves du 1^{er} stade étaient plus faibles que chez les imagos.

Afin d'évaluer l'effet de certaines souches de champignons entomopathogènes, *Metarhizium anisopliae*, *Paecilomyces fumosoroseus* et *Verticillium lecanii* sur les femelles adultes de l'acarien *Tetranychus urticae* ; trois concentrations, 1×10^6 , 1×10^7 et 1×10^8 conidies/ml de chaque souche fongique ont été utilisées. Le taux de mortalité chez les femelles adultes a augmenté avec l'augmentation de la concentration des conidies. Et le plus virulent contre l'acarien était *Paecilomyces fumosoroseus* ayant la plus faible valeur de la CL₅₀ ($9,1 \times 10^4$ conidies/ml) et TL₅₀ (4,58 jours à 1×10^8 conidies/ml) suivie par *Verticillium lecanii* avec une CL₅₀ ($1,7 \times 10^6$ conidies/ml) et TL₅₀ de 5,45 jours à 1×10^8 conidies/ml (Amjad *et al.*, 2012).

Par ailleurs, chez les larves de *L. migratoria* traitées par la solution huileuse de Dieldrine, on constate qu'il n'y a qu'une différence tout à fait négligeable entre les doses létales de la solution récemment préparée et de la solution conservée pendant trois ans, ce qui indique donc qu'il y a eu que très peu de diminution du pouvoir insecticide en trois ans de stockage. La DL₅₀ de la solution fraîchement préparée est de 0,095 mm³ par gramme d'insecte pour un délai d'observation de trois jours; elle est de 0,100 mm³ par gramme pour la solution qui a subi un stockage de trois ans en Afrique (Gry *et al.*, 1966).

3. Effet des bactéries sur le développement larvaire chez les L5 de *L. migratoria*

Concernant ce paramètre, il paraît très affecté par les entomopathogènes utilisés. En effet les témoins présentent, les durées de développement les plus courtes (15.48 jours), suivis des individus traités par la faible et moyenne dose et après la forte dose de chaque suspension bactérienne. Des durées de 21,02 ; 21,79 ; et 23,59 jours sont enregistrées respectivement pour les larves traitées à la faible dose D3, la moyenne dose D2 et la forte dose D1 de la souche bactérienne *Bacillus sp.*(HE805963) et 20,58; 21,27 et 23,36 jours chez les larves traitées par les dose D3, D2 et D1 de la bactérie *B. sphaericus*. La durée du 5^{ème} stade larvaire chez les larves traitées par *Bacillus sp.* (HE799656) à la D3 est de 20,56 jours contre 20,05 et 20.17 chez les larves traitées par les D3 et D2 de *P. fluorescens bvIII* avec la mort de

l'ensemble des larves traitées par les doses D1 et D2 de la souche *Bacillus sp.* (HE799656) et la doses D1 de la bactérie *P. fluorescens bvIII*, avant l'achèvement du 5^{ème} stade larvaire et le passage au stade imago.

Nous signalons aussi des difficultés de la mue imaginale et des malformations chez les survivants après traitement.

Chez les larves, la température est parmi les facteurs qui influencent la vitesse et la réussite du développement (Duranton et al., 1982). Toutefois, les conditions de la présente expérience sont contrôlées ; la température est de $30^{\circ}\pm 2^{\circ}$., ce qui laisse présager que la réduction de la durée de vie des larves est vraisemblablement due à la présence de la bactérie dans son hémolymphe.

Chez les grégaires, au Sahel, la durée du développement larvaire est d'une trentaine de jours. Le stade le plus bref est le premier, le cinquième est le plus long. En pourcentage, la durée du stade 5 est de 32 % de la durée totale du développement, soit 11 jours avec une durée totale de développement de 34 jours (**Duranton et Lecoq, 1990**). **Rachadi (1991) a estimé cette durée de 9 à 18 jours.**

Des expériences similaires entretenues par Tail et al. (2006) ont montré une augmentation de la durée du dernier stade larvaire et que le traitement des larves de *S. gregaria* au diflubenzuron, provoque l'incapacité des individus pour compléter leur mue imaginale. Nos résultats confirment ceux des auteurs précités.

Outtar (2009) signale une absence totale de mue imaginale chez les larves L5 de *L. migratoria* traitées aux trois biopesticides *M. anisopliae*, Triflumuron et le henné, avec une durée moyenne de développement de 16,4 jours chez les larves témoins. De même, Moussa (2003) annonce que le traitement à l'huile de Neem a provoqué un retard de développement et un blocage de l'exuviation et de la mue des larves L4 et L5 de *L. migratoria*.

Ould El Hadj et al. (2006) annoncent que les L5 de *S. gregaria* nourries à base de fragments de chou traités au neem ou au mélia, n'ont pas pu effectuer leur mue imaginale; et 20% seulement de celles traitées par l'eucalyptus ont pu atteindre leur dernière mue.

La même constatation est faite chez les larves de la même espèce traitées par l'extrait foliaire brut d'*Euphorbia guyoniana* (Kemassi et al. 2010), *M. anisopliae*, et *B. bassiana* (Milat-Bissaad, 2011), et *Glinus lotoide* (Ould Ahmadou et al., 2001). Berbouche et al.(2001) notent que même à faible dose et par voie orale, l'extrait de *Cestrum parqui* provoque un blocage de la mue chez les larves dû à l'absence du liquide exuvial qui apparaît au début de la

mue et qui est riche en glycoprotéines et en protéases responsables de la résorption de l'ancienne endocuticule.

Plusieurs auteurs ont travaillé sur cet aspect; Moussa (2003) a trouvé que le traitement à l'huile de Neem provoque une inhibition de la croissance des larves L4 et L5 de *L. migratoria* ainsi que Ould El Hadj *et al.* (2006) chez des L5 de *S. gregaria* mises en présence de chou trempé dans les extraits de Neem, de méliá et d'eucalyptus. Abbassi *et al.*(2005) après traitement au *Peganum harmala*, Ould ahmadou *et al.* (2001), suite à l'alimentation des larves de *S. gregaria*. à base de *Glinus lotoides*, ainsi que Kemassi *et al.* (2010), après traitement des larves de la même espèce par *Euphorbia guyoniana*.

4. Effet des bactéries sur les métabolites hémolymphatiques

4.1. Effet sur les protéines hémolymphatiques

Il se révèle à la lumière des résultats obtenus, que le taux des protéines est élevé chez les individus traités par *Bacillus sp.*(HE799656) et *Bacillus sp.*(HE805963) comparativement aux témoins ; par contre, une nette diminution de la concentration des protéines est obtenue chez les individus traités par *B. sphaericus* et *Pseudomonas fluorescens* bvIII par rapport aux témoins.

Chez les larves traitées par *Bacillus sp.*(HE799656) et *Bacillus sp.*(HE805963), l'augmentation du taux des protéines hémolymphatiques constatée peut être expliquée par l'accumulation de protéines issues de la prolifération de la bactérie injectée directement dans l'hémolymphe ou encore par le fait que l'individu lui-même sécrète des substances de nature protéique comme forme de défense ou en cas de stress.

La réponse aux stress est constituée d'une série d'événements génétiques et métaboliques utilisés par les organismes vivants pour maintenir l'intégrité de leur soma face aux agressions. Chez les insectes, la présence des protéines du stress a été mise en évidence (Gourdon *et al.*, 1998).

Concernant la bactérie *B. sphaericus* ; son activité larvicide est due à un cristal protéique produit pendant la sporulation, appelé toxine binaire ou Bin, qui est formé de deux polypeptides (BinA et BinB).(Neves et Charles,1999 et Opota *et al.*, 2011). La diminution de la quantité de protéines hémolymphatiques peut s'expliquer, alors soit par la présence de ces toxines qui inhibent la biosynthèse des protéines conduisant à une diminution de la protéinémie ou bien par la présence d'enzymes extracellulaires (Priest, 1977) hydrolysant les métabolites hémolymphatique de l'insecte.

Quant à la bactérie *Pseudomonas fluorescens* bvIII; Larpent et Sanglier (1989) annoncent que les *Pseudomonas* peuvent dégrader de multiples macromolécules grâce à des enzymes hydrolytiques exocellulaires parmi lesquelles on peut retenir les protéases. On peut expliquer alors la diminution du taux des protéines hémolympatiques dans ce cas ; par la capacité de ces bactéries à dégrader ces métabolites.

D'après Raccaud-Schoeller (1980), les glandes de mue dépendent d'une hormone juvénile que les corpora allata secrètent pendant la vie larvaire, cependant, l'activité du corpora allata dépend de la protéinémie. On peut conclure alors que la chute du taux de protéines dans l'hémolymphe que nous avons constaté dans notre étude chez les individus traités par les bactéries entomopathogènes *B. sphaericus* et *Pseudomonas fluorescens* bv III d'une part et le prolongement du dernier stade larvaire et l'incapacité de certaines larves à la mue imaginale sont fortement liés.

Pour mieux comprendre la diminution du taux des protéines hémolympatiques enregistrée chez les larves L₅ de *Locusta migratoria* traitées par *P. fluorescens* bv III et la diminution constatée après traitement par *Bacillus sp.*(HE799656), nous avons procédé à une étude qualitative comparative par un profil électrophorétique de l'hémolymphe chez les larves traitées par les 2 bactéries.

Les résultats obtenus montrent une différence dans la constitution protéique de l'hémolymphe entre les larves témoins et celles traitées. En effet, le profil électrophorétique a mis en évidence 7 fractions protéiques chez les témoins, ces fractions protéiques sont caractérisées par leurs mobilités relatives (Rf) et leurs poids moléculaires (PM) qui varient de 45.055 Da à 105.127 Da. Le traitement avec *P. fluorescens* bv III a engendré une réduction du nombre des fractions protéiques (6 bandes) avec des poids moléculaires qui varient de 52.888 Da à 105.127 Da.

Concernant le traitement par *Bacillus sp.*(HE799656), le nombre de bandes protéiques est le même en comparaison avec les témoins (7 bandes) avec un poids moléculaire qui varie de 41.532 Da à 96.906 Da.

On peut dire à la lumière des résultats relatifs à la souche *P. fluorescens* bv III que la diminution du taux de protéines et la disparition de la bande protéique sont fortement liées.

La diminution de ce paramètre fut déjà notée par Halouane (1997), Halouane *et al.* (2001), Kara et Doumandji- Mitchenche (2006), Hemour (2009) et Milat-Bissaad(2011); qui ont montré que le traitement aux champignons ; *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* et

Metarhizium flavoviride affecte la protéinémie des L5 et des adultes de *Schistocerca gregaria* et *Locusta migratoria* quantitativement par une diminution de taux des protéines hémolymphatiques et qualitativement par une réduction dans le nombre et dans la colorabilité des bandes protéiques.

Des résultats similaires ont été soulignés par Moussa (2003), qui a noté une diminution significative des protéines hémolymphatiques et cuticulaires chez *L. migratoria* traitée à l'huile de Neem, cela est justifié par l'action anti-appétante de cette plante.

Au cours d'un travail antérieur, Seymoun *et al.*, (2002) indiquent que la concurrence du *Metarhizium anisopliae var acridum*, avec l'individu de *S. gregaria* vis-à-vis de ces métabolites hémolymphatiques conduit à l'épuisement des réserves en protéines accumulées dans le corps gras. Des résultats semblables ont été observés par Fediere (1982) qui annonce que la présence de l'amibe pathogène *Malanieba locustae* influe sur la protéinémie des criquets parasités, Le taux de protéines circulantes est réduit de 8 % chez les mâles, et de 15 3% chez la femelles au cours de vitellogénèse.

Coulybaly (2002) a signalé une augmentation de la concentration des protéines dans l'hémolymph des adultes d'*Anacridium aegyptium* infectés par *Beauveria bassiana* et par *Metarhizium flavoviride*. De même Soltani (1990), signale une perturbation de protéinémie chez les nymphes de *Tenebrio molitor* L, traitées par le diflubenzuron.

Le henné présente le même effet chez les L5 de *L. migratoria*, par contre le dérégulateur de croissance ; Triflumuron engendre l'augmentation de ces métabolites. (Outtar, 2009). Cet auteur a aussi montré que le nombre de bande protéiques pour les traitées par ingestion au *Metarhizium anisopliae* est le même que celui des témoins avec une diminution de poids moléculaire et que le traitement au henné par ingestion a marqué une diminution de nombre de bandes chez les traités.

4.2. Effet sur les glucides hemolymphatiques

La diminution de la quantité des glucides hémolymphatiques que nous avons enregistrés avec les 3 bactéries du genre *Bacillus* peut être expliquée par l'hydrolyse des sucres réducteurs par les bactéries testées.

Les résultats relatifs à l'utilisation de *P fluorescens* bv III diffèrent de ceux que nous avons obtenus avec le genre *Bacillus*, ce qui est tout à fait normal du fait que, les *Pseudomonas* fluorescents produisent certains métabolites comme les lipopolysaccharides (Lemanceau, 1992), ce qui serait probablement à l'origine de l'augmentation du taux des glucides hémolymphatiques.

Nos résultats ne sont pas en contradiction avec ceux trouvés par d'autres auteurs entre autres Achou et Soltani (1998) et Belaid (2011) qui ont obtenu des réductions assez comparables chez l'abeille ouvrière *Apis mellifera intermissa* L. infectée par *Varroa jacobsoni*, ainsi que Kara et Doumandji- Mitiche(2006) après traitement des L5 de *S. gregaria* par le champignon *Metarhizium flavoviride*.

Nos résultats sont rapprochés de travaux antérieurs (Moretau , 1991)) montrant que le lindane et le fenthion diminuent très significativement la teneur en glucides totaux (50 et 33 %) et du tréhalose circulant (45 % et 36 %) de l'hémolymphe des larves de *L. migratoria* au jour 4 du dernier stade. La deltaméthrine agit de même (diminution de 30 % de la glycémie et de la tréhalosémie). Par contre, chez les animaux intoxiqués par le baygon, ces paramètres ne sont pas modifiés.

Les travaux de Singh (1986) montrent l'épuisement des glucides hémolympatiques (hypoglycémie) chez *L. migratoria* traitée par un insecticide pyréthriinoïde ; la Bioresmethrine.

Les résultats des études menées par Moretau (1991) et Singh (1986) suggèrent que l'épuisement des glucides hémolympatiques, peut être dû à leur utilisation accrue en réponse à l'hyperactivité causée par le traitement insecticide.

En effet Dahoun (2000) a montré que le traitement des larves L₅ de *Locusta migratoria* par le téflubenzuron provoque une diminution significative des concentrations des sucres totaux au cours du stade L₅, par contre à la veille d'exuviation imaginale, le traitement a engendré une augmentation des sucres chez la série traitée comparativement aux témoins.

Enfin et d'après l'étude entreprise par Shairra (2009), une diminution du volume de l'hémolymphe des larves L5 de *S. gregaria* a été observée comme une réponse à l'infection du nématode *Steinernema glaseri*.

5. Effet des bactéries sur l'histologie de l'appareil digestif

A la lumière des résultats obtenus, il s'avère que les bactéries entomopathogènes affectent surtout l'intestin moyen car le mesenteron est la partie d'assimilation et d'absorption, il présente une sensibilité élevée aux traitements biologiques administrés par ingestion par rapport aux deux autres parties de l'appareil digestif ; le stomodeum et le proctodeum.

L'acridien paraît plus affecté par *Pseudomonas fluorescens* bvIII, suivi de la souche *Bacillus* sp.(HE799656) et *Bacillus* sp.(HE805963), cependant l'administration de la suspension

bactérienne *Bacillus sphaericus* n'a aucun effet sur l'histologie de l'appareil digestif de *L. migratoria*.

Plusieurs études portées sur l'histopathologie du tube digestif des acridiens ayant subi des traitements chimiques ou biologiques ont donné des résultats similaires à ceux que nous avons enregistrés ; Bendou (2001) a signalé des altérations remarquables provoquées par l'ingestion des extraits de polyphénols d'olivier chez *L. migratoria* au niveau de l'intestin moyen et Nasiruddin et Mordue (1993) ont remarqué les mêmes effets après ingestion des extraits de *Melia azedarach* par le criquet pèlerin et le criquet migrateur.

Des modifications notables au niveau du tube digestif chez les imagos de *Locusta migratoria* traités par un insecticide chimique le Decis ont été enregistrées par Acheuk (2000).

Idrissi Hassani et Hermas (2008), ayant testé les effets toxiques de *Peganum harmala* (*Zygophyllaceae*) sur le tube digestif du criquet pèlerin *Schistocerca gregaria* ; ont montré que l'intestin moyen présente une réduction de la musculature circulaire externe entraînant un relâchement de l'intestin et une atrophie de la muqueuse intestinale présentant un épithélium strié réduit, en brosse altérée et des signes typiques de nécrose cellulaire.

De même, des traitements par l'huile de Neem apportés sur les larves de cinquième stade de *Locusta migratoria* ont provoqué une destruction de l'épithélium de mesenteron, des caecum gastriques et une légère désorganisation de la musculature (Acheuk Et Doumandji-Mitiche , 2006). Bissaad (2002) a montré des modifications histologiques chez les adultes de *S.gregaria* traités au Fibronil.

.Labdaoui (2007) a étudié l'histologie de l'appareil digestif des adultes de *S. gregaria*, l'effet de *Beauveria bassiana* est observé au niveau de l'intestin antérieur et postérieur par contre l'effet de la plante toxique *Peganum harmala* se manifeste seulement au niveau de l'intestin moyen de l'insecte.

L'application de la bactérie *P. fluorescens* par ingestion sur des L5 de *Schistocerca gregaria* révèle une altération de la membrane péritrophique ainsi qu'un élargissement de la lumière intestinale au niveau de l'intestin moyen (Tail, 1998).

Abbas et Redouane (2007) signalent que la bactérie *B. thuringiensis* n'engendre que quelques altérations au niveau de la partie antérieure du tube digestif des adultes de *S. gregaria*.

Des observations ultrastructurales ont révélé que l'intestin moyen des adultes de *L. migratoria* traités par *B. thuringiensis* était hypertrophié et ont montré une désorganisation considérable en comparaison avec l'intestin moyen des adultes non traités (Quesada-Moraga et Santiago-

Alvarez, 2001), Yan *et al* (2011) ajoutent que le δ -endotoxine de *B. thuringiensis* induit des changements histopathologiques dans les cellules épithéliales de l'intestin moyen des adultes de *L. migratoria*.

Enfin, l'ingestion de la même bactérie par un lépidoptère, engendre un effet immédiat et provoque la mort des chenilles qui résulte de la dégénérescence de l'épithélium intestinal (Habes et Soltani, 1992).

Par ailleurs, un travail réalisé sur des acridiens traités par *B. thuringiensis*, a montré que ces individus ne subissent aucune altération au niveau des trois parties de l'appareil digestif (Chemoul, 1998).

On peut conclure à la lumière de ces résultats, que le pH intestinal acide des criquets a embarrasé la dissolution du cristal de l'endotoxine de la bactérie *B. sphaericus* qui se dissout normalement dans un milieu à pH alcalin (les enzymes intestinales, jouent un rôle dans le processus de dissolution).

Quant à la souche *P. fluorescens* bv III ; les conditions de l'intestin de *L. migratoria* semblent permettre la multiplication de la bactérie qui a trouvé toutes ces exigences dans ce milieu pour exercer son activité insecticide.

Enfin, pour comprendre l'effet des 2 souches *Bacillus sp.*(HE799656) et *Bacillus sp.*(HE805963) sur les 3 parties de l'appareil digestif des larves, il faut d'abord faire une identification complète des 2 souches après un séquençage total et une étude d'homologie ADN-ADN, ceci va nous permettre d'établir leur position taxonomique exacte et ainsi déterminer leur mode d'action.

6. Effet des bactéries sur les souris blanches de laboratoire

Pour l'étude de la toxicité des bactéries sur les souris blanches de laboratoire, aucune mortalité n'est marquée durant toute la période de suivie chez les souris blanches traitées par la bactérie *Bacillus sp.*(HE799656), *Bacillus sp.*(HE805963), *B. sphaericus* et *Pseudomonas fluorescens* bvIII. On a enregistré également un taux de croissance pondérale identique.

Pour l'étude de l'action inflammatoire chez les souris traitées par injection des 4 bactéries, nous avons noté une légère augmentation du poids de la patte gauche traitée par la bactérie. Cette dernière est apparue aussi au niveau de la patte gauche des témoins traitée par l'eau physiologique. Elle se traduit par un gonflement uniquement au niveau du muscle dans lequel nous avons réalisé la piqure. En plus, cette augmentation du poids n'est pas accompagnée de

sécrétion d'œdème (signe d'inflammation), ce qui nous laisse supposer qu'elle est due à la pique et non pas à la bactérie.

Ces agents entomopathogènes de lutte n'ont alors, aucun effet toxique, ni un effet sur le comportement et l'état physiologique des souris blanches qui ont continué à se reproduire et à se développer normalement. Leur activité nutritionnelle a été le plus normalement possible et aucun autre signe n'est remarqué (chute du pelage, diarrhée, comportement agressif baisse d'appétit...).

Il s'avère à la lumière de cette étude que l'exposition aux entomopathogènes *Bacillus sp.*(HE799656), *Bacillus sp.*(HE805963), *B. sphaericus* et *Pseudomonas fluorescens* bvIII n'a aucun impact toxique sur les mammifères lorsqu'ils sont utilisés sur champs comme biopesticide en agriculture

L'exposition de l'être humain et les petits mammifères aux insecticides à base de *Bacillus* peut résulter de l'ingestion de la bactérie déposée sur le feuillage ou d'insectes infectés, de l'inhalation de gouttelettes de la bactérie ou de l'exposition cutanée (Dromigny, 2008).

Cependant, dans le cadre d'une étude de terrain réalisée au Canada, Buckner et *al.* (1974) ont noté que les petits mammifères (souris sauteuse des bois, souris sylvestre, grande musaraigne, musaraigne commune, campagnol à dos roux, tamia rayé) ont continué de se reproduire durant toute la durée des traitements. Ils ont indiqué que les traitements au Bt n'avaient pas altéré la structure de la communauté de petits mammifères vivant dans les secteurs traités.

Siegel et *al.* (1987, 1990) ont établi l'innocuité des formulations de Bti pour le rat, la souris et le lapin. Ils n'ont observé aucun signe d'infection par *B.thuringiensis* ni chez le rat, ni chez la souris, Selon ces auteurs, le Bti est non virulent et non envahissant chez les mammifères et peut être utilisé sans danger dans des environnements où l'exposition humaine est prévisible.

Dans le même contexte, les travaux publiés par l'Agence de Réglementation de la Lutte Antiparasitaire « ARLA » (2007) contiennent peu de rapports d'effets nocifs de *Bacillus subtilis* qui a été mise en cause dans des cas de mastite bovine et de trouble de reproduction chez les chèvres. Cependant cette bactérie isolée des tissus infectés de ces mammifères ne s'est pas avérée pathogène pour la souris blanche suisse. Aucun autre rapport d'effet nocif n'a été publié malgré l'omniprésence de ces microorganismes dans l'environnement.

De même Monteny (1990), Belles-Isles et *al.* (2007) ainsi que Yovo(2010), indiquent que les larvicides *Bacillus thuringiensis* et *Bacillus sphaericus* étudiés dans le cadre de la lutte biologique ne présentent pas un potentiel d'impact important sur l'environnement car ils

présentent des risques négligeables pour les espèces qui pourraient être exposées, comme les mammifères, les oiseaux, les poissons ou les batraciens lorsqu'ils sont appliqués conformément aux doses opérationnelles recommandées

De même; les travaux de Lacey et Merrit (2003) démontrent que *Bacillus sphaericus*, lorsqu'il est appliqué aux doses prescrites par les manufacturiers, ne présente que très peu d'effets envers les espèces non visées. De plus, *Bacillus sphaericus* ne s'accumule pas dans les tissus des mammifères ; l'innocuité du produit pour les organismes non visés s'explique en partie du fait que les intestins de ces organismes ne sont pas pourvus des récepteurs sensibles à la toxine.

Halouane (2008) lorsqu'il a traité des rats et des souris par le champignon *Beauveria bassiana*, n'a constaté aucun cas de mortalité, Cependant elle a montré que l'effet inflammatoire de *B.bassiana* sur le poids de la patte gauche (traitée) et droite (non traitée) chez la souris cobay, se traduit par l'élévation de poids de la patte gauche traité comparativement à la patte droite non traité et l'inflammation évolue avec la concentration de la dose.

Enfin Zimmermann(2007) montre que *Beauveria bassiana* est peu spécifique, les risques d'effets sur les organismes non ciblés sont grands. Des effets négatifs ont été observés en laboratoire chez certains poissons mais pas chez les oiseaux entomophages ni les mammifères (dont l'homme).

En revanche, aux doses normalement appliquées, le Bt n'a jamais causé d'effets phytotoxiques. De même aucun effet néfaste n'a été signalé sur *Coccinella septempunctata* et d'autres espèces de coccinelles ni parmi les colonies d'abeilles à la suite de traitements foliaires au Bt ou de l'exposition des abeilles à la bactérie en présence de conditions naturelles ou simulées. Ainsi Aucune mention d'effets néfastes directs pour les amphibiens ou les reptiles n'a été trouvée dans la littérature et aucune mortalité n'a été observée chez les poissons, les populations d'oiseaux et l'homme (Joung et Cote (2000)

7. Etude de la persistance de *Bacillus sp.*(HE799656) et *P. fluorescens* bv III sur le feuillage du blé tendre d'hiver et dans le sol

La conservation des agents de lutte biologique dans les agro-écosystèmes est l'une des stratégies adoptées pour le l'exploitation des entomopathogènes.

Les résultats que nous avons obtenus indiquent que les 2 microorganismes entomopathogènes *Bacillus sp.*(HE799656) et *Pseudomonas fluorescens* bv III persistent sur le feuillage de blé

tendre d'hiver et dans le sol avec une différence soit dans le nombre de colonies persistantes ou dans la durée de la persistance.

En effet, concernant la persistance sur le feuillage, le nombre de bactéries de *Bacillus sp.*(HE799656) persistant a diminué progressivement dans le temps jusqu'à la disparition totale le 9^{ème} jour. De même *P. fluorescens* bv III a persisté sur le feuillage en grand nombre durant 6 jours pour disparaître complètement après ce temps.

Cette disparition peut être expliquée par la forte chaleur qui a précédé le dernier échantillonnage, ce qui a provoqué un assèchement des feuilles, la bactérie alors meurt ou elle tombe pour trouver un autre endroit de vie favorable comme le sol.

Par contre, la persistance des 2 bactéries dans le sol est meilleure, elle reste stable durant toute la période de l'expérimentation pour *Bacillus sp.*(HE799656), de même *Pseudomonas*, la persistance de *fluorescensbvIII* dans le sol est en augmentation durant les premiers jours pour se stabiliser après.

En effet la majorité des bactéries du genre *Bacillus* et *Pseudomonas spp* fluorescents sont des bactéries d'origine tellurique d'où elles tirent leurs besoins nutritifs de la matière organique, azotée et les sels minéraux présents dans sol (Mamoun et Olivier, 1989, Davet, 1996 ; Flandrois ,1997 ; Delarras, 2007 et Ashnaei et al, 2009).

La persistance des microorganismes entomopathogènes dans l'environnement dépend de plusieurs facteurs dont les principaux sont l'exposition au soleil, la température, le déficit hygrométrique, le rayonnement solaire, en particulier le rayonnement ultraviolet et les précipitations.

Dans le sol, la persistance des deux microorganismes entomopathogènes peut être due aussi aux caractères physico-chimiques et granulométriques du sol utilisé, la présence des éléments nécessaires à leurs croissance tels que C, H, N, O en quantité importante, le P et le S et enfin les oligo-éléments (Na, K⁺, Mg⁺⁺, Ca⁺⁺, CaCO₃) en faibles quantités, ainsi qu'au pH neutre du sol (pH=7,4) et à sa texture argilo-sableuse (Annexe 7).

Caron et al. (2006) trouvent que certaines souches de *Bacillus subtilis* colonisent les organes des végétaux où elles relâchent des composés permettant de réduire la compétition pour l'espace et les nutriments. De même Davet (1996) décrit que des souches de *Pseudomonas fluorescens* sont capables de vivre en antagoniste avec le champignon *Gaeumannomyces graminis var tritici* qui attaque les feuilles de blé.

D'après les résultats marqués par Beckwith et Stelzer (1987), *Bacillus thuringiensis* peut persister jusqu'à dix jours sur le feuillage. Par contre Joung et Cote (2000) montrent que cette bactérie perd 50% de son potentiel insecticide après le 3^{ème} jour de pulvérisation sur feuillage, et une deuxième application est donc souvent nécessaire contre certains insectes.

Le devenir du *Bacillus thuringiensis* dans le sol dépend vraisemblablement de l'intensité de la compétition avec les autres formes microbiennes. En effet, l'inoculation dans le sol à la dose de 10⁵ cellules par gramme de sol, *Bacillus thuringiensis* s'est maintenu à la densité de 10³ cellules par gramme pendant 12 à 16 mois (Akiba *et al.*, 1977).

Les travaux réalisés par Inglis *et al.* (1997) montrent que les conidies de *Beauveria bassiana* persistent sur deux types de feuillage (la luzerne, chiendent) durant une période de 20 jours. La diminution de la persistance de *B. bassiana* est due à ce que ses conidies s'infiltrèrent sous la couverture des récoltes, tombent à la surface du sol et continuent de vivre dans le sol argileux-glaiseux. Des isolats de *B. Bassiana* ont persisté au bout de 4 mois dans le sol et après inoculation dans différentes parties du Pin (racines, aiguilles,...) (Brownbridge *et al.*, 2012).

Les spores de *Metarhizium anisopliae var acridum* persistent longtemps sur les végétaux et gardent leur pouvoir d'infection pendant plusieurs jours ou même plusieurs semaines ce qui réduit le besoin en traitement répété souvent nécessaire avec les insecticides chimiques (Arthurs *et al.*, 2001).

Une formulation contenant le virus entomopathogène Nuclear Polyhedrovirus (AgMNPV) a été conservée dans une armoire de laboratoire pendant 20 mois ensuite elle a été ajoutée à l'alimentation artificielle des larves de 4^{ème} stade d'*Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). Cette préparation n'avait perdu que 18,3% de son activité initiale (Batista Filho *et al.*, 2001a).

Enfin, à la lumière de cette étude, on conclue que les 2 microorganismes entomopathogènes étudiés peuvent persister durant une période importante dans l'environnement notamment le sol, cela pourrait constituer une stratégie nécessaire aux succès de la lutte biologique contre les insectes nuisibles et ravageurs des cultures.

8. Etude *in vitro* de la compatibilité des microorganismes entomopathogènes avec les pesticides chimiques

Les tests de compatibilité réalisés montrent que les diamètres des zones d'inhibition sont nuls pour les trois insecticides La deltaméthrine, la lambda-cyhalothrine et le Téflubenzuron vis-à-vis des 4 souches bactériennes testées (*Pseudomonas fluorescens* bv III, *Bacillus sp.*(HE799656), *Bacillus sp.*(HE805963), et *B. sphaericus*).

Ces dernières sont alors, compatibles avec les produits évalués et peuvent être compatibles aussi avec de nombreux autres produits chimiques. Ce qui constitue un résultat encourageant pour leur utilisation dans le cadre de lutte intégrée avec les insecticides chimiques contre les acridiens.

La compatibilité de ces agents entomopathogènes avec d'autres moyens de contrôle font d'excellents candidats pour des programmes de gestion intégrée (Jacques et Morris, 1981).

En effet l'action des pesticides sur la croissance végétative et la sporulation des microorganismes varie en fonction de la nature chimique des produits, leur concentration et de l'espèce microbienne (Batista Filho *et al.*, 2001b). Ces derniers ajoutent que le thiaméthoxame est compatible avec *B. thuringiensis*, *B. bassiana*, *M. anisopliae* et *Sporothrix insectorum*; Par contre l'endosulfan, le monocrotophos et la deltaméthrine sont les insecticides qui ont le plus affecté ces agents de lutte biologique.

Les nématodes entomopathogènes sont aussi compatibles avec la plupart des insecticides chimiques et biologiques (Gaugler 2000). Aquino *et al.* (2006) ont constaté que les champignons et les nématodes entomopathogènes sont une excellente alternative pour la lutte contre le charançon, comme ils étaient en mesure d'éliminer jusqu'à 89,3% des populations de larves et d'adultes de cet insecte. D'après une étude entreprise par Aquino *et al.* (2011), les fongicides (Méfénoxam, chlorothalonil) diminuent de façon significative le pourcentage de germination des spores de champignons entomopathogènes de *Beauveria bassiana* et *Metarhizum anisopliae* ainsi que l'insecticide carbofuran (2 L / ha) a éliminé 89% des nématodes entomopathogènes (*Steinernema feltiae* et *Heterorhabditis bacteriophora*).

Duran (1998) a constaté que le fongicide chlorothalonil réduit de façon significative la croissance des champignons entomopathogènes. Par conséquent, leur application doit être espacée autant que possible.

En effet, les pesticides peuvent agir d'une manière positive en combinaison avec les entomopathogènes. À des doses sublétales ils interagissent avec ceux-ci en causant des maladies infectieuses par le stress, ou rendre les insectes plus sensibles à l'action des toxines microbiennes. À cet égard, Chen *et al.* (1974) ont noté que *B. thuringiensis*, en combinaison avec le carbaryl, avait un effet synergique sur le contrôle des *Heliothis virescens*. L'interaction entre *B. bassiana* et une huile minérale a été évaluée par Batista Filho *et al.* (1995) afin de contrôler la pyrale du bananier, *Cosmopolites sordidus* (all.). Ils ont observé un effet additif de l'association, qui a causé 98% de mortalité des insectes adultes, comparativement à 70% causée par le champignon seul et 33% par de l'huile minérale seule.

D'autre part ; les effets des pesticides sur la germination des conidies, la croissance végétative et la sporulation du champignon entomopathogène *Beauveria bassiana* (Bals.) ont été étudiés. Les résultats ont indiqué que flufenoxuron n'est pas compatible avec *B. bassiana* et il a causé une inhibition totale de son développement. La formulation compatible avec *B. bassiana* est l'imidaclopride. Cette formulation pourrait être utilisée simultanément avec cet entomopathogène dans la gestion intégrée des ravageurs (Alizadeh *et al.*, 2007).

L'étude réalisée par Mochi *et al.*, (2005) visait à analyser l'action de certains acaricides (abamectine), fongicides (Mancozèbe, tébuconazole), insecticides (trichlorfon) et herbicides (glyphosate, trifluraline et Ametrin), contenant des ingrédients actifs différents sur *Metarhizium anisopliae* Metsch. inoculés dans un sol autoclavé. Les résultats indiquent que l'action toxique des pesticides sur le champignon dans le sol est faible, ce qui suggère que cet agent de lutte peut être utilisé en combinaison avec des pesticides sans compromettre son activité.

Par ailleurs, un travail réalisé *in vitro* a montré que certains insecticides inhibent de façon significative la croissance du mycélium et la germination des conidies des champignons entomopathogènes *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) et *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize). Lorsban était l'insecticide le plus toxique suivie par Lannate et Pirate. Cascade et Match, étaient relativement moins toxiques pour les agents entomopathogènes. A l'inverse, Abamectine et Curacron étaient compatibles avec une inhibition de la croissance moindre (Asi *et al.*, 2010), Ces derniers suggèrent que, sauf quelques-uns (Lorsban et Lannate) tous les autres insecticides testés peuvent être utilisés avec les champignons entomopathogènes.

Cependant, les résultats peuvent différer sur champ parce que *in vitro* les champignons sont exposés à des concentrations maximale d'insecticides ce qui ne se produit pas dans les

conditions de terrain. En outre, les champignons peuvent récupérer après la décomposition de certains pesticides chimiques sur les feuilles des plantes. Donc, les effets peuvent être temporaires et non permanents. Par conséquent, une haute toxicité in vitro d'un produit ne sera pas toujours la même sur champs (Butt et Brownbridge, 1997), mais est susceptible de se produire (Alves *et al.*, 1998).

Plusieurs études concernant les effets inhibiteurs de certains pesticides ont fourni des informations pour le choix des pesticides à action plus sélective sur les entomopathogènes, et la plupart d'entre eux ont été menés sous des conditions de laboratoire (Jaques et Morris, 1981, Calderon *et al.* 1991, Silva *et al.* 1993).

Enfin, il se révèle à la lumière de cette étude que l'évaluation de cette interaction doit être envisagée avant de recommander un agent chimique donné, elle représente un outil important dans les programmes de gestion intégrée des ravageurs.

Conclusion.

Dans notre étude, nous avons évalué l'impact biologique de quelques souches bactériennes sur l'acridien *Locusta migratoria* afin de valoriser au mieux leurs efficacités entomopathogènes dans le but d'élargir leurs spectres d'action.

Notre travail est divisé en deux parties ; dans un premier temps, nous avons isolé à partir de sol au niveau d'une palmeraie située dans la région d'Adrar au sud de l'Algérie, des bactéries locales. Après purification, les isolats sont identifiés suivant leurs caractères physiologiques, biochimiques et génétiques.

La classification spécifique de ces bactéries a permis d'affilier les souches bactériennes isolées du genre *Bacillus* en 5 espèces: *B. circulans*, *B. subtilis*, *B. thuringiensis*, *B. sphaericus* et *B. coagulans*.

Concernant le groupe *Pseudomonas spp* fluorescents, la classification spécifique et intraspécifique a permis d'affilier les souches bactériennes probablement en 3 espèces : *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas chlororaphis*, *Pseudomonas putida*.

Pour l'identification moléculaire des souches étudiées, nous avons procédé à l'extraction de l'ADN, PCR et séquençage de l'ARN 16S.

La position phylogénétique des deux souches étudiées Strain-B1 et Strain-B2 est représentée dans un arbre phylogénique tracé par la méthode de Neighbor-Joining. Les séquences d'ADNr 16S de ces deux souches ont été enregistrées dans la banque de donnée EMBL/EBI sous les numéros d'accessions HE799656 et HE805963 respectivement. Elles sont identifiées alors comme *Bacillus sp.* (HE805963) et *Bacillus sp.* (HE799656).

D'une autre part, nous avons réalisé une étude sur les incidences biologiques de ces bactéries sur les larves de 5^{ème} stade L5 du criquet migrateur *Locusta migratoria*.

Pour cela, nous avons choisi 4 souches parmi les bactéries isolées, il s'agit de *Bacillus sp.*(HE799656) (1,60 mg/ml, 0,59 mg/ml et 0,33 mg/ml), *Bacillus sp.*(HE805963) (1,67 mg/ml, 0,62 mg/ml et 0,35 mg/ml.), *Bacillus sphaericus* (1,72 mg/ml, 0,75 mg/ml et 0,28 mg/ml) et *Pseudomonas fluorescens* bvIII (1,7 mg/ml, 0,65 mg/ml et 0,31 mg/ml). Le traitement des larves L₅ de *Locusta migratoria* par ces 4 bactéries a provoqué des symptômes et des comportements très remarquables (des mortalités, difficulté de la mue imaginale et malformations, retard important de la maturité sexuelle, perte d'appétit, diminution de l'activité,.....).

Après traitement par *Bacillus sp.*(HE799656), Le taux de mortalité atteint 100% au bout de 12 jours après traitement à la forte concentration D1 suivi de *P. fluorescens* avec un taux de mortalité finale de 100% atteint le 18^{ème} jour après le traitement par la même concentration. Par contre, 86,67% de mortalité sont obtenus après traitement à la forte dose de *Bacillus sp.*(HE805963) au bout de 22 jours. Enfin chez les individus traités par *B. sphaericus*, des mortalités de 76,67% sont obtenues pour la concentration D1 le 22^{ème} jour.

Parallèlement, l'examen des TL₅₀ montre que les larves L5 de *L. migratoria* traitées par *Bacillus sp.*(HE799656) présentent les TL50 les plus faibles, suivies des L5 traitées par *P. fluorescens* bvIII et ensuite celles traitées par *Bacillus sp.* (HE805963). Enfin, les larves traitées par *B. sphaericus* présentent les TL50 les plus élevés.

Si l'on compare les concentrations létales CL₅₀ des différentes souches testées, on peut constater que les souches *Bacillus sp.*(HE799656) et *P. fluorescens* bvIII se montrent plus efficaces et plus rapides d'action que les autres. Elles présentent en général, les CL₅₀, les plus faibles dans tous les temps (5, 7 et 14 jours après traitement).

L'étude du développement larvaire du cinquième stade larvaire témoigne que le rythme de croissance est plus marqué chez les larves témoins (15,48 jours), suivis des individus traités par la faible et moyenne dose et après la forte dose de chaque suspension bactérienne avec des durées de développement allant de 20,05 à 23,59 jours chez les larves traitées.

Quant au dosage quantitatif des protéines, il se révèle à la lumière des résultats obtenus, que le taux des protéines est élevé chez les individus traités par *Bacillus sp.*(HE805963) et *Bacillus sp.*(HE799656) comparativement aux témoins. Par contre, une nette diminution de la concentration des protéines est obtenue chez les individus traités par *B. sphaericus* et *Pseudomonas fluorescens* bvIII par rapport aux témoins.

L'électrophorèse sur gel de polyacrilamide à 10% en milieu dénaturant des protéines hémolympatiques des larves L₅ de *L. migratoria* traitées par *P. fluorescens* III et *Bacillus sp.*(HE799656) montre une différence qualitative dans les fractions protéiques entre les témoins et les traités.

L'examen comparatif des résultats relatifs au dosage des glucides obtenus pour les témoins et pour les jeunes traités à l'aide des bactéries *Bacillus sp.*(HE799656), *Bacillus sp.*(HE805963) et *B. sphaericus* nous a permis de constater une diminution importante de la teneur en glucides hémolympatiques comparativement aux témoins notamment avec la souche *B. sphaericus*. Par ailleurs; chez les larves traitées par *Pseudomonas fluorescens* III, la concentration en glucides est relativement élevée comparativement aux témoins.

Concernant l'étude histologique, nous notons essentiellement que l'examen des différentes parties du tube digestif sur les larves traitées par les 4 bactéries a montré des différences de structure notamment au niveau du mésenteron.

Concernant, l'étude de la toxicité des 4 bactéries sur les souris blanches de laboratoire, aucune mortalité n'a été marquée durant toute la période de suivie chez les souris blanches traitées par les bactérie *Bacillus sp.*(HE799656), *Bacillus sp.*(HE805963), *B. sphaericus* et *Pseudomonas fluorescens* bv III. On a enregistré également un taux de croissance pondérale identique. L'action inflammatoire chez les souris traitées par injection des 4 bactéries est aussi absente.

Pour l'étude de la persistance de *Bacillus sp.*(HE799656) et *Pseudomonas fluorescens* bv III sur le feuillage de blé tendre d'hiver et dans le sol, on conclut que les 2 microorganismes entomopathogènes peuvent persister durant une période importante dans l'environnement notamment le sol. Cela pourrait constituer une stratégie nécessaire aux succès de la lutte biologique contre les insectes nuisibles et ravageurs des cultures.

Enfin, les tests de compatibilité réalisés montrent que les diamètres des zones d'inhibition sont nuls pour les trois insecticides la deltaméthrine, la lambda-cyhalothrine et le Téfubenzuron vis-à-vis des 4 souches bactériennes testées (*Pseudomonas fluorescens* bv III, *Bacillus sp.*(HE799656), *Bacillus sp.*(HE805963), et *B. sphaericus*).

Ces dernières sont donc, compatibles avec les produits chimiques évalués; ce qui constitue un résultat encourageant pour leur utilisation dans le cadre de lutte intégrée avec les insecticides chimiques contre l'insecte ravageur *Locusta migratoria*.

En conclusion, il apparaît clairement que les 4 souches bactériennes isolées représentent une avancée intéressante dans la lutte contre les acridiens en général et le criquet migrateur en particulier car elles affectent sensiblement le développement et le métabolisme de cet insecte ainsi que l'histologie de l'appareil digestif.

Une fonction très importante semble être affectée aussi par les entomopathogènes; la reproduction ainsi que le processus de la mue imaginale.

D'autre part les 4 souches bactériennes sont persistantes dans l'environnement, très compatibles avec les pesticides chimiques les plus utilisés dans la lutte antiacridienne et elles ne sont pas toxiques pour les souris blanches de laboratoire donc pour l'homme.

Enfin, cette étude projette des perspectives où il serait intéressant, d'étudier de façon approfondie le mécanisme d'action de ces bactéries au niveau de l'insecte.

La connaissance du mode d'action des insecticides biologiques revêt donc une importance considérable non seulement pour la compréhension des processus physiologiques fondamentaux chez les insectes mais aussi parce qu'elle est susceptible de faire progresser la recherche appliquée en matière de mise au point de nouvelles substances insecticides plus efficaces et ayant un moindre impact sur les organismes non cibles.

Il est très avantageux d'approfondir les études sur les toxines de *B. sphaericus* et d'étudier leurs toxicités après extraction. Il est de même pour la souche *Pseudomonas fluorescens* bv III, Il est très important de faire l'extraction de ses antibiotiques afin de définir leur impact et l'efficacité de chacun sur le criquet migrateur dans le but d'élargir leur spectre d'action et de les intégrer dans la lutte antiacridienne. Pour les souches *Bacillus sp.*(HE799656) et *Bacillus sp.*(HE805963; il serait donc nécessaire d'effectuer un séquençage total de d'ARNr 16S et une étude d'homologie ADN-ADN afin d'établir la position taxonomique exacte de ces souches. Ceci va nous permettre de comprendre leur mécanisme d'action.

La dernière alternative est de procéder à l'analyse qualitative des protéines afin de déterminer la nature des protéines hémolympatiques disparues chez les larves traitées par les 4 souches bactériennes et leur relation avec le prolongement de la durée de développement des larves L5 et peut être même comprendre la cause de l'absence de la mue imaginale et le retard marqué dans la maturité sexuelle.

Références bibliographiques

- 1- **Abbas L et Redouane N., 2007.** *Etude préliminaire de l'activité insecticide des alcaloïdes du Cytise à trois fleurs Cytisus triflorus L'Hérit et de la bactérie Bacillus thuringiensis vis à vis du criquet pèlerin Schistocerca gregaria (Forskal, 1775).* Mém. Ing. Fac. scie. UMBB, Boumerdes, 130 p.
- 2- **Abbassi, K., Mergaoui, L., Atay-Kadiri, Z., Ghaout, S. et Stambouli, A. 2005.** Activités biologiques des feuilles de *Peganum harmala* (Zygophyllaceae) en floraison sur la mortalité et l'activité génésique chez le criquet pèlerin. *Zool. baetica*, 16: 31-46.
- 3- **Abot W.B., 1925.** A method for computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ.Ent.* 18: 256-267.
- 4- **Abou Thiam, 1991.** Problématique de l'utilisation des insecticides chimiques dans la lutte anti-acridienne. In : Essaid A. *La lutte anti-acridienne.* Ed. AUPELF-UREF, John Libbey Eurotext, Paris © 1991, pp. 193-206.
- 5- **Acheuk F. 2000.** *Effet de quelques substrats alimentaires sur quelques paramètres de la biologie et de la reproduction de L. migratoria (Orth. Oedipodinae). Etude de l'efficacité de deux insecticides de synthèse : Dursban et Décis au laboratoire, et des perturbations histopathologiques du tube digestif.* Thèse Magister, Inst. Nati. Agro., El Harrach, 206 p.
- 6- **Acheuk F. et Doumandji-Mitiche B., 2006.** Etude de l'impact de l'huile de Neem sur l'histologie de tube digestif des larves L5 du criquet pèlerin. *Recueil communic. Congr. international. Zool.*, Inst. Nati. Agro., El Harrach.
- 7- **Achou M. et Soltani N., 1998.** Impact de *Varroa jacobsoni* Oudemans sur la morphométrie et la composition biochimique de l'hémolymphe chez l'abeille ouvrière *Apis mellifera intermissa* L. *Parasitica.*, 53(4), 127-134.
- 8- **Akiba Y., Sikijima Y., Atzawa K. and Fujiyoshi N., 1977.** Microbial ecological studies on *Bacillus thuringiensis* II. Dynamics of *B. thuringiensis* in sterilized soil. *Japanese J. Appl. Entomol. Zool.*, 21: 41-46.
- 9- **Albrecht F.O., 1967.** *Polymorphisme phasaire et biologie des acridiens migrants.* Collection GPB Masson et Cie, Paris, 194 pp.
- 10- **Alizadeh A., Samih MA., Khezri M. and Riseh RS., 2007.** Compatibility of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. with Several Pesticides. *International Journal Of Agriculture & Biology.* 9(1):31-34.
- 11- **Allal- Benfkih L., 2006.** *Recherches quantitatives sur le criquet migrant Locusta migratoria (Orth, Oedipodinae) dans le Sahara algérien, Perspectives de lutte biologique à l'aide de microorganismes pathogènes et de peptides.* Thèse de Doctorat: Université de Limoge, Laboratoire UMR INRA 1061, Inst. Nat. Agro., El Harrach, Alger.
- 12- **Allal-Benfekih L., Petit D. et Doumandji-Mitiche B., 2007.** Vers une nouvelle approche d'utilisation des bactéries en lutte anti-acridienne : Premiers résultats sur l'effet de *Bacillus subtilis* sur *Locusta migratoria*. 17^{ème} Conférence de l'Association Africaine des Entomologistes; 11-15 juin 2007, Université Cheikh Anta Diop de Dakar, Dakar- Fann, Sénégal.
- 13- **Alves S.B., Almeida J.E.M. et Salvo S. 1998.** Associação de produtos fitossanitários com *Beauveria bassiana* no controle da broca e ferrugem do cafeeiro. *Man. Integr. Plagas* 48: 18-24.
- 14- **Amjad M., Hamid Bashir M., Afzal M., Altaf Sabri1 M. and Javed N., 2012.** Synergistic Effect of Some Entomopathogenic Fungi and Synthetic Pesticides, Against Two Spotted Spider Mite, *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). *Pakistan J. Zool.*, vol. 44 (4): 977-984.

- 15- Ammadou B., 2003.** Généralités sur la lutte biologique contre les insectes. *Agrhymet info.*, 5(3), 10-11.
- 16- Anoumou YD., Mireille P.D. et Aoussi H., 2001.** Activité antimicrobienne de la ciprofloxacine et de la nétilmicine comparée à celle de divers antibiotiques à Lomé, Togo. *Cah. Etud. rech franc. / Santé.* 11(1) : 63-6.
- 17- Appert J. et Deuse J., 1982.** *Les ravageurs des cultures vivrières et maraichères sous les tropiques.* Ed. G- P Maisonneuve & Larousse, Paris, 420p.
- 18- Aquino BT., Ruiz VJ. et Iparraguirre CM. 2006.** Control biológico del picudo negro (*Scyphophorus interstitialis* Gyllenhal) con nemátodos y hongos entomopatógenos en agave en Oaxaca, México. *UDO Agríc.* 6(1): 92-101.
- 19- Aquino B.T., Ruiz V.J., Giron P.S., Pérez P.R., Martínez T.S.H., and Silva R.M.E., 2011.** Interrelationships Of The Agave Weevil *Scyphophorus Acupunctatus* (Gyllenhal), *Erwinia Carotovora* (Dye), Entomopathogenic Agents And Agrochemicals. *African Journal Of Biotechnology.* 10(68): 15402-15406,
- 20- ARLA (Agence de la Réglementation de la Lutte Antiparasitaire), 2007.** Souche QST 713 de *Bacillus subtilis* Serenade MAX, Serenade ASO, Rhapsody ASO, Serenade Garden Concentrate, Serenade Garden Ready To Use. Rapport d'évaluation, 75p.
- 21-Arthurs S. P., Thomas M. B. and Lawton J. L., 2001.** Seasonal patterns of persistence and infectivity of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* in grasshopper cadavers in the Sahel. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 100: 69–76.
- 22- Ashnaei S. P., Sharifi T. A., Ahmadzadeh M. and Behboudi K., 2009.** Interaction of different media on production and biocontrol efficacy of *Pseudomonas fluorescens* P-35 and *Bacillus subtilis* B - 3 against gray mould of apple. *Journal of Plant Pathology*, **91** : 65 - 70.
- 23- Asi MR., Bashir MH., Afzal M., Ashfaq M. and Sahil ST., 2010.** Compatibility of entomopathogenic fungi, *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces fumosoroseus* With selective insecticides. *Pak. J. Bot.*, 42(6): 4207-4214.
- 24- Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidelman J.G. and Struhl KE., 1988.** *Current Protocols in Molecular Biology.* Wiley, New York.
- 25- Bachelier G. et Gavinelli R., 1966.** Dosage global des glucides du sol par les méthodes colorimétriques à l'anthrone et à l'orcinol. *Cah. ORSTOM. sér. Pédol.*, IV(3) : 97-103.
- 26- Balachowsky A. et Mesnil L., 1936.** *Les insectes nuisibles aux plantes cultivées, leurs mœurs, leur destruction.* Ed. Etablissements Busson, Paris, 1921p.
- 27- Barbottin A., 2004.** *Utilisation d'un modèle de culture pour évaluer le comportement des génotypes : Pertinence de l'utilisation d'Azodyn pour analyser la variabilité du rendement et de la teneur en protéines du blé tendre.* Thèse Doct. Inst. Nat. Agr., Paris-Grignon, 178 p.
- 28- Barbouche N., Hajjem B., Lognay G. et Ammar M., 2001.** Contribution à l'étude de l'activité biologique d'extraits de feuilles de *Cestrum parqui* L'Hérit. (Solanaceae) sur le criquet pèlerin *Schistocerca gregaria* (Forsk.). *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 2001 **5** (2), 85–90.
- 29- Batista Filho A., Almeida J.E.M. and Lamas C., 2001b.** Crop protection. Effect of Thiamethoxam on Entomopathogenic Microorganisms. *Neotropical Entomology.* 30(3): 437-447.
- 30-Batista Filho A., Leite L.G., Raga A. and Sato M.E.. 1995.** Enhanced activity of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. associated with mineral oil against *Cosmopolites sordidus* (Germar) adults. *An. Soc. Entomol. Brasil.* 24: 405-408.
- 31- Batista Filho A., Alves S.B., Augusto N.T., Pereira R.M. and Alves E.F.A., 2001a.** stability and Persistence of Two Formulations Containing *Anticarsia gemmatilis* Nuclear Polyhedrovirus (AgMNPV). *Neotrop. Entomol.* 30 (3): 411-416.

- 32- Batten A., 1966.** The course of the last major plague of the African Migratory Locust, 1928 to 1941. *Pl. Prot. Bull. F.A.O.* 14:1-16.
- 33- Beaumont A., Cassier P. 1970.** *Travaux pratique de biologie animale : zoologie, embryologie, histologie.* Ed. Dunod, Paris, 472 p.
- 34- Beckwith R.C. and Stelzer M.J. (1987):** Persistence of *Bacillus thuringiensis* in two formulations applied by helicopter against western spruce budworm (Lepidoptera: Tortricidae) in north central Oregon. *Jour. Econ. Entomol.*, 80: 204-207.
- 35- Belaid M., 2011.** *Effet du parasitisme par Varroa destructor sur les paramètres morphométriques et physiologiques de l'abeille ouvrière Apis mellifera L., dans la région medio-septentrionale d'Algérie.* Thèse de Doctorat, Ecol. Nat. Sup. Agro., El Harrach, Alger.182 p.
- 36- Belles-Isles J.C., Plourde D., Plamondon J. et Baril J., 2007.** Rapport sectoriel 9. Évaluation des impacts du programme de contrôle vectoriel du VNO sur l'environnement. Institut national de santé publique, Québec, 43p.
- 37- Bellman H. et Luquet G.C. , 1995.** *Guide des sauterelles, Grillons et criquets d'Europe occidentale.* Ed. Delachaux et Niestlé. , Paris .383p.
- 38- Benchaabane M., 2005.** *Caractérisation des effets d'antagonisme microbien et la promotion de la croissance végétale de souches de Pseudomonas spp. fluorescents.* Thèse Doctorat. USTHB, Alger, 230 p.
- 39- Bendou R. 2001.** *Contribution à l'étude anatomique et histophysologique de l'appareil digestif de Locusta migratoria (Linné, 1758). Action histopathologique des extraits de polyphénol totaux de feuille d'olivier Olea europea sur le tractus digestif du criquet migrateur.* Thèse magistère Sci. Agro., Inst. Nati. Agro., El Harrach, 163p.
- 40- Bensalem-Bendjelloul M. 1998.** *Techniques histologiques: Théorie et pratique.* Ed.Off.Pub.Univers., Alger, 109 p.
- 41- Benzina F., 2001.** *Isolement et identification taxonomique des Pseudomonas spp. fluorescent à partir des rhizobactéries du palmier dattier et mise en évidence de leurs activité antagoniste vis-à-vis de Fusarium oxysporum f.sp.albedinis.* Mém. Ing. Blida.77p.
- 42- Benzina F. 2004.** *Indigenous genotype of fluorescent Pseudomonas as potential biological control against verticillium dahliae olive (olea europeal.) wilt pathogen.* Thèse Magister, .Jordan university of science and technology. 108 P
- 43- Berradj F. et Khoudi S., 2005.** *Etude de la toxicité de deux espèces bactériennes vis-à-vis des larves de S. gregaria (Orthoptera, Acrididae).* Mém. DES. UMBB, Boumerdes, 112p.
- 44- Bertrand A. 2007.** *Travaux pratiques. Détermination des activités endon. et exo. B-glucanases, étude de l'activité pectine méthylestérase, dosage des protéines,* INRA-UCBN EVA, 15p.
- 45-Bissaad F.Z., 2002.** *Etude comparative de l'effet du fipronil et d'un entomopathogène Beauveria bassiana Bals. sur le criquet pèlerin Schistocerca gregaria (Forskal, 1775) (Orthoptera, Acrididae).* Thèse Magister Sci. Agro., Inst. Nati. Agro., El Harrach, 112 p.
- 46- Bi-Zhen H., Ying X, Xiao-Rong Z. and Shi Wang-Peng S., 2012.** Molt disruption and mortality of *Locusta migratoria* var. *manilensis* (Meyen) (Orthoptera: Acrididae) caused by insect growth regulators. *African Journal of Biotechnology.* 11(16) : 3882-3887
- 47- Bonnemaïson L., 1961 -** *Les ennemis animaux .des plantes cultivées et des forets.* Ed.Sep, T.I, Paris, 599p.
- 48- Bouaïchi A. and Chihrane J. 2001.***The potential and extended effect of Diflubenzuron (IGR's) on the reproduction and feeding behaviour of desert locust Schistocerca gregaria Forsk à l (Orthoptera, Acrididae).* - 8 th. International Meeting of the Orthopterist's Society, International Conference on Orthopteroid Insects, August 19-22, 2001, Montpellier, France.

- 49- Bradford M., 1976.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical biochemistry* 72, 248-254.
- 50- Brossard et Terry., 1984-***Bactériologie systématique*. Ed. C.R.D.P, Lyon, 220 p.
- 51- Brownbridge M., Reay S.D., Nelson T.L. and Glare T.R., 2012.** Persistence of *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) as an endophyte following inoculation of radiata pine seed and seedlings. *Biological Control*. 61(3) : 194–200.
- 52- Buckner C.H., Kingsbury P.D., McLeod B.B., Mortensen K.L. and Ray D.G.H., 1974.** Evaluation of commercial preparations of *Bacillus thuringiensis* with and without chitinase against spruce budworm. F. Impact of aerial treatment on non-target organisms. Chemical Control Research Institute, Info. Rep. CC-X-59. Canadian Forestry Service, Ottawa.
- 53- Butt T.M. and Brownbridge M., 1997.** Fungal pathogens of thrips. In *Thrips as crop pests*. (Ed.): T. Lewis. CAB international, Wallingford, UK. pp. 399-433.
- 54- Calderon A., Fraga M., Lujan M. and Sanchez E., 1991.** Reproduction de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. y *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) sobre sub-productos industriales. *Proc. Of Caribbean Meetings on Biological Control*. 5-7 Nov. Guadeloupe. F.W.I., pp. 325-326.
- 55- Caroline B. et Dieler H., 2000.** Iron regulation of the hcn ABC genes encoding hydrogen cyanide synthase depends on the anaerobic regulator ANR rather than on the global activator Gac A in *Pseudomonas fluorescens* CHFO. *Microbiology* (146), 2417-2424.
- 56- Caron J., Laverdiere L. et Belanger R., 2006.** Recherche et développement de biopesticides et pesticides naturels à faible toxicité pour les organismes non ciblés et respectueux de l'environnement –Rapport final – Volet Phytopathologie. Québec, Ed. MDDEP, 278p.
- 57- Castella C, 2008.** Cry1C, toxine de *Bacillus thuringiensis* : Analyse des récepteurs potentiels et du mode d'action sur lignées cellulaires Sf9. Diplôme de l'Ecole Pratique des Hautes Etudes. Sciences de la Vie et de la Terre, France.
- 58- Charles J.F., Nielsen-Leroux C. and Delecluse A., 1996.** *Bacillus sphaericus* toxins : molecular biology and mode of action. *Ann. Rev Entomol* 41: 451-472.
- 59- Chauvin, R. 1956.** Anatomie et histologie du tube digestif de *Schistocerca gregaria*. *Bulletin de la Société d'Histoire Naturelle de l'Afrique du Nord*, 18: 488-499.
- 60- Chemoul, M.S. 1998.** Contribution à l'inventaire des espèces des orthoptères au sein de Bab-Ezzouar et l'étude histophysiologique du tube digestif de *Pamphagus elephas* (L) (*Orthoptera*, *Acrididae*). Mém. D.E.S.,Bio. U.S.T.H.P., Bab-Ezzouar, 78p.
- 61- Chen, K.S., Funke B.R., Schulz J.T., Carlson R.B. and Proshold F.I. 1974.** Effects of certain organophosphate and carbamate insecticides on *Bacillus thuringiensis*. *J. Economic Entomol*. 67: 471-473.
- 62- Chippers B., Baker A., Bakker P., and Van Peer R., 1990.** Beneficial and deleterious effects of HCN – producing *Pseudomonads* on rhizosphere interactions. In *plant and soil*.Ed. kluwer academic publishers, Netherlands. pp 75-83.
- 63- Chopard L., 1932.** Sur la présence du criquet migrateur (*Locusta migratoria* L.) en Normandie. *Bulletin de la Société Entomologique de France* 37 : 122-123; Paris.
- 64- Chopard L., 1938.** *La biologie des orthoptères* .Ed. Paul Lechevalier, Paris, 541p.
- 65-Chopard L., 1943.** *Orthoptéroïdes de l'Afrique du Nord. Faune de l'empire français* 1. Paris, Librairie Larose, 450p
- 66- Cloutier C. et Cloutier C., 1992.** Les solutions biologiques de lutte pour la répression des insectes et acariens ravageurs des cultures. In VINCENT C. et CODERRED D., 1992: *lutte biologique*, pp : 20-21, Ed. Gaïtan Morin, Québec, 671 p.

- 67- Coulybaly M., 2002.** *Effet de Beauveria bassiana (B) et Metarhizium flavoviride (G et R) sur l'hémogramme et les protéines de l'hémolymphe d'Anacridium aegyptium (L., 1764) (Orthoptera, Acrididae). Etude de la persistance des spores sur le support végétal.* Mém. Ing. agro., Inst. nati. agro., El Harrach, 99 p.
- 68- Cressman K., 2001-** *Directives sur le criquet pèlerin.* Ed. Organisations des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture, Rome, 56p.
- 69- Davet P., 1996.** Vie microbienne du sol et production végétale. Ed. INRA, Paris, 383 p.
- 70-Dahoun A. 2000.** *Activité biologiques d'un dérégulateur de croissance le Téfluobenzurum sur le cinquième stade larvaire de Locusta migratoria (Linné, 1758) : efficacité et effet sur la biochimie de la cuticule. L'hémolymphe et les ovaires.* Mém. Ing. Agr.. Inst. Nat. Agro.. El-Harrach, 175p.
- 71- Dedet P., 2007.** *La microbiologie, de ses origines aux maladies émergentes.* Ed. Donod. Paris. 262 p.
- 72- Defaut B., 2005.** Sur la répartition de *Locusta migratoria migratoria (L.)* en France (Caelifera, Acrididae, Oedipodinae). *Matériaux Orthoptériques et Entomocénétiques* 10 : 81-86.
- 73- Delarras C., 2007 -** *Microbiologie pratiques pour le laboratoire.* Ed Lavoisier. 463 p.
- 74-De Loof A., 1991.** Les possibilités des hormones d'insectes dans la lutte anti-acridienne. In : Essaid A. *La lutte anti-acridienne.* Ed. AUPELF-UREF, John Libbey Eurotext, Paris © 1991,141-147.
- 75- Denis F. et Ploy MC., Martin C., Bingen E. et Quentin R., 2007.** *Bactériologie médicale, technique usuelles.* Ed. Elsevier Masson, France, 573 p.
- 76- De Visscher, M.N., 1991.** L'environnement et la lutte anti-acridienne, les perspectives et les contraintes de la recherche. In : Essaid A. *La lutte anti-acridienne.* Ed. AUPELF-UREF, John Libbey Eurotext, Paris © 1991, 219-227.
- 77- Dijkshoorn L., Nemeč A., Seifert H., 2007.** An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Nat Rev Microbiol* 5: 939–951.
- 78- Diop B. and Wilps H., 1997-** Field trials with neem oil and *Melia volkensii* extracts on *Schistocerca gregaria*, pp.201-207 in Krall S., Peveling R. and Ba Diallo D., *New strategies in locust control*, Ed. Birkhäuser Verlag, Basel/ Switzerland, 522p.
- 79- Dobson H.M., 2001.** Directives sur le Criquet pèlerin - Lutte antiacridienne. Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture. Rome, 85p.
- 80- Doumandji S. et Doumanji –Mitiche B., 1994.** *Criquets et sauterelles.* Ed. Office des publications universitaires, Alger, 99p.
- 81-Doumanji–Mitiche B. et Doumandji S., 1993.** *La lutte biologique contre les déprédateurs des cultures.* Ed. Office des publications universitaires, Alger, 94p.
- 82-Dromingy E. (2008):** *Bacillus cereus. Monographies de microbiologie.* Ed. Lavoisier, Paris, 338p.
- 83- Duran MJ. 1998.** *Uso de Beauveria bassiana como alternativa de control del picudo del Chile Anthonomus eugenii.* Tesis de M. Sc. CATIE, Turrialba, Costa Rica.
- 84- Durand J. et Tourmanoff C., 1967-** Contribution à l'étude de la flore bactérienne des poissons du Niger superieur . In *cah.O. R. S.T.O.M., sér. Hydrobiol.* I(1-4):101-138
- 85- Duranton, J.F., Launois, S.M., Launois-Luong, M.H. et Lecoq, M. 1982.** *Manuel de prospection acridienne en zone tropicale sèche.* Ed. G.E.R.D.A.T., T.1, Paris, 695p.
- 86- Duranton, J.F. et Lecoq, M. 1990.** *Le criquet pèlerin au sahel.* Ed. CIRAD/PRIFAS-Coll. Acrid. Operat. France, 183 p.
- 87- Essaid A., 1991.** *La lutte antiacridienne.* Ed. John Libbey euro text. France.
- 88- Euzeby J.P., 2007.** Dictionnaire de Bactériologie Vétérinaire. www.bacdico.net.
- 89- Eyquem A., Alouf J. et Montagnier L., 2002.** *Traité de microbiologie clinique.* Ed. PICCIN, France, 238p.

- 90- Fargues J. et Goettel M., 1996-** Environmental constraints of mycopesticides; a challenge. *Bull OILB srop*, 19(8).
- 91- Fargues J., Rougier M., Goujet R. et Itier B., 1988.** Effet de rayonnement solaire sur la persistance des conidiospores de l'hyphomycète entomopathogène, *Nomuraea rileyi*, à la surface d'un couvert végétal. *Entomophaga*, 33(3) :357- 370.
- 92- Fediere G., 1982.** *Etude électrophorétique et immunologique des protéines de l'hémolymphe des orthoptères Schistocerca gregaria Forskal. Influence du parasitisme dû au protozoaire Malamiba locustae (KING et TAYLOR).* Mémoire pour obtenir le diplôme d'études approfondies d'entomologie, Univ.Pierre et Marie Curie, Paris.
- 93-Fescemyer H.W., 1993-** Influence of phase polymorphism on the morphometric and physiological processes in preparation for insect migration. *J. Agri. Entomol.*, 10(4): 219-237.
- 94- Flandrois P. J., 1997.** *Bactériologie médicale.* Paris, Ed. Press universitaire, 136 p.
- 95- Gardan L. et Luisetti G., 1981.** Méthodes d'isolement et d'identification des bactéries phytopathogènes. INRA Angers, France. 32p.
- 96- Gaugler R. 2000.** Entomopathogenic fungi as Bioinsecticides, Department of entomology, Rutgers University, New Yersey, pp. 144- 159.
- 97- Gerard J. Tortora, Berdell R. Funke, Christine L. Case, Et Martin L, 2003 –** *Introduction à la microbiologie.* ERPI, QUEBEC, 945 p.
- 98- Grassé P.P., 1949.** *Traité de zoologie : Anatomie, systématique et biologie.* Ed. Masson et C^{ie}, T, IX, Paris, 1117p.
- 99- Grassé, P.P. 1976.** *Traité de Zoologie.* Tome VIII. Masson. Paris, 226-259.
- 100- Greathead, D., Kooyman, C., Launois-Luong, M. et Popov, G. 1994.** *Les ennemis naturels des criquets du sahel.* Coll. Acrid. Operat. n°8 . Ed. Cirad/Prifas. Montpellier, 85p.
- 101- Greppin H. et Horn R., 1969.** Action de la – (+) catechine sur *Pseudomonas fluorescens* in cellular and molecular *life sciences*.vol.25 (4). Ed. Birk hauser Basel, pp 429-430.
- 102- Gourdon I., Guerin M.C. et Torreilles J., 1998.** Mécanismes cellulaires et moléculaires de la réponse aux stress chez les bivalves marins = Cellular and molecular mechanisms of the stress response from marine bivalvia. *Comptes rendus des séances de la Société de biologie et de ses filiale.* 192 (4): 749-774
- 103- Gry J., Coquard G., et Coquard J ., 1963.** Participation de la section de phytopharmacie de la division de défense des cultures de l'IRAT aux recherches de lutte chimique antiacridienne de l'OICMA. *L'agronomie tropicale.* vol. XVIII, n° 12, pp 1307-1317.
- 104- Gry J., Coquard J., et Coquard G ., 1966.** Appréciation en laboratoire de l'activité des insecticides a l'égard du criquet migrateur. *L'agronomie tropicale.* (6-7)837-855. Montpellier.
- 105-Guiraud J.P. 1998.** *Microbiologie alimentaire.* Ed. Dunod, 652p.
- 106-Guiraud J.P.,2003.** *Microbiologie alimentaire; Application à l'étude des principaux groupes microbiens.* Ed. DUNOD, 651p.
- 107- Gupta D.K. Et Vyas M., 1989-** Efficacy of *Bacillus subtilis* against mosquito larvae (*Anopheles culicifacies*). *Zeitschrift fuer Angewandte Zoologie* 76(1) : 85-91.
- 108- Habes D. et Soltani N. 1992.** Perturbation de la structure de l'intestin et de l'hémogramme par le thurucide HP chez *Thaumetopoea pityocampa*. *Schiff. Mém. Soc. Belge.* 35 :724-726
- 109- Haddadj S., Doumandji-Mitiche B., Halouane F. et Doumandji S., 1998.** Efficacité de *Metarhizium anizopliae* sur les œufs, les larves et les imagos de *S. gregaria*. Effet sur la respiration et le rythme cardiaque de cet acridien. *2ème journée d'entomologie*, 18 mars 1998, Inst. Nat. Agro. El Harrach, Alger.
- 110- Halouane F., 1997.** *Cycle biologique de Schistocerca gregaria (Forskal, 1775) et de Locusta migratoria (Linné, 1758) (Orthoptera, Acrididae). Efficacité de Metarhizium*

anisopliae (Metch) (Hyphomycètes, Deuteromycotina) et effet sur quelques paramètres physiologiques de *Schistocerca gregaria*. Thèse Magister : Inst. Nati. Agro., El Harrach, Alger.

111- Halouane F., 2008. Recherche sur l'acridopathogène *Beauveria bassiana* (Hyphomycète, Deuteromycotina) : Bioécologie, biochimie, production et application sur *Schistocerca gregaria* (Forskål, 1775)(Orthoptera, Acrididae). Thèse de Doctorat d'Etat, Inst. Nati. Agro., El Harrach, 190 p.

112- Halouane F., Doumandji-mitiche B., Bouhacein M., 2001. Effet de deux entomopathogènes, *Beauveria bassiana* (Bals.) et *Metarrhizium flavoviride* (Gams et Rozy.) (Hyphomycètes, Deuteromycotina) sur l'hémogramme des L5 et des adultes de *Locusta migratoria* (Orthoptera, Acrididae). Journées techniques phytosanitaires 2001, Inst. Nat. Prot. Vég.. pp.378-384.

113-Harz K., 1975. Die Orthopteren Europas II - The Orthoptera of Europe II. *Entomologica*. 11

114- Held U., 2010. Pièges des corrélations: les coefficients de corrélation de Pearson et de Spearman. *Forum Med Suisse*. 10(38):652-653

115- Hemour, S. 2009. Effet du biopesticide «Green Muscle » (*Metarizium anisopliae* var *acridum*) sur la reproduction du criquet pèlerin *schistocerca gregaia*(Forskål, 1775)(Acrididae, Cyrtacanthacridinae) en condition contrôle. Thèse Magister Sci.agro., Inst.

116- Hettwer U., Gross M. Et Rudolph K., 1995- Purification and characterization of an extracellular levansucrase from *Pseudomonas syringae* pv.*phaseolicola*. *Journal of bacteriology*. 10 (177): 2834-2839.

117- Jacques M.A., 1994. Ecologie quantitative et physiologie de la communauté bactérienne épiphyllle de *Cichorium endiva* var .*Latifolia*. Thèse doctorat, université de Paris-sud- Orsay,France, 111p.

118- Jacques R.P. and Morris O.N., 1981. Compatibility of pathogens with other methods of pest control and with different crops, p. 695-715. In H.D. Burges (ed.), *Microbial control of pests and plant diseases*. New York, Academic Press, 949p.

119- Joly L., 2005- Comparaison des divers types d'adultoïdes chez *Locusta migratoria* L. *Insectes sociaux*. 5(4) : 373- 378.

120- Joung J. et Côté J. C., 2000. Une analyse des incidences environnementales de l'insecticide microbien *Bacillus thuringiensis*. Ed.AAC. Centre de recherche et développement en horticulture, Bulletin technique n.29, Canada,

121- Kamoun P., 1997. Appareils et méthodes en biochimie et biologie moléculaire.Ed. Médecine-science flammarion,Paris,pp24-25.

122- Kara F.Z.et Doumandji-Mitiche B., 2006. Impact of entomopathogenic fungus *metarhizium flavoviride* exposed to ultraviolet radiation on *schistocerca gregaria*. Ninth Arab Congress of Plant Protection, 19-23 November 2006, Damascus, Syria.

123- Keith D. et Kevan M.E., 1992. Les agents de la lutte biologique existant en potentiels contre les orthoptéroïdes nuisibles, pp. : 107 – 150 in VINCENT C. et CODERRED D., 1992 : *La lutte biologique*. Ed. Gaëtan Morin, Québec 671 p.

124- Kemassi A., Boual Z., Ould El Hadj- Khelil A., Dadi Bouhoun M. et Didi Ould El Hadj M., 2010. Activité biologique de l'extrait d'*Euphorbia guyoniana* (Boiss. & Reut.) (*Euphorbiaceae*) sur les larves du cinquième stade et sur les adultes de *Schistocerca gregaria* (Forskål, 1775) (*Orthoptera-Acrididae*). *Annale des sciences et technologie, Revue Périodique Universitaire en Sciences et Technologie*, Université Kasdi Merbah Ouargla, Algérie, 2(1), 61- 70.

125- King E.O., Ward M.K. et Raney D.E., 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *JLab cLin Med* 44 :301-307.

- 126- Klier A., 2007.** L'utilisation de *Bacillus thuringiensis* pour la lutte contre les lépidoptères, bilan et perspectives offertes par les biotechnologies, Copyright – Académie d'Agriculture de France.
- 127- Idrissi Hassani L. M. et Hermas J. 2008.** Effets de l'alimentation en *Peganum harmala* L.(Zygophyllaceae) sur le tube digestif du criquet pèlerin *Schistocerca gregaria* Forsak. (Orthoptera, Acrididae). *Zool. baetica*, 19: 71-84.
- 128- Index Des Produits Phytosanitaires A Usage Agricole, 2003.** Direction de la protection des végétaux et des contrôles techniques, Alger, 191p.
- 129- Inglis GD., Johnson DL. et Goettel MS. 1997.** Effects of temperature and sunlight on mycosis (*Beauveria bassiana*) (Hyphomycetes: Symphodulosporae) of grasshoppers under field conditions. *Environ Entomol* 26:400–409.
- 130- Labdaoui S., 2007.** Etude de l'effet de *Beauveria bassiana* et *Peganum harmala* sur le criquet pèlerin *Schistocera gregaria* (Forsk., 1775). Mém. DES, Fac. Sci. UMBB.
- 131- Lacey L. A., Merrit R. W. (2003).** The safety of bacterial microbial agents used for black fly and mosquito control in aquatic environments. Kluwer Academic Publishers Dordrech, The Netherlands, pp. 151-168.
- 132- Lacey L. A., Frutos R., Kaya H. K. and Vail P., 2001.** Insect Pathogens as Biological Control Agents: Do They Have a Future? *Biological Control* 21, 230–248.
- 133-Lambin S. et German A., 1969.** *Précis de microbiologie*. Ed. Masson et Cie, 668 p.
- 134- Lamont I. L. et Martin L. W., 2003 .** Identification and characterizations of novel poverties synthesis genes in *pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*. 149:833 – 842.
- 135- Larpent JP. 1997.** Microbiologie Alimentaire, Techniques de laboratoire. 3^{ème} Edition, 1073p.
- 136- Larpent J.P. et Gourgaud M.L., 1975.** *Mémento technique de la microbiologie*. Ed. Technique et documentation, Paris, 269 p.
- 137- Larpent P.J. et Gaurgaud L.M., 1997.** *Mémento technique de microbiologie*. Ed. Lavoisier, Paris, 934p.
- 138- Larpent, J.P. et Sanglier, J.J. 1989.** *Biotechnologies des antibiotiques*. Ed.Masson, Paris, 148p.
- 139- Latchininsky V. et Launois-Luong M., 1992.** *Le criquet marocain Docioctaurus maroccanus (THUNBERG, 1815) dans la partie orientale de son aire de distribution* .Ed. CIRAD -GERDAT/PRIFAS., Montpellier, 270 p.
- 140- Launois- Luong M. H. et Lecoq M., 1989.** *Vade- Mecum des criquets du sahel*. Ed. CIRAD/PRIFAS, Montpellier, France, 125 p.
- 141- Launois-Luong M.A., Launois M. et Rachadi T., 1988.** La lutte chimique contre les criquets du Sahel. Coll. Acrid. Operat. no 3, Ed. CIRAD/PRIFAS, Montpellier, 125 p.
- 142- Lazare K., Haubruge E., Destain J., Thonart P., Lienard V. et Gaspar C., 1996.** Utilisation de *Bacillus subtilis* comme insecticide à l'égard de *Drosophila melanogaster* (MEIGEN). *Med. Fac.Landbouwen*; 61(3a): 887-893.
- 143- Leblanc N. et Samson C., 2006.** Centre D'expertise En Analyse Environnementale Du Québec. Paramètres d'exposition chez les mammifères –Souris commune. Fiche descriptive. Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs du Québec, 15 p
- 144- Lecadet M.M., 1996.** *La lutte bactériologique contre les insectes : une vieille histoire très actuelle*. *Annales de l'Institut Pasteur, Actualités* 7(4):207-216.
- 145- Lecoq M. 1991.** *Le Criquet pèlerin : enseignements de la dernière invasion et perspectives offertes par la biomodélisation* . Paris : Ed. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext.
- 146- Leisinger T. and Margraff R., 1979.** Secondary metabolites of the fluorescent *Pseudomonas*. *Microbiol Rev*. 43:422- 442.

- 147- Lemanceau P., 1992.** Effets bénéfiques de rhizobactéries sur les plantes exemple des *Pseudomonas spp.* fluorescents. *Agronomie*, 12(6), 413-43.
- 148- Lemanceau P., Corberand T., Gardan, L., Latour X., Laguerre G., Boeufgras J. and Alabouvette C., 1995.** Effect of Two Plant Species, Flax (*Linum usitatissimum L.*) and Tomato (*Lycopersicon esculentum Mill.*), on the Diversity of Soilborne Populations of Fluorescent Pseudomonads. *Appl. Environ. Microbiol.* 61(3) : 3 1004-1012.
- 149- Lomer C.J., Bateman R.P., Johnson D.L., Langewald J. and Thomas M., 2001.** Biological control of locusts and grasshoppers. *Annu. Rev. Entomol.*, 46: 667-702.
- 150- Louveaux A et Ben Halima T, 1986.** Catalogue des orthoptères d'Afrique du Nord Ouest. *Bull.Soc.Ent., France*, 91 (3-4) : 73-86.
- 151- Luong-Skormand M.H., Rachadi T. et Lecoq M., 1999.** *La lutte contre les criquets ravageurs : l'intérêt des mycopesticides.* Ed. Cirad-Amis-Programme Protection des cultures, n°19, Paris, : 49-52. (Disponible sur <http://www.inra.fr/dpenv/do.htm#d19>).
- 152- Mahmoud M.F. 2004.** *Etude de la compétence rhizosphérique de quelques souches bactériennes de Pseudomonas spp fluorescents en interaction avec Fusarium oxysporum.* Thèse Magister Sci. Agro., INA. Elharach, Alger.
- 153- Mallamaire A., 1963.** *Les ennemies animaux des plantes cultivées en Afrique accidentel.* Ed. Dakar, 157p
- 154- Mamadou A., Mazih A. et Inezdane A., 2005.** L'impact des pesticides utilisés en lutte contre le criquet pèlerin (*Schistocerca gregaria* Forskål, 1775) (*Orthoptera, Acrididae*) sur deux espèces de pimelia (*Coleoptera, Tenebrionidae*) au Niger », *VertigO - la revue électronique en sciences de l'environnement* [En ligne], Volume 6 Numéro 3 | décembre 2005, mis en ligne le 01 décembre 2005.
- 155- Mamoun M. and Olivier J.M. , 1989.** Dynamique des populations fongiques et bactériennes de la rhizosphère des noisetiers truffiers. II. Chélation du fer et répartition taxonomique chez les *Pseudomonas* fluorescents. *Agronomie*, 9 (4) : 345 - 351
- 156- Marchal N., Bourdon J.L. et Richard D., 1982.** *Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries.* Ed. Doin, Paris, 482 p
- 157- Marin M. et Rénie F. 2000.** *Lyophilisation. Technique de l'ingénieur*, traité agro-alimentaire. F3240 :1-10. <http://www.termsscience.fr> (2012-06-01)
- 158- Martoja, R. et Martoja-Pierson, M. 1967.** *Initiation aux techniques de l'histologie animale*, Ed. Masson et Cie, Paris, 345p.
- 159- Masson M., 1989.** *Locustes et sautériaux : Le criquet migrateur africain : biologie et lutte.* Ed. Bayer, Hevertusen, 39p
- 160- Mathias K, 2001.** Les possibilités de la lutte microbiologique. *Vertigo.* La revue électronique en sciences de l'environnement. Vol (2), n° (2). Ed lodel, pp.1 - 18.
- 161- McNeill, M.R. and Hurst, M.R.H. 2008.** *Yersinia sp. (mh96) – A potential biopesticide of migratory locust Locusta migratoria L. New Zealand Plant Protection 61: 236-242 (2008).*
- 162- Meena M.R. and Sethi V., 1994.** Antimicrobial activity of essential oils from spices. *Jour.food.sci.Tech.* 31: 68-70.
- 163- Meinzingen W.F., 1997.** Overview and challenges of new control agents, pp.105-115 in Krall S., Peveling R. and Ba Diallo D., *New strategies in locust control*, Ed. Birkhäuser Verlag, Basel/ Switzerland, 522p.
- 164- Meyer J. M. and Abdallah M.A., 1978.** The fluorescent pigment of *Pseudomonas fluorescens*: Biosynthesis, purification and physico - chemical properties. *Jour. Gen. Microbiology.* 107 : 319- 328.
- 165- Milat- Bissaad, F.Z., 2011.** *Etude de l'effet de deux entomopathogènes , Beauveria bassiana (Vuil.1912) et Metarhizium anisopliae var acridum (Metch., 1883)(Hyphomycètes, Deuteromycotina) sur le criquet pèlerin Schistocerca gregaria (Forskål, 1775) (Orthoptera, Acrididae).* Thèse Doctorat: Inst. Nati. Agro., El Harrach, Alger, 205.

- 166- Mochi DA., Monteiro A.C. and Barbosa JC., 2005.** Action of pesticides to *Metarhizium anisopliae* in soil. *Neotrop. Entomol.* 34(6).
- 167- Mohand Kaci H., 1998.** *Etude de la toxicité de Bacillus subtilis (Sporulale, Bacillaceae) sur les cinq stades larvaires et les imagos de Schistocerca gregaria (Orthoptera, Acrididae). Effet sur la respiration et le rythme cardiaque.* Mém. Ing, Inst. Nat. Agro, El-harrach.
- 168- Mohanad Kaci, H. and B. Doumandji-Mitiche, B. 2006.** *Evaluation of the biological impact of bacteria on desert locust pilgrim schistocerca gregaria.* Ninth Arab Congress of Plant Protection, 19-23 November 2006, Damascus, Syria.
- 169- Monteny N., 1990.** *Influence de facteurs biotiques et abiotiques, induits et naturels, sur l'efficacité larvicide de Bacillus sphaericus.* Thèse Doctorat en Science, Université de Paris-Sud Centre D'Orsay
- 170- Moretau B., 1991.** *Etude de certains aspects de la physiotoxicologie d'insecticides de synthèse chez Locusta migratoria.* In : Essaid A. *La lutte anti-acridienne.* Ed. AUPELF-UREF, John Libbey Eurotext, Paris © 1991, 167-178.
- 171-Moussa A., 2003.** *Effet de l'huile de neem (Azadirachata indica) sur quelques paramètres biologiques et physiologiques de Locusta migratoria (Linnée, 1758) et Locusta migratoria migratorioides (Ret F 1850) (Orthoptera- Acrididae).* Thèse magister. Sci.Agro.Inst. Nati.Agro.,El-Harrach, 123p.
- 172- Nasiruddin M. and Mordue A.J. 1993.** The effet of azdirachtine on the midgut of histology of the locusts, *Schistocerca gregaria* and *Locusta migratoria*. *Tissus and Cell*, 25 (06):pp 875-884.
- 173- Neilands J.B., 1995.** Siderophores structure and function of microbial iron transport compounds. *The journal of biological chemistry.* 270: 26723 - 26726
- 174-Neves L. S. F. M. H. et Charles J.-F. , 1999.** *Mode d'action de la toxine binaire de Bacillus sphaericus : liaison de la toxine et caractérisation de son récepteur chez les larves de moustiques (Diptères : Culicidae).* Thèse doctorat, Université de Paris 06, Paris, France.
- 175- Niassy S., Diarra K., Ndiaye S. and Niassy A., 2011.** Pathogenicity of local *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* strains on *Locusta migratoria migratorioides* Reiche and *Farmaire* and *Zonocerus variegates* Linnaeus in Senegal. *African Journal of Biotechnology.* 10(1), 28-33.
- 176- Opota O., Gauthier N.C., Doye A., Berry C., Gounon P., et al, 2011.** *Bacillus sphaericus* Binary Toxin Elicits Host Cell Autophagy as a Response to Intoxication. *PLoS ONE* 6(2): e14682. doi:10.1371/journal.pone.0014682. Ed. Diane Bassham, Iowa State University, U. S. A.
- 177-Oudjiane A., 2009.** *Etudes etho-écologique de Schistocerca gregaria Forskål (1775) (Orthoptera, Cyrtacanthacridinae) et Locusta migratoria cinerascens linné (1758) (Orthoptera, Oedipodinae) dans la région d'Adrar.* Thèse magister. Sci.Agro.Inst. Nati.Agro., El-Harrach.
- 178- Ould Ahmedou M.L, Bouaichi A et Idrissi Hassani L.M., 2001.** Mise en évidence du caractère répulsif et du pouvoir toxique de *Glinus lotoides* (Aizoacées) sur les larves du criquet pèlerin, *Schistocerca gregaria* Forskål, 1775 (Orthoptera, Acrididae). *Zoologica baetica*, 12,109-117.
- 179- Ould El Hadj M.D., 1992.** *Bioécologie des sauterelles et des sautereaux dans trois zones d'étude au Sahara.* Thèse Magister: Inst. Nat. Agro., El Harrach, Alger.
- 180- Ould El Hadj M.D., 2002.** Les nouvelles formes de mise en valeur dans le Sahara algérien et le problème acridien. *Science et changements planétaires. Sécheresse* 13 : 37-42.
- 181- Ould El Hadj M. D., Tankari Dan- Badjo A., Halouane F. et Doumandji S., 2005.** *Etude de la toxicité de trois plantes acridifuges chez Schistocerca gregaria Forskål, 1775(Orthoptera, Cyrtacanthacridinae).* 6^{ème} Journée d' Acridologie - Inst. Nati. Agro., El-

Harrach - Alger. 06 mars 2005.

182- Ould El Hadj MD., Tankari Dan-Badjo A., Halouane F. et Doumandji S., 2006. Toxicité comparée de trois plantes acridifuges sur les larves du cinquième stade et sur les adultes de *Schistocerca gregaria* Forskål, 1775 (Orthoptera, Cyrtacanthacridinae), Algérie. *Sécheresse* ;17, (3) , 407-414.

183- Outtar F., 2009. *L'utilisation de quelques biopesticides sur le criquet migrateur Locusta migratoria (Linné. , 1758) (Oedipodinae, Acrididae).* Thèse. Magister: Ecole. Nat. Agro. EL.harrach, Alger.

184- Paillot A. 1933. *L'infection chez les insectes immunité et symbiose.* Ed. Patissier, Paris, 471p.

185- Palleroni N. 1984. Gram negative aerobic rods and cocci: Family I Pseudomonadaceae. In : *Bergey's manual of bacteriology* 1. Ed. Kregg and Holt, William and Wilkins. Baltimore. pp 141-168.

186- Paulsen T., Press M. and Kobayashi Y., 2005. Complete genome sequence of the plant commensal *Pseudomonas fluorescens* . *Nature biotechnologie.* 23 (7) : 873- 878.

187- Prescott LM., Harley JP. et Klein DA., 2003. *Microbiologie.* Ed De boeck, Bruxelles, 1137 p.

188- Philippe L., 2003- *Phytopathologie.* Ed . De Boeck université, Bruxelles, 432p.

189- Philippe J., Philippe D., Marco ., Philippe L., Pierre C., Nicok., Louis N. et Philippe T., 1993 . Les mécanismes biochimiques développés par les *Pseudomonas* fluorescents dans la lutte biologique contre les maladies des plantes transmises par le sol, *Cahiers Agricultures* ; 2 : 301- 307.

190- Popov G.B., 1980. Studies on oviposition, egg development and mortality on *Oedaleus senegalensis* (Krauss), (Orthoptera, Acridoidea) in the Sahel. – Centre for Overseas Pest Research, Miscellaneous Report. – 48 p.

191- Popov G.B., Duranton J.F. et Gigault J., 1991. *Etude écologique des biotopes du criquet pèlerin Schistocerca gregaria (Forskål, 1775) en Afrique nord occidentale. Mise en oeuvre et description des unités territoriales écologiquement homogènes.* Ed. CIRAD-PRIFAS, Coll : Les Acridiens,: Montpellier (France), 744 p.

192- Popov G.B., Launois- Luong M. H . et Vander Weel J.J., 1990. *Les oothèques des criquets du sahel.* Ed. CIRAD/PRIFAS, Pays-Bas, 153p.

193- Prevôt A. R., 1977. *Bactériologie, notion élémentaire.* Ed. Presses universitaires de France, 218 p.

194- Priest F.G., 1977. Extracellular Enzyme Synthesis in the Genus *Bacillus*. *Bacteriological reviews.* *American Society for Microbiology*, 41(3), 711-753.

195- Quesada-Moraga E. and Santiago-Alvarez C., 2001. Histopathological Effects of *Bacillus thuringiensis* on the Midgut of the Mediterranean Locust *Dociostaurus maroccanus*. *Journal of Invertebrate Pathology* **78**, 183–186.

196- Raccaud-Schoeller J., 1980. *Les insectes : physiologie et développement.* Paris : Ed. Masson.

197- Rachadi T., 1991. Promesses et limites de la lutte chimique dans la stratégie anti-acridienne. In : Essaid A. *La lutte anti-acridienne.* Ed. AUPELF-UREF, John Libbey Eurotext, Paris © 1991, 151-165.

198- Rahmani N. et Kais S., 2005. *Evaluation de l'impact biologique de Bacillus subtilis et Bacillus thuringiensis vis-à-vis des larves de S. gregaria (Orthoptéra, Acrididae).* Mém. DES. UMBB, Boumerdes.

199- Ramade F., 1991. Caractères écotoxicologiques et impact environnemental, potentiel des principaux insecticides utilisés dans la lutte anti-acridienne. In : Essaid A. *La lutte anti-acridienne.* Ed. AUPELF-UREF, John Libbey Eurotext, Paris © 1991, 179-191.

- 200-Rembold H., 1997-** *Melia volkensii*: a natural insecticide against desert locust, pp.185-191 in Krall S., Peveling R. and Ba Diallo D., *New strategies in locust control*, Ed. Birkhäuser Verlag, Basel/ Switzerland, 522p.
- 201- Rhodes E., 1959.** The characterization of *Pseudomonas fluorescens*. *J.gen-microbial*.21: 221-268
- 202- Riba G . et Silvy C., 1989.** *Combattre les ravageurs des cultures* .Ed . INRA , Paris , 230p.
- 203- Robert P.A., 1972.** *Les insectes I- Aptères, Archiptères, Orthoptères, Coléoptères, Névroptères*, .Ed. Delachaux et Neistle., Coll. Les Beautés de la Nature Suisse, 270p.
- 204- Rowley J., 1993.** *La razzia des criquets au sahel*. Ed. L'Harmatan, Paris, 154p.
- 205- Saitou N. et Nei M., 1987.** The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4(4):406-25.
- 206- Sands D.C. and Rovira A.D., 1971.** *Pseudomonas fluorescens* biotype G, the dominant fluorescent pseudomonad in South Australian soils and wheat rhizospheres. *J. Appl. Bacteriol.* 34 : 261-275.
- 207- Schaechter M., Medoff G., Eisenstein BI. et Flandrois JP., 1999.** *Microbiologie et pathologie infectieuse*. Ed. De Boeck université, Bruxelles, 973p.
- 208- Schippers B., Bakker A.W., Bakker P.A.H.M. et Van Peer R., 1991.** Bénéficial and deleterious effects of HCN-producing pseudomonads on rhizosphere interactions. Pp. 211-219 in D.L Keister et P.B. Cregan (réds.), *The rhizosphere and plant growth*. Kluwer Académie Publishers, Netherlands.
- 209- Seymoun E., Bateman R.P., Charnly A.K., 2002.** The effect *Metarhizium anisopliae var acridum* on haemolymph energy reserves and flight capability in the desert Locust, *Schistocerca gregaria*. *J. Appl. Ent .*, 126, 119-124
- 210- Shairra S. A., 2009.** Parasitism of Locust by entomopathogenic Nematode in Relation to Insect Microaggregation Inhibitor Egypt. *Acad. J. biolog. Sci.*, 2 (2): 221- 230.
- 211- Siegel J.P., Shadduck J.A and Szabo J. (1987):** Safety of the entomopathogen *Bacillus thuringiensis var. israelensis* for mammals. *J. Econ. Entomol.* 80: 717-723.
- 212- Siegel J.P and Shadduck J.A. (1990):** Clearance of *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis ssp. israelensis* from mammals. *J. Econ. Entomol.* 83: 347-355.
- 213- Sid Amar A., 2008:** Morphométrie et régime alimentaire du criquet migrateur *Locusta migratoria cinerescens* (Linné, 1758) dans la région d'Adrar en 2007-2008. Thèse ing., INA, El harrach, 83 p.
- 214- Silva L., Silva R.F.P. & Heineck M.A., 1993.** Avaliação “*in vitro*” do efeito de diferentes inseticidas sobre a esporulação do fungo *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson. *An. Soc. Entomol. Brasil* 22: 99-103.
- 215- Simard L. 2001.** *Contrôle biologique du Hanneton européen et de la pyrale de la canneberge à l'aide de nématodes entomopathogènes*. Mem. MSc., Faculté d'agriculture, alimentation et consommation, université LAVAL, Canada, 89p.
- 216- Singh G. J. P., 1986.** Hemolymph carbohydrate and lipid mobilization in *Locusta migratoria* in relation to the progress of poisoning following bioresmethrin treatment. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 25(2), 264-269
- 217- Singleton P., 2005.** *Bactériologie pour la médecine, la biologie et la biotechnologie*. Ed. Dunod, Paris, 541 p.
- 218- Soltani., 1990.** Action de duflubenzuron et de la 20-hydroxyecdysone sur les glucides et les protéines hémolymphatique chez les nymphes de *Tenebrio molitor* L. *Annale Société Entomologie de France*. 26 (4) : 575-584.
- 219-Song L., Gao M., Dai S. et Peng K., 2005.** Activity of *Bacillus thuringiensis* against *Locusta migratoria manilensis*. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology* 11 : 592-594.

- 220- Starnes R. L., C. L. Liu et P. G. Marone. 1993.** History, use and future of microbial insecticides. *Amer. Entomol.* 39: 83-91.
- 221- Stephan D., Welling M. and Zimmerman G., 1997-** Locust control with *Metarhizium flavoviride*: New approaches in the development of biopreparation based on blastospores, pp.151-158 in Krall S., Peveling R. and Ba Diallo D., *New strategies in locust control*, Ed. Birkhäuser Verlag, Basel/ Switzerland, 522p.
- 222-Suty L., 2010.** La lutte biologique .Ed Educagri et Quae .Paris.192p.
- 223- Tail G. 1998.** *Action de quelques substrats alimentaires sur quelques paramètres biologiques de Schistocerca gregaria (Forskal, 1775) (Orthoptère, Acrididae). Efficacité entomopathogène de Pseudomonas fluorescens (Pseudomonadecae) sur quelques aspects physiologiques du criquet pèlerin.* Thès. Mag. sci. agro., Inst. Nati. Agro., El Harrach, 190p.
- 224- Tail G., Bourchoroun B. and Doumandji Mitiche B., 2006.** *Effect of diflubenzuron on the fourth and fifth stage larvae of the desert locust schistocerca , gregaria under laboratory conditions.* Ninth Arab Congress of Plant Protection, 19-23 November 2006, Damascus, Syria
- 225- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Steker G., Nei M., Kumar S., 2011.** MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* Verifier avec gana
- 226- Thomashow L. and Weller M., 1988.** Role of a phenazine antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* in biological control of *Gaeumannomyces graminisvar . tritici.* *Journal of bacteriology* . Copyright . pp 3499 - 3508.
- 227- Toma B., 1985.** « *Bacillus* », in *Bactériologie médicale*. Ed. Le Minor L. et Veron M., Flammarion Medecine Sciences, pp.558-578.
- 228- Uvarov B.P., 1977.** *Grasshoppers and locusts. A handbook of general acridology.* Vol. II: Behaviour, Ecology, Biogeography, Population Dynamics. London : Centre for Overseas Pest Research.
- 229- Weisburg W.G., Barns S.M., Pelletier D.A. and Lane D.J., 1991.** 16S ribosomal DNA for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173: 697–703.
- 230- Yan W., Cheng-Feng L., DanY., Peng-Ming L., and Mei-Ying G., 2011.** Novel *Bacillus thuringiensis* δ -Endotoxin Active against *Locusta migratoria manilensis*. *Applied and Environmental Microbiology*, May 2011, 77(10), p. 3227-3233.
- 231-Yovo K., 2010.** Consentement à payer les biopesticides: une enquête auprès des maraîchers du littoral au sud-Togo. *Tropicultura*, 28(2) :101-106.
- 232- Zakaria O. et Sagnia S.B., 2003.** Lutte intégrée contre les sautereaux et les locustes: importance du biopesticide Green Muscle. *Bulletin trimestriel d'information du Centre Régional AGRHYMET*, 5 (3).
- 233- Zelazny Y.B., Goetelm S., and Keller B., 1997.** The potential of bacteria for the microbial control of grasshoppers and locusts. *Memoire of the entomological society of Canada* ; 171, 147-156.
- 234- Zibin Liu, Wang Q.C., Wang H.C. et Zheming Zheng, 1996.** Sécherèsse et fleau acridien en chine: le cas du Criquet migrateur, *Locusta migratoria manilensis* (Meyen). Sécherèsse. 2(7): 105-108
- 235- Zimmermann G. 2007.** Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. *Biocontrol Science and Technologie*, 17(6):553-596.
- 236- Zimmermann G., Zelazny B., Kleespies R. and Welling M., 1994.** Biological control of African locusts by entomopathogenic microorganisms, pp. 127-138, in KRALL S., WILPS H., *New trends in locust control*. Ed. TZ-Verlags-Gesellschaft, Rossdorf, Germany.

Annexe

Annexe 1

Milieux de culture préparés

✓ **Gélose nutritive :**

Extrait de viande	2g
Peptone	15g
NaCl	5g
Agar	15 g
Eau distillée	1000 ml

pH = 7,2 avec autoclavage à 120°C pendant 20 minutes.

✓ **Bouillon nutritif :** La même composition avec élimination de l'agar.

✓ **Milieu de King B :**

Peptone.....	20g
Glycérol	15g
K ₂ HPO ₄	1,5g
MgSO ₄	1,5g
Agar	15g
Eau distillée	1000 ml

pH = 7,2 avec autoclavage à 120°C pendant 20 minutes.

✓ **Milieu King B liquide :** La même composition avec élimination de l'agar.

✓ **Milieu Levane :**

Extrait de levure	20g
Bactopéptone	15g
Na Cl	1,5g
Saccharose	1,5g
Agar	15g
Eau distillée	1000ml

pH = 7,2 avec autoclavage à 120°C pendant 20 minutes.

✓ **Milieu gélatiné :**

Extrait de levure	3g
Bactopéptone	5g
Gélatine	120g

Eau distillée 1000ml

pH = 7,2 avec autoclavage à 120°C pendant 20 minutes.

✓ **Milieu ARJ (Ayers, Rupp et Joeston) :**

Peptone 1g

NaCl 5g

Agar 3g

K₂HPO₄ 0,3g

Eau distillée 1000ml

pH = 7 avec autoclavage à 120°C pendant 20 minutes.

✓ **Milieu Lépase :**

Peptone bactériologique10g

Chlorure de sodium 5g

Chlorure de calcium 0,1g

Tween 80 10gouttes

Agar 25g

Eau distillée 1000ml

pH = 7 avec autoclavage à 120°C pendant 20 minutes.

Table 3.2 Transformation of percentages to probits

%	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	—	2,67	2,95	3,12	3,25	3,36	3,45	3,52	3,59	3,66
10	3,72	3,77	3,82	3,87	3,92	3,96	4,01	4,05	4,08	4,12
20	4,16	4,19	4,23	4,26	4,29	4,33	4,36	4,39	4,42	4,45
30	4,48	4,5	4,53	4,56	4,59	4,61	4,64	4,67	4,69	4,72
40	4,75	4,77	4,8	4,82	4,85	4,87	4,90	4,92	4,95	4,97
50	5,00	5,03	5,05	5,08	5,10	5,13	5,15	5,18	5,20	5,23
60	5,25	5,28	5,31	5,33	5,36	5,30	5,41	5,44	5,47	5,50
70	5,52	5,55	5,58	5,61	5,64	5,67	5,71	5,74	5,77	5,81
80	5,84	5,88	5,92	5,95	5,99	6,04	6,08	6,13	6,18	6,23
90	6,28	6,34	6,41	6,48	6,55	6,64	6,75	6,88	7,05	7,33
—	0,0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9
99	7,33	7,37	7,41	7,40	7,51	7,58	7,65	7,75	7,88	8,09

Annexe 3

Solutions utilisées pour le dosage quantitatif des glucides et des protéines

- **Solution d'anthrone**

Anthrone : 150mg

Acide sulfurique : 75 ml

Eau distillée : 25 ml

- **Solution de bleu brillant de coomassié (BBC) G-250**

BBC : 50 mg

Ethanol 95° : 25 ml

Acide orthophosphorique à 85% : 50 ml

Eau distillée : 500 ml

Il est à noter que la préparation de ce réactif se fait dans une fiole couverte totalement avec du papier aluminium pour éviter la détérioration de cette solution suite à son contact avec la lumière.

Annexe 4

Solutions utilisées pour le dosage qualitatif des protéines

❖ Préparation des solutions et des tampons électrophorétiques.

➤ Tampon de concentration : Stacking Gel Buffer (0,5M Tris ; 0,4% SDS)

✓ Tris base 3g

✓ SDS 0,2g

Additionner 25ml de l'eau distillée et ajuster le pH à 6,8

➤ Tampon de séparation : Resolving Gel Buffer (1,5 M Tris ; 0,4% SDS)

✓ Tris base 9g

• SDS 0,2g

Additionner 25ml de l'eau distillé et ajuster le pH à 6,8

➤ Tampon de migration :

• Tris basse 30,3 g

• Glycine 144,2 g

• SDS 10g

Additionner 150 ml de l'eau distillé et ajusté le pH à 8,5

❖ Préparation des colorants :

➤ solution de coloration :

✓ 250 ml méthanol

✓ 100 ml d'acide acétique

✓ 0,25 g bleu de Coomassie R-250

✓ 1000 ml eau distillée

➤ solution de décoloration :

✓ 250 ml méthanol

✓ 100 ml d'acide acétique

✓ 1000 ml eau distillée

❖ Préparation des gels :

➤ Gel de concentration (pour 5ml, 5%)

✓ 30% Acrylamide /Bis-acrylamide (ml)..... 0,83

✓ 4x Gel de concentration (ml) 1,30

✓ Eau (ml)..... 2,90

✓ 10% PSA (µl) 50

✓	TEMED (μl).....	60
➤	Gel de séparation (pour 10ml, 10%)	
✓	Acrylamide-Bisacrilamide (ml).....	3,3
✓	Resolving Buffer (ml)	2,5
✓	Eau (ml)	4,1
✓	10% PSA (μl)	100
✓	TEMED (μl)	40

Annexe 5

Tableau I : Poids moléculaires (PM) et mobilités relatives (Rf) des marqueurs Bisrad
Prestained SDS-PAGE Standards Low Rang, catalog 161- 0305, control 310000986

Protéines	Rf	PM (Da)	Log PM
Phosphorylase B	0.290	100.886	2
Bovine serum albumin	0.451	97.320	1.98
Ovalbumin	0.548	54.051	1.73
Carbonic anhydrase	0.709	37.551	1.57
Soybean trypsin inhibitor	–	–	–
Lysozyme	–	–	–

Annexe 6

Solutions utilisées pour l'étude histologique

- **Bouin de hollande**

Acétate neutre de cuivre : 5g
Acide picrique : 8g
Formol à 40% : 20 ml
Acide acétique cristallisable : 3 ml
Eau distillée : 200 ml

- **L'eau gélatinée**

Gélatine en poudre : 0,1 à 0,5 g
Eau distillée : 100 ml

- **Solution de Mallory**

Bleu d'aniline : 0,5g
Orange G : 2g
Acide phosphotungstique : 1g
Eau distillée : 100 ml

- **Solution de fuchsine acide**

Fuchsine acide : 1g
Eau distillée : 100 ml

Annexe 7

Caractères physico-chimiques et granulométriques du sol utilisé dans l'étude de la persistance

Le sol est prélevé de la parcelle expérimentale de l'ENSA où il a subi des analyses. Les résultats fournis par le laboratoire de pédologie de l'ENSA, sont comme suit :

- **La granulométrie**

Argile : 13,05%.

Limon : 25,31%.

Limon grossier : 26,77%.

Sable fin : 33,15%.

Sable grossier : 1,72%.

- **Bases échangeables**

$K^+_{meq/100g}$: 0, 29.

$Na_{meq/100g}$: 3, 15.

$Mg^{++}_{meq/100g}$: 2, 14.

$Ca^{++}_{meq/100g}$: 6, 35.

- **Sels minéraux**

Potassium assimilable: 0, 46.

Phosphore P_2O_5 (ppm):21, 05ppm.

$CaCO_3$: 0,40 %.

- **Matière organique et azoté**

Matière organique: 2,14%.

Azote: 0,009 %.

- **pH** : 7,41.

Annexe : 8

Tableau II : Taux de mortalité journalière cumulée des larves L5 de *L.migratoria* traitées par *Bacillus sp.*(HE799656)

Jours	Témoin					D1=10 ⁻¹					D2=10 ⁻²					D3=10 ⁻⁴				
	R1	R2	R3	M	ET	R1	R2	R3	M	ET	R1	R2	R3	M	ET	R1	R2	R3	M	ET
1	0	0	0	0,00	0,00	0	20	10	10,00	10,00	0	0	0	0,00	0,00	0	0	0	0,00	0,00
2	0	0	0	0,00	0,00	30	30	10	23,33	11,55	0	0	0	0,00	0,00	0	0	0	0,00	0,00
3	0	0	0	0,00	0,00	40	40	20	33,33	11,55	10	0	10	6,67	5,77	0	0	0	0,00	0,00
4	10	0	0	3,33	5,77	50	40	40	43,33	5,77	10	10	20	13,33	5,77	10	0	0	3,33	5,77
5	10	0	0	3,33	5,77	70	60	50	60,00	10,00	10	10	20	13,33	5,77	10	0	10	6,67	5,77
6	10	0	0	3,33	5,77	80	70	60	70,00	10,00	20	10	20	16,67	5,77	20	10	10	13,33	5,77
7	10	0	0	3,33	5,77	80	70	70	73,33	5,77	40	30	40	36,67	5,77	20	10	10	13,33	5,77
8	10	0	0	3,33	5,77	100	90	80	90,00	10,00	40	30	40	36,67	5,77	20	10	10	13,33	5,77
9	10	0	0	3,33	5,77	100	90	80	90,00	10,00	50	40	40	43,33	5,77	20	10	20	16,67	5,77
10	10	0	0	3,33	5,77	100	100	90	96,67	5,77	60	40	50	50,00	10,00	30	40	40	36,67	5,77
11	10	0	0	3,33	5,77	100	100	90	96,67	5,77	70	50	50	56,67	11,55	30	40	40	36,67	5,77
12	10	0	0	3,33	5,77	100	100	100	100,00	0,00	70	50	50	56,67	11,55	40	40	40	40,00	0,00
13	10	0	0	3,33	5,77	100	100	100	100,00	0,00	80	60	60	66,67	11,55	40	60	40	46,67	11,55
14	10	0	0	3,33	5,77	100	100	100	100,00	0,00	80	70	60	70,00	10,00	40	60	50	50,00	10,00
15	10	0	0	3,33	5,77	100	100	100	100,00	0,00	80	70	60	70,00	10,00	50	70	70	63,33	11,55
16	10	0	0	3,33	5,77	100	100	100	100,00	0,00	80	80	60	73,33	11,55	50	70	70	63,33	11,55
17	10	0	0	3,33	5,77	100	100	100	100,00	0,00	100	80	80	86,67	11,55	60	80	70	70,00	10,00
18	10	0	0	3,33	5,77	100	100	100	100,00	0,00	100	80	80	86,67	11,55	60	80	70	70,00	10,00
19	10	0	0	3,33	5,77	100	100	100	100,00	0,00	100	100	90	96,67	5,77	60	80	70	70,00	10,00
20	10	0	0	3,33	5,77	100	100	100	100,00	0,00	100	100	90	96,67	5,77	70	90	90	83,33	11,55
21	10	0	0	3,33	5,77	100	100	100	100,00	0,00	100	100	100	100,00	0,00	80	100	90	90,00	10,00
22	10	0	0	3,33	5,77	100	100	100	100,00	0,00	100	100	100	100,00	0,00	80	100	90	90,00	10,00

R : Répétition. D : Dose , ET : Ecart type

Tableau III : Taux de mortalité journalière cumulée des larves L5 de *L.migratoria* traitées par *Bacillus sphaericus*

Jours	Témoin					D1=10 ⁻¹					D2=10 ⁻²					D3=10 ⁻⁴				
	R1	R2	R3	M	ET	R1	R2	R3	M	ET	R1	R2	R3	M	ET	R1	R2	R3	M	ET
1	0	0	0	0	0	0	0	10	3,33	5,77	0	0	0	0,00	0,00	0	0	0	0,00	0,00
2	0	10	0	3,33	5,77	10	0	10	6,67	5,77	0	0	20	6,67	11,55	0	10	0	3,33	5,77
3	0	10	0	3,33	5,77	10	10	20	13,33	5,77	0	0	20	6,67	11,55	0	10	0	3,33	5,77
4	0	10	0	3,33	5,77	40	20	20	26,67	11,55	0	20	30	16,67	15,28	0	10	0	3,33	5,77
5	0	10	0	3,33	5,77	40	20	20	26,67	11,55	0	20	30	16,67	15,28	0	10	0	3,33	5,77
6	0	10	0	3,33	5,77	40	20	20	26,67	11,55	0	20	30	16,67	15,28	20	10	10	13,33	5,77
7	0	10	0	3,33	5,77	40	20	30	30,00	10,00	0	20	30	16,67	15,28	20	10	10	13,33	5,77
8	0	10	0	3,33	5,77	40	20	30	30,00	10,00	0	20	30	16,67	15,28	20	10	10	13,33	5,77
9	0	10	0	3,33	5,77	40	20	30	30,00	10,00	30	20	30	26,67	5,77	20	20	20	20,00	0,00
10	0	10	0	3,33	5,77	40	20	30	30,00	10,00	30	30	30	30,00	0,00	20	20	20	20,00	0,00
11	0	10	0	3,33	5,77	40	20	30	30,00	10,00	30	30	30	30,00	0,00	30	20	20	23,33	5,77
12	0	10	0	3,33	5,77	40	30	40	36,67	5,77	30	30	30	30,00	0,00	30	20	20	23,33	5,77
13	0	10	0	3,33	5,77	40	30	40	36,67	5,77	40	30	40	36,67	5,77	40	30	20	30,00	10,00
14	0	10	0	3,33	5,77	40	30	40	36,67	5,77	40	30	40	36,67	5,77	40	30	20	30,00	10,00
15	0	10	0	3,33	5,77	40	30	40	36,67	5,77	40	30	40	36,67	5,77	40	30	40	36,67	5,77
16	0	10	0	3,33	5,77	40	40	40	40,00	0,00	40	30	40	36,67	5,77	40	30	40	36,67	5,77
17	0	10	0	3,33	5,77	50	40	60	50,00	10,00	40	30	40	36,67	5,77	40	30	40	36,67	5,77
18	0	10	0	3,33	5,77	50	40	60	50,00	10,00	50	30	40	40,00	10,00	40	30	40	36,67	5,77
19	0	10	0	3,33	5,77	50	40	60	50,00	10,00	50	40	40	43,33	5,77	40	30	40	36,67	5,77
20	0	10	0	3,33	5,77	50	40	70	53,33	15,28	50	40	40	43,33	5,77	40	30	40	36,67	5,77
21	0	10	0	3,33	5,77	60	50	100	70,00	26,46	50	40	50	46,67	5,77	40	40	40	40,00	0,00
22	0	10	0	3,33	5,77	70	60	100	76,67	20,82	50	50	60	53,33	5,77	40	40	50	43,33	5,77

R : Répétition. D : Dose , ET : Ecart type

Tableau IV : Taux de mortalité journalière cumulée des larves L5 de *L.migratoria* traitées par *Bacillus sp.*(HE805963)

Jours	Témoin					D1=10 ⁻¹					D2=10 ⁻²					D3=10 ⁻⁴				
	R1	R2	R3	M	ET	R1	R2	R3	M	ET	R1	R2	R3	M	ET	R1	R2	R3	M	ET
1	0	0	0	0,00	0,00	0	0	0	0,00	0,00	0	0	0	0,00	0,00	0	0	0	0,00	0,00
2	0	0	0	0,00	0,00	0	10	20	10,00	10,00	0	10	10	6,67	5,77	0	0	0	0,00	0,00
3	0	0	0	0,00	0,00	0	10	20	10,00	10,00	10	10	10	10,00	0,00	0	10	0	3,33	5,77
4	10	0	0	3,33	5,77	0	10	20	10,00	10,00	10	10	10	10,00	0,00	10	10	10	10,00	0,00
5	10	0	0	3,33	5,77	30	30	50	36,67	11,55	10	10	10	10,00	0,00	10	10	10	10,00	0,00
6	10	0	0	3,33	5,77	40	50	60	50,00	10,00	10	10	10	10,00	0,00	20	10	10	13,33	5,77
7	10	0	0	3,33	5,77	40	50	60	50,00	10,00	10	10	10	10,00	0,00	20	20	10	16,67	5,77
8	10	0	0	3,33	5,77	50	50	60	53,33	5,77	10	20	40	23,33	15,28	20	20	10	16,67	5,77
9	10	0	0	3,33	5,77	70	60	60	63,33	5,77	10	20	40	23,33	15,28	20	20	20	20,00	0,00
10	10	0	0	3,33	5,77	70	70	60	66,67	5,77	20	20	40	26,67	11,55	30	20	20	23,33	5,77
11	10	0	0	3,33	5,77	70	70	60	66,67	5,77	20	20	40	26,67	11,55	30	30	30	30,00	0,00
12	10	0	0	3,33	5,77	70	70	70	70,00	0,00	40	20	40	33,33	11,55	40	40	40	40,00	0,00
13	10	0	0	3,33	5,77	70	70	70	70,00	0,00	40	30	40	36,67	5,77	40	60	40	46,67	11,55
14	10	0	0	3,33	5,77	70	70	70	70,00	0,00	40	30	40	36,67	5,77	40	60	50	50,00	10,00
15	10	0	0	3,33	5,77	70	70	70	70,00	0,00	80	50	40	56,67	20,82	50	70	50	56,67	11,55
16	10	0	0	3,33	5,77	70	70	70	70,00	0,00	80	50	40	56,67	20,82	50	70	50	56,67	11,55
17	10	0	0	3,33	5,77	70	70	70	70,00	0,00	80	50	60	63,33	15,28	60	80	50	63,33	15,28
18	10	0	0	3,33	5,77	70	70	70	70,00	0,00	80	50	60	63,33	15,28	60	80	50	63,33	15,28
19	10	0	0	3,33	5,77	70	80	70	73,33	5,77	80	50	60	63,33	15,28	60	80	50	63,33	15,28
20	10	0	0	3,33	5,77	70	80	80	76,67	5,77	80	50	70	66,67	15,28	70	80	50	66,67	15,28
21	10	0	0	3,33	5,77	80	90	80	83,33	5,77	80	60	70	70,00	10,00	70	80	60	70,00	10,00
22	10	0	0	3,33	5,77	80	100	80	86,67	11,55	80	60	70	70,00	10,00	70	80	60	70,00	10,00

R : Répétition. D : Dose , ET : Ecart type

Tableau V : Taux de mortalité journalière cumulée des larves L5, traitées par *P. fluorescens* bv III

Jours	Témoin					D1=10 ⁻¹					D2=10 ⁻²					D3=10 ⁻⁴				
	R1	R2	R3	Témoin	ET	R1	R2	R3	D1	ET	R1	R2	R3	D2	ET	R1	R2	R3	D3	ET
1	0	0	0	0,00	0,00	10	0	0	3,33	5,77	0	0	0	0,00	0,00	0	0	0	0,00	0,00
2	0	0	0	0,00	0,00	10	10	10	10,00	0,00	0	0	10	3,33	5,77	0	20	0	6,67	11,55
3	0	0	0	0,00	0,00	10	20	20	16,67	5,77	10	0	10	6,67	5,77	0	20	0	6,67	11,55
4	10	0	0	3,33	5,77	10	20	20	16,67	5,77	10	20	10	13,33	5,77	20	20	0	13,33	11,55
5	10	0	0	3,33	5,77	30	20	40	30,00	10,00	10	20	30	20,00	10,00	20	20	0	13,33	11,55
6	10	0	0	3,33	5,77	30	50	40	40,00	10,00	10	20	30	20,00	10,00	20	20	10	16,67	5,77
7	10	0	0	3,33	5,77	30	50	40	40,00	10,00	10	30	30	23,33	11,55	20	20	10	16,67	5,77
8	10	0	0	3,33	5,77	50	60	40	50,00	10,00	30	40	30	33,33	5,77	20	20	10	16,67	5,77
9	10	0	0	3,33	5,77	60	60	50	56,67	5,77	30	40	40	36,67	5,77	20	20	20	20,00	0,00
10	10	0	0	3,33	5,77	70	60	50	60,00	10,00	50	40	40	43,33	5,77	30	30	20	26,67	5,77
11	10	0	0	3,33	5,77	70	60	60	63,33	5,77	50	40	40	43,33	5,77	30	30	20	26,67	5,77
12	10	0	0	3,33	5,77	90	80	60	76,67	15,28	50	50	40	46,67	5,77	40	40	20	33,33	11,55
13	10	0	0	3,33	5,77	90	80	60	76,67	15,28	50	50	40	46,67	5,77	40	50	40	43,33	5,77
14	10	0	0	3,33	5,77	90	80	60	76,67	15,28	50	50	40	46,67	5,77	40	50	40	43,33	5,77
15	10	0	0	3,33	5,77	90	80	70	80,00	10,00	60	50	40	50,00	10,00	50	50	40	46,67	5,77
16	10	0	0	3,33	5,77	90	80	70	80,00	10,00	70	50	40	53,33	15,28	50	50	50	50,00	0,00
17	10	0	0	3,33	5,77	90	100	100	96,67	5,77	70	50	50	56,67	11,55	60	60	50	56,67	5,77
18	10	0	0	3,33	5,77	100	100	100	100,00	0,00	70	60	60	63,33	5,77	60	60	50	56,67	5,77
19	10	0	0	3,33	5,77	100	100	100	100,00	0,00	70	60	70	66,67	5,77	60	70	50	60,00	10,00
20	10	0	0	3,33	5,77	100	100	100	100,00	0,00	70	60	70	66,67	5,77	60	70	50	60,00	10,00
21	10	0	0	3,33	5,77	100	100	100	100,00	0,00	80	60	70	70,00	10,00	60	70	60	63,33	5,77
22	10	0	0	3,33	5,77	100	100	100	100,00	0,00	80	60	70	70,00	10,00	60	70	60	63,33	5,77

R : Répétition. D : Dose , ET : Ecart type

Annexe 9

Tableau VI : Analyse de la variance relative à l'effet de traitement par *Bacillus sp.*(HE799656) sur la mortalité des L5 de *L. migratoria*

Source	ddl	Somme des carrés	Carré moyen	F de Fisher	Pr > F
Modèle	24	340656,232	14194,010	52,735	< 0,0001
Résidus	238	64059,357	269,157		
Total	262	404715,589			

Tableau VII : Classement des groupes non significativement différents par le test de Tukey (HSD) chez les L5 de *L. migratoria* traitées par *Bacillus sp.*(HE799656)

Modalités	Moyenne	Regroupements			
D1	81,212	A			
D2	53,485	B			
D3	39,848	C			
T	2,923	D			

Tableau VIII : Analyse de la variance relative à l'effet de traitement par *Bacillus sp.*(HE805963) sur la mortalité des L5 de *L. migratoria* :

Source	ddl	Somme des carrés	Carré moyen	F de Fisher	Pr > F
Modèle	87	213193,156	2450,496	33,503	< 0,0001
Résidus	175	12800,000	73,143		
Total	262	225993,156			

Tableau IX : Classement des groupes non significativement différents par le test de Tukey (HSD) chez les L5 de *L. migratoria* traitées par *Bacillus sp.*(HE805963) :

Modalités	Moyenne	Regroupements			
D1	55,758	A			
D3	35,909	B			
D2	35,152	B			
T	2,923	C			

Tableau X: Analyse de la variance relative à l'effet de traitement par *B. sphaericus* sur la mortalité des L5 de *L. migratoria*

Source	ddl	Somme des carrés	Carré moyen	F de Fisher	Pr > F
Modèle	24	69215,904	2883,996	31,310	< 0,0001
Résidus	238	21922,499	92,111		
Total	262	91138,403			

Tableau XI : Classement des groupes non significativement différents par le test de Tukey (HSD) chez les L5 de *L. migratoria* traitées par *B. sphaericus*

Modalités	Moyenne	Regroupements
D1	35,000	A
D2	28,333	B
D3	22,879	C
T	2,923	D

Tableau XII : Analyse de la variance relative à l'effet de traitement par *P.fluorescens* bvIII sur la mortalité des L5 de *L. migratoria*

Source	ddl	Somme des carrés	Carré moyen	F de Fisher	Pr > F
Modèle	24	210230,771	8759,615	47,664	< 0,0001
Résidus	238	43739,571	183,780		
Total	262	253970,342			

Tableau XIII : Classement des groupes non significativement différents par le test de Tukey (HSD) chez les L5 de *L. migratoria* traitées par *P.fluorescens* bvIII

Modalités	Moyenne	Regroupements
D1	62,424	A
D2	40,000	B
D3	33,636	C
T	2,923	D

Annexe : 10

Tableau XIV : Probites des pourcentages des mortalités corrigées (MC%) et logarithmes décimaux des temps chez les L5 de *L. migratoria* traitées par *Bacillus sp.*(HE799656)

Log temps	MC%			Probites		
	D1	D2	D3	D1	D2	D3
0	10	0	0	3,72	0	0
0,3	23,33	0	0	4,32	0	0
0,48	33,33	6,667	0	4,61	3,83	0
0,6	41,38	10,34	0	4,81	3,85	0
0,7	58,62	10,34	3,448	5,25	3,85	3,59
0,78	68,97	13,79	10,34	5,55	4,1	3,84
0,84	72,41	36,67	10,34	5,61	4,73	3,84
0,9	89,66	36,67	10,34	6,28	4,73	3,84
0,95	89,66	43,33	13,79	6,28	4,86	4,11
1	96,55	50	34,48	6,79	5	4,65
1,04	96,55	56,67	34,48	6,79	5,21	4,65
1,08	100	56,67	37,93	8,09	5,21	4,97
1,11	100	66,67	44,83	8,09	5,46	4,94
1,15	100	70	48,28	8,09	5,52	4,98
1,18	100	70	62,07	8,09	5,52	5,32
1,2	100	73,33	62,07	8,09	5,63	5,32
1,23	100	86,67	68,97	8,09	6,12	5,54
1,25	100	86,67	68,97	8,09	6,12	5,54
1,28	100	96,67	68,97	8,09	6,8	5,54
1,3	100	96,67	82,76	8,09	6,8	5,97
1,32	100	100	89,66	8,09	8,09	6,27
1,34	100	100	89,66	8,09	8,09	6,27

Tableau XV : Probites des pourcentages des mortalités corrigées (MC%) et logarithmes décimaux des temps chez les L5 de *L. migratoria* traitées par *Bacillus sp.*(HE805963)

Log temps	MC%			Probites		
	D1	D2	D3	D1	D2	D3
0	0	0	0	0	0	0
0,30	10,00	6,67	0,00	3,72	3,83	0,00
0,48	10,00	10,00	3,33	3,72	3,72	3,46
0,60	6,90	6,90	10,34	3,96	3,96	3,84
0,70	37,70	6,90	10,34	4,73	3,96	3,84
0,78	48,28	6,90	10,34	4,98	3,96	3,84

0,84	48,28	6,90	13,79	4,98	3,96	4,10
0,90	51,72	20,69	13,79	5,10	4,30	4,10
0,95	62,07	20,69	17,24	5,32	4,30	4,11
1,00	65,52	24,14	20,69	5,43	4,31	4,30
1,04	65,52	24,14	27,59	5,43	4,31	4,49
1,08	68,97	31,03	37,93	5,54	4,50	4,77
1,11	68,97	34,48	44,83	5,54	4,65	4,94
1,15	68,97	34,48	48,28	5,54	4,65	4,98
1,18	68,97	55,17	55,17	5,54	5,15	5,15
1,20	68,97	55,17	55,17	5,54	5,15	5,15
1,23	68,97	62,07	62,07	5,54	5,32	5,32
1,25	68,97	62,07	62,07	5,54	5,32	5,32
1,28	72,41	62,07	62,07	5,61	5,32	5,32
1,30	75,86	65,52	65,52	5,73	5,43	5,43
1,32	82,76	68,97	68,97	5,97	5,54	5,54
1,34	86,21	68,97	68,97	6,09	5,54	5,54

Tableau XVI : Probits des pourcentages des mortalités corrigées (MC%) et logarithmes décimaux des temps chez les L5 de *L. migratoria* traitées par *B. sphaericus*

Log temps	MC%			Probits		
	D1	D2	D3	D1	D2	D3
0	3,33	0	0	3,46	0	0
0,3	3,45	3,45	0	3,58	3,58	0
0,48	10,34	3,45	0	3,85	3,58	0
0,6	24,14	13,79	0	4,31	3,86	0
0,7	24,14	13,79	0	4,31	3,86	0
0,78	24,14	13,79	0	4,31	3,86	0
0,84	27,59	13,79	0	4,35	3,86	0
0,9	27,59	13,79	10,34	4,35	3,86	3,85
0,95	27,59	24,14	17,24	4,35	4,31	4,11
1	27,59	27,59	17,24	4,35	4,35	4,11
1,04	27,59	27,59	20,69	4,35	4,35	4,13
1,08	34,48	27,59	20,69	4,65	4,35	4,13
1,11	34,48	34,48	20,69	4,65	4,65	4,13
1,15	48,28	34,48	20,69	4,98	4,65	4,13
1,18	48,28	34,48	34,48	4,98	4,65	4,65

1,2	48,28	34,48	34,48	4,98	4,65	4,65
1,23	48,28	34,48	34,48	4,98	4,65	4,65
1,25	48,28	37,93	34,48	4,98	4,68	4,65
1,28	48,28	41,38	34,48	4,98	4,81	4,65
1,3	51,72	41,38	34,48	5,02	4,81	4,65
1,32	68,96	44,83	37,93	5,50	4,85	4,68
1,34	75,86	51,72	41,38	5,70	5,02	4,81

Tableau XVII : Probits des pourcentages des mortalités corrigées (MC%) et logarithmes décimaux des temps chez les L5 de *L. migratoria* traitées par *P. fluorescens* bvIII

Log temps	MC%			Probits		
	D1	D2	D3	D1	D2	D3
0,00	3,33	0,00	0,00	3,46	0,00	0,00
0,30	6,67	3,33	0,00	3,82	3,46	0,00
0,48	16,67	6,67	6,67	4,18	3,82	3,82
0,60	13,79	10,34	10,34	4,11	3,85	3,85
0,70	48,28	17,24	10,34	4,98	4,11	3,85
0,78	48,28	17,24	13,79	4,98	4,11	4,11
0,84	48,28	20,69	13,79	4,98	4,30	4,11
0,90	48,28	31,03	13,79	4,98	4,50	4,11
0,95	55,17	34,48	17,24	5,14	4,65	4,11
1,00	58,62	41,38	24,14	5,25	4,81	4,31
1,04	62,07	41,38	24,14	5,32	4,81	4,31
1,08	75,86	44,83	31,03	5,73	4,94	4,50
1,11	75,86	44,83	41,38	5,73	4,94	4,81
1,15	75,86	44,83	41,38	5,73	4,94	4,81
1,18	79,31	48,28	44,83	5,83	4,98	4,94
1,20	79,31	51,72	48,28	5,83	5,10	4,98
1,23	96,55	55,17	55,17	6,79	5,14	5,14
1,25	100,00	62,07	55,17	8,09	5,32	5,14
1,28	100,00	65,52	58,62	8,09	5,43	5,25
1,30	100,00	65,52	58,62	8,09	5,43	5,25
1,32	100,00	68,97	62,07	8,09	5,55	5,32
1,34	100,00	68,97	62,07	8,09	5,55	5,32

Annexe : 11

Tableau XVIII: Durées moyennes de développement larvaire chez les L5 de *L. migratoria* traitées par les bactéries *Bacillus sp.*(HE 799656), *Bacillus sp.*(HE 805963), *B. sphaericus* et *P. fluorescens* bvIII.

	<i>Bacillus sp.</i> (HE 799656)			<i>Bacillus sp.</i> (HE 805963)			<i>B. sphaericus</i>			<i>P. fluorescens</i> bvIII			
	Témoin	D1	D2	D3	D1	D2	D3	D1	D2	D3	D1	D2	D3
Moyennes	15,48	0,00	0,00	17,47	23,59	21,80	21,03	23,36	21,28	20,58	0,00	20,18	20,05
Ecart types	1,44	0,00	0,00	0,70	0,52	1,09	0,07	1,12	0,95	0,11	0,00	0,79	1,59

Annexe 13

Tableau XXIII : Les concentrations(C) des échantillons en protéines et glucides chez les individus traités par *Bacillus sp.*(HE799656), *Bacillus sp.*(HE805963) et *B. sphaericus* et par *Pseudomonas fluorescens III*

Bactéries		<i>Bacillus sp.</i> (HE805963)		<i>Bacillus sp.</i> (HE799656),		<i>B. sphaericus</i>		<i>Pseudomonas fluorescens III</i>	
		Protéines	Glucides	Protéines	Glucides	Protéines	Glucides	Protéines	Glucides
D ₁	R ₁	1,533	0,552	1,132	0,433	0,111	0,122	0,050	1,174
	R ₂	1,466	0,876	1,334	0,564	0,122	0,139	0,045	1,430
	R ₃	1,777	0,677	0,978	0,511	0,123	0,201	0,096	1,141
	R ₄	1,9	0,61	1,235	0,389	0,107	0,084	0,103	0,968
	R ₅	1,379	0,64	0,686	0,458	0,08	0,1185	0,131	1,499
	C (mg/ml)	1,611	0,671	1,073	0,471	0,1086	0,1329	0,083	1,242
	ET	0,219	0,123	0,253	0,068	0,017	0,042	0,218	0,18
D ₂	R ₁	1,671	0,487	1,212	0,559	0,133	0,22	0,302	1,387
	R ₂	1,877	0,813	0,998	0,698	0,098	0,211	0,033	0,914
	R ₃	1,901	0,474	1,237	0,387	0,121	0,281	0,063	0,475
	R ₄	1,232	0,544	1,433	0,498	0,202	0,197	0,280	1,319
	R ₅	1,644	0,322	1,71	0,693	0,15	0,235	0,038	0,781
	C (mg/ml)	1,665	0,528	1,318	0,567	0,1408	0,2288	0,141	0,975
	ET	0,268	0,179	0,267	0,132	0,0390	0,032	0,016	0,035

R : Répétition. D : Dose , ET : Ecart type

Tableau XXIV : Les concentrations(C) des échantillons en protéines et glucides chez les individus témoins.

	Protéines	Glucides
R ₁	0,511	0,733
R ₂	0,498	0,79
R ₃	0,482	0,801
R ₄	0,411	0,729
R ₅	0,4275	0,8025
C (mg/ml)	0,4659	0,7711
ET	0,0441	0,037

Annexe 14

Tableau XXV : Analyse de la variance relative à l'effet de *Bacillus sp.*(HE805963) sur les concentrations(C) en protéines hémolympathiques des L5 de *L. migratoria*

Source	ddl	Somme des carrés	Carré moyen	F de Fisher	Pr > F
Modèle	2	3,888	1,944	40,256	< 0,0001
Résidus	11	0,531	0,048		
Total	13	4,420			

Tableau XXVI : Classement des groupes non significativement différents par le test de Tukey (HSD) relatif à l'effet de *Bacillus sp.*(HE805963) sur les concentrations(C) en protéines hémolympathiques des L5 de *L. migratoria*

Modalités	Moyenne	Regroupements
d2	1,665	A
d1	1,611	A
d0	0,473	B

Tableau XXVII : Analyse de la variance relative à l'effet de *Bacillus sp.*(HE799656) sur les concentrations(C) en protéines hémolympathiques des L5 de *L. migratoria*

Source	ddl	Somme des carrés	Carré moyen	F de Fisher	Pr > F
Modèle	2	1,644	0,822	15,209	0,001
Résidus	11	0,594	0,054		
Total	13	2,238			

Tableau XXVIII: Classement des groupes non significativement différents par le test de Tukey (HSD) relatif à l'effet de *Bacillus sp.*(HE799656) sur les concentrations(C) en protéines hémolympathiques des L5 de *L. migratoria*

Modalités	Moyenne	Regroupements
d2	1,318	A
d1	1,073	A
d0	0,473	B

Tableau XXIX: Analyse de la variance relative à l'effet de *B. sphaericus* sur les concentrations(C) en protéines hémolympathiques des L5 de *L. migratoria*

Source	ddl	Somme des carrés	Carrés moyens	F de Fisher	Pr > F
Modèle	2	0,314	0,157	136,911	< 0,0001
Résidus	11	0,013	0,001		

Total	13	0,326		
-------	----	-------	--	--

Tableau xxx : Classement des groupes non significativement différents par le test de Tukey (HSD) relatif à l'effet de *B. sphaercus* sur les concentrations(C) en protéines hémolymphatiques des L5 de *L. migratoria*

Modalités	Moyenne	Regroupements
d1	0,109	A
d2	0,141	A
d0	0,455	B

Tableau xxxi : Analyse de la variance relative à l'effet de *Pseudomonas fluorescens III* sur les concentrations(C) en protéines hémolymphatiques des L5 de *L. migratoria*

Source	ddl	Somme des carrés	Carrés moyens	F de Fisher	Pr > F
Modèle	2	0,766	0,383	17,746	< 0,0001
Résidus	11	0,237	0,022		
Total	13	1,004			

Tableau xxxii : Classement des groupes non significativement différents par le test de Tukey (HSD) relatif à l'effet de *Pseudomonas fluorescens III* sur les concentrations(C) en protéines hémolymphatiques des L5 de *L. migratoria*

Modalités	Moyenne	Regroupements
d1	0,085	A
d2	0,143	A
d0	0,629	B

Annexe 15

Tableau XXXIII : Analyse de la variance relative à l'effet de *Bacillus sp.*(HE805963) sur les concentrations(C) en glucides hémolymphatiques des L5 de *L. migratoria*

Source	ddl	Somme des carrés	Carré moyen	F de Fisher	Pr > F
Modèle	2	0,202	0,101	4,811	0,032
Résidus	11	0,230	0,021		
Total	13	0,432			

Tableau XXXIV : Classement des groupes non significativement différents par le test de Tukey (HSD) relatif à l'effet de *Bacillus sp.* (HE805963) sur les concentrations(C) en glucides hémolymphatiques des L5 de *L. migratoria*

Modalités	Moyenne	Regroupements
d0	0,829	A
d1	0,671	A B
d2	0,528	B

Tableau XXXV : Analyse de la variance relative à l'effet de *Bacillus sp.*(HE799656) sur les concentrations(C) en glucides hémolymphatiques des L5 de *L. migratoria*

Source	ddl	Somme des carrés	Carré moyen	F de Fisher	Pr > F
Modèle	2	0,298	0,149	12,599	0,001
Résidus	11	0,130	0,012		
Total	13	0,428			

Tableau XXXVI : Classement des groupes non significativement différents par le test de Tukey (HSD) relatif à l'effet de *sp.*(HE799656) sur les concentrations(C) en glucides hémolymphatiques des L5 de *L. migratoria*

Modalités	Moyenne	Regroupements
d0	0,829	A
d2	0,567	B
d1	0,471	B

Tableau XXXVII : Analyse de la variance relative à l'effet de *B. sphaericus* sur les concentrations(C) en glucides hémolymphatiques des L5 de *L. migratoria*

Source	ddl	Somme des carrés	Carrés moyens	F de Fisher	Pr > F
Modèle	2	1,051	0,525	380,029	< 0,0001
Résidus	11	0,015	0,001		
Total	13	1,066			

Tableau XXXVIII : Classement des groupes non significativement différents par le test de Tukey (HSD) relatif à l'effet de *B. sphaericus* sur les concentrations(C) en glucides hémolymphatiques des L5 de *L. migratoria*

Modalités	Moyenne	Regroupements
d1	0,133	A
d2	0,229	B
d0	0,781	C

Tableau XXXIX : Analyse de la variance relative à l'effet de *Pseudomonas fluorescens* III sur les concentrations(C) en glucides hémolymphatiques des L5 de *L. migratoria*

Source	ddl	Somme des carrés	Carrés moyens	F de Fisher	Pr > F
Modèle	2	0,673	0,337	3,534	0,065
Résidus	11	1,048	0,095		
Total	13	1,722			

Tableau XL : Classement des groupes non significativement différents par le test de Tukey (HSD) relatif à l'effet de *fluorescens* III sur les concentrations(C) en glucides hémolymphatiques des L5 de *L. migratoria*

Modalités	Moyenne	Regroupements
d0	0,692	A
d2	0,975	A
d1	1,242	A

Annexe 16

Tableau XLI : Evolution des poids moyens des souris traitées par *Bacillus sp.*(HE799656)

Jours	Témoin	D1	D2	D3	Ecart type Témoin	Ecart type D1	Ecart type D2	Ecart type D3
1	13,38	13,21	13,1	12,67	0,76	0,89	1,24	0,24
2	13,84	13,26	13,5	12,98	0,68	1,04	1,23	0,73
3	14,42	13,46	14,2	13,23	0,75	1,64	0,41	0,41
4	14,79	13,87	14,6	13,66	0,76	0,84	0,39	1,39
5	15,18	14,22	15,03	13,96	0,82	1,71	2,29	1,29
6	16,27	14,98	15,79	14,55	0,56	0,88	2,4	1,4
7	16,81	15,78	16,01	15,01	0,39	0,68	0,55	0,55
8	16,98	15,99	16,85	15,87	0,49	1,12	0,81	0,88
9	17,58	16,05	17,21	16,05	0,97	0,65	0,58	0,68
10	18,57	16,84	17,88	16,65	0,9	0,49	0,87	1,19
11	19,53	17,06	18,3	17	0,63	0,45	0,6	0,66
12	20,37	18,07	18,6	18,03	0,59	0,61	0,78	0,69
13	21,77	19,53	19,5	18,66	0,46	0,28	1,12	0,78
14	22,66	21,77	20,1	19,34	0,56	1,37	0,64	0,92
15	23	22,7	21	20	0,82	0,5	0,98	0,64

D : dose

Tableau XLII : Evolution pondérale des souris témoins et traitées par *Bacillus sp.*(HE805963)

Jours	Témoin	D1	D2	D3	Ecart type Témoin	Ecart type D1	Ecart type D2	Ecart type D3
1	13,38	12,48	11,67	13,59	0,76	1	0,89	0,09
2	13,84	12,79	11,95	14,25	0,68	1,6	1,08	1,62
3	14,42	13,13	12,98	14,85	0,75	1,27	0,86	1,14
4	14,79	15,14	14,98	16,59	0,76	1,02	1,87	1,74
5	15,18	15,23	15,28	17,04	0,82	1,16	2,12	1,95
6	16,27	16,07	16,35	18,11	0,56	1,46	1,52	2
7	16,81	16,11	16,4	18,69	0,39	1,33	1,25	2,19
8	16,98	16,01	16,84	18,93	0,49	1,03	2,21	2,12
9	17,58	16,23	17,14	19,61	0,97	1,13	2,12	1,77
10	18,57	16,43	17,81	20,09	0,9	1,23	1,87	1,76
11	19,53	16,67	18,27	20,66	0,63	1,21	1,61	1,15
12	20,37	16,73	18,43	21,33	0,59	1,45	1,69	1,52
13	21,77	17,44	19,01	21,93	0,46	1,43	1,72	1,42
14	22,66	18,22	19,5	23,01	0,56	1,37	1,86	1,07
15	23	19,27	20,44	24,14		1,25	1,72	2,28

D : dose

Tableau XLIII : Evolution des poids moyens des souris traitées par *Bacillus sphaericus*

Jours	Témoin	D1	D2	D3	Ecart type Témoin	Ecart type D1	Ecart type D2	Ecart type D3
1	13,38	12,98	12	13,5	0,76	1,22	0,89	0,09
2	13,84	13,01	12,3	13	0,68	1,6	1,08	1,62
3	14,42	13,78	12,98	13,6	0,75	1,27	0,86	1,14
4	14,79	14,03	13,24	14,23	0,76	1,02	1,87	1,74
5	15,18	14,78	13,98	14,86	0,82	1,16	2,12	1,95
6	16,27	15,88	14,66	15,22	0,56	1,46	2,52	2,33
7	16,81	16,77	15,08	15,94	0,39	1,33	2,25	2,13
8	16,98	17,12	15,78	16,11	0,49	1,03	2,21	2,02
9	17,58	17,89	16,99	17	0,97	1,13	2,12	1,77
10	18,57	19	17,33	18,58	0,9	1,23	1,87	1,76
11	19,53	20,11	18,22	19,05	0,63	1,21	1,61	1,69
12	20,37	21,56	19,07	20,08	0,59	1,45	1,69	1,52
13	21,77	22,1	19,87	21,03	0,46	1,43	1,72	1,42
14	22,66	22,3	20,59	22,44	0,56	1,37	1,86	1,72
15	23	22,9	21,68	23,11	0,82	1,25	1,72	1,28

D : dose**Tableau XLIV : Evolution pondérale des souris témoins et traitées par *Pseudomonas fluorescens* bvIII**

Jours	Témoin	D1	D2	D3	Ecart type Témoin	Ecart type D1	Ecart type D2	Ecart type D3
1	13,38	12,3	13,26	13,66	0,76	0,89	0,24	0,24
2	13,84	13,1	13,46	13,96	0,68	1,04	0,22	0,23
3	14,42	13,5	14,01	14,51	0,75	1,14	0,4	0,41
4	14,79	14,2	14,03	14,9	0,76	0,84	0,39	0,39
5	15,18	14,6	14,73	15,3	0,82	0,91	0,29	0,29
6	16,27	15,2	14,73	15,73	0,56	0,88	0,39	0,4
7	16,81	16	15,14	16,17	0,39	0,68	0,54	0,55
8	16,98	16,6	15,38	16,38	0,49	0,9	0,81	0,82
9	17,58	17	16,05	16,85	0,97	0,66	0,81	0,81
10	18,57	17,2	16,84	17,14	0,9	0,69	0,87	0,88
11	19,53	17,6	17,06	17,96	0,63	0,45	0,6	0,6
12	20,37	18	18,07	18,67	0,59	0,51	0,98	0,99
13	21,77	18,6	18,69	19,69	0,46	0,28	1,12	1,12
14	22,66	19,5	19,35	20,35	0,56	0,37	0,64	0,65
15	23	20,6	20,34	21,34	0,82	0,58	0,48	0,49

D : dose

Annexe 17

Tableau XLV : Effet inflammatoire de *Bacillus sp.*(HE799656), *Bacillus sp.*(HE805963), *B. sphaericus* et *P.fluorescens bvIII* sur les souris blanches.

Poids	Témoin	<i>B. sp.</i> (HE799656)	<i>B. sp.</i> (HE805963)	<i>B.</i> <i>sphaericus</i>	<i>P.fluo. bvIII</i>
Patte droite					
R1	0,711	0,7	0,686	0,61	0,657
R2	0,701	0,69	0,622	0,603	0,701
R3	0,722	0,721	0,49	0,579	0,66
R4	0,738	0,693	0,582	0,528	0,622
Poids Moyen	0,718	0,701	0,595	0,58	0,66
Ecart type	0,0158	0,0139	0,082	0,037	0,032
Patte gauche					
R1	0,723	0,707	0,67	0,63	0,68
R2	0,737	0,74	0,648	0,55	0,72
R3	0,738	0,69	0,65	0,57	0,7
R4	0,762	0,703	0,652	0,61	0,72
Poids Moyen	0,74	0,71	0,655	0,59	0,705
Ecart type	0,016	0,021	0,01	0,036	0,019

R : répétition

Annexe 18

Tableau XLVII : Analyse de la variance relative à l'évolution de nombre des colonies de *Bacillus sp.*(HE799656) sur le feuillage.

Source	ddl	Somme des carrés	Carrés moyens	F de Fisher	Pr > F
Modèle	3	4487,076	1495,692	54,578	< 0,0001
Résidus	7	191,833	27,405		
Total	10	4678,909			

Tableau XLVIII : Analyse de la variance relative à l'évolution de nombre des colonies de *Bacillus sp.*(HE799656) dans le sol.

Source	ddl	Somme des carrés	Carrés moyens	F de Fisher	Pr > F
Modèle	3	18240,000	6080,000	1,044	0,431
Résidus	7	40779,500	5825,643		
Total	10	59019,500			

Tableau XLIX : Analyse de la variance relative à l'évolution de nombre des colonies de *P. fluorescens* bv III dans le sol.

Source	ddl	Somme des carrés	Carrés moyens	F de Fisher	Pr > F
Modèle	3	12383,803	4127,934	1,717	0,250
Résidus	7	16833,833	2404,833		
Total	10	29217,636			

ملخص

يستند بحثنا عن استخدام بعض أنواع البكتيريا المضاد حشرية من جنس البكتيريا العصوية (*Bacillus*) و الفلورسنت *Pseudomonas spp* ضد يرقات الطور الخامس (L5) للجراد المهاجر *Locusta migratoria*، ودراسة تأثيرها على بعض المؤشرات البيولوجية والفيزيولوجية مثل معدل الهلاك، مدة نمو اليرقات L5، بنية السيج في الجهاز الهضمي ومكونات الأيض النووي (بروتينات، بوليوسيدات).

البكتيريا المستعملة هي سلالات محلية معزولة من تربة أشجار التخليل في منطقة أدرار بالجنوب الجزائري. بعد التلقيح، يتم تحديدها وفقاً لخصائصها المورفولوجية، الفيزيولوجية، الكيموحيوية والجينية.

التصنيف سمح لنا بتحديد 05 أنواع عصوية (*Bacillus*) هي *B. circulans*, *B. subtilis*, *B. thuringiensis*, *B. sphaericus*, *B. coagulans*. أما عن فلورسنت *Pseudomonas spp* فقد تم عزل 06 سلالات موزعة على 3 أنواع وهي *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas chlororaphis*, *Pseudomonas putida*.

بعد هذا أجرينا التحديد الجزيئي للتعين من الجنس العصوي وذلك باستخراج الحمض النووي PCR، ADN، وتسلسل ARN 16S وقد تم تعريف النوعين المعنيين بهذه الدراسة بـ *Bacillus sp.*(HE805963) و *Bacillus sp.*(HE799656).

أما لمعالجة يرقات الطور الخامس للجراد المهاجر *Locusta migratoria*، فقد استعملنا 04 سلالات بكتيرية وهي: *Bacillus sp.* (HE799656)، *Bacillus sp.* (HE805963)، *B. sphaericus*، *Pseudomonas fluorescens* bvIII، للسلالة وتركيز البكتيريا المستخدمة اليرقات المعالجة بالسلالتين *Bacillus sp.*(HE799656) و *P. fluorescens* bvIII. تسببت في أضرار و سلوكيات مختلفة مثل معدل الهلاك الذي يختلف تبعاً للبيئات الأربعة المستعملة تسببت في اضطراب على مستوى مكونات الأيض النووي للجراد و تغيرات في أنسجة الجهاز الهضمي لهذه الحشرة من جهة أخرى. الأنواع البكتيرية الأربعة هي ليست سامة لقران المخبر البيضاء. ثبتة في البيئة و متوافقة للغاية مع المبيدات الكيميائية.

الكلمات المفتاح: الجراد المهاجر، البكتيريا، عزل،سمية، التوافق، الدم، بنية السيج، إيثبات.

Résumé

Notre travail de recherche est basé sur l'utilisation de quelques bactéries entomopathogènes du genre *Bacillus* et *Pseudomonas spp* fluorescents sur les larves de cinquième stade (L5) du criquet migrateur *Locusta migratoria* et ceci afin de voir leurs effets sur plusieurs paramètres biologiques et physiologiques tels que le taux de mortalité, la durée du développement des larves L5, l'histologie de l'appareil digestif et les métabolites hémolympatiques; les protéines et les glucides.

Les bactéries utilisées sont des souches autochtones, nous les avons isolées à partir de sol dans une palmeraie située au sud de l'Algérie, à Adrar. Après purification, elles ont été identifiées suivant leurs caractères morphologiques, physiologiques, biochimiques et génétiques. La classification spécifique de ces bactéries a permis d'affilier les souches bactériennes isolées du genre *Bacillus* en 5 espèces; *B. circulans* avec 4 souches, *B. subtilis* avec 1 souche, *B. thuringiensis* avec 1 souche, *B. sphaericus* avec 2 souches et *B. coagulans* avec 3 souches. Pour le groupe *Pseudomonas spp* fluorescents; nous avons sélectionné 6 souches bactériennes affiliées probablement à 3 espèces: *Pseudomonas fluorescens* avec 4 souches, *Pseudomonas chlororaphis* avec 1 souche, *Pseudomonas putida* avec 1 souche.

Après cela, nous avons procédé à l'identification moléculaire de 2 isolats en réalisant l'extraction de l'ADN, PCR et séquençage de l'ARN 16S. Les 2 souches concernées sont identifiées comme *Bacillus sp.*(HE805963) et *Bacillus sp.*(HE799656).

Pour le traitement des larves L₅ de *Locusta migratoria*; nous avons choisi 4 souches parmi les bactéries isolées; *Bacillus sp.* (HE799656), *Bacillus sp.* (HE805963), *B. sphaericus* et *Pseudomonas fluorescens* bvIII. Ces dernières ont provoqué des symptômes et comportements très remarquables avec des taux de mortalité qui varient en fonction de la souche et de la concentration bactérienne testée. Les larves traitées par les bactéries *Bacillus sp.*(HE799656) et *P. fluorescens* bvIII ont montré les plus faibles TL₅₀ et CL₅₀. Les 4 bactéries utilisées ont engendré une perturbation au niveau des métabolites hémolympatiques du criquet migrateur et des modifications histologiques au niveau de l'appareil digestif.

D'autre part les 4 souches bactériennes sont persistantes dans l'environnement et très compatibles avec les 3 pesticides chimiques deltaméthrine, lambda-cyhalothrine et le Téflubenzuron. Elles ne sont pas toxiques pour les souris blanches de laboratoire.

Mots clés : *Locusta migratoria*, *Bacillus sp.* (HE799656), *Bacillus sp.* (HE805963), *B. sphaericus*, *Pseudomonas fluorescens* bv III, isolement, toxicité, hémolymphe, histologie, persistance, compatibilité.

Summary

Our research is based on the use of some entomopathogenic bacteria of the genus *Bacillus* and *Pseudomonas spp* fluorescents on the fifth stage larvae (L5) of the migratory locust *Locusta migratoria* and in order to study their effects on several biological and physiological parameters such as mortality, duration of larval development L5, histology of the digestive tract and haemolymph metabolites, proteins and carbohydrates.

The bacteria used are local strains, we have isolated from soil in a grove south of Algeria (Adrar). After purification, they were identified according to their morphological, physiological, biochemical and genetic characteristics. The specific classification of these bacteria allowed Affiliate bacterial strains isolated from the genus *Bacillus* in 5 species: *B. circulans* with 4 strains, *B. subtilis* with one strain, *B. thuringiensis* with 1 strain, *B. sphaericus* with 2 strains and *B. coagulans* with 3 strains.

For fluorescent *Pseudomonas spp* group, we have selected 6 bacterial strains affiliated probably to three species: *Pseudomonas fluorescens* with 4 strains, *Pseudomonas chlororaphis* with 1 strain, *Pseudomonas putida* with 1 strain.

After that, we performed molecular identification of two isolates carrying the DNA extraction, PCR and sequencing of the 16S RNA. The 2 strains concerned are identified as *Bacillus sp.* (HE805963) and *Bacillus sp.* (HE799656).

For the treatment of L5 larvae of *Locusta migratoria*, we chose 4 strains from the bacteria isolated; *Bacillus sp.* (HE799656), *Bacillus sp.* (HE805963), *B. sphaericus* and *Pseudomonas fluorescens* bvIII. These have caused symptoms and behaviors very remarkable with mortality rates that vary depending on the strain and the bacterial concentration tested.

Larvae treated by bacteria *Bacillus sp.* (HE799656) and *P. fluorescens* bvIII showed the weakest LC50 and LT50. The 4 bacteria used were led to a disturbance at the haemolymphatic metabolites and histological changes in the digestive system.

Moreover, the four bacterial strains are persistent in the environment, and very compatible with the 3 chemical pesticides deltamethrin, lambda-cyhalothrin and teflubenzuron. They are not toxic to laboratory white mice.

Keywords: *Locusta migratoria*, *Bacillus sp.* (HE799656), *Bacillus sp.* (HE805963), *B. sphaericus*, *Pseudomonas fluorescens* bv III, isolation, toxicity, haemolymph, histology, persistence, compatibility.