



## Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master académique

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie (D04)

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Présenté par :

GUELTA Malika

KHELIFA Ahlem

LAKEHAL Fatima

Thème

*Toxicité d'une souche entomopathogène isolée  
localement de *Bacillus thuringiensis*  
sur un insecte ravageur.*

Soutenu publiquement le 20 juin 2019

Jury:

Grade :

Présidente: Melle BOUBAKEUR B

MCB

Encadreur: M. BOUNACEUR F.

PR

Co-encadreur: Mme OUABED A.

MCB

Examineur 1: M. ABDELHAMID D

MCB

## Remerciements

*Tout d'abord, nous tenons à remercier Allah tout puissant qui à éclairé notre chemin et qui par sa seule grâce, nous avons pu réaliser ce travail.*

*A notre encadreur Mr BOUNACEUR Farid et la co-promotrice Mme OUBABED A pour ses patience, et surtout pour ses confiance, ses remarques et ses conseils, ses disponibilité et ses Bienveillance. Lesquels trouvent ici le témoignage de notre profonde gratitude.*

*Nous voudrions également remercier les membres du jury, Melle BOUBAKEUR B, Mr. ABDELHAMID D, pour avoir accepté d'évaluer ce travail et pour toutes leurs remarques et critiques,*

*Nous tenons remercier aussi Mme MOHANDKACI Hakima, pour leurs aidés et leurs encouragement.*

*Grand merci à tous les travailleurs de laboratoire*

*A tous les gens qui nous ont encouragés et qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.*

*Du profond de mon cœur, je dédie ce travail à tous ceux qui me sont chers,*

***A MA CHÈRE MÈRE***

*Tu m'as donné la vie, la tendresse et le courage pour réussir.*

*Tout ce que je peux t'offrir ne pourra exprimer l'amour et la*

*Reconnaissance que je te porte*

*En témoignage, je t'offre ce modeste travail pour te remercier pour*

*Tes Sacrifices et pour l'affection dont tu m'as toujours entourée.*

***A LA MÉMOIRE DE MON PÈRE***

*L'épaulé solide, l'œil attentif compréhensif et la personne la plus*

*Digne de mon estime et de mon respect.*

*Aucune dédicace ne saurait exprimer mes sentiments, que Dieu te*

*Préserve et te procure santé et longue vie.*

***A mes chères sœurs KHADIJA et SOUMIA***

*Pour le soutien et l'encouragement et je leur souhaite beaucoup de succès,*

*Je vous aime beaucoup mes chères,*

***A mes frères, AHMED, MOSTAPHA, YUCEF, HOCINE, ABD EL LAH,***

*je les souhaite beaucoup de succès dans leur vie,*

***A mes grandes familles parentales et maternelles***

*A tous mes amis, surtout mes chères amies KHALDIA, DJAHIDA, AMINA, MALAK, KHALDIA, je vous adore, et j'espère que notre amitié restera pour toujours,*

*A qui m'a soutenu dans la vie mon mari DJEBALI SALAH EDIN, merci beaucoup pour leur encouragement tout au long de la réalisation de ce travail, je te souhaite une longue vie pleine de santé et de bonheur,*

*A mes trinômes AHLEM et MALIKA qui je leurs souhaite tous le bonheur et le succès dans leur vie.*

*A tous ceux qui, par un mot, m'ont donné la force de continuer....*

**LAKEHAL Fatima**

*Du profond de mon cœur, je dédie ce travail à tous ceux qui me sont chers,*

***A MA CHERE MERE***

*Tu m'as donné la vie, la tendresse et le courage pour réussir.*

*Tout ce que je peux t'offrir ne pourra exprimer l'amour et la reconnaissance que je te porte*

*En témoignage, je t'offre ce modeste travail pour te remercier pour*

*Tes Sacrifices et pour l'affection dont tu m'as toujours entourée.*

***A LA MEMOIRE DE MON PERE***

*L'épaule solide, l'œil attentif compréhensif et la personne la plus*

*Digne de mon estime et de mon respect.*

*Aucune dédicace ne saurait exprimer mes sentiments, que Dieu te*

*Préserve et te procure santé et longue vie.*

***A mes chères sœurs NADIA et NAWAL***

*Pour le soutien et l'encouragement et je leur souhaite beaucoup de succès,*

*Je vous aime beaucoup mes chères,*

***A mes frères, GHARBI, RABEH, ABD EL SALAM, SOFIANE***

*je les souhaite beaucoup de succès dans leur vie,*

***A mes grandes familles parentales et maternelles***

***A tous mes amis, surtout mes chères amies NAIMA, KOUDA, KHADIDJA, SOUMIA, SAMIRA, CHAHIRA, je vous adore, et j'espère que notre amitié restera pour toujours,***

*A qui m'a soutenu dans la vie WAHIBA, merci beaucoup pour leur encouragement tout au long de la réalisation de ce travail, je te souhaite une longue vie pleine de santé et de bonheur,*

***A mes trinômes AHLEM et FATIMA qui je leurs souhaite tous le bonheur et le succès dans leur vie.***

*A tous ceux qui, par un mot, m'ont donné la force de continuer.....*

*Du profond de mon cœur, je dédie ce travail à tous ceux qui me sont chers,*

***A MA CHÈRE MÈRE***

*Tu m'as donné la vie, la tendresse et le courage pour réussir.*

*Tout ce que je peux t'offrir ne pourra exprimer l'amour et la*

*reconnaissance que je te porte*

*En témoignage, je t'offre ce modeste travail pour te remercier pour*

*Tes Sacrifices et pour l'affection dont tu m'as toujours entourée.*

***A LA MÉMOIRE DE MON PÈRE***

*L'épaulé solide, l'œil attentif compréhensif et la personne la plus*

*Digne de mon estime et de mon respect.*

*Aucune dédicace ne saurait exprimer mes sentiments, que Dieu te*

*Préserve et te procure santé et longue vie.*

***A mes chères sœurs KHALDIA et MERIEM,***

*Pour le soutien et l'encouragement et je leur souhaite beaucoup de succès,*

*Je vous aime beaucoup mes chères,*

***A mes frères, KHALLED, MEDJAHAD et M'HAMED ABDEL OUAFLI, je les souhaite beaucoup de succès dans leur vie,***

***A mes grandes familles parentales et maternelles***

***A tous mes amies, surtout mes chères amies NOURA, ZAHRA, FATIHA, NADJET, FAIZA, HAKIMA, SIHAM, je vous adore, et j'espère que notre amitié restera pour toujours,***

***A qui m'a soutenu dans la vie CHEBAHI SIDAHMED, merci beaucoup pour leur encouragement tout au long de la réalisation de ce travail, je te souhaite une longue vie pleine de santé et de bonheur,***

***A mes trinômes MALIKA et FATIMA qui je leurs souhaite tous le bonheur et le succès dans leur vie.***

*A tous ceux qui, par un mot, m'ont donné la fore de continuer.....*

**KHELIFA Ahlem**

## Liste des figures

<b>Figure 1</b> : Les stades de développements de <i>T.castaneum</i> .....	4
<b>Figure 2</b> : le cycle biologique de tribolium castaneum.....	5
<b>Figure 3</b> : Gélose nutritive (photo original.....)	10
<b>Figure 4</b> : Elevage de masse de <i>Tribolium castaneum</i> ).....	11
<b>Figure 5</b> : La purification de la souche bactérienne <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	11
<b>Figure 6</b> : Application du traitement biologique par la pulvérisation .....	15
<b>Figure 7</b> : observation microscopique de la souche <i>Bacillus thuringiensis</i> après la coloration de Gram (à gauche) et la coloration simple (à droite) (Obj×100) .....	18
<b>Figure 8</b> : résultat du test de catalase .....	18
<b>Figure 9</b> : résultat du test de TSI .....	19
<b>Figure 10</b> : la courbe d'étalonnage de BSA pour le calcul des concentrations bactériennes .....	20
<b>Figure 11</b> : Taux de mortalités journalières cumulées des larves L5 de <i>Tribolium castaneum</i> .....	21
<b>Figure 12</b> : Taux de mortalité observées sur les larves 7 jours après traitement.....	22
<b>Figure 13</b> : Courbe de référence exprimant la probit en fonction du logarithme décimal des doses .....	23
<b>Figure 14</b> : Mortalité des individus <i>T. castaneum</i> en fonction du temps sous l'effet de <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	24

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1</b> : la gamme d'étalonnage de BSA pour le calcul des concentrations bactériennes .....	15
<b>Tableau 2</b> : Densités optiques (DO) et concentrations décimales de <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	20
<b>Tableau 3</b> : Taux de mortalités journalières cumulées des larves L5 de <i>Tribolium castaneum</i> .....	21
<b>Tableau 4</b> : résultats observées sur les larves 7 jours après traitement .....	22

## Liste des abréviations

**BN** : Bouillon nutritif.

**BSA** : Albumine de sérum bovin.

**Bt** : *Bacillus thuringiensis*.

**D** : Dose.

**DL50** : Dose Létale pour 50% des individus.

**DO** : Densité Optique.

**G<sup>-</sup>** : Gram négative.

**G<sup>+</sup>** : Gram positive.

**GN** : Gélose nutritive.

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** : Pyroxyde d'hydrogène.

**JO** : Journal officiel. .

**L5** : Larve de cinquième stade.

**M** : Pourcentage de mortalité observée dans la population traitée.

**M.E.B** : Microscope électronique à balayage.

**MC(%)** : Pourcentage de mortalité corrigée.

**Mt** : Pourcentage de mortalité observée dans la population témoin.

**Obj** : Objectif

***T.castaneum*** : *Tribolium castaneum*.

**TL50** : Temps létal pour 50% des individus.

**TSI** : Triple sugar iron



# SOMMAIRE

Liste des tableaux

Liste des figures

Introduction générale

## Première partie : Etude bibliographique

### CHAPITRE I : Données bibliographiques sur le modèle biologique

1-Généralités sur <i>Tribolium castaneum</i> .....	3
2-Position systématique.....	3
3-Description des différents stades de <i>Tribolium castaneum</i> .....	4
3.1- Œuf .....	4
3.2- Larve.....	4
3.3-Nymphe.....	4
3.4-Adulte.....	4
4- Cycle biologique, importance économique, plantes hôtes et dégâts.....	5

### CHAPITRE II : Aperçu bibliographique sur la bactérie entomopathogène

1-Historique.....	6
2-Classification.....	6
3-Caractéristique .....	6
4-Mode d'action.....	7
5- Avantages et les inconvénients.....	8
5-1- Les avantages.....	8
5-2-Les inconvénients.....	8

## Deuxième partie : Etude expérimentale

### CHAPITRE III : Matériels et Méthodes

1-Lieu et durée de travail.....	9
2-Objectif de l'étude.....	9
3-Matériels et méthodes.....	9
1. Matériels .....	9
1.1. Matériels biologique .....	9
1.1.1. <i>Tribolium castaneum</i> .....	9
1.1.2. La bactérie entomopathogène <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	9
1.2. Milieu de culture utilisé.....	9
➤ Gélose nutritive.....	9
➤ Bouillon nutritive.....	10
2. Méthodologie.....	10
2.1. Elevage de masse de <i>Tribolium castaneum</i> .....	10
2.2. Souche bactérienne <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	11
2.2.1. Purification de la souche.....	11
2.2.2. Présentation des caractères généraux d'identification.....	12
2.2.2.1. Tests classiques d'identification .....	12
✓ Tests microscopique.....	12
➤ Coloration simple au bleu de méthylène .....	12
➤ Coloration de Gram.....	12
✓ Tests biochimiques.....	13
➤ Test de la catalase.....	13
➤ Etude de milieu TSI .....	13
2-3-Préparation du suspension bactérienne et application de traitement biologique..	14
2-3-1- Préparation de la solution mère.....	14
2-3-2- Préparation des dilutions.....	14

2-3-3- Méthode de détermination des concentrations bactériennes.....	14
➤ Préparation de la gamme d'étalonnage.....	14
2-3-4-Modèle expérimental des bioessais.....	15
2-4-Mode opératoire .....	15
2-5-Exploitation des données .....	16
2-5-1- Calcul du pourcentage de mortalité.....	16
2-5-2-Correction de mortalité.....	16
2-5-3-calcul de TL50.....	16
2-5-4-Calcul de DL50.....	17

## **CHAPITRE VI : Résultats et discussion**

### **I- Résultats.....18**

1-Résultats des tests d'identification de bactérie <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	18
❖ Tests microscopiques.....	18
❖ Test de catalase.....	18
❖ Test de TSI.....	19
2-Résultats de la détermination des concentrations bactériennes.....	20
2-1- la gamme d'étalonnage.....	20
2-2- Densité optique (DO) et concentrations des dilutions décimales de <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	20
3-Effet de mortalité sur les larves de <i>Tribolium castaneum</i> .....	21
4- Calcule de DL50.....	23
4-Effet de mortalité sur les adultes de <i>T.castaneum</i> .....	24
<b>II-Discussion.....25</b>	
<b>Conclusion.....28</b>	

**Référence.....29**

**Annexe.....34**

# INTRODUCTION

---

## Introduction

Les insectes jouent un rôle considérable dans l'équilibre biologique de la nature et l'homme les qualifie d'espèces utiles (abeilles ou ver à soie) ou nuisibles aux cultures (bio-agresseurs), forêts (chenille) ou encore à la santé tels les moustiques ou les blattes, ces espèces cosmopolites colonisent les endroits chauds et humides et particulièrement les commerces liés à la nourriture (**GRANDCOLAS, 1998**).

Les insectes ravageurs des denrées, majoritairement des Coléoptères peuvent causer la perte totale d'un stock (**NGAMO et HANCE, 2007**). Parmi ces insectes des denrées stockées dont *Tribolium Castaneum* représentent un partie très important des ravageurs de denrées stockées (**SYED SHAYFUR et al., 2007**).

Cependant ; le moyen le plus courant pour limiter ces attaques est l'usage des insecticides dont les effets indésirables sont malheureusement très nombreux (**NGAMO et HANCE, 2007**).

Afin de réduire les effets toxiques vis-à-vis du consommateur et les résidus sur les denrées stockées nous avons jugé utile de substituer les produits chimiques par un produit microbiologique représenté par une bactérie entomopathogène : *Bacillus thuringiensis*.

Notre travail sur **Toxicité d'une souche entomopathogène isolée localement de *Bacillus thuringiensis* sur un insecte ravageur** a tracé comme objectifs :

1-Evaluer la toxicité d'une bactérie entomopathogène sur *Tribolium castaneum* ravageur des denrées stockées.

2- Etude l'effet létal de la souche sur l'insecte utilisé.

3- Application et usage en lutte biologique.

La présentation de ce travail s'articule autour de deux parties :

- La première partie est une synthèse bibliographique. Elle est divisée en deux chapitres : le premier est consacré à la présentation des insectes étudiés ( *Tribolium castaneum*). le second abordera *la bactérie entomopathogène (Bacillus thuringiensis)*.

## INTRODUCTION

---

- .La deuxième partie est consacrée à l'étude expérimentale qui se subdivise en plusieurs chapitres : matériel et méthodes, résultats, discussion, conclusion, et l'annexe.

## 1-Généralités sur *Tribolium castaneum*

Le genre *Tribolium* comporte 36 espèces dont quatre sont cosmopolite (**ANGELINI et al., 2008 cité par BONNETON.,2010**). Dans ce genre on trouve : *T.cofusum* , *T.castaneum* , *T.destructor* et *T.madens* (**CALMENT et SOLDATI, 2008**).

*Tribolium castaneum* est un coléoptère qui a la capacité d'infester toutes les céréales légumineuses entreposées. Ça capacité à dérouler son cycle de développement sur divers substrats alimentaires a suscité des réflexions sur son adaptabilité morphologique (**DIA et al., 2017**).

## 2-Position systématique

Selon **BUGGUIDE (2017)**, la systématique de *T.castaneum* est la suivante :

Règne	Animalia
Embranchement	Arthropoda
Sous-embranchement	Hexapoda
Classe	Insecta
Ordre	Coleptera
Sous-ordre	polyphage
Super- famille	Tenebrionoidea
Famille	Tenebrionidea
Sous- famille	Tenebrioninea
Tribu	Triboliini
Genre	<i>Tribolium</i>
Espèce	<i>Tribolium castaneum</i> ( <b>Herbst,1797</b> )

### 3-Description des différents stades de *Tribolium castaneum*

#### 3.1-L'œuf

**GAUTAM et al., 2014**, élucident son ultra-structure, elle est de forme oblongue, ovale, lisse et de couleur blanchâtre, sa longueur est de 381,3 –710,8 µm. Son diamètre est de 290,7-324 µm. L'œuf est enveloppé dans un amas visqueux ou placenta (en anglais; choion, ce placenta est visible sous microscope électronique à balayage (M.E.B) avec grossissement supérieur à (×180).

#### 3.2-La larve

**ROBINSON., 2005**, indique que la larve est vermiforme, elle est de couleur jaune à blanchâtre, sa tête et le segment terminal sont bruns, elle mesure 8 mm de long avant la nymphose.

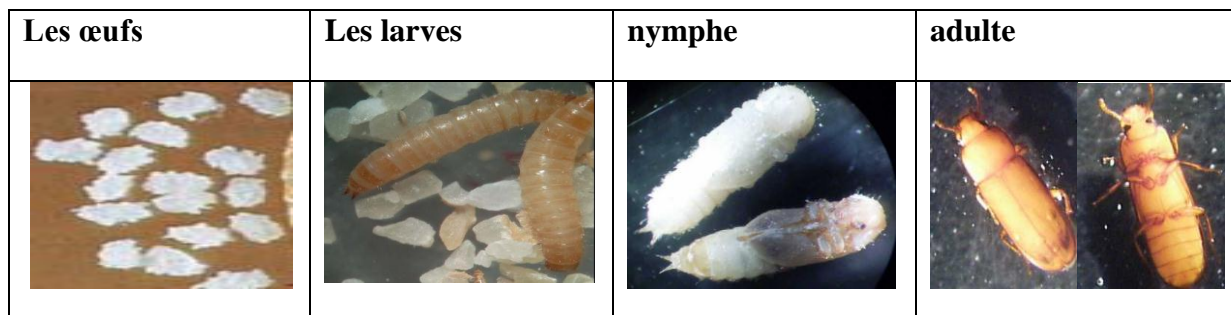
#### 3.3-Nymphe

A la fin du dernier stade larvaire, les larves s'immobilisent, cessent de se nourrir et se transforment en nymphes immobiles .Ce processus s'étend sur 3 à 9 semaines. Elles sont blanches au départ mais leur couleur s'assombrit graduellement avant de devenir adultes (**GUEYE et al., 2015**).

#### 3.4-L'adulte

L'adulte mesure de 3 à 4mm, de couleur uniformément brun rougeâtre .Il est étroit, allongé, à bord parallèles, à pronotum presque aussi large que les élytres et non rebordé antérieurement.

Les 3 derniers articles des antennes sont nettement plus gros que les suivants (**CAMARA., 2009**).



**Figure 1** : Les stades de développements de *T.castaneum*.



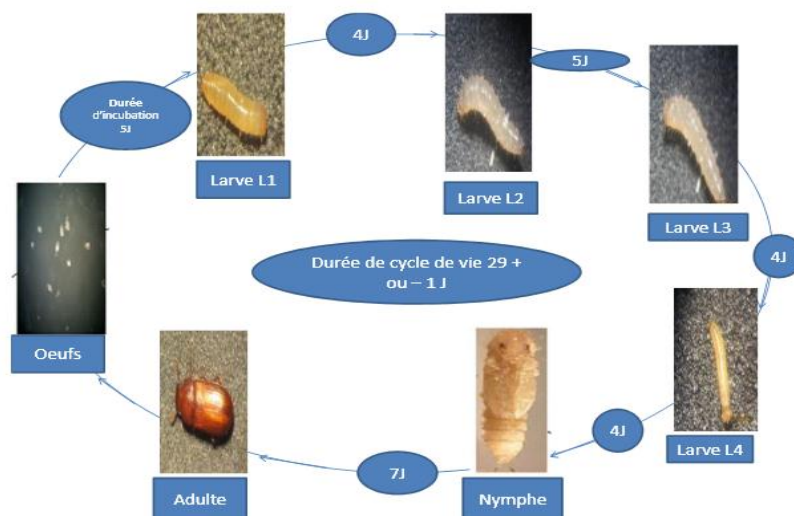
#### 4- Cycle biologique, importance économique, plantes hôtes et dégâts

Probablement originaire d'Asie du Sud, le *Tribolium castaneum* est devenue cosmopolite (DELOBEL et TRAN., 1993). La température optimale au développement de *Tribolium castaneum* est comprise entre 25 à 38 °C et de 70 % d'hygrométrie suivant les plantes hôtes infestées (TOUMNOU., 2012).

Dans la nature et selon BONNETON., 2010, cet insecte vit sous l'écorce des arbres. Le *Tribolium* rouge de la farine est un polyphage de très nombreuses denrées amylicées, surtout les farines de céréales. Il attaque les grains brisés et consomme le germe de la plupart du temps (DELOBEL et TRAN., 1993).

Dès l'âge de trois jours, la femelle pond quotidiennement une dizaine d'œufs qui, vers 30°C éclosent au bout de cinq jours. La femelle pond entre 500 à 800 œufs. Les larves circulent librement dans les denrées infestées et s'y nymphosent sans cocon. À 30°C, la vie larvaire dure à peu près trois semaines et l'adulte émerge de la nymphe six jours après sa formation. La durée du cycle dure environ un mois. La longévité de l'insecte est de 2 à 8 mois suivant les conditions abiotiques (DELOBEL et TRAN., 1993; CRUZ et al., 1988).

Son mouvement et sa dispersion dans la nature d'après CAMPBELL et HAGSTRUM., 2002, sont favorisés par plusieurs facteurs comme. Densité des insectes ; L'âge des insectes ; Qualité de nutrition ; L'héritabilité (facteurs génétique) de dispersion ; La réponse aux substances volatiles de l'alimentation et aux phéromones d'agrégation et la fitness de reproduction qui augmente les chances de colonisation.



**Figure 2 :** le cycle biologique de *tribolium castaneum*.

## 1-Historique

Le *Bacillus thuringiensis* a été découvert pour la première fois au Japon en 1902 par le bactériologiste **S. Ishiwata** dans un élevage de vers à soie (*Bombyx mori*). Il a été à nouveau isolé en 1911 en Thuringe en Allemagne à partir d'une population de teigne de la farine (*Ephestia kuhniella*) par Berliner (**ITO et al., 2004**). Il comprend l'utilisation possible de ce microbe pour lutter contre les insectes nuisibles.

Le biologiste **Ernst Berliner** redécouvre la bactérie et en donne sa première description scientifique et son nom scientifique *Bacillus thuringiensis* qui signifie «Bacille de Thuringe» (**LOUDHAIEF., 2016**).

## 2-Classification

Classification de *Bacillus thuringiensis* selon **BERGEY'S (2005)**

Règne	Bacteria
Phylum	Firmicute
Classe	Bacilli
Ordre	Bacillales
Famille	Bacillaceae
Genre	Bacillus
Espèce	<i>Bacillus thuringiensis</i>

## 3-Caractéristiques

Le bacille de Thuringe, *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), est un membre du genre *Bacillus*, une bactérie sporulante, flagellée, mobile, Gram positive et anaérobie facultative. Forme des colonies blanches, mâtes et à bord dentelée, qui se multiplie rapidement sur un milieu gélosé. Les spores de *B.thuringiensis* sont ovalaires, réfringentes ou brillantes (**LOUDHAIEF, 2016**). A l'état végétatif *B.thuringiensis* a la forme d'un bâtonnet. Dans un milieu liquide standard, la taille des bâtonnets varie entre 3 et 5 µm de longueur et 1 µm de largeur (**RAHBANI, 2015**).

L'espèce *Thuringiensis* se distingue par la production d'une ou plusieurs inclusions cristallines parasporales en phase de sporulation dont certaines ont une activité entomopathogène.

Le *Bacillus thuringiensis* (Bt) se trouve dans le sol, sur le feuillage des plantes et dans les cadavres de certains insectes (LOUDHAIEF., 2016). Au cours des dernières années, *B.thuringiensis* a également été retrouvé dans d'autres milieux tels que les boues activées (MIZUKI et al., 2001, MOHAMMEDI et al., 2006).

#### 4-Mode d'action

Les bioinsecticides *Bacillus thuringiensis* « Bt » sont utilisés principalement pour tuer les larves des insectes cibles.

Les sporanges de Bt une fois ingérés par l'insecte vont s'autolyser dans l'intestin et libérer les cristaux et les spores de Bt. Les spores vont germer et les cristaux vont être solubilisés sous l'action du pH intestinal alcalin (LOUDHAIEF., 2016).

Les toxines ainsi activées vont ensuite se fixer sur des récepteurs présents à la surface des microvillosités des cellules épithéliales de la paroi intestinale (fixation par la région C – terminal des toxines).

Après fixation sur le récepteur, la partie N-terminal des toxines va s'insérer dans la membrane cellulaire. L'oligomérisation des molécules de toxine va permettre la formation de pores qui vont interférer avec les systèmes de transport d'ions à travers la membrane cellulaire, et conduire à une modification du pH intestinal, (GRIFFITTS et ARORIAN., 2005).

Par la suite, la fixation des toxines affecteraient des voies de signalisation cellulaire cadhérine-dépendantes induisant l'apoptose des cellules (VACHON et al., 2012).

De plus, les spores sont capables de coloniser l'hémolymphe et germer induisant ainsi une septicémie pouvant être responsable de la mort de l'insecte dans les 24-72 heures qui suivent l'intoxication (RAYMOND et al., 2010; SOBERON et al., 2009)

## 5- Avantages et les inconvénients

L'utilisation des biopesticides en agriculture comporte des avantages et des inconvénients (ANONYME., 2006)

### 5-1- Les avantages

- Restreindre ou éliminer l'utilisation d'insecticides chimiques.
- Moins toxique que les pesticides chimiques.
- Diminuer les risques de développer de la résistance.
- Plus grande spécificité d'action.
- Ne prévoir aucun délai avant la récolte.
- Offrir aux consommateurs des produits sains.

### 5-2- Les inconvénients

- Lutte souvent faire en prévention et moins efficace lorsqu'elle est curative.
- Effet moins drastique que les pesticides (plus d'applications).
- Seuil de tolérance très bas pour les ravageurs.
- Activités restreinte lors d'une grande pression du ravageur.

## 1-Lieu et durée de travail

L'expérimentation a été effectuée au sein des laboratoires de microbiologie et laboratoire de biotechnologie, au niveau de la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie Université Ibn Khaldoun, Tiaret, au cours de la période allant de la fin février jusqu'à la fin du mois de mai 2019.

## 2-Objectifs de l'étude

-Evaluer la toxicité d'une bactérie entomopathogène sur un ravageur des denrées stockées *Tribolium castaneum*.

-Application et usage en lutte biologique.

## 3-Matériels et méthodes

### 1. Matériels

#### 1.1. Matériels biologique

##### 1.1.1. *Tribolium castaneum*

L'étude est effectuée sur des larves de 5<sup>ème</sup> stade de l'espèce *Tribolium castaneum*. Les individus sont issus d'un élevage en masse mené au laboratoire de biotechnologie.

##### 1.1.2. Bactérie entomopathogène *Bacillus thuringiensis*

Nous avons utilisé une souche autochtone, qui est isolée à partir d'un sol cultivé au Sahara Algérien (Adrar), cette dernière nous a été fournie gracieusement par Dr. Mohand Kaci de l'université de Boumerdes qui collabore avec notre promoteur le Pr. Bounaceur F.

#### 1.2. Milieu de culture utilisé

##### ➤ Gélose nutritive

La gélose nutritive (GN) 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.



**Figure 3 :** Gélose nutritive (photo original reprise le)

### ➤ **Bouillon nutritive**

Le bouillon nutritif (BN) constitue un milieu d'utilisation générale pour un grand nombre de microorganismes ne présentant pas d'exigences particulières. Sa formulation répond aux directives du J.O. du 8 Août 1972 pour la recherche d'un pouvoir inhibiteur intrinsèque des produits cosmétiques.

## **2. Méthodologie**

### **2.1. Elevage de masse de *Tribolium castaneum***

L'élevage de masse de *Tribolium castaneum* est réalisé dans trois bocaux en verre transparent de (16 x 7cm). Chaque bocal contient 500g de semoule (blé dur) sont utilisées comme substrat alimentaire. L'élevage des insectes se fait dans une étuve réglée à une température de 27°C et à une humidité relative de 70%.

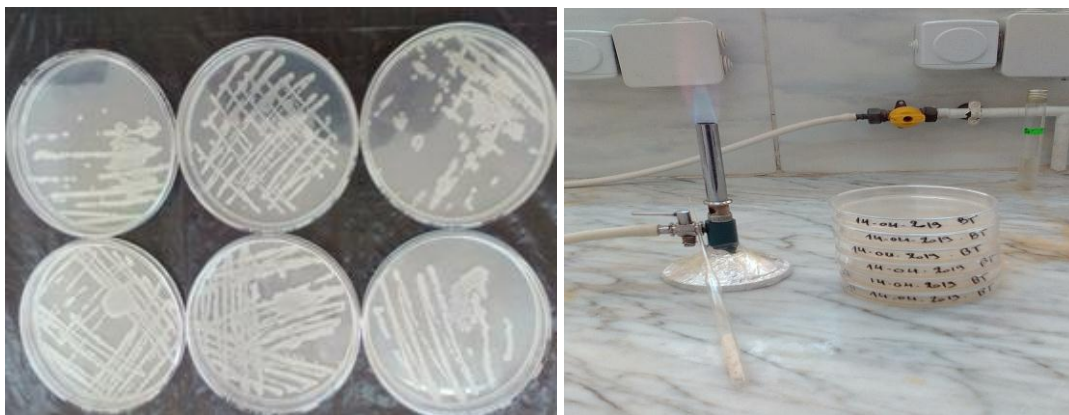


**Figure 4 :** Elevage de masse de *Tribolium castaneum* (photo original prise le)

## 2.2. Souche bactérienne *Bacillus thuringiensis*

### 2.2.1. Purification de la souche

La technique de purification consiste à ensemencer la culture bactérienne par des stries sur une gélose nutritive, afin de disperser la bactérie à la surface du milieu de culture et obtenir des colonies bien isolées, après incubation de 24h à 30°C, on effectue des repiquages successifs. La pureté de la souche est vérifiée par les tests d'identification.



**Figure 5 :** La purification de la souche bactérienne *Bacillus thuringiensis* (photo prise le )

## 2.2.2. Présentation des caractères généraux d'identification

### 2.2.2.1. Tests classiques d'identification

#### ✓ Tests microscopique

##### ➤ 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 bunsen (GUIRAUD, 1998).

##### ➤ Coloration de Gram

Selon PRESCOTT et al., (2003) et MOHAND KACI , (2012) 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 (G+) qui possèdent une paroi rudimentaire, contenant une faible proportion de lipides et Gram négatives (G-) 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 (LARPENT., 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).



**✓ Tests biochimiques****➤ Test de la catalase**

La catalase est une enzyme contenant de fer, qui catalyse la décomposition de peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 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 oxygéné. Un dégagement gazeux abondant sous forme de mousse ou de bulle d'air traduit le test positif de la catalase (**LAMBIN ET GERMAN., 1969**).



Catalase

**➤ 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' $\text{H}_2\text{S}$  (**GUIRAUD, 1998**).

## **2-3-Préparation de la suspension bactérienne et application de traitement biologique**

Afin de mettre en évidence leur pouvoir entomopathogène vis à vis du *tribolium castaneum* en a choisis la bactérie *Bacillus thuringiensis*.

### **2-3-1- Préparation de la solution mère**

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

### **2-3-2- Préparation des dilutions**

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

### **2-3-3- Méthode de détermination des concentrations bactériennes**

Pour déterminer la concentration des dilutions bactériennes utilisées dans nos traitements biologique, 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 l' albumine de sérum bovin (BSA) (GUIRAUD, 2003).

#### **➤ Préparation de la gamme d'étalonnage**

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

**Tableau 1** : Gamme d'étalonnage de BSA pour le calcul des concentrations bactériennes.

Le tableau ci -dissous exprime les résultats de gamme d'étalonnage de BSA

concentration mg/ml	0,2	0,4	0,6	0,8	1
DO (620)	0,016	0,025	0,051	0,101	0,116

Dans cette étude, On constate que la densité optique (DO) est élevée avec l'augmentation de concentration de protéine BSA.

### 2-3-4-Modèle expérimental des bios essais

Notre dispositif expérimental est constitué de 15 unités expérimentales avec cinq répétitions, à raison de 10 larves du stade L5 par unités.

### 2-4-Mode opératoire

- Préparer les doses de traitement.
- Traiter le milieu de culture à l'aide d'un pulvérisateur à main à l'exception des lots témoins qui sont traités uniquement avec de l'eau distillée stérile.
- Mettre dans chaque boîte 10 g de substrat alimentaire (le semoule).
- Les larves du stade L5 sont répartie dans 15 boites d'expérimentations à raison de 10 individus par boîte avec cinq répétitions.
- Les concentrations des doses utilisées sont D1, D2 et D3 sont respectivement (0.66mg/ml, 0.84mg/ml et 0,96mg/ml).



**Figure 6** : Application du traitement biologique par la pulvérisation (photo prise le)

## 2-5-Exploitation des données

### 2-5-1- Calcul du pourcentage de mortalité

Le pourcentage de mortalité chez les larves de *Tribolium castaneum* témoin et traité est calculé par la formule suivante :

**Mortalité observée = (Nombre d'individus morts /Nombre total des individus) × 100**

### 2-5-2-Correction de mortalité

Le nombre d'individus démontré dans une population traité par un produit toxique n'est pas le nombre réel d'individus tués par ce toxique.

La formule **D'ABBOT, 1925** permet de corriger la mortalité :

$$MC(\%) = \frac{M - Mt}{100 - Mt} \times 100$$

**MC(%) : pourcentage de mortalité corrigée**

**M : pourcentage de mortalité observée dans la population traitée**

**Mt : pourcentage de mortalité observée dans la population témoin**

### 2-5-3- Calcul des TL50

Pour calculer les TL50 (le 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. Ce ci nous permet d'obtenir des équations de droite de régression de type :

$$Y = ax + b$$

**Y** : probit de mortalité corrigée.

**X** : logarithme décimale du temps.

**a** : la pente.

**2-5-4-Calcul des DL50**

Le calcul de DL50 est fait, en utilisant la fonction suivante :  $Y = aX + b$  (d'où  $y$  : probit et  $x$  : log doses), et pour un pourcentage de mortalité de 50 %  $y = 5$  (dont probit de 50 = 5).

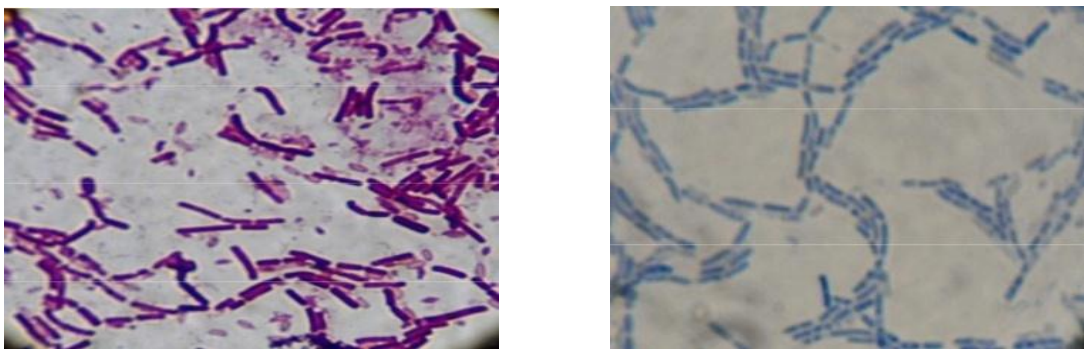
Pour évaluer les DL50 du *Bacillus thuringiensis* sur les larves, des droites de régression des probits en fonction des logarithmes des doses de traitement.

## I-Résultats

### 1-Résultats des tests d'identification de bactérie *Bacillus thuringiensis*

#### ❖ Tests microscopiques

Observation au microscope photonique des cellules après coloration à l'état frais, coloration simple au bleu de méthylène et coloration de Gram a montré que notre souche a la forme de bâtonnet long à extrémité arrondi ou carré, et sont à Gram positif.



**Figure 7 :** Observation microscopique de la souche *Bacillus thuringiensis* après la coloration de Gram (à gauche) et la coloration simple (à droite) (Obj×100) (Mohand kaci)

#### ❖ Test de catalase

Après le contact de la suspension bactérienne avec l'eau oxygéné, on a obtenue un dégagement gazeux abondant sous forme de mousse ou de bulles d'air traduit le test positif de catalase.



**Figure 8 :** Test de catalase (photo prise le).

**❖ Test de TSI**

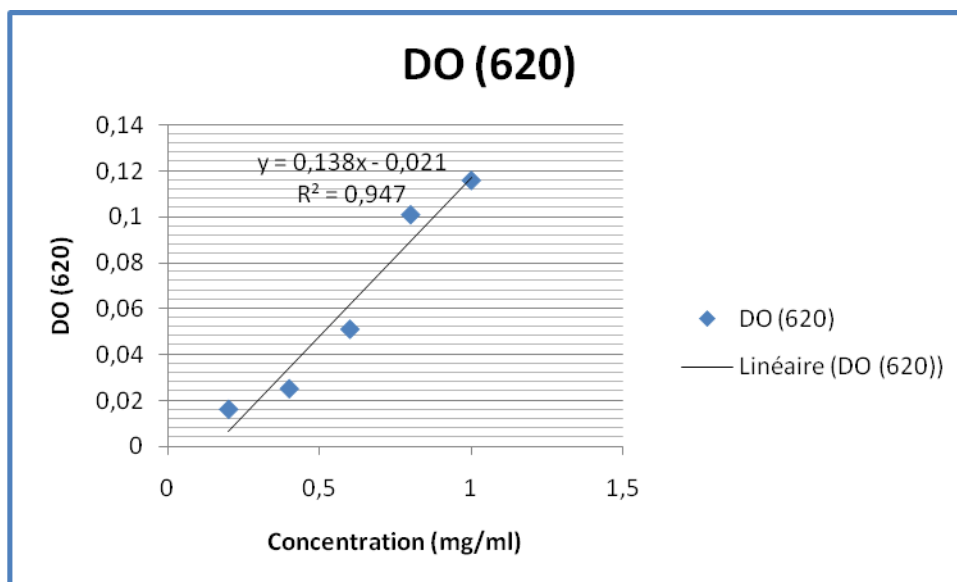
Le test TSI permet de mettre en évidence la fermentation de certains sucres avec ou sans production de gaz. Après incubation, l'apparition de la coloration jaune (pH acide) de la pente indique l'utilisation du lactose et/ou du saccharose par la bactérie *Bacillus thuringiensis* après épuisement du glucose.



**Figure 9 :** Test de TSI (photo prise le).

## 2-Résultats de la détermination des concentrations bactériennes

### 2-1- Gamme d'étalonnage



**Figure 10 :** Courbe d'étalonnage de BSA pour le calcul des concentrations bactériennes.

### 2-2- Densité optique (DO) et concentrations des dilutions décimales de *Bacillus thuringiensis*

Le tableau ci-dessous représente la densité optique et les concentrations des dilutions décimales de *Bacillus thuringiensis*, on observe que la concentration de la suspension bactérienne est diminuée avec la densité optique au fur et à mesure que la dilution est augmentée.

**Tableau 2 :** Densités optiques (DO) et concentrations des dilutions décimales de *Bacillus thuringiensis*.

Dilutions	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$
DO(620)	0,112	0,095	0,07	0,022	0,011
concentrations (mg/ml)	0,96	0,84	0,66	0,31	0,23

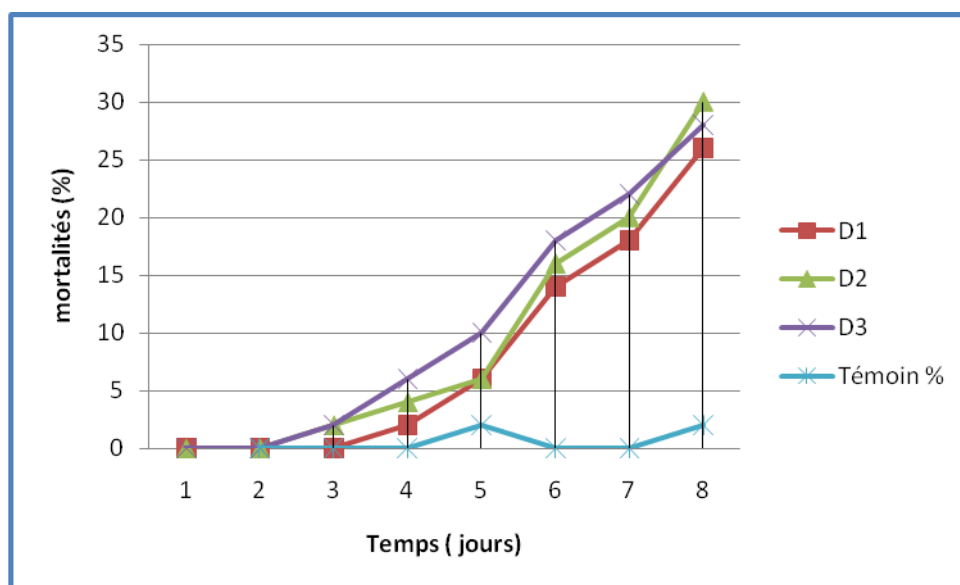


### 3- Effet de mortalité sur les larves de *Tribolium castaneum*

Les résultats des taux de mortalité journalière cumulé des larves L5, témoins et traitées par la bactérie sont résumés dans les tableaux ci-dessous :

**Tableau 3 :** Taux de mortalités journalières cumulées des larves L5 de *Tribolium castaneum*.

Doses / Jours	Doses			
	D1 %	D2 %	D3 %	Témoin %
1	0	0	0	0
2	0	2	2	0
3	2	4	6	0
4	6	6	10	2
5	14	16	18	0
6	18	20	22	0
7	26	30	28	2



**Figure 11 :** Taux de mortalités journalières cumulées des larves L5 de *Tribolium castaneum*.

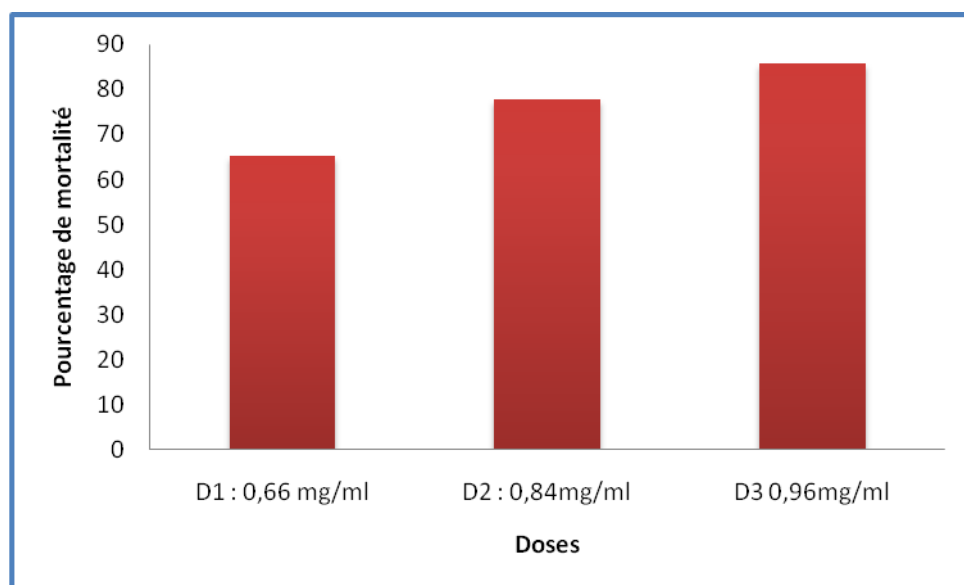
Les résultats obtenus sont consignés dans les tableaux suivants, après correction du taux de mortalité par la formule d'ABBOT (1925)

$$MC\% = \frac{M - Mt}{100 - Mt} \times 100$$

**Tableau 4 :** Résultats des tests d'exposition des larves 7 jours après traitement.

Les résultats des tests d'exposition des larves 7 jours après le traitement par la bactérie sont résumés dans les tableaux ci-dessous :

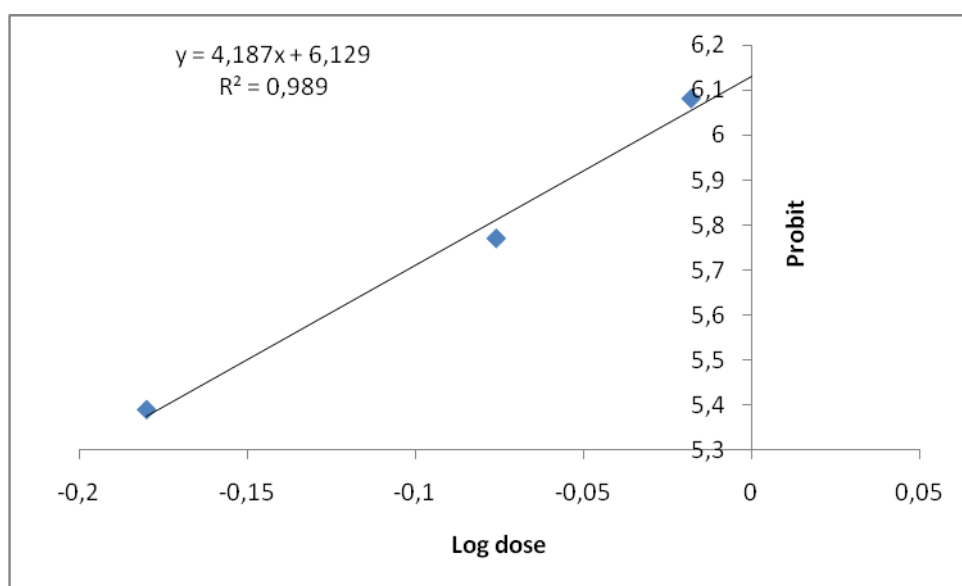
Doses	Log dose	R1	R2	R3	R4	R5	Moy	M%	MC%	Probit
D1: 0,66lg/ml	-0,18	5	8	6	5	9	6,6	66	65,3	5,39
D2 : 0,84mg/ml	-0,076	6	6	8	9	10	7,8	78	77,75	5,77
D3 : 0,96mg/ml	-0,018	8	9	7	10	9	8,6	86	85,71	6,08
Témoin		0	0	0	2	0				



**Figure 12 :** Pourcentage de mortalité observée après traitements par les trois doses.

L'action de *Bacillus thuringiensis*, sur les larves de *T. castaneum* s'exprime par un taux de mortalité observé après 48 h du traitement. Ce taux progresse au fur et à mesure que la dose augmente pour atteindre 2 % avec la D2, 2% avec la dose D3 et 2% avec la D3 observé après 72h. Après 7 jours du traitement, le taux de mortalité atteint 66 % pour la première dose D1, 78% pour la dose D2 et un taux qui de 86% pour D3 %. On note une mortalité très faible 4% est observée pour les témoins durant la période du traitement.

#### 4- Calcule de DL50



**Figure 13 :** Courbe de référence exprimant le probit en fonction du logarithme décimal des doses.

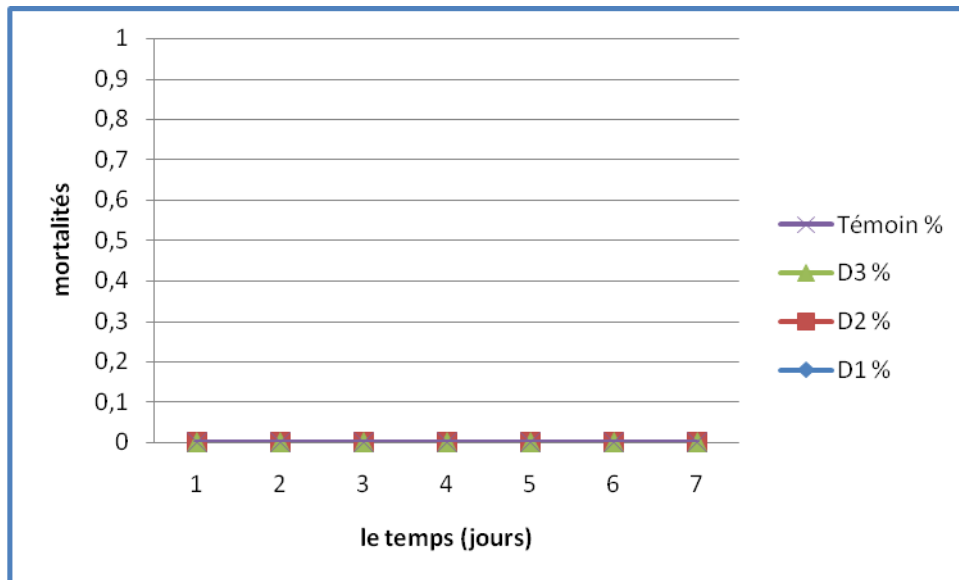
Le calcul de DL50 est fait, en utilisant la fonction suivante :  $Y = aX + b$  (d'où  $y$  : probit et  $x$  log doses), et pour un pourcentage de mortalité de 50 %  $y = 5$  (dont probit de 50 = 5).

Donc la **DL50 = 0,54 mg/ml**

**DL90 = 0,92 mg/ml**

### 5-Effet de mortalité sur les adultes de *T.castaneum*

Les doses de traitements biologiques appliqués de *Bacillus thuringiensis* n'ont aucun effet sur les adultes de *Tribolium castaneum*.



**Figure 14 :** Mortalité des individus *T. castaneum* en fonction du temps sous l'effet de *Bacillus thuringiensis*.

## II –Discussion

La toxicité d'une souche de la bactérie entomopathogène du genre *Bacillus thuringiensis* sur les larves de 5<sup>ème</sup> stade (L5) du *Tribolium castaneum* testée dans des conditions de laboratoire à différentes à raison de trois doses (0,96mg/ml, 0,84mg/ml et 0,66mg/ml) sur les larves.

Nos résultats indiquent que l'entomopathogène « *Bacillus thuringiensis* » exerce une toxicité plus ou moins importante sur les larves de l'insecte étudié avec un taux de mortalité de l'ordre de 66%, 78% et 86%. En revanche cette bactérie n'a aucun effet sur les adultes de *Tribolium castaneum*. Les essais effectués portant sur l'application de l'entomopathogène sur substrat alimentaire, pulvérisé au milieu artificiel d'élevage ayant servi à notre expérimentation montrent que les larves de *T castaneum* sont très sensibles à ses insecticides biologiques puisque les mortalités enregistrées sont supérieures à 50%. On constate que les mortalités correspondantes à la dose D3 sont supérieures à ceux de D1 et de D2.

En effet, les mortalités corrigées les plus importantes concernent les doses 3 correspondantes et ceux pour les trois produits ayant fait l'objet de notre suivi. Nos observations journalières nous ont permis de remarquer que les premières mortalités se manifestent dès le premier jour après traitement par la bactérie seule (66%, 78% et 86%) respectivement pour les doses D1, D2 et D3.

Cependant cette souche bactérienne de *Bacillus thuringiensis*, isolée localement s'est montrée assez efficace entraînant une mortalité larvaire allant jusqu'à 66% et 86% ceux-ci sont en concordance avec les résultats obtenus par (JERARAYA., 2003).

En examinant les résultats issus des traitements à base de cette bactérie, nous remarquons que les taux de mortalités observées au cours de notre expérimentation se justifient par l'ampleur et la rapidité de l'intoxication qui varient selon le stade larvaire examiné où nous observant que la mortalité de ce dernier est fortement manifestée à partir du premier jour qui suit les traitements.

L'examen des taux des mortalités corrigées causées par la souche commercialisée *Bacillus thuringiensis*, d'une grande toxicité, cependant la souche testée s'est avérée très virulente.

Nos données corroborent ceux de OUMANE., 2008, qui montre que l'utilisation d'une formulation à base de *Bacillus thuriengiensis* sur le 3<sup>ème</sup> stade larvaire de *Tribolium confusum* (Coléoptère) a provoqué une mortalité importante juste après 48 heures d'ingestion, en effet

les mortalités enregistrés s'avèrent intéressantes et ceux à partir du 2<sup>ème</sup> jours et sont de l'ordre de 14. % Pour atteindre les 100% au bout du 7<sup>ème</sup> jours.

De son coté **ABDEL RAZEK., 1998**, a utilisé des formulations à base de *Bacillus thuriengiensis var.indiana et var. morrisoni*, ces dernières se sont montrées efficaces à l'égard de *Cadra cautella* Walker et *Tribolium confusum* Duval respectivement. Par ailleurs **SAADAOUI et al., 2007**, a montré une hyper toxicité d'une souche de *Bacillus thuriengiensis var kurstaki* sur larves d'insectes ce qui lui a permis de confirmer que cette souche présente une hyperactivité contre ces dernières.

Il est évident que les traitements ont des effets sur la mortalité des larves, en particulier pour les doses les plus fortes, où les larves sont toutes décédées. D'après les mortalités remarquées au cours des essais de *Bacillus* on suppose qu'elles sont dues essentiellement à l'effet de l'ingestion des cristaux de ce biopesticide contenant l'endotoxine.

Cette hypothèse vienne d'être argumenter par les travaux d'autres auteurs en particuliers ceux de :

**FRANKANHUYZEN et al., 1992** qui singalent que le *Bacillus thuringiensis* sous espèce Kurstaki est efficace contre divers chenilles de lépidoptères nuisibles à des arbres fruitiers, aux cultures et aux forêt, elle constitue l'une des meilleurs souches sélectivement toxique pour une large gamme des larves de lépidoptères.

**GUYANCOMT et al., 1989, LECARDET et BARJAC 1981**, qui signalent que le *Bacillus thuringiensis* est très toxique pour les insectes appartenant aux ordres des lépidoptères, diptères, hyménoptères, coléoptères, orthoptères et isoptères.

Nos résultats sont comparables à ceux de **RAHIM et ZOUIOUECH., 2008** sur la purale des dattes, qui ont testés un biopesticide de la même famille à savoir le Dipel 8L, les résultats auxquels ils ont aboutit, montre une forte efficacité de cet insecticide biologique sur les larves néonates (L1).

De même **KARDI et ROUICI., 2007**, ont montrés en conditions de laboratoire, que la pulvérisation d'une suspension bactérienne issue d'une souche locale à base de *Baccillus thuriengiensis* appliquée sur le milieu de culture artificiel destiné à l'alimentation de larves néonates d'*Ectomyelois ceartoniae* Zeller provoque des pourcentages de mortalités de l'ordre de 64% chez les L3 et 40% chez les L5 d'*Ectomyelois ceartoniae* Zeller.

Par ailleurs **DHOUBI., 1993**, note que la mortalité chez ce même ravageur survient à tout les stades larvaires mais elle est très importante pour les jeunes stades et même les chenilles âgées meurent quand elle reçoivent la dose létale, la chenille atteinte au *Bacillus thuringiensis* s'arrête de s'alimenter suite à une perturbation métabolique provoquant alors un rétrécissement du corps de la larves ainsi cette bactérie présente l'avantage d'être compatible avec les auxiliaires et les autres agents biologiques, d'autres part il remarque que la Bactospeine ne présente aucun effet de choc contre *Ectomyelois ceratoniae*.

Les résultats obtenus ont montré que des souches telluriques marocaines de *Bacillus thuringiensis* présentent une activité insecticide importante qui peut atteindre 100% chez l'adulte et 84,43% chez les larves de *Ceratitis capitata* (**ABOUSSAID et al., 2007**)

L'efficacité d'un tel procédé peut être lié au mode d'application ou la pulvérisation du produit sur le substrat alimentaire, nous pensons que seule les parties imbibées ont retenue les spores entomopathogènes, ainsi les larves qui ne sont pas intoxiquées les premiers jours du traitements, ont ingérés une partie du substrat alimentaire qui ne renfermais pas de spores, ceux -ci est comparable avec les travaux de (**SCALO et al ., 1997**) qui ont montré que le taux de mortalité est en relation avec le mode d'application , ainsi ils observent que sur des grappes pulvérisés des taux de mortalité moins importants par rapport à des grappes complètement trempées, et ceux-ci pour les tordeuses de la grappe, lépidoptère proche de notre insecte.

**CHARLES et CODERRE., 1992**, signalent que la toxine *thuringiensis* produit plusieurs effets importants, parmi lesquels la mort des larves avant la mue et la cessation de toute alimentation après la mue, des doses sub-létales produisent généralement des effets tératologiques incluant des malformations des parties buccales, des yeux, des antennes et des ailes.

## CONCLUSION

---

A la lumière des résultats obtenus lors de cette expérimentation nous pouvons retenir que ;  
La souche *Bacillus thuringiensis* utilisée a montrée une toxicité insecticide en relation dose réponse temps pour les larves de *Tribolium castaneum*. Nous avons enregistré des taux de mortalités de l'ordre de 66%, 78% et 86% respectivement après 7 jours d'exposition aux traitements.

Compte tenu des moyens à bord, nous nous sommes limités au seul test de toxicité vu le temps très court accordé à l'expérimentation.

Cependant l'impact biologique de la souche bactérienne *Bacillus thuringiensis* a été évalué sur les larves de *Tribolium castaneum* afin de valoriser son efficacité entomopathogène dans le but testée son effet toxique contre un insecte ravageur sur denrées entreposées a été démontré.

En perspectives il nous paraît intéressant d'élargir ce travail sur d'autres aspects chez l'insecte comme l'effet des doses létales sur les paramètres de reproduction chez ce dernier.

Il est également souhaitable d'étudier la toxicité d'autres souches bactériennes d'entomopathogènes, en vue d'optimiser une lutte biologique raisonnée et d'en préserver l'entomofaune utile d'un aspect, et étudier la rémanence de ces produits qui sont directement consommés, en vue de préserver la santé des consommateurs dans le cadre d'une agriculture durable et d'étudier de façon approfondie le mécanisme d'action de ces bactéries au niveau de l'insecte.



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- ABDEL RAZAK A., 1998.** Biological efficacy of some commercial and isolated varieties of *Bacillus thuringiensis* on the development of stored crushed corn. IOBC. Bulletin, Vol 21 (3), pp : 67-74.
- ABOT W.B., 1925.** A method for computing the effectiveness of an insecticide. J. Econ.Ent. 18: 256-267.
- ABOUSSAID H. ; OUFDOU K. ; et EL MESSOUSSI S., 2007.** *Biodiversité végétale : Rôle de Bacillus thuringiensis dans la protection de la forêt d'arganier contre la mouche méditerranéenne : Ceratitis capitata (Wied).* IV èmes Journées Nationales de Biodiversité. Tétouan, Maroc. 26-27 ,Octobre 2007. pp : 14.
- ANGELINI D.R., KIKUCHI M., JOCKUSCH E.L., 2008.** Genetic patterning in the adult capitata antenna of the beetle *Tribolium castaneum*. Developmental Biology 327(2009) :240-251.
- ANONYME., 2006.** Recherche et développement de biopesticides et pesticides naturels à faible toxicité pour les organismes non ciblés et respectueux de l'environnement.
- BERGY'S M., 2005.** Bergey's Manuel of Systematic Bacteriology, deuxième édition.
- BONNETON F., 2010.** Quand *Tribolium* complémente la génétique de la drosophile. Médicinales / science, 26 :297-303.
- CALMONT B., et SOLDATI F., 2008.** Découverte de *Tribolium madens* (charpentier, 1825) dans le département du Puy-de-Dôme (France) ; clé de détermination et distribution des espèces du genre *Tribolium* en France. ResearchGate. T.XVII (2) : 1-8.
- CAMARA A., 2009.** Lutte contre *Sitophilus oryzae* L (Coleptera : Curculionidae) et *Tribolium castaneum* Herbst (coleptera : Tenebrionidae) dans les stocks de riz par la technique d'étuvage traditionnelle pratiquée en Basse-Guinée et l'utilisation des huiles essentielles végétales Thèse de doctorat : sciences de l'environnement. Montréal : Université du Québec à Montréal. p154.
- CAMPBELL J.F., HAGSTRUM D.W., 2002.** Patch exploitation by *Tribolium castaneum*: movement patterns, distribution, and oviposition . Journal of Stored Products Research, 38 (2002): 55-68.
- CHARLES V., et CODERRE D., 1992.** La lutte biologique. Ed: I.N.R.A, 671P.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- CRUZ J. F., TRONDE F., GRIFFON D. et HEBER J.P., 1988.** Conservation des grains en régions chaudes « techniques rurale en Afrique, 2ed, Ministère de la coopération et du développement, Paris France, 545p.
- DELOBEL A., et TRAN M., 1993.** Les Coléoptères des denrées alimentaires entreposées dans les régions chaudes, ORSTOM, Paris.
- DIA., ADIOUMA G. R., KAFOM A ., DIOME T., NGOM D., THIAW C ., NDIAYE S., SEMBENE M., 2017.** Identification morphométrique des populations de *Tribolium castaneum* Herbst (Coleoptera, Tenebrionidae) inféodées à trois céréales à Widou Thiengoli, Journal of Applied Biosciences 119: 11929-11942.
- DHOUBI M.H., et JAMMAZI A., 1993.** Lutte biologique contre la pyrale des caroubes *Ectomyelois ceratoniae* Zeller (Lepidoptera ,pyralidae) par (*Habrobracon hebetor*) (Hymenoptera, Braconidae) en verger de grenadier. Fac. Landbouww. Univ. 1993.
- FRANKANHUYZEN R., MILNE R., BROUSSAE O., et MASSON L., 1992.** Comparative toxicity of the HD1 and NRD12 strains of defoliating forest lepidoptera. J. invertebr. Pathol, 59, pp : 149 -159.
- GAUTAM, S. G., OPIT, G., et al., 2014.** Comparative Egg Morphology and Chirionic Ultrastructure of Key Stored-Product Insect Pests. Annals of the Entomological Society of America, 108(01). 44-56.
- GRANDCOLAS P., 1998.** The evolutionary interplay of social behaviour, resource use and antipredator behavior in Zetoborinae, Blaberinae, Gyninae and Diplopterinae cockroaches: a phylogenetic analysis. Cladistics, 14: 117-127p.
- GRIFFITTS and ARORIAN., 2005.** Many roads to resistance : how invertebrates adapt to Bt toxins. BioEssay27, pp :614-624.
- GUEYE M.T., SECKD., WATHELET J.P., &LOGNAY G., 2001.** Lutte contre le Ravageurs des stocks de céréales et de légumineux au Sénégal et en Afrique occidentales : synthèse bibliographique. Biotechnologie.
- GUEYE A.C., DIOME T., THIAW C., SEMBENE M., 2015.** Évolution des paramètres biodémographiques des populations de *Tribolium castaneum* H. (Coleoptera, Tenebrionidae)

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

inféodé dans le mil (*Pennisetum glaucum* Leek) et le maïs (*Zea mays* L.), *Journal of Applied Biosciences* 90:8355–8360.

**GUIRAUD J.P., 1998.** Microbiologie alimentaire. Ed. Dunod, 652p.

**GUIRAUD J.P., 2003.** Microbiologie alimentaire; Application à l'étude des principaux groupes microbiens. Ed. DUNOD, 651p.

**ITO A, SASAGURI Y., KITADA S., KUSAKA Y., KUWANO K., MASUTOMI K., MIZUKI E., AKAO T., OHBA M., 2001.** Selective cytotoxic action of a crystal protein of *Bacillus thuringiensis* on human cancer cells. *J. Biol. Chem.* 279, 21282-6.

**JERRAYA A., 2003.** Principaux nuisibles des plantes et des denrées stockées en Afrique du nord (Leurs biologie, leurs ennemis naturels, leurs dégâts et leurs contrôles). Ed. Climat PUB. TUNIS. 415p.

**KADRI K., ET ROUICI M., 2007.** Contribution à l'étude de l'efficacité de deux souches entomopathogènes (*Bacillus thuringiensis* et *Beauveria bassiana*) sur les larves de la pyrale des dattes *Ectomyelois ceratoniae* Zeller, (*Lepidoptera, pyralidae*) aux conditions contrôlées. Mémoire Ing. Inst. Agro. Biskra, 60 p.

**LAMBIN S. et GERMAN A., 1969.** Précis de microbiologie. Ed. Masson et Cie, 668 p.

**LARPENT J.P., 1997.** Microbiologie Alimentaire, Techniques de laboratoire. 3ème Edition, 1073p.

**LOUDHAIEF R., 2016.** Effets des bioinsecticides à base de *Bacillus thuringiensis* sur la physiologie intestinale de la Drosophile Thèse de doctorat : science de la vie (aspect moléculaires et cellulaires de la biologie) Université Nice Sophia Antipolis UFR Science. 195.

**MIZUKI E., MAEDA M., TANAKA R., LEE D.W., HARA M., AKAO T., YAMASHITA S., KIM H.S., ICHIMATSU T., and OHBA M., 2001.** *Bacillus thuringiensis*: a common member of microflora in activated sludges of a wastewater treatment plant. *Curr. Microbiol.* 42: 422-425.

**MOHAMMEDI S., Bala SUBRAMANIAN S., YAN S., TYAGI R.D., and VALERO J.R., 2006.** Molecular screening of *Bacillus thuringiensis* strains from wastewater sludge for biopesticide production. *Process Biochemistry* 41: 829-835.

**NGAMO L.S.T., HANCE Th., 2007.** Diversité des ravageurs des denrées et méthodes alternatives de lutte en milieu tropical. *Tropiculture*, 25(4) :215-220p.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

**OUAMANE W., 2008.** contribution a l essai d'une lutte intégrée contre *Tribolium castaneum* ravageurs des denrées stockées. Mémoire Ingénieur Agronome Université de Biskra 75p.

**PRESCOTT et al., 2003** dans la thèse de **MOHAND KACI ., 2012**, Evaluation de l'impact biologique de quelques souches locales de *Bacillus* sp. et *Pseudomonas* spp. fluorescents vis à vis du criquet migrateur *Locusta migratoria cinerascens* (Orthoptera: Acrididae) 187p.

**PREVOT A. R., 1977.** Bactériologie, notion élémentaire. Ed. Presses universitaires de France, 218 p.

**RAHBANI J., 2015.** Optimisation, étude de la cinétique et dimensionnement de la production des biopesticides à base de souches de *Bacillus thuringiensis* isolées du sol libanais. Thèse de doctorat : Génie des procédés et de l'environnement. Université de TOULOUS.177.

**RAHIM F-Z. ET ZOUIOUECH F-Z., 2008.** Etude de quelques aspects bioécologiques de la pyrale des dattes *Ectomyelois ceratoniae* Zeller, (*Lepidoptera, pyralidae*) et aussi d'une lutte biologique par le *Bacillus thuringiensis var Kurstaki* dans la région de Biskra. Mémoire Ing. Inst. Agro. Biskra, 100 p.

**RAYMOND B., JOHNSTON P.R., NIELSEN-LEROUX C., LERECLUS D., AND CRICKMORE N., 2010.** *Bacillus thuringiensis*: an impotent pathogen? Trends Microbiol. 18, 189–194.

**ROBINSON W. H., 2005.** Urban Insects and Arachids : A Handbook of Urban Entomology. Cambridge : Cambridge University press. 472p.

**SAADAoui I; ROUIS S.; BOUKHRIS M.; KARRAY M.; JAOUA S., 2007.** Caractérisation d'une souche de *Bacillus thuringiensis* hypertoxique contre larves de lépidoptères *Ephestia kueniella*. 2<sup>ème</sup> Journée Scientifiques de la Société Tunisienne de Microbiologie. Monastir du 17 au 20 Décembre 2007.

**SCALLO P., CHARMILLOT D., PASQUI .R ., 1997.** Comparaison de produits à base de *Bacillus thuringiensis* dans la lutte contre vers de la grappe : du laboratoire vignoble, pp : 345 349.

**SINGLETON P., 2005.** Bactériologie pour la médecine, la biologie et la biotechnologie. Ed. Dunod, Paris, 541 p.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

**SOBERON M., GILL S.S., AND BRAVO A., 2009.** Review Signaling versus punching hole : How do *Bacillus thuringiensis* toxins kill insect midgut cells ? 66, 1337–1349.

**SYED SHAYFUR R., M d. MIZANUS R., MOHAMMAD, MIZANUR R.K., SHAMEEN A.B. ,BA LARAM R. and FAKRUDDIN SHAHED S.M., 2007.** Ethanolic extract of melgona (*Sitophilus oryzae*) African Journal of Biotechnology 6(4) : 379-383p.

**TOUMMNOU L. A., 2012.** Gestion intégrée des principaux insectes ravageurs des céréales par l'utilisation des métabolites secondaires des plantes indigènes du Sénégal et de Centrafrique. Thèse de doctorat : science de la nature et de la vie, de la santé et de l'environnement : université CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR.332p.

**VACHON V., LAPRADE R., AND SCHWARTZ J.L., 2012.** Current models of the mode of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: A critical review. J. Invertebr. Pathol. 111, 1–12.

# 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.

## **Annexe 2 :**

### **BSA :**

L'albumine de sérum bovin ou, est une protéine extraite du sérum de bovin largement utilisée en laboratoire de biologie. Cette albumine peut être utilisée comme agent diluant ou bloquant dans de nombreuses manipulations telles que l'ELISA, l'immunohistochimie et le Western blot.

## ANNEXE

---

### Annexe 3 :



**Figure 1 :** préparation de gélose nutritive



**Figure 2 :** l'étuve utilisée pour l'élevage de l'insect.



**Figure 3 :** bacillus thuringiensis.

## ANNEXE



**Figure 4 :** l'ensemencement de la souche bactérienne (*Bacillus thuringiensis*).



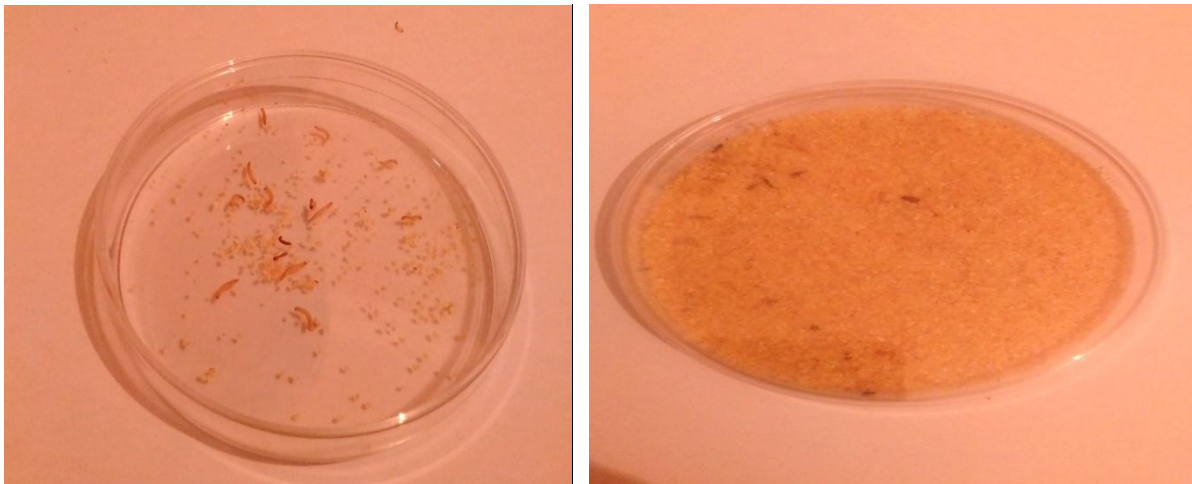
**Figure 5 :** test de TSI avant et après l'ensemencement.



## ANNEXE



**Figure 6 :** l'élevage de l'insecte (*Tribolium castaneum*).



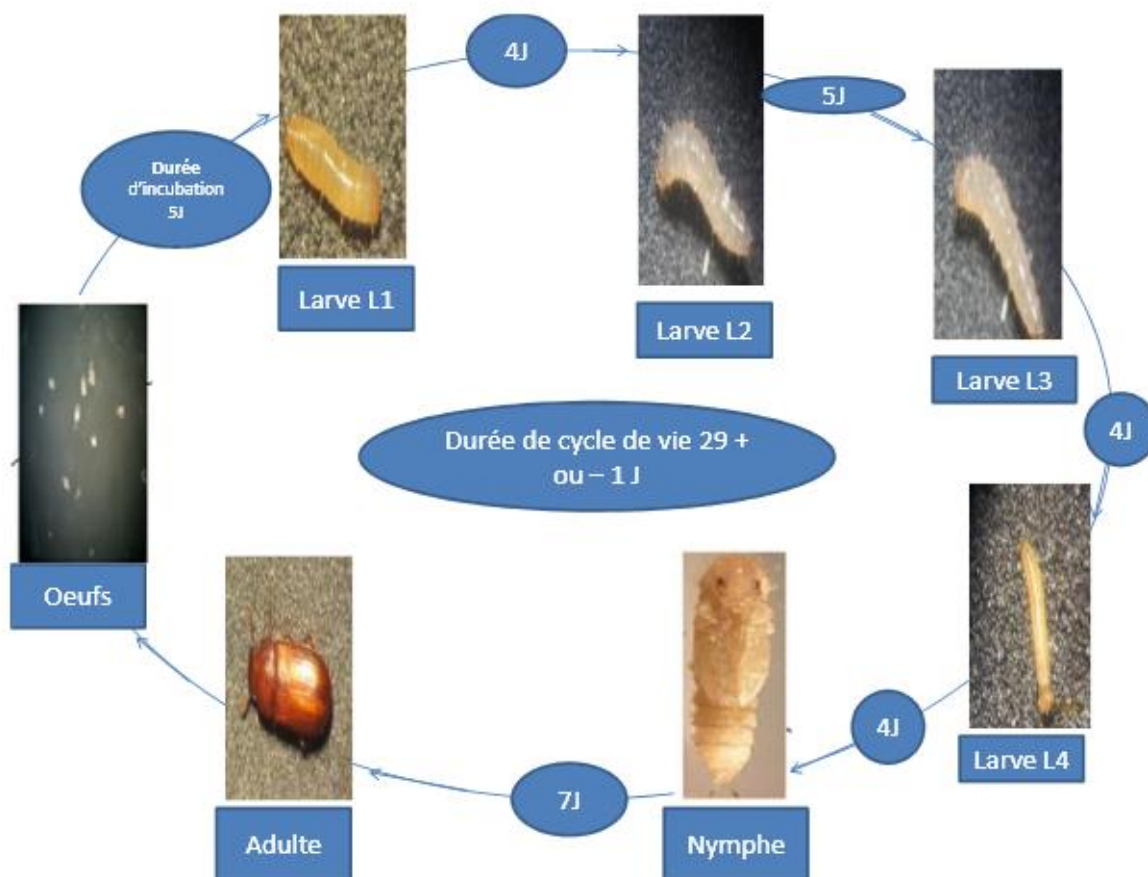
**Figure 7 :** les larves de *Tribolium castaneum*.

## ANNEXE



Figure 8 : pulvérisation de la souche.

### Annexe 4 :



Le cycle biologique de *Tribolium castaneum*

## Résumé :

Toxicité d'une souche entomopathogène isolée localement de *Bacillus thuringiensis* sur un insecte ravageur.

Cette étude a été réalisée au niveau des laboratoires de microbiologie et de biotechnologie de la faculté des Sciences de la Nature et de la vie de l'université Ibn Khaldoun de Tiaret. Elle avait comme objectifs Evaluer la toxicité d'une bactérie entomopathogène « *Bacillus thuriengiensis* » sur un ravageur des denrées stockées *Tribolium castaneum*, étude l'effet létal de l'insecticide utilisé sur les larves.

Notre expérimentation est basée sur l'utilisation d'une souche de la bactérie entomopathogène du genre *Bacillus thuringiensis* sur les larves de 5<sup>ème</sup> stade (L5) du *Tribolium castaneum* testée dans des conditions de laboratoire à différentes à raison de trois doses (0,66g/ml, 0,84mg/ml et 0,96mg/ml) sur les larves.

Nos résultats indiquent que l'entomopathogène « *Bacillus thuringiensis* » exerce une toxicité plus ou moins importante sur les larves de l'insecte étudié avec un taux de mortalité de l'ordre de 66%, 78% et 86% respectivement. En revanche cette bactérie n'a aucun effet sur les adultes de *Tribolium castaneum*.

**Mots clés :** Toxicité, *Bacillus thuringiensis*, *Tribolium castaneum*, les larves, entomopathogène.

## Abstract

Toxicity of an entomopathogenic strain isolated locally from *Bacillus thuringiensis* on a pest insect.

This study was carried out at the level of the microbiology and biotechnology laboratories of the Faculty of Nature and Life Sciences of Ibn Khaldoun University of Tiaret. Its objectives were to evaluate the toxicity of an entomopathogenic bacterium "*Bacillus thuriengiensis*" on a pest of stored products *Tribolium castaneum*, study the lethal effect of the insecticide used on the larvae.

Our experiment is based on the use of a strain of the entomopathogenic bacterium of the genus *Bacillus thuringiensis* on 5th instar larvae (L5) of *Tribolium castaneum* tested under laboratory conditions at different doses (0.66mg / ml, 0.84mg / ml and 0.96mg / ml) on the larvae.

Our results indicate that the entomopathogenic "*Bacillus thuringiensis*" exerts a more or less significant toxicity on the larvae of the studied insect with a mortality rate of the order of 66%, 78% and 86% respectively. On the other hand this bacterium has no effect on adults of *Tribolium castaneum*.

**Key words:** Toxicity, *Bacillus thuringiensis*, *Tribolium castaneum*, larvae, entomopathogen.

## ملخص :

سمية سلالة بكتيرية معزولة محليا من *Bacillus thuringiensis* على الافات الحشرية وقد اجريت هذه الدراسة في مخبر علم الاحياء الدقيقة و مخبر التكنولوجيا

الحيوية في كلية علوم الطبيعة و الحياة جامعة ابن خلدون تيارت . بهدف تقييم سمية بكتيريا *Bacillus thuriengiensis* على *Tribolium castaneum* الموجودة في المواد

الغذائية المخزنة وتأثيرها القاتل على اليرقات وتُستند تجربتنا على استخدام سلالة من البكتيريا من جنس بكتيريا « *Bacillus thuriengiensis* » Entomopathogène على يرقات

المرحلة الخامسة ل5 من *Tribolium castaneum* واختبارها في ظروف المخبر بثلاث جرعات مختلفة (0.66 مع/ مل - 0.84 مع/ مل، 0.96 مع/ مل) على اليرقات

وتشير النتائج التي توصلنا اليها ان *Bacillus thuringiensis* لديه سمية اكثر او اقل على يرقات الحشرات مع معدل وفيات يتراوح

ما بين 66%، 78%، 86% على التوالي لكن هذه البكتيريا ليس لها تأثير على الحشرة البالغة.

الكلمات المفتاحية : سمية، اليرقات، *Bacillus thuringiensis*, *Tribolium castaneum*.