

ÉLEVAGE PERMANENT
D'*ATHALIA COLIBRI* (CHRIST)
(TENTHREDINIDÆ)
EN VUE DE TESTER LA TOXINE SOLUBLE
THERMOSTABLE DE *BACILLUS THURINGIENSIS*

par J. E. LAURENT

De nombreux auteurs (GRISON 1956, TANADA 1959, HURPIN 1960) ont déjà souligné l'importance que doit prendre l'élevage d'insectes dans l'utilisation des méthodes biologiques pour lutter contre les ennemis des cultures : étude et multiplication de certains germes entomopathogènes (virus, bactéries, champignons notamment) ou d'insectes entomophages.

Tous ces travaux nécessitent la fourniture d'un certain nombre d'insectes phytophages.

Bien que l'élevage ait toujours fait partie de techniques utilisées en Entomologie agricole pour l'étude d'un insecte, ce procédé doit faire l'objet de mises au point très poussées pour répondre aux besoins qualitatifs et quantitatifs des expérimentateurs.

L'aménagement d'un insectarium est une nécessité pour les recherches d'Entomologie agricole modernes.

La réalisation d'élevages permanents astreint à connaître le cycle de développement de chaque espèce. Les chambres climatisées de l'insectarium permettent d'assurer la température optimale pour chaque espèce. La température des diverses chambres est de 30°, 25°, 20°, 15° et 5° et suivant les besoins éventuels, il est possible d'accélérer le développement ou de le retarder.

Certaines recherches du laboratoire consistent à étudier les deux toxines de *Bacillus thuringiensis* (BUGERGEON et MARTOURET).

1) La toxine cristalline.

Les cristaux spores sont formés pendant la sporulation et sont spécifiques de certains Lépidoptères. Pour les recherches sur la toxine cristalline, il est nécessaire de faire des élevages de *Pieris brassicae* qui est l'insecte test étalon assez facile à élever et qui permet de connaître l'activité de diverses souches de *B. thuringiensis*. Pour élever cet insecte, il est indispensable d'avoir du chou en bon état de fraîcheur. La méthode consiste à induire la diapause pendant la belle saison et d'en lever les effets suivant les besoins. A la température de 20°, l'obscurité étant permanente où avec une photopériode de 16 heures, le développement se fait sans diapause, mais avec une photopériode de 12 heures, les chrysalides subissent une diapause. La réactivation de ces chrysalides nécessite un traitement au froid (+ 5°) de 85 jours. Connaissant le cycle des insectes en toutes conditions, un tableau permet de connaître la situation des élevages et de prévoir les besoins futurs, ce qui autorise à accélérer ou retarder le développement en se fondant sur le facteur température.

L'ingestion du cristal provoque l'intoxication de certains Lépidoptères parmi lesquels se trouve *Pieris brassicae*. Un arrêt partiel de l'alimentation qui correspond à une paralysie du complexe buccal et du tube digestif, la quantité de feuillage ingéré est inversement proportionnelle à la toxicité de la souche de *Bacillus thuringiensis* éprouvée. Ce phénomène est à rapporter à une unité toxicologique du *P. brassicae*.

2) La toxine soluble.

Elle est moins spécifique que celle des cristaux spores qui, après centrifugation, restent dans le culot, tandis que la toxine thermo stable reste dans le filtrat. Les Lépidoptères noctuides qui ne sont pas sensibles aux cristaux spores paraissent réagir à celle-ci. L'action de cette toxine est beaucoup plus lente et se manifeste au moment des mues sans arrêt alimentaire. Elle paraît également plus forte. Les chenilles de *Mamestra brassicae* permettent l'étude comparative des 2 toxines du culot et du surnageant.

Etant sensibles aux deux toxines, *Mamestra* est élevée avec du plantin au jeune stade et du chou plus âgé. La souche du *Bacillus thuringiensis*

Berliner, variété *thuringiensis*, émet seule une quantité notable de toxines thermo-stable ; les autres en ont des quantités négligeables. Beaucoup d'insectes y sont sensibles (Acridiens, coléoptères, chrysomèles, diptères).

Données bibliographiques sur *Athalia rosae*.

Certains auteurs ont effectué des études sur cet Hyménoptère *Tenthrenididae Athalia rosae* L. synonymes d'*Athalia colibri* (Christ.), et d'*Athalia spinarum*. En Allemagne, RIGGERT (1939), MAYER (1933), en Italie, MARTELLI (1959), en Hongrie, SARINGER (1954-1956).

Athalia rosae a été observé pour la première fois comme ravageur en Angleterre, dans le Sud-Est, en 1920. Des gradations parfois importantes apparaissent dans plusieurs pays d'Europe et d'Asie paléarctique, jusqu'en Corée. Des dégâts irréguliers ont été signalés en Allemagne, en Russie, en Autriche, au Danemark, en Finlande, en Hongrie, en Mandchourie, en Silésie et en Suisse.

La ponte s'effectue sur crucifères : moutarde sauvage (*Sinapis arvensis*), moutarde blanche (*Sinapis alba*), qui est cultivée comme engrais vert, et le *Thlaspi arvensis*, qui peut indiquer la répartition de l'espèce dans une région, le navet (*Brassica napus*) est plus apprécié que le chou rave (*Brassica rapa esculenta*). La femelle utilise son ovipositeur en forme de scie pour mettre les œufs entre les deux épidermes de la feuille et préfère les feuilles tendres (79 %) que les feuilles dures (21 %).

La larve d'*Athalia* accepte toutes sortes de plantes pour son alimentation et la durée du développement n'est pas influencée. Les plantes peuvent appartenir à différentes familles : Ombellifères, Chenopodiacées (betterave en Silésie), Solanacées, Rosacées, (roses en Hollande). Dans la nature, les larves migrent d'un champ à l'autre, lorsque le feuillage d'un champ est absorbé. Les femelles subissent quatre mues pour leur développement et ont cinq stades, l'alimentation se terminant quelque temps avant la fin du dernier stade.

Les mâles n'ont que trois mues, quelques mues supplémentaires apparaissent sur 202 chenilles, 50 % ont eu 5 stades alimentaires à la température de 16° et de 28°. Dans les températures intermédiaires, il n'y a que 4 stades seulement (RIGGERT).

A la fin de son développement, la larve tisse un cocon et s'enterre à 5 cm du sol ; à 10 cm de la surface, il n'y a aucun cocon.

Le cocon semble donner une protection toute relative vis-à-vis des facteurs climatiques.

Athalia compte parmi les espèces écologiquement indépendantes dont le développement à n'importe quelle saison, s'achève avec les températures favorables.

La diapause n'est pas en rapport avec le nombre de générations.

Ce sont des facteurs abiotiques qui permettent d'induire artificiellement une diapause.

FUNCS et MAYER ont constaté que la sécheresse et une forte chaleur augmentent le nombre de larves qui subissent la diapause. Mais, pour que les adultes soient viables, une certaine humidité doit exister. Une humidité relative de 70 % est la plus favorable, comme l'avait prévu RIGGERT avec ses expériences de laboratoires. Dans la nature, le sol et la pluie permettent d'atteindre ces conditions.

Certains auteurs voulaient utiliser le Diptère Tachynaire *Maignia mutabilis* Fall pour la lutte biologique. Il se rencontre en Allemagne, en France et en Italie.

Travaux personnels.

La souche que nous avons étudiée venait d'Antibes. Nous avons reçu de jeunes larves du 1^{er} et 2^e stade, placées sur des feuilles de navette, dans des beurriers en matière plastique.

L'humidité était produite par une feuille de papier filtre légèrement mouillée, introduite au fond de la boîte. Après avoir essayé différentes méthodes, nous nous sommes aperçus que dans un élevage on rencontre toujours au bout d'un certain temps, des larves, à des stades très différents à cause des facteurs individuels, malgré leur milieu homogène. Cette inhomogénéité nous a conduits à tenter des élevages isolés à partir de larves venant d'éclore, afin de connaître avec précision le développement de cet insecte.

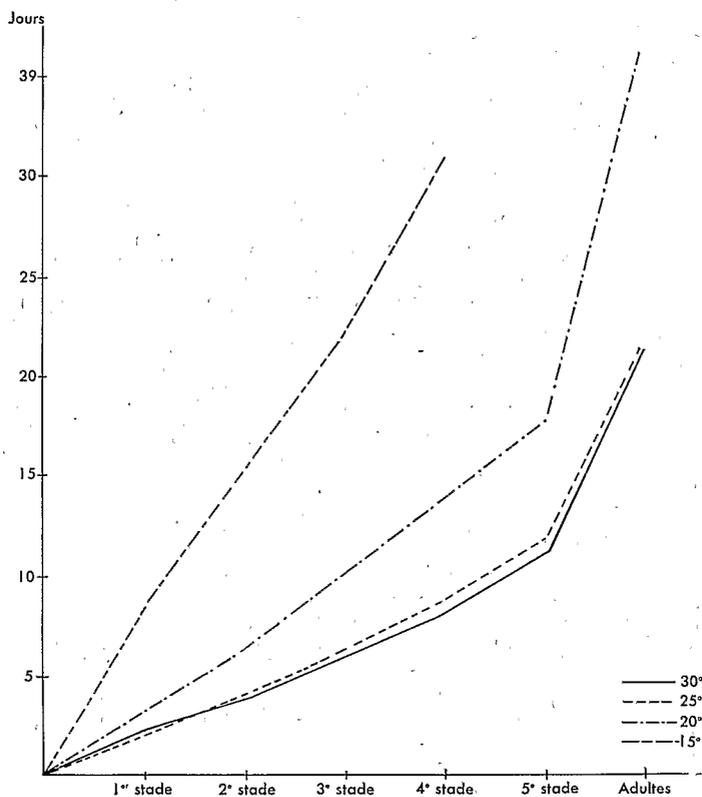
La méthode actuellement employée consiste en l'élevage en petites boîtes rondes en matière plastique d'un volume de 58 cm³, non aérées et garnies d'un papier filtre humide. Les essais en boîtes aérées n'ont pas été concluants, un dessèchement rapide intervenant alors.

La jeune larve est donc placée sur une feuille de chou tendre forcé en chambre climatisée. Comme l'ont constaté différents auteurs, la larve ne peut se nourrir sur des feuilles trop coriaces : nous-mêmes avons constaté dans ces conditions un déchet de 50 % par dessiccation.

Nous avons mis des lots de 10, puis de 15 larves du 1^{er} stade, dans des chambres climatisées à diverses températures : 15°, 20°, 25° et 30° C.

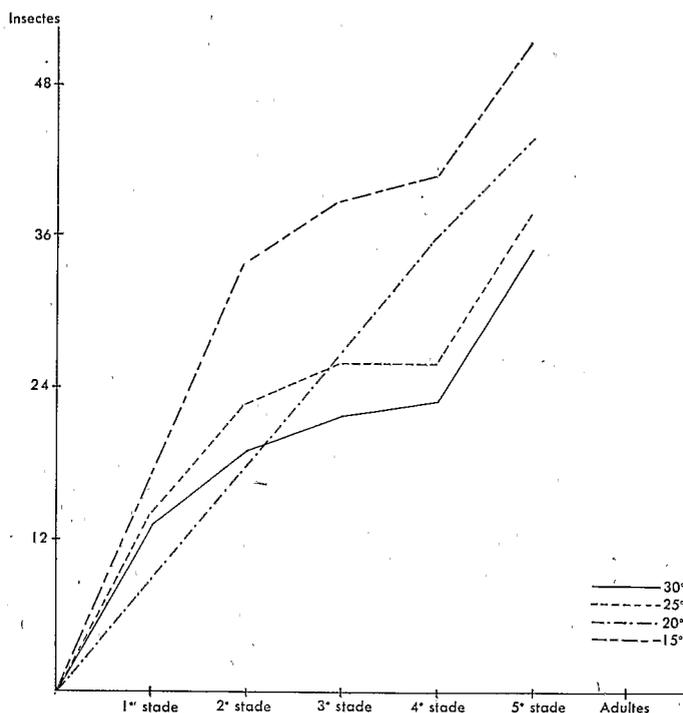
Chaque jour la feuille de chou était changée et en même temps, nous regardions à la loupe binoculaire l'évolution de la chenille. Ce n'est qu'après avoir vu l'exuvie du stade précédent que nous pouvions conclure à un changement de stade. Nous avons recommencé 5 à 6 fois ce contrôle.

Nous avons été amené à établir des courbes comparant le nombre d'insectes et leur temps moyen pour passer d'un stade à un autre, aux différentes températures (courbe I).



COURBE I. — Durée des stades aux différentes températures.

Nous avons également établi une courbe comparant les mortalités à chaque température, pour les premiers stades (courbe II).



COURBE II - MORTALITÉ

Il aurait été nécessaire d'effectuer ces recherches sur un nombre plus grand de sujets, pour pouvoir donner ici une conclusion statistiquement valable. Ce ne sont que des conclusions préliminaires dont nous reproduisons ci-dessous le tableau récapitulatif.

Stades	Durée en jours				Mortalité			
	30°	25°	20°	15°	30°	25°	20°	15°
1 ^{er}	2,1	1,8	3,1	8,3	13	14	8	16
2°	1,6	2	3,2	6,4	6	9	8	18
3°	1,9	2,1	2,8	7,2	3	3	9	5
4°	2,2	2,4	5,5	9	1	0	11	2
	2,6 m	3,4 m	4,6 m					
	2 f	1,4 f	2,9 f					
5°	2,8	3	5,1					
Adulte	10,2	10,2	18,2					
	10,6 m	10,6	19,5 m					
	10 Ff	9,8 f	16,7 f					
Total	20,8	21,5	35,9					

Il faut noter qu'il n'a pas été donné d'indications de mortalité au-delà du 4^e stade pour les mâles, 5^e stade pour les femelles, car tous les adultes quittent alors les cocons, en règle générale, aux températures de 30°, 25° et 20°.

Nous allons donner maintenant les données de la biologie des adultes d'après nos brèves études.

Dès l'apparition des adultes, nous les mettions sur des plantes en pots de 20 cm de diamètre (colza ou radis) qui servaient de supports de ponte. Ceux-ci étaient entièrement recouverts d'une bonnette en rhodoïd largement aérée, de forme tronconique renversée, la partie inférieure étant enfoncée dans la terre.

Comme l'avaient déjà établi RIGGERT et MAYER, que ce soit sur colza ou radis, la durée du développement est toujours la même.

Nous mettions quelques adultes dans chaque pondoir, leur nourriture étant fournie par deux boîtes à pillules, l'une contenant du pollen, l'autre de l'eau miellée, car nous n'avions pas de fleurs à notre disposition. Les adultes broyaient avec leurs mandibules les grains de pollen, si bien qu'en fin de compte, au bout d'un jour ou deux, la plus grande partie était pulvérisée, ce qui laisse à penser que ce régime leur convenait parfaitement.

Nous avons pu observer le comportement des adultes suivant les températures de 15°, 20°, 25° et 30°, dont voici un tableau récapitulatif.

	15°	20°	25-30°
Durée de vie	14-20 jours	10 jours	8 jours
Accouplement	0	+	++
Ponte	0	+	+++
Temps de ponte		(sans évolution)	2-3 jours
Larves au 1 ^{er} stade ..			6-8 jours
Nombre d'œufs pondus.			10 à 280

Nous avons laissé un pondoir à la température de 20° et observé qu'un petit nombre d'œufs étaient pondus et nous n'avons pu suivre l'évolution des larves, car le support de ponte s'était desséché.

D'après les courbes qui précèdent et le tableau ci-dessus, il est remarquable que certaines températures conviennent mieux au développement et à la vie de l'insecte que d'autres. 25 ou 30° paraissent être les températures nécessaires pour le développement de la larve,

avec une mortalité moindre, et pour l'activité de l'adulte. Par contre, à 15°, les chenilles se développent lentement, et pratiquement, seules quelques-unes arrivent au stade de la formation du cocon, mais les cocons se dessèchent souvent. Il a fallu, pour l'éclosion d'un cocon, le mettre à une température plus élevée (25°) au bout de 45 jours.

Tous les quinze jours, nous vérifions les cocons afin de savoir s'ils étaient viables. On ouvre l'enveloppe du cocon pour voir s'il est desséché ou non. Un autre a mis environ 3 mois et demi pour éclore à 15°. Dans ces conditions, nous n'avons pu observer que des insectes mâles et seulement une femelle. A 25°, les adultes émergent entre 8 et 12 jours, que ce soit mâles ou femelles.

De même que la nymphe vit au ralenti dans son cocon, l'adulte laissé à une température peu élevée a une durée de vie parfois deux fois supérieure à celle de l'insecte à 30°.

Certains élevages en laboratoire risquent de manquer d'insectes mâles. C'est alors qu'il est intéressant d'avoir en réserve, dans des chambres climatisées à 15°, quelques-uns de ces insectes qui serviront à la reproduction. En effet, les femelles non accouplées donnent toujours des mâles. L'accouplement se fait immédiatement à la rencontre d'un mâle et d'une femelle ou, au plus tard, un jour après.

La ponte se fait deux à trois jours plus tard, et dure deux à trois jours.

Le mode de ponte est typique pour toutes les Tenthredes. Elle a lieu avec l'aide de la scie, qui correspond à la tarière des Hyménoptères parasites. La femelle de la Tenthrede, de la rave, se déplace à l'époque de la ponte, sur le bord de la feuille, sur laquelle elle se présente à cheval avec les soies et les poils de la scie et les antennes à la partie inférieure (les cuisses d'un des côtés du corps se trouvent sur la face supérieure et les autres sur la face inférieure de la feuille). De temps en temps, elle relève un peu l'arrière-train pour enfoncer profondément dans le parenchyme la scie presque perpendiculairement au bord de la feuille). Ensuite, la scie forme une petite poche dans laquelle les œufs se logent. Les œufs sont placés en chapelet au bord des feuilles et sont très visibles au bout d'un certain temps. Ils se gonflent par hydratation.

Dès la sortie de l'œuf, la larve creuse l'épiderme supérieur de la feuille, et si celle-ci est assez tendre, y fait un trou. Si la feuille est trop dure, nous avons pu constater qu'un grand nombre d'entre elles périssaient.

Une autre cause de pertes importantes était un phénomène de cannibalisme, comme en témoignaient certaines blessures visiblement effectuées par les mandibules des larves. Nous ignorons la cause de ce comportement, mais nous pensons qu'il est dû aux conditions d'élevage.

Les couleurs des larves varient suivant les températures dans lesquelles elles sont élevées : à 25 ou 30°, elles sont de teinte claire, à 15°, beaucoup plus sombres.

Les dégâts importants sont effectués par des larves du 3^e et du 4^e stade, (80 à 90 % des dégâts). Les larves qui vont donner des mâles cessent de s'alimenter après le 4^e stade. Cependant, il y a certaines exceptions ; d'après nos résultats, certaines ont un autre stade alimentaire.

Après cette période, les larves ne s'alimentent plus et prennent une couleur très claire ; ce sont les Eonymphes. Pour les futures femelles, il y a un stade supplémentaire d'alimentation.

D'après nos constatations, à 25°, avec une humidité de 70 %, la durée de la nymphose varie, de 9 à 12 jours.

Les Eonymphes étaient placées sur du sable pour qu'elles puissent s'enterrer, dans des beurriers. Ensuite, on distinguait les cocons mâles des cocons femelles en les pesant, les cocons femelles étant plus lourds que les cocons mâles.

Les cocons étaient recouverts d'une mince couche de sable blanc. Par exemple, les cocons femelles pesaient de 100 à 105 milligrammes dans la même série et les mâles de 80 à 89 milligrammes. Nous faisons 3 lots : les mâles, les femelles et les poids intermédiaires.

Nous avons mis à 5° des cocons mâles et femelles. Tous se sont desséchés.

Nous avons essayé d'induire la diapause, ou plutôt une pseudo-diapause comme l'a indiqué M. BONNEMAISON. M. BUNGS ayant observé une diapause sur *Athalia cordata* qui attaque le muflier au Maroc, nous avons essayé de reproduire cette expérience dans des conditions semblables, à une température de 30°, dans une atmosphère très sèche. Nous n'avons pu l'induire et nous avons essayé un rythme lumineux de 16 heures à différentes températures.

Ces essais ont été tentés en fin de stage et n'ont pu être poursuivis. Le seul résultat que nous avons pu obtenir est à la température de 15° où le développement depuis la larve du 1^{er} stade a duré 3 mois et demi, jusqu'à l'émergence de l'image.

Nous avons pu obtenir un élevage permanent sans avoir pu induire la diapause par les procédés classiques du laboratoire.

Tests de la toxine thermostable sur *Athalia colibri*.

L'activité insecticide a été mise en évidence par la méthode de libre ingestion. En 1960, par BURGERION et DE BARJAC. Après la récolte des spores et des cristaux par centrifugation, ils utilisent le surnageant du milieu de culture, autoclavé de la souche de *B. thuringiensis*, variété Berliner.

L'action de la toxine « cristaux-spore » paraît être beaucoup plus rapide que celle de la toxine thermostable de la même bactérie, les larves subissant un arêt net de l'alimentation dans le premier cas. Toutefois, la toxine thermostable semble atteindre un plus grand nombre d'espèces d'insectes. La mise en évidence de l'action de la toxine thermostable sur la Tenthrède *Diprion pini* a été manifeste.

Le but de cette étude a été de savoir si son action l'est aussi sur les larves d'*Athalia colibri* qui sont économiquement préjudiciables à certaines cultures.

Méthode expérimentale.

Ces tests étaient effectués pour étudier l'ingestion par les larves. On pulvérisait la toxine thermostable sur des rondelles de chou « cœur de bœuf » dans la tour « Burgerjon ». Cette « tour » consiste en un cylindre fermé dans lequel on déverse la toxine qui se trouve pulvérisée grâce à un système de dépression contrôlée; à la base de cet appareil se trouve un disque en matière plastique supportant les rondelles de chou et animé d'un mouvement de rotation constant; ainsi, la toxine est répartie de façon homogène.

Les larves sont pesées afin de pouvoir les répartir selon leur poids. Les chenilles lourdes sont placées avec les plus légères, les moyennes restent ensemble. Cette façon de procéder donne une idée statistiquement plus juste.

Le premier test (13-2-1964) a été effectué avec des larves du 3^e et 4^e stade, pour savoir quel était leur comportement et la quantité de nourriture qu'elles ne pouvaient ingérer. Après 24 heures, les feuilles traitées ont toutes été consommées; la majeure partie l'a été au cours des 16 premières heures. Les larves ont été mises ensuite sur feuillage

sain, mais on n'a constaté aucune consommation, car elles étaient arrivées au stade Eonymphe.

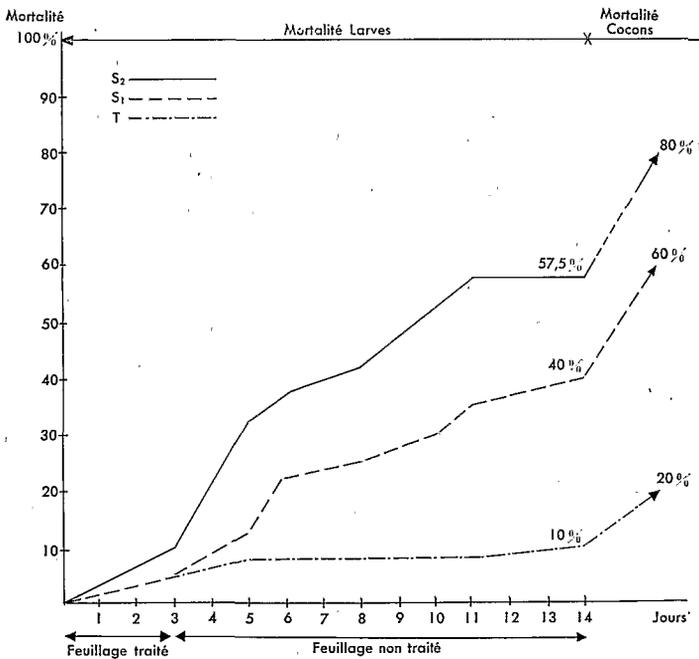
Le deuxième test du 19-3-1964 a été fait avec des chenilles plus jeunes, du début du 3^e et 4^e stade. Le témoin et les chenilles traitées ne montrent pas de différence au point de vue de l'émergence.

- Pour le témoin 38 adultes
- Pour la dose la plus forte de toxine 40 adultes
- Pour la dose la moins forte 31 adultes

Résultat non valable statistiquement.

Pour le 3^e test du 24-4-1964, nous avons utilisé des chenilles du 1^{er} ou du 2^e stade avec le surnageant Berliner étalon du 13-4-1964. Comme dose faible, nous avons utilisé 1/25 cm³ de produit sur les deux faces de la feuille ; comme dose forte 5 cm³ sur les deux faces de la feuille, comme à l'ailleurs pour les deux tests précédents. Comme mouillant, nous avons utilisé du Novémol à 2 %.

GRAPHIQUE III - TEST du 24-4-1964



Du 24 au 26-4, les chenilles ont consommé du feuillage sain. A partir du 27-4, nous avons fait 7 contrôles jusqu'au 15-5, date de l'apparition des derniers adultes. A ce moment-là, la mortalité était de 20 % pour les témoins et 60 % pour les larves soumises à une faible dose de toxine, et 80 % pour la dose forte.

Interprétation du graphique III.

Au premier contrôle, trois jours après le début de l'expérience, le témoin (T) non traité et le lot d'insectes soumis à la dose la plus faible de toxine (S_1) avaient le même pourcentage de mortalité tandis que l'on constatait dans l'autre lot avec la dose la plus forte (S_2), une mortalité deux fois supérieure.

Ensuite, si le pourcentage de mortalité chez le témoin restait à peu près stationnaire, celui des essais avec les différentes doses augmentait rapidement pour atteindre 57,5 % pour S_2 et 40 % pour S_1 , à la fin du dernier stade larvaire. Il est remarquable que la mortalité était encore plus importante chez les Eonymphes que chez les larves puisqu'elle augmentait de 22,5 % dans le premier cas, 20 % dans le deuxième et moins de 10 % chez les témoins non traités.

Ce test montre l'efficacité de la toxine thermostable sur *Athalia colibri*, mais il serait intéressant de le renouveler pour en faire une interprétation statistique.

Dès maintenant, nous pouvons penser que le fait d'employer des larves au premier et deuxième stade était intéressant et que par conséquent, cette méthode paraît valable.

OUVRAGES CONSULTÉS

- BALACHOWSKY (A.). — Mesnil, L. (1936), les Insectes nuisibles aux plantes cultivées, Paris, II, p. 1216-1219.
- BENSON (R.B.) (1931). — Notes on the habits and the occurrences of *Athalia* species in Britain. *Ent. Mon. Mag.* LXVII, 805, p. 143-137. Ref. RAE XIX, 1931, p. 421.
- BONNEMAISON (L.) (1945). — Arrêts de développement et diapauses. *Ann. Epiphyt.* (N.S.), XI, p. 19-56.
- MARTELLI (G.M.) (1946). — L'*Athalia colibri* Christ (Hym. Tenthred.) e i suoi danni a Crucifere oleginose in Emilia. *Bol. Ist. Ent. Bologna*, XV, p. 184-202. RAE XXXVI, 1948, p. 192-193.
- ANGUS (T.A.). — Separation of bacterial spores and parasporal bodies with a fluorocarbon. *Jour. of Insect. Pathology*, 1, 97-98, 1959.

- DE BARJAC (H.), BURGERJON (A.) (1960). — Nouvelles données sur le rôle de la toxine soluble thermostable produite par *Bacillus thuringiensis* B. C.R. Acad. Sci. 251, 911-912.
- BEGUIN (S.) (Mme) et MARTOURET (D.). — Essais de traitement microbiologique par poudrage C.R. IV^e Congrès Int. de Lutte contre les Ennemis des Plantes, Hambourg 1957, 1, 885-887.
- BONNEFOI (A.), BURGERJON (A.), GRISON (P.) (1958). — Titrage biologique des préparations de spores de *Bacillus thuringiensis*. Berliner. C.E. Acad. Sci. 247, 1418-1420.
- BURGERJON (A.). — Pulvérisation et poudrage au laboratoire de préparations pathogènes insecticides. *Ann. Epiphyties*, 1956, v 4, p. 677-686.
L'utilisation des chenies de *Pieris brassicae* L. comme insecte test de laboratoire dans un service de contrôle de préparations pathogènes insecticides. *Entomophaga*, 1957, v 2, p. 129-135.
- GRISON (P.), SYLVESTRE DE SACY (R.). — L'élevage de *Pieris brassicae* pour les essais de traitement microbiologique. *Ann. Epiphyties*. 4, 663-676, 1956.
- HURPIN (B.). — L'Insectarium de la Minière. *Ann. Epiphyties* 11, (3), 1960.
- MARTOURET (D.). — Etudes préliminaires sur le mode d'action de *Bacillus thuringiensis* var. *Thuringiensis* Berliner vis-à-vis de *Pieris brassicae* L. Congrès Int. Ent. Vienne, 1960.
-

Ent. agric.

Extrait du « Bulletin de l'École Nationale Supérieure Agronomique de Nancy »
Tome VII - Fascicule I. 1965

ÉLEVAGE PERMANENT
D'ATHALIA COLIBRI (CHRIST)
(TENTHREDINIDÆ)
EN VUE DE TESTER LA TOXINE SOLUBLE
THERMOSTABLE DE *BACILLUS THURINGIENSIS*

par J. E. LAURENT

*en laboratoire de lutte biologique
et de bio cosmétique de la Mission
(INRA) (juillet 1963)*

O. R. S. T. O. M.

Collection de Références

n° 12155

5 AVRIL 1968