

THÈSE

présentée

à

L'UNIVERSITÉ DE PARIS-SUD

CENTRE D'ORSAY

pour obtenir le titre de Docteur 3ème Cycle

SPÉCIALITÉ : BIOLOGIE ANIMALE

par

Jacques GRY

ACTION DE LA TOXINE SOLUBLE THERMOSTABLE DE BACILLUS THURINGIENSIS
SUR LA CROISSANCE ET LE DÉVELOPPEMENT DU CRIQUET MIGRATEUR AFRICAIN
LOCUSTA MIGRATORIA MIGRATORICIDES (R. et F.) (ORTHOPTERA, ACRIDIDAE)

Soutenue le

devant la Commission d'examen :

MM. J. BERGERARD	Président
J.R. LE BERRE	Rapporteur
Mlle G. LAUGÉ	Examineur
M. P. GRISON	Invité

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

PARIS

1971

ACTION DE LA TOXINE SOLUBLE THERMOSTABLE
DE BACILLUS THURINGIENSIS
SUR LA CROISSANCE ET LE DEVELOPPEMENT
DU CRIQUET MIGRATEUR AFRICAIN
LOCUSTA MIGRATORIA MIGRATORIOIDES
(R. et F.) (ORTHOPTERA, ACRIDIDAE)

Jacques GRY

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

PARIS

1971

AVANT-PROPOS

=====

Succédant aux insecticides minéraux du type arsenical et aux substances d'origine végétale telles que la nicotine et la roténone, les produits organiques de synthèse constituant une "seconde génération" d'insecticides ; après ces vingt cinq dernières années au cours desquelles ces insecticides se développèrent prodigieusement et apparurent comme l'un des progrès les plus bienfaisants pour l'humanité dans le domaine de la santé et dans celui de la protection des ressources alimentaires du monde, leur emploi est maintenant très sévèrement remis en question et fait de plus en plus l'objet de mesures législatives qui le limitent ou l'interdisent.

Aussi, doit-on dès à présent préparer leur relève par la "troisième génération" d'insecticides dont le premier exemple proposé par C.M. Williams (1967) est l'hormone juvénile. L'idée maîtresse qui préside à l'avènement de cette nouvelle génération est d'améliorer, par rapport à l'emploi des insecticides actuels insuffisamment spécifiques, l'efficacité et la sécurité des prochains traitements en recourant à l'avenir à des produits qui n'altèrent que des processus physiologiques appartenant en propre à l'insecte, tels que les processus du développement qui dépendent essentiellement d'hormones bien spécifiques de l'insecte.

C'est dans le cadre de cette recherche de la spécificité d'action que se situe notre travail sur la toxine soluble thermostable de Bacillus thuringiensis, substance dont l'activité insecticide liée au phénomène de la mue fut mise en lumière à La Minière sur criquet migrateur par BURGERJON, GRISON, KACHKOULI (1964) et CHARLES (1965).

Je suis profondément reconnaissant à Monsieur le Professeur J.R. LE BERRE et à Monsieur P. GRISON, Directeur de la Station de Lutte Biologique et de Biocoenotique de La Minière de m'avoir confié l'étude du mode d'action de cette toxine et de ses interactions avec la physiologie de la croissance du criquet migrateur, de m'avoir si généreusement accueilli dans leurs laboratoires et de m'y avoir accordé tout au long de mon travail une aide considérable.

Je remercie vivement Monsieur le Professeur J. BERGERARD de m'avoir guidé et encouragé et d'avoir bien voulu présider le jury de thèse.

J'exprime ma profonde gratitude à Mademoiselle G. LAUGE, Maître de Conférences, pour toute la lumière qu'elle m'a apportée et les précieux conseils qu'elle m'a donnés pour la rédaction de ma thèse.

Je suis heureux de remercier très cordialement Monsieur A. BURGERJON, Monsieur D. MARTOURET et Madame GONOD pour toute la somme d'informations et de documentation qu'ils m'ont si largement prodiguées ainsi que toutes les personnes qui m'ont tant aidé dans la réalisation et la mise en oeuvre du dispositif expérimental que j'ai utilisé à La Minière : Messieurs PONSARDIN, SENECHAL, GAROT, SOYER, ARRETEAU et Mesdames LE TALLEC et RENOU.

Je suis tout particulièrement reconnaissant à Mademoiselle M.O. AUBERT et à Monsieur J. MANCION pour la réalisation de la partie graphique de ma thèse et à toutes les autres personnes du Laboratoire d'Entomologie d'Orsay qui m'ont aidé à divers titres dans la préparation de cette thèse, Mademoiselle BROUARD, Madame LAROCHE et Monsieur PENNEC.

J'exprime enfin ma plus vive reconnaissance à Messieurs BONNET-DUPEYRON et HIERNAUX et au personnel qui, sous leur

responsabilité, a assuré, au Service Central de Documentation de l'O.R.S.T.M., la dactylographie, le tirage et la reliure de cette thèse : Mesdames DELARBRE, VIEILLARD et DECOBERT ainsi que Messieurs RAZAC et BOSSART.

SOMMAIRE

=====

INTRODUCTION

BACILLUS THURINGIENSIS ET SES TOXINES ENTOMOPATHOGENES

- Nature de Bacillus thuringiensis
- Les toxines de Bacillus thuringiensis
- Premières données sur la sensibilité des acridiens à l'égard des toxines de Bacillus thuringiensis
- Principales caractéristiques de l'action insecticide de B.t. β - exotoxine
- Objectif du présent travail

CHAPITRE I

CONDITIONS EXPERIMENTALES

- 1 - Nature du matériel étudié
 - A - L'insecte soumis à l'expérimentation
 - B - La substance étudiée
- 2 - Description des méthodes utilisées
 - A - Constitution des lots d'insectes soumis à l'expérimentation
 - B - Méthode de traitement
- 3 - Modalités de contrôle et critères biologiques utilisés
 - A - Modalités de contrôle
 - B - Critères biologiques

CHAPITRE II

RESULTATS EXPERIMENTAUX

Incidences du traitement sur la croissance et le développement du criquet

- 1 - Effet de la toxine sur la durée du développement
 - A - Essais avec les doses de 100 et 140 µg/g
 - B - Essais avec les doses de 200 et 230 µg/g
 - C - Conclusion

- 2 - Action mortelle de la toxine
 - A - Mortalité naturelle et mortalité provoquée par la toxine
 - B - Mortalités corrigées
 - C - Echelonnement des mortalités dans le temps
 - D - Relation entre la dose et la mortalité
 - E - Dose létale et dosage biologique de la toxine

- 3 - Effet de la toxine sur l'évolution pondérale du criquet
 - A - Evolution pondérale des criquets placés dans les conditions de l'élevage de base
 - B - Variation de l'activité de prise de nourriture et évolution pondérale concomitante chez des criquets soumis à la température constante de 30° C

- 4 - Fécondité et fertilité des criquets

DISCUSSION

CONCLUSION

BIBLIOGRAPHIE

INTRODUCTION

=====

BACILLUS THURINGIENSIS ET SES TOXINES ENTOMOPATHOGENES

NATURE DE BACILLUS THURINGIENSIS

Les bactéries entomopathogènes du type Bacillus thuringiensis appartiennent au groupe Bacillus cereus.

Ce sont des bactéries Gram positives, aérobies ; leur température optimale de développement est comprise entre 28°C et 35°C ; elles produisent des spores cylindriques ou ellipsoïdales, à parois minces, ne déformant pas le corps microbien.

Bacillus thuringiensis constitue, à l'intérieur du groupe B.cereus, un ensemble bien particulier de bactéries dites "cristallophores" ; en effet, ces bactéries se distinguent des autres espèces du groupe par la propriété qu'elles ont de former dans chaque cellule au moment de la sporulation une inclusion parasporale rhomboédrique de nature protéinique, désignée de façon usuelle par le terme de "cristal".

Bonnefoi et de Barjac (1962-1968) classent, en fonction de leurs antigènes H, les nombreuses souches connues de B. thuringiensis en neuf sérotypes différents ; les souches qui appartiennent à un même sérotype possèdent en commun un certain nombre de caractères biochimiques déterminés et, en particulier, l'aptitude à produire certaines ou la totalité des différentes toxines spécifiques de B.thuringiensis.

LES TOXINES DE BACILLUS THURINGIENSIS

Trois toxines sont reconnues à ce jour comme jouant un rôle important dans le pouvoir pathogène de B.thuringiensis à l'égard des insectes ; ce sont, désignées selon la nouvelle nomenclature proposée par Heimpel (1967) :

- α - exotoxine de Bacillus thuringiensis ou B.t. α - exotoxine
 δ - endotoxine de Bacillus thuringiensis ou B.t. δ - endotoxine
 β - exotoxine de Bacillus thuringiensis ou B.t. β - exotoxine

Deux d'entre elles sont thermolabiles ; la troisième est thermostable.

TOXINES THERMOLABILES

- B.t. α - exotoxine est la première substance insecticide mise en évidence dans les cultures de bactéries cristallophores (Toumanoff, 1953) ; c'est une exoenzyme soluble, la phospholipase C ; elle est émise par les formes végétatives du bacille.

- B.t. δ - endotoxine, la deuxième toxine reconnue insecticide (Hannay, 1953 et Angus, 1954) est la protéine de l'inclusion cristalline qui se forme dans chaque bactérie sporulée ; des trois toxines actuellement connues de B.thuringiensis, c'est, jusqu'à présent, la plus étudiée et la plus importante sur le plan pratique de la lutte contre les insectes nuisibles.

Les insectes qui ont été reconnus, à ce jour, sensibles à l'une ou l'autre de ces deux premières toxines (B.t. α - exotoxine et B.t. δ - endotoxine) appartiennent essentiellement à l'ordre des Lépidoptères et, dans l'ordre des Hyménoptères, à certaines espèces de Symphytes.

Les filtrats de cultures de B.thuringiensis qui constituent la base des préparations bactériennes utilisées contre

les chenilles contiennent un mélange de spores et de cristaux. Ils agissent donc sur l'insecte par la B.t.δ - endotoxine des cristaux. Lorsque les spores germent dans le tube digestif des chenilles traitées, les formes végétatives de la bactérie qui se développent sécrètent la phospholipase C ou B.t.α - exotoxine ; il en résulte que cette toxine peut, sur le même insecte, ajouter son effet à celui de l'endotoxine du cristal.

TOXINE THERMOSTABLE : B.t.β - exotoxine

Mac Connell et Richards découvrent la troisième toxine en 1959 ; dans un bouillon de culture de B.thuringiensis, ces auteurs prélèvent du surnageant à divers moments du développement de la bactérie ; ils maintiennent les prélèvements en autoclave à une température de 120° C pendant quinze minutes de façon à s'assurer de la destruction complète des toxines thermolabiles qui ont pu se former ; ils injectent les différents échantillons du surnageant à des larves de la teigne des ruches, Galleria mellonella ; en comparant les mortalités obtenues avec les prélèvements successifs, ils constatent qu'assez rapidement au cours de la multiplication de la bactérie, le surnageant de la culture devient toxique à l'égard des chenilles ; le pouvoir insecticide du surnageant atteint son maximum avant que la bactérie ne sporule. Mac Connell et Richards établissent ainsi qu'une substance insecticide est élaborée par la bactérie pendant sa phase de croissance et libérée dans le milieu de culture.

Cette troisième substance insecticide des cultures de B.thuringiensis est souvent désignée par sa première appellation de "toxine soluble thermostable" ; elle a reçu la nouvelle dénomination de B.t.β - exotoxine.

L'aptitude à produire cette toxine est le propre d'un certain nombre de variétés bien déterminées de B.thuringiensis appartenant aux sérotypes I, IV, VIII et IX (de Barjac, Burgerjon et Bonnefoi, 1966).

Burgerjon (1960) montre que la toxine thermostable n'agit pas seulement lorsqu'elle est appliquée en injection mais qu'elle est également toxique en ingestion ; en administrant aux chenilles par voie orale des quantités suffisantes de surnageant, l'auteur constate que diverses espèces de chenilles s'avèrent sensibles à la toxine, y compris celles qui se montrent les plus résistantes aux préparations bactériennes à base de spores et de cristaux ; il établit en outre que l'activité insecticide de la toxine thermostable ne se limite pas au seul ordre des Lépidoptères, mais qu'elle s'exerce sur des espèces très variées se répartissant dans les autres ordres d'Insectes et plus particulièrement chez les Orthoptères, les Coléoptères, les Hyménoptères et les Diptères (Burgerjon, 1964 et 1965).

PREMIERES DONNEES
SUR LA SENSIBILITE DES ACRIDIENS
A L'EGARD DES TOXINES DE
BACILLUS THURINGIENSIS

Descamps et Wintrebert (1966) rapportent que, chez des larves du cinquième stade du criquet migrateur africain, Locusta migratoria migratorioides R. et F., l'injection d'une préparation à base de spores et de cristaux de B. thuringiensis provoque 100 % de mortalité ; la même préparation, pulvérisée sur des plantules de blé, ne provoque aucune mortalité chez des criquets nourris exclusivement de ce blé.

Par contre, Venkatram, Mathur et Chander (1962) signalent que le criquet pèlerin, Schistocerca gregaria, se montre sensible vis à vis de certaines préparations industrielles à base de spores et de cristaux de B. thuringiensis, lorsqu'elles sont administrées au criquet par ingestion en fortes doses.

En 1964, Charles sépare, par centrifugation et filtration d'une culture de B.thuringiensis, d'une part le culot de centrifugation où se trouvent rassemblées les spores et les inclusions parasporales et, d'autre part, le surnageant ; il pulvérise sur des rondelles de feuilles de chou constituant la nourriture exclusive de larves de S.gregaria soit une suspension aqueuse très riche en inclusions parasporales, soit le surnageant ; il ne constate aucune mortalité dans les lots de criquets qui s'alimentent sur chou traité par les cristaux, tandis que de fortes mortalités apparaissent chez les larves qui se nourrissent sur des rondelles de chou ayant reçu suffisamment de surnageant.

Burgerjon, Grison et Kachkouli (1964) montrent que la toxicité des surnageants de cultures bactériennes à l'égard des larves du criquet migrateur malgache, Locusta migratoria capito, et du criquet migrateur africain, L.m.migratorioides, dépend de l'aptitude de la souche utilisée de B.thuringiensis à sécréter dans son milieu de culture la β - exotoxine ; ils pulvérisent les surnageants provenant de différentes souches de la bactérie sur des plantules de blé en pot à raison de 36 centimètres cubes de surnageant par pot, chacun de ces pots recevant après traitement un lot de 25 larves du premier ou du deuxième stade ; seuls subissent de fortes mortalités les criquets qui se nourrissent sur feuillage traité par du surnageant provenant de souches appartenant à des sérotypes et variétés reconnus producteurs de β - exotoxine.

Les mortalités que l'on observe sur criquets à la suite de traitements par des préparations bactériennes sont donc essentiellement causées par la toxine thermostable du surnageant de Bacillus thuringiensis ou B.t. β - exotoxine, à l'exclusion de toute action de la B.t. δ - endotoxine des inclusions parasporales.

PRINCIPALES CARACTERISTIQUES
DE L'ACTION INSECTICIDE
DE B.t. β - EXOTOXINE

Les expérimentations de Burgerjon et de Barjac (1960, 1964) et celles de Martouret (1961) sur chenilles; ainsi que les essais signalés ci-dessus de Burgerjon, Grison et Kachkouli (1964) sur larves de criquets migrateurs, établissent que l'activité insecticide de la toxine thermostable se caractérise par le fait qu'elle se manifeste d'une façon retardée et prolongée.

Charles (1965) montre que les larves du criquet migrateur et du criquet pèlerin qui survivent à l'ingestion de certaines doses de surnageant muent avec un net retard et poursuivent leur développement d'une façon ralentie.

L'activité de la β - exotoxine apparaît étroitement liée au développement de l'insecte. Burgerjon et Biache (1967) précisent, en particulier, que l'effet de la toxine est d'autant plus intense qu'elle est appliquée plus tôt au cours du stade ; ils découvrent en outre que, lorsqu'elle est administrée à des insectes Holométaboles dans l'un de leurs trois derniers stades larvaires à des doses un peu inférieures à celles qui seraient nécessaires pour provoquer la mort des larves ou des nymphes, la β - exotoxine intervient sur le développement de l'insecte par des effets à plus longue échéance qui se manifestent lors de l'apparition du stade imaginal, notamment par des atrophies ou des malformations (Burgerjon et Biache, 1967-1969).

O B J E C T I F S D U P R E S E N T T R A V A I L

Les observations que nous venons de rappeler nous permettent de présumer que nous devrions pouvoir disposer avec la toxine thermostable et avec des substances analogues d'un moyen d'action d'un caractère tout à fait nouveau contre les insectes ; la toxine thermostable apparaît, en effet, comme faisant preuve d'une activité d'une nature très différente des autres toxines de B.thuringiensis ou des divers types de modes d'action que l'on attribue aux insecticides de synthèse actuellement utilisés en défense des cultures ; elle intervient tout particulièrement sur la physiologie du développement de l'insecte.

Le but de notre étude est de :

- 1) préciser et compléter les observations qui ont été faites à ce sujet en nous attachant à mettre au point et à appliquer des méthodes d'évaluations quantitatives rigoureuses,
- 2) déterminer exactement la teneur en toxine thermostable des surnageants et de leurs extraits,
- 3) caractériser et évaluer l'action mortelle de la toxine sur les criquets en fonction des doses appliquées,
- 4) définir et évaluer l'activité de la toxine en ce qui concerne les modifications qu'elle entraîne dans le développement du criquet,
- 5) délimiter dans la séquence du déroulement des stades larvaires successifs les intervalles précis où l'activité de la toxine se manifeste.

Notre discussion aura pour objectifs de

- 1) confronter les résultats de nos contrôles avec certaines observations antérieures,
- 2) chercher à établir la relation qui peut exister entre les faits observés et de très récentes acquisitions réalisées en biochimie en ce qui concerne l'action de la toxine au niveau de la cellule,

3) tenter d'élucider le processus physiologique suivant lequel la toxine perturbe le développement de l'insecte et entraîne sa mort,

4) confronter ce type d'activité avec le mode d'action d'autres substances qui semblent présenter des effets biologiques analogues.

Nous concluons enfin sur les possibilités qu'offrirait le développement de l'étude des actions de ces différents types de substances en vue d'apporter une amélioration aux conditions présentes de la lutte antiacridienne.

CHAPITRE I

=====

CONDITIONS EXPERIMENTALES

1 - NATURE DU MATERIEL ETUDIE

A - L'INSECTE SOUMIS A L'EXPERIMENTATION

L'expérimentation est conduite sur le criquet migrateur africain, Locusta migratoria migratorioides R. et F., dont la souche provient de la Boucle du Niger.

L'élevage de base, permanent, est réalisé dans des cages construites sur le modèle de celles de l'Anti-Locust Research Centre (Hunter-Jones, 1961) ; la capacité est d'une soixantaine de litres, les dimensions intérieures de 40 cm x 40 cm x 40 cm. Des branchettes très ramifiées garnissent la plus grande partie du volume des cages.

La salle d'élevage est éclairée en photopériode de 12 heures par des tubes fluorescents ; elle est maintenue constamment à une température de 30° C.

Une ampoule de 25 watts est disposée sous le plancher de chaque cage ; une ampoule de 60 watts est fixée à l'intérieur contre la paroi verticale arrière.

Les ampoules s'allument suivant une photopériode de 12 heures, en même temps que l'éclairage fluorescent de la salle.

Lorsque les ampoules sont allumées, les températures mesurées aux différents points des parois et des branchettes, sur lesquelles se répartissent les criquets à l'intérieur de la cage, s'étagent entre 33° C sur les surfaces grillagées les plus éloignées de l'ampoule et 43° C aux alentours immédiats de l'ampoule.

Pendant les 12 heures d'obscurité, la température tombe uniformément à l'intérieur des cages à 30° C, qui est la température de la salle d'élevage.

La nourriture est essentiellement constituée par de jeunes pousses de blé d'une quinzaine de centimètres de haut et par du son de blé.

Pour assurer en permanence un grégarisme intense dans l'élevage de masse, on réalise un peuplement très dense dans chaque cage en mettant à éclore une dizaine ou plusieurs dizaines d'oothèques pondues dans un délai de moins de 10 jours l'effectif initial varie ainsi de quelques centaines à quelques milliers de jeunes larves par cage. Cependant il s'effectue à l'intérieur de chaque cage une régulation de la densité du peuplement qui implique de sévères mortalités au cours du développement larvaire ; la moyenne du nombre des insectes qui parviennent au stade d'imago immature est, en effet, dans les conditions de notre élevage, de 160 criquets comprenant, en moyenne, 85 mâles et 75 femelles. Ce rendement est comparable à celui obtenu par d'autres auteurs (Hunter-Jones, 1961).

B - LA SUBSTANCE ETUDIEE

1) Origine

Le produit dont nous étudions les effets sur la croissance et le développement du criquet migrateur africain est la substance insecticide thermostable, B.t. β - exotoxine, que la bactérie entomopathogène Bacillus thuringiensis sécrète dans son milieu de culture au cours de sa phase de croissance avant de sporuler.

Au fur et à mesure que se sont perfectionnées les techniques de concentration et de purification appliquées à cette sécrétion bactérienne, trois produits à base de

B.t. β - exotoxine nous furent successivement fournis par les Laboratoires Roger Bellon :

"Surnageant 24 fois concentré",

"P 45",

"Eluat nucléotidique E 14".

2) Procédés de préparation

Le surnageant est obtenu à partir d'une culture de Bacillus thuringiensis en milieu nutritif liquide, aéré et agité, à base de maïs ("corn steep liquor") ; la culture est réalisée à une température de 30° C à l'intérieur des hautes cuves de fermentation utilisées le plus souvent à la préparation des antibiotiques ; la culture sporule au bout d'une trentaine d'heures.

La culture sporulée est centrifugée, puis filtrée ; le culot obtenu est formé essentiellement des spores et inclusions parasporales du bacille ; c'est ce culot de centrifugation qui sert de base à la fabrication des spécialités insecticides bactériennes actuellement commercialisées pour les traitements contre les chenilles de divers Lépidoptères, en horticulture et en sylviculture.

Le surnageant est ce qui reste du bouillon de culture après élimination du culot.

Tel quel, le bouillon de culture contient trop d'impuretés et a une teneur trop réduite en B.t. β - exotoxine pour pouvoir se prêter à une étude expérimentale suffisamment aisée et précise de l'activité de cette toxine sur les insectes ; il est nécessaire d'éliminer du surnageant toute activité insecticide qui ne serait pas celle de la toxine que nous étudions, mais proviendrait d'autres substances également présentes dans le bouillon de culture ; ces substances, dont l'activité à l'égard des insectes risque d'interférer avec l'effet étudié de B.t. β - exotoxine, sont notamment la B.t. δ - endotoxine des inclusions parasporales ainsi que

la B.t. α - exotoxine ou phospholipase C.

a) obtention du "surnageant 24 fois concentré".

La centrifugation et la filtration des cultures sporulées de Bacillus thuringiensis permettent de retirer du bouillon les inclusions parasporales, c'est-à-dire la B.t. δ - endotoxine, en même temps que les spores et les débris de cellules bactériennes ainsi que diverses autres matières solides en suspension provenant du milieu nutritif.

Le chauffage du surnageant en autoclave pendant 15 minutes à 120° C assure la destruction des toxines sécrétées dans le milieu de culture par la bactérie au cours de sa croissance, à l'exclusion de la B.t. β - exotoxine qui résiste à la température de 120° C. Ce chauffage détruit, de plus, le pouvoir germinatif des spores qui auraient pu échapper à la filtration ; il rend impossible toute élaboration ultérieure de nouvelles quantités de toxines.

L'augmentation de la concentration en B.t. β - exotoxine s'obtient par évaporation sous vide à 60° C.

Le premier produit dont nous avons pu disposer pour commencer notre étude est un surnageant de culture bactérienne concentré 24 fois par ce procédé.

b) obtention du "P45"

"P45" est un extrait sec de surnageant obtenu à partir de cultures bactériennes centrifugées, filtrées et concentrées par évaporation sous vide ; la B.t. β - exotoxine est précipitée par des sels de baryum, puis adsorbée sur charbon et, enfin, éluee par une solution éthanolique.

c) obtention du "E 14"

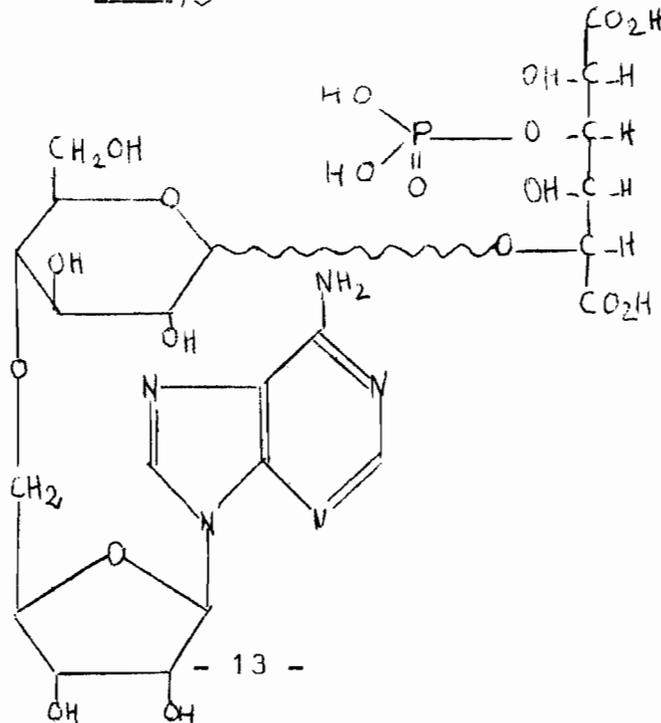
Pour compléter la purification et aboutir au produit "E 14", les opérations précédentes sont suivies d'une nouvelle adsorption effectuée sur résines échangeurs d'ions,

d'une élution avec une solution chlorhydrique, d'une filtration sur gel et d'une chromatographie sur cellulose substituée ; E 14 est la substance que l'on extrait alors par élution de la zone de chromatographie qui correspond à la hauteur d'adsorption d'un nucléotide dont les caractéristiques spectrales en ultra-violet sont voisines de l'ADP et de l'ATP ; cette substance nucléotidique reproduit sur insectes les symptômes du surnageant traité à l'autoclave ; elle a été identifiée par de Barjac et Dedonder (1965 et 1968) comme étant la B.t. β - exotoxine.

3) Nature chimique

Par chromatographie et spectroscopie en ultra-violet, de Barjac et Dedonder ont mis en évidence la présence d'adénine dans le surnageant de Bacillus thuringiensis ; ils ont également établi l'existence d'une molécule de ribose et d'un ion phosphate par molécule d'adénine (1965).

En 1969, en hydrolisant l'exotoxine déphosphorylée, Farkas, Sebesta, Horska et coll., en plus de l'adénine, obtiennent de l'acide allerique et un disaccharide constitué par la réunion d'un D - glucose et d'un ribose ; ils proposent pour la B.t. β - toxine la structure suivante :



2 - DESCRIPTION DES METHODES UTILISEES

A - CONSTITUTION DES LOTS D'INSECTES SOUMIS A L'EXPERIMENTA- TION

Les criquets destinés à être utilisés dans un même essai proviennent tous d'oothèques pondues dans un même intervalle de vingt quatre heures.

Après dix jours d'incubation à 36° C, ces oothèques sont mises à éclore, au nombre de quinze à vingt, dans une cage du type "A - L.R.C" précédemment décrit. Les larves sont élevées dans les mêmes conditions d'alimentation, de température et d'éclairement que celles de l'élevage de base ; elles sont maintenues dans la même cage jusqu'à ce qu'elles aient atteint le stade auquel est appliqué le traitement.

Les larves que l'on retient pour l'expérimentation sont dénombrées et retirées de la cage au fur et à mesure qu'elles achèvent leur exuviation ; dès que l'on a rassemblé l'effectif correspondant aux exigences quantitatives du dispositif expérimental adopté, on cesse le prélèvement ; ainsi le contingent destiné à l'essai est constitué par des insectes dont la dernière mue s'est accomplie dans l'intervalle de temps le plus bref possible qui n'a jamais excédé douze heures.

Les criquets sont pesés et regroupés en classes de poids. Ils sont alors répartis en autant de lots qu'il y a de doses à expérimenter plus un lot témoin, dont les individus ne recevront pas la substance étudiée ; la distribution des criquets entre ces lots est faite de façon à ce que les proportions des insectes mâles et femelles appartenant aux diverses classes de poids soient les mêmes dans tous les lots du même essai.

Chaque lot comprend au minimum quarante criquets.

B - METHODE DE TRAITEMENT

1) Mode d'expression des doses

Nous exprimons les doses de surnageant de culture de Bacillus thuringiensis en millimètres cubes par gramme (mm³/g), c'est-à-dire par le nombre de millimètres cubes de surnageant administrés par gramme de poids vif de l'insecte traité.

Lorsque les produits dont nous disposons pour l'expérimentation sont à l'état solide, tels que l'extrait de surnageant "P 45" et l'éluat nucléotidique "E 14" qui se présentent l'un et l'autre sous forme pulvérulente, nous exprimons les doses en microgrammes par gramme (µg/g).

Tout criquet qui fait partie d'un lot destiné à l'essai d'une dose donnée de substance reçoit individuellement une quantité de substance égale au produit du poids de l'insecte, exprimé en grammes, par la valeur de la dose, exprimée en microgrammes ou en millimètres cubes par gramme.

2) Pesée des criquets

Les criquets sont pesés individuellement juste avant le traitement et après avoir été soumis à un jeûne préalable de six heures ; on s'assure ainsi qu'au moment de la pesée tous les criquets ont effectué dans des conditions identiques le vidage de leur tube digestif.

Lorsque l'essai implique un traitement en début de stade larvaire, les criquets ont, au moment du traitement, cessé de s'alimenter depuis la fin du stade précédent ; la dose leur est administrée avant toute nouvelle prise nourriture.

Chaque criquet est pesé à l'intérieur d'un tube étanche préalablement taré.

3) Dilution et mode d'application

Les surnageants liquides concentrés ou les extraits pulvérulents dont nous disposons pour nos essais ne sont pas acceptés tels quels par les criquets ; nous les diluons dans de l'eau en proportion des doses à essayer.

Pour faire ingérer intégralement par chaque criquet la dose qui lui revient, nous étalons le volume de dilution contenant cette dose à l'extrémité de fragments de limbe de jeunes plantules de blé fraîchement coupées.

Pour exciter suffisamment et entretenir l'appétence du criquet de façon à lui faire consommer en totalité les portions traitées, on doit maintenir les brins de blé en parfait état de fraîcheur.

A cet effet, les brins de blé sont insérés dans une fente pratiquée axialement sur un bouchon de caoutchouc qui obture un petit tube rempli d'eau ; la base des brins de blé baigne dans l'eau du tube ; leurs extrémités supérieures, recouvertes d'un fin dépôt de produit, émergent au-dessus du bouchon.

Pour que la quantité de feuille fraîche ingérée par criquet au moment du traitement soit identique pour tous les insectes d'un même essai, les parties libres de limbe sont toutes taillées au-dessus du bouchon à la même hauteur ; la dimension retenue correspond à une quantité de matière verte que tout criquet sain peut facilement consommer en moins de vingt quatre heures.

Les criquets traités en début du troisième stade larvaire reçoivent ainsi trois fragments de limbe de 1,5 cm de long.

La concentration des dilutions appliquées aux brins de blé varie en fonction de la dose attribuée aux différents lots ; dans chaque lot, la dilution correspondant à la dose

essayée est appliquée suivant des volumes qui varient en fonction du poids des criquets à traiter de façon à ce que l'ensemble des surfaces foliaires que consommera le criquet au moment du traitement reçoive un volume de la dilution qui corresponde exactement, compte tenu du poids de l'insecte, à la dose assignée au lot dont fait partie l'insecte.

Le volume voulu de la dilution est réparti sous forme d'un certain nombre de gouttes d'un volume déterminé à la surface des extrémités libres de chacun des brins de blé que l'on donne à consommer au criquet.

La distribution de ces gouttes, calibrées au volume désiré, est effectuée très rapidement et d'une manière très précise avec une seringue micrométrique "AGLA" actionnée au moyen du microapplicateur automatique "BURKARDT" (Arnold, 1965).

4) Ingestion

Après le dépôt des gouttes, on coiffe le tube d'un manchon cylindrique en grillage moustiquaire qui s'ajuste au bord supérieur du tube ; le manchon forme ainsi une cagette au centre de laquelle se dressent les portions de limbes traitées.

Chaque insecte est mis, à l'intérieur d'une de ces cagettes, en présence des trois brins traités.

Au bout de vingt quatre heures, on retire les criquets qui ont consommé entièrement les trois brins de blé ; on les regroupe en cages d'observation en utilisant une cage par lot, chaque cage rassemblant les insectes qui ont été traités à la même dose.

Les criquets qui, au bout de vingt quatre heures, n'ont pas consommé intégralement la totalité des brins de blé traités, sont éliminés de l'essai.

3 - MODALITES DE CONTROLE ET CRITERES BIOLOGIQUES UTILISES

A - MODALITES DE CONTROLE

1) Conditions d'élevage des insectes en observation après traitement

- a) Criquets placés dans les conditions de l'élevage de masse

Après traitement, les insectes sont mis en observation en cages d'une capacité de 9 litres (dimensions intérieures 21 cm x 24 cm x 17,5 cm).

La paroi antérieure de la cage est en matière plastique transparente et comporte une porte à guillotine qui facilite la capture des criquets ; les parois latérales sont grillagées ; la paroi arrière et le plafond sont en verre ; le plancher est en tôle perforée.

Ces cages sont disposées dans la salle de l'élevage de masse. Pendant les douze heures d'éclairage de la salle, une lampe à incandescence de 15 watts s'allume à l'intérieur de chaque cage de sorte que les conditions de température et d'éclairage à l'intérieur des cages d'observation sont les mêmes que celles des cages de l'élevage de masse.

Les criquets en observation sont alimentés avec des plantules de blé et du son pendant 16 heures consécutives sur 24.

- b) Criquets placés à température modérée

Pour pouvoir suivre, insecte par insecte et avec le maximum de relevés dans chacun des stades, la variation des accroissements du poids des criquets ainsi que les fluctuations de leur activité de prise de nourriture, nous

élevons, dans certains de nos essais, après traitement, chaque criquet isolément. L'insecte est placé à l'intérieur de la petite enceinte grillagée, précédemment décrite, qui a été utilisée pour le traitement ; les caquettes sont disposées dans la salle de l'élevage de masse sans appoint de chaleur complémentaire ; les criquets s'y trouvent donc à la température constante de 30° C qui est celle de l'insectarium.

Cette température modérée double la durée des stades larvaires par rapport à celles des criquets regroupés dans les cages d'observation plus chauffées ; le nombre des contrôles quotidiens qui peuvent être réalisés à l'intérieur de chacun des stades larvaires est donc également doublé ; ce plus grand nombre de contrôles permet de détecter et de mieux situer au cours du stade les périodes assez brèves où se manifestent avec une particulière intensité les brusques poussées de croissance de l'insecte ou, au contraire, l'activité inhibitrice du produit.

2) Mode de retrait des criquets en vue des contrôles journaliers

Tous les jours, à la même heure, on extrait un à un de leur cage les insectes survivants de chaque lot en les capturant au moyen d'un petit tube.

Ce procédé s'avère préférable à la capture à la pince qui, en se renouvelant tous les jours, risque de causer de graves lésions à l'insecte.

L'emprisonnement de l'insecte en tube pendant la durée du contrôle présente, de plus, l'avantage de permettre de s'abstenir de la pratique de l'anesthésie à l'anhydride carbonique ; ce dernier procédé, couramment utilisé pour faciliter l'examen des insectes vivants et leur pesée, risque, à la longue, de perturber profondément la physiologie du criquet (Nicolas - 1969).

Les insectes morts sont retirés à la pince de chacune des cages d'observation et dénombrés tous les jours.

B - CRITERES BIOLOGIQUES

1) Evolution pondérale et durée des stades de développement

Les criquets sont retirés de leur cage pour la pesée tous les jours à la même heure, soit six heures après qu'on leur ait retiré toute nourriture.

Chaque insecte est posé dans le tube numéroté et préalablement taré qui a servi à le capturer. Le tube est transparent, ce qui permet de procéder à l'examen du criquet enfermé, de reconnaître le sexe et de déterminer le stade de développement.

La croissance et le développement des criquets sont définis chaque jour pour chacun des lots par les moyennes des poids des criquets du lot relevés le jour même et par les pourcentages d'insectes survivants qui se répartissent à la même date entre les divers stades ; ces moyennes et ces pourcentages sont calculés chaque jour séparément pour les criquets mâles et pour les criquets femelles.

Dès que sont terminées les pesées de tous les lots, les insectes sont réintroduits dans la cage correspondant au traitement qu'ils ont reçu.

On regarnit de blé vert et de son toutes les cages huit heures après que l'on en ait retiré le restant de la nourriture introduite le jour précédent.

2) Prise de nourriture et évolution pondérale à température modérée

Dans les lots placés à température modérée, chaque larve, tous les jours, après pesée, est mise pendant seize heures consécutives en présence d'un bouquet de plantules de blé obtenues en serre dans des conditions de végétation bien constante ; les plantules sont coupées juste avant d'être mises à la disposition des criquets et sont pesées dans un parfait état de fraîcheur ; elles conservent cette fraîcheur à l'intérieur de l'enceinte grillagée grâce à l'immersion continue de leur base dans l'eau qui remplit le tube au-dessus duquel s'emboîte la cagette.

Au bout des seize heures, on retire de chaque cagette le restant de feuillage qui n'a pas été consommé ; on éponge soigneusement entre deux épaisseurs de feuilles de papier filtre l'eau retenue en surface des brins de blé et l'on pèse immédiatement chaque bouquet d'herbe.

Nous obtenons une certaine estimation de la consommation journalière d'herbe fraîche par le criquet en soustrayant du poids du bouquet non entamé le poids de ce qui en reste après que l'insecte ait prélevé sa nourriture de la journée.

Les moments et les durées de prise de nourriture sont très variables et la vitesse des déperditions d'eau diffère dans les plantules selon qu'elles sont plus ou moins sévèrement et précocement attaquées (LE BERRE, 1963). Aussi, l'évaluation du poids frais de végétation réellement consommée par jour ne peut-elle guère être faite en valeur absolue avec beaucoup de précision ; cependant, grâce à une stricte uniformisation des conditions expérimentales, nous pouvons comparer entre les divers lots les résultats de nos pesées et établir des indices de consommation qui nous permettent de nous rendre compte dans quelle mesure le traitement agit

sur la prise de nourriture en même temps que sur la croissance du criquet.

3) Fécondité et fertilité

Lorsque les criquets atteignent leur maturité sexuelle, on encastre dans le fond de chacune des cages d'observation, au ras du faux-plancher de tôle perforée, un pot profond de dix centimètres, rempli de tourbe finement émiettée, humidifiée et modérément tassée.

A l'occasion de chaque pesée quotidienne des criquets, les pots sont retirés des cages, numérotés, datés et remplacés par d'autres pots fraîchement garnis de tourbe.

Grâce à un grattage superficiel de la tourbe qui fait apparaître les bouchons spumeux des pontes, on dénombre les oothèques pondues en les laissant en place dans le pot ; après réhumidification de la tourbe, les pots sont mis à incuber pendant dix jours à une température de 36° C.

Au bout des dix jours, chaque pot est coiffé d'un manchon en toile moustiquaire ; les larves retrouvées vivantes à l'intérieur de l'enceinte sont journellement dénombrées jusqu'à la fin des éclosions, c'est-à-dire jusqu'au quinzième jour qui suit la date de la ponte.

La fécondité des criquets d'un lot est exprimée par le nombre moyen d'oothèques pondues par femelle, cette moyenne étant établie en divisant le nombre total des oothèques recueillies dans le lot par le nombre de femelles qui, dans ce lot, ont pu mener à bien leur mue imaginale et survivre jusqu'à atteindre la maturité sexuelle.

La fertilité est évaluée, dans chacun des lots, par le nombre moyen de larves vivantes que l'on obtient par oothèque pondue, cette moyenne étant calculée d'après le total de larves écloses à partir de l'ensemble des oothèques pondues par les femelles du lot.

CHAPITRE II

=====

R E S U L T A T S E X P E R I M E N T A U X

INCIDENCES DU TRAITEMENT SUR LA CROISSANCE ET LE DEVELOPPEMENT DU CRIQUET

1 - EFFET DE LA TOXINE SUR LA DUREE DU DEVELOPPEMENT

L'ingestion d'une quantité suffisante de toxine thermostable par le criquet est suivie d'un ralentissement du développement de l'insecte.

Le tableau I résume les résultats obtenus sur des criquets femelles au cours d'un essai comportant l'application, en début du troisième stade larvaire, d'une série de doses de l'éluat nucléotidique E 14.

Toute date de mue ou de première ponte indiquée pour chacun des lots traités à différentes doses est la moyenne des temps d'apparition de la mue ou de la première ponte de tous les criquets constituant le lot ; ces temps sont exprimés en nombre de jours comptés à partir de l'éclosion jusqu'au moment de la mue ou de la première ponte.

Les moyennes sont suivies de leur erreur-type.

Nous indiquons également, dans le tableau I, les durées des stades, déduites par différence des dates d'apparition des mues successives.

Nous donnons aussi le délai de ponte, c'est-à-dire l'intervalle de temps entre la mue imaginale des femelles et leur première ponte.

T A B L E A U I

ACTION DE LA TOXINE THERMOSTABLE
SUR LES DUREES DE DEVELOPPEMENT
DES CRIQUETS FEMELLES

Dates d'apparition des mues et des premières pontes

en nombres moyens de jours comptés à partir de l'éclosion (\pm erreur-type)

Durées moyennes des stades larvaires et du délai de ponte

en nombres de jours (soulignés deux fois)

	Criquets non traités		Criquets femelles traités par l'éluat nucléotidique E 14							
			100 μ g/g		140 μ g/g		200 μ g/g		230 μ g/g	
	Date	Durée	Date	Durée	Date	Durée	Date	Durée	Date	Durée
2 ^e mue (début du traitement)	6,63		6,63		6,63		6,63		6,63	
3 ^e stade larvaire		<u>4,73</u>		<u>5,00</u>		<u>4,98</u>		<u>5,44</u>		<u>5,87</u>
3 ^e mue	11,36 \pm 0,07		11,63 \pm 0,07		11,61 \pm 0,07		12,07 \pm 0,18		12,50 \pm 0,57	
4 ^e stade larvaire		<u>4,91</u>		<u>5,25</u>		<u>5,36</u>		<u>5,66</u>		<u>6,00</u>
4 ^e mue	16,27 \pm 0,09		16,88 \pm 0,15		16,97 \pm 0,12		17,73 \pm 0,22		18,50 \pm 0,73	
5 ^e stade larvaire		<u>6,99</u>		<u>6,70</u>		<u>6,82</u>		<u>7,49</u>		<u>7,17</u>
5 ^e mue	23,26 \pm 0,15		23,58 \pm 0,18		23,79 \pm 0,19		25,22 \pm 0,30		25,67 \pm 0,60	
St.adulte immature. Délai de ponte		<u>12,29</u>		<u>14,20</u>		<u>13,48</u>		<u>10,10</u>		<u>9,83</u>
1 ^{ères} pontes	35,55 \pm 0,35		35,78 \pm 0,46		37,27 \pm 0,40		35,32 \pm 0,39		35,50 \pm 0,32	

A - ESSAIS AVEC LES DOSES DE 100 ET 140 µg/g

Le traitement, en début du troisième stade larvaire, augmente de 5 % la durée de ce stade chez les criquets qui ont ingéré 100 ou 140 microgrammes de nucléotide par gramme de leur poids vif. Cette comparaison, ainsi que les suivantes, est faite par rapport à la durée du même stade chez les criquets témoins, non traités.

La durée du stade suivant s'est accrue, par rapport à la durée observée chez les témoins, de 7 % à la suite de l'application de la dose de 100 microgrammes. Elle s'est accrue de 10 % après l'application de la dose de 140 microgrammes.

Par contre, le dernier stade larvaire des criquets traités par l'une et l'autre de ces doses s'est raccourci respectivement de 3 % et 5 % de sorte qu'entre les temps d'apparition de la mue imaginale chez les insectes témoins et chez les insectes traités aux doses de 100 et 140 microgrammes, il n'apparaît plus de différence significative.

B - ESSAIS AVEC LES DOSES DE 200 ET 230 µg/g

Lorsque l'on applique des doses de 200 et de 230 microgrammes, la durée de l'un et l'autre des deux premiers stades larvaires qui succèdent au traitement augmente de 16 à 25 % par rapport à la durée des mêmes stades chez les criquets non traités.

Alors que les effets des doses de 100 et 140 microgrammes ne se manifestent que sur les deux premiers stades qui succèdent au traitement, les doses de 200 et 230 microgrammes ralentissent le développement de tous les stades larvaires. Il en résulte que le temps moyen d'apparition de la mue imaginale chez les criquets traités par les plus fortes

doses se montre, à l'analyse, significativement différent du temps de la mue imaginaire des criquets témoins.

Par contre, il n'y a plus de différence significative entre les temps d'apparition des premières pontes chez les criquets témoins et chez les criquets traités aux doses de 200 et 230 microgrammes ; ceci correspond, chez les derniers, à un raccourcissement de l'intervalle moyen de temps qui sépare la mue imaginaire des premières pontes ; ce délai moyen de ponte est de 10 jours pour les femelles traitées par 200 et 230 microgrammes de nucléotide alors qu'il varie entre 12 et 14 jours pour les criquets non traités ou pour les criquets traités aux doses de 100 et 140 microgrammes.

C - CONCLUSION

L'effet retardateur de la toxine thermostable ne s'exerce donc sur le développement du criquet que pendant un temps limité.

Lorsque la toxine est ingérée par les criquets au début d'un stade larvaire, le ralentissement se manifeste dès ce stade et le retard subsiste d'autant plus longtemps que les quantités de toxine ingérée sont plus fortes.

Le retard finit par se résorber complètement, soit avant la fin de la vie larvaire, soit au moment de la mue imaginaire, soit, pour les plus fortes doses utilisées, dans les premiers temps de la vie imaginaire en cours de maturation sexuelle, avant la première ponte.

2 - ACTION MORTELLE DE LA TOXINE

A - MORTALITE NATURELLE ET MORTALITE PROVOQUEE PAR LA TOXINE

Tout essai destiné à mettre en évidence et à évaluer l'action mortelle de la toxine à l'égard du criquet met simultanément en jeu un certain nombre de lots traités par la toxine et un lot témoin dont les individus n'ont pas ingéré de toxine ; mise à part l'ingestion de la toxine, le lot témoin subit rigoureusement les mêmes traitements, les mêmes conditions d'élevage et les mêmes opérations de contrôle que les lots d'insectes traités par différentes doses de la toxine.

Le graphique de la fig. 1 représente les pourcentages de mortalité cumulés relevés journallement dans un essai comportant un lot témoin non traité et trois lots respectivement traités par 100, 140 et 200 microgrammes d'éluat nucléotidique E 14 par gramme d'insecte au début du troisième stade larvaire.

On constate que le lot de criquets non traités par la toxine subit une mortalité qui n'est pas négligeable ; cette mortalité atteint, en effet, 13 % quatorze jours après le début de l'expérience.

A l'intérieur d'un même essai, les conditions expérimentales peuvent être considérées comme identiques pour tous les lots de l'essai ; on peut donc penser que les mortalités qui dépendent de ces conditions et que l'on enregistre chez les criquets du lot témoin affectent de la même façon les lots traités qui sont placés dans les mêmes conditions ; les mortalités observées dans les lots traités, représentées en fig. 1, comprennent, par conséquent, une certaine proportion d'insectes dont la mort n'est pas pro-

Fig. 1 - Relevé journalier des mortalités cumulées observées chez Locusta migratoria migratorioides après traitement au début du troisième stade larvaire par l'éluat nucléotidique E 14.

Fig. 2 - Relevé journalier des mortalités cumulées corrigées de Locusta migratoria migratorioides après traitement au début du troisième stade larvaire par l'éluat nucléotidique E 14.

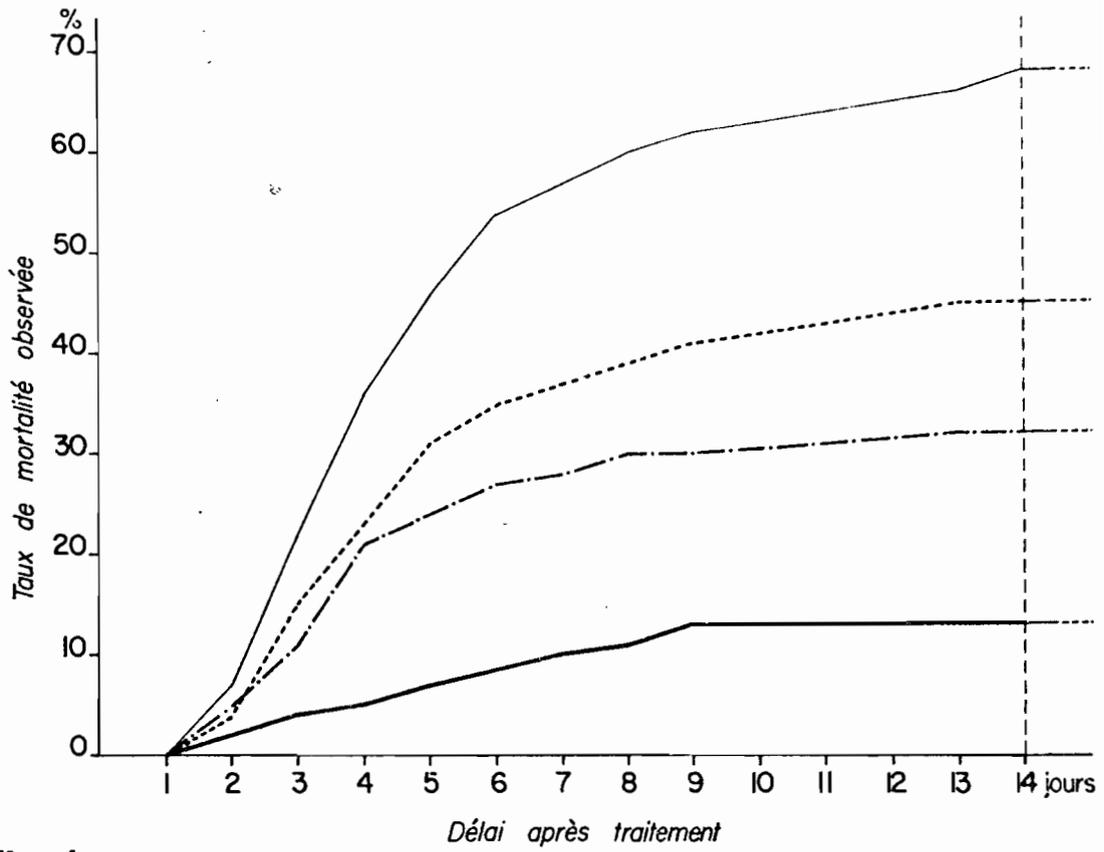


Fig. 1

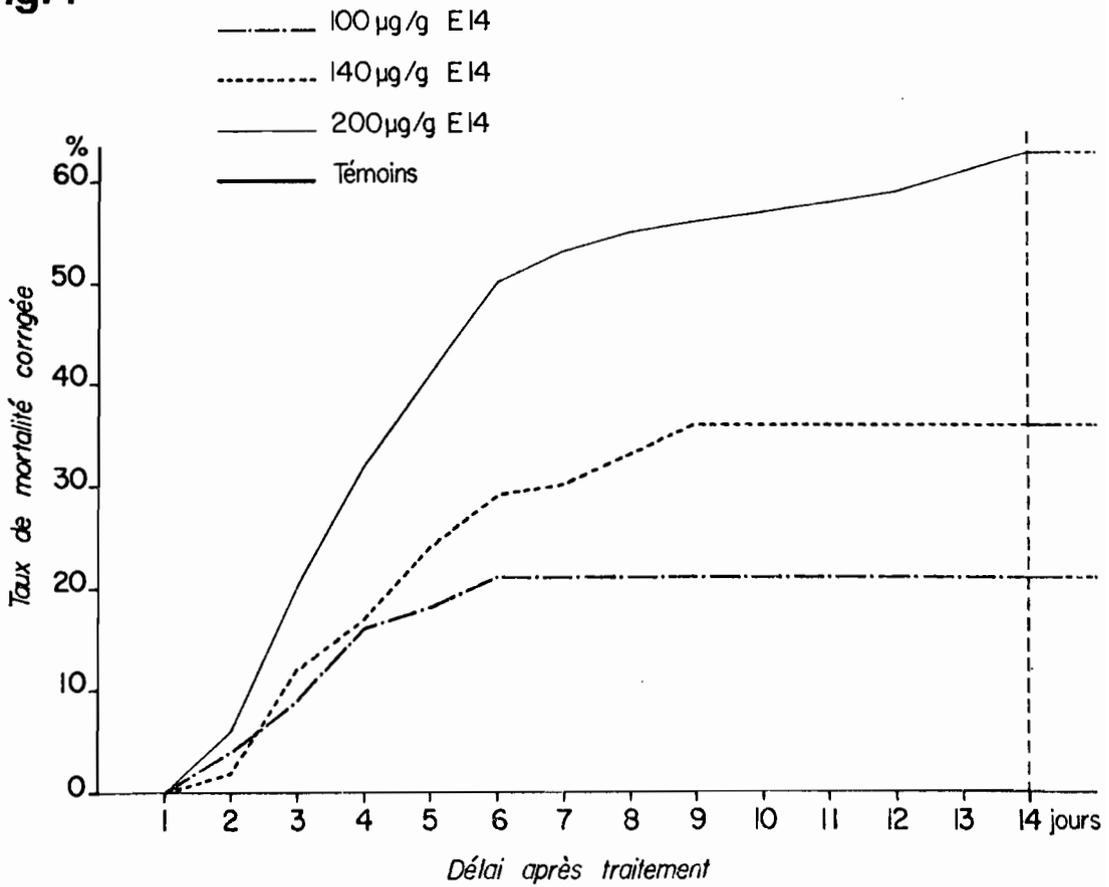


Fig. 2

voquée par la toxine.

Cette part qui, dans la mortalité globale observée dans chacun des lots traités, se rapporte à la mortalité "naturelle", peut être estimée en tenant compte de la mortalité observée dans le lot témoin du même essai ; elle doit être défalquée de la mortalité globale observée chez les criquets traités en appliquant la formule suivante établie par Abbot (1925) :

% mortalité corrigée =

$$\frac{\% \text{ morts du lot traité} - \% \text{ morts du lot non traité}}{100 - \% \text{ morts du lot non traité}} \times 100$$

Les mortalités ainsi calculées pour les différents lots traités sont les mortalités dites "corrigées" qui sont provoquées par l'action de la seule toxine ; ce sont essentiellement de ces mortalités corrigées dont nous rendons compte dans la présente étude.

B - MORTALITES CORRIGÉES

Nous représentons en fig. 2 les mortalités corrigées des lots traités dont les mortalités observées sont représentées en fig. 1 ; en tenant compte de la mortalité naturelle de 13 % observée dans le lot témoin deux semaines après le traitement, le calcul par la formule d'Abbot donne, pour la mortalité produite au bout de ce même délai par la toxine aux doses de 100, 140 et 200 microgrammes, les valeurs respectives de 21 %, 36 % et 63 %. Dans les mêmes lots, les mortalités effectivement observées sont respectivement de 32 %, 45 % et 68 %.

C - ECHELONNEMENT DES MORTALITES DANS LE TEMPS

Les histogrammes des fig. 3, 4 et 5 représentent les mortalités quotidiennes, durant les trois derniers stades larvaires, provoquées par les doses de 100, 140 et 200 microgrammes de l'éluat nucléotidique E 14 appliquées en début de troisième stade.

A la suite de l'ingestion d'une dose faible telle que celle de 100 microgrammes qui donne moins de 21 % de mortalité, les morts provoquées par la toxine s'échelonnent depuis le deuxième jour qui suit le début de l'ingestion de la toxine jusqu'aux premiers jours du stade suivant, c'est-à-dire sur une période de six jours.

Lorsque les doses ingérées en début de stade larvaire sont plus importantes (140 ou 200 microgrammes), les mortalités se succèdent journellement sur tout le stade ; elles se poursuivent, en décroissant, sur le stade suivant et, pour les plus fortes doses, débordent sur une plus ou moins grande partie du cinquième stade.

C'est cependant entre les deuxième et sixième jours qui succèdent au traitement que se produisent la plupart des mortalités ; en effet, le tiers environ du total des mortalités provoquées par les fortes doses de toxine survient dans les trois premiers jours qui succèdent au traitement ; la moitié du total des mortalités est atteinte après quatre jours, les deux tiers sont atteints après cinq jours et les quatre cinquièmes après six jours.

Les mortalités se raréfient dans la semaine qui suit ; elles sont nulles au plus tard au quatorzième jour.

Ce sont les valeurs des mortalités corrigées, relevées quatorze jours après traitement, que nous utilisons pour évaluer et comparer l'action mortelle des différentes doses

Fig. 3 - Mortalités journalières corrigées de Locusta traité par 100 µg/g d'éluat nucléotidique E 14 au début du troisième stade larvaire.

Fig. 4 - Mortalités journalières corrigées de Locusta traité par 140 µg/g d'éluat nucléotidique E 14 au début du troisième stade larvaire.

Fig. 5 - Mortalités journalières corrigées de Locusta traité par 200 µg/g d'éluat nucléotidique E 14 au début du troisième stade larvaire.

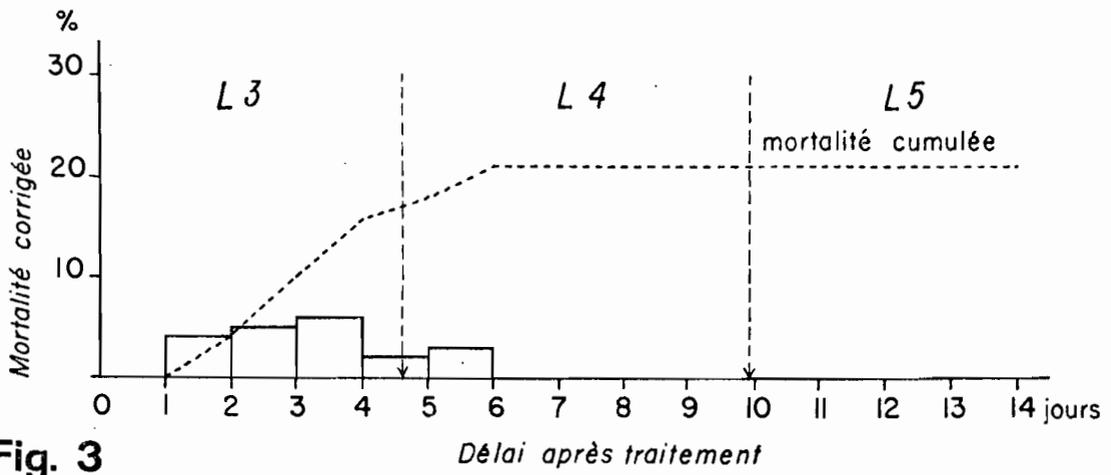


Fig. 3

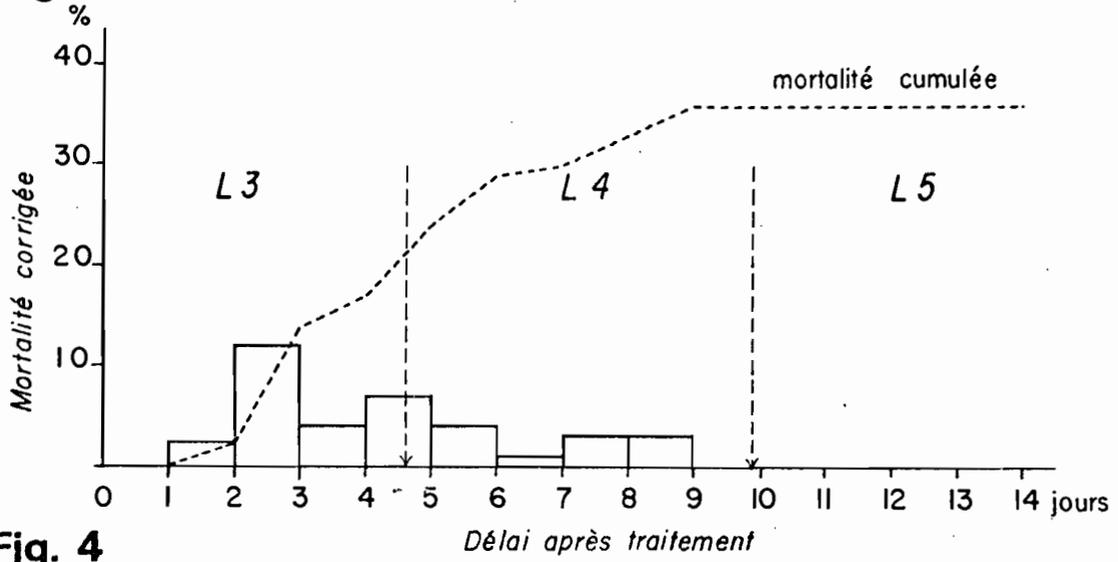


Fig. 4

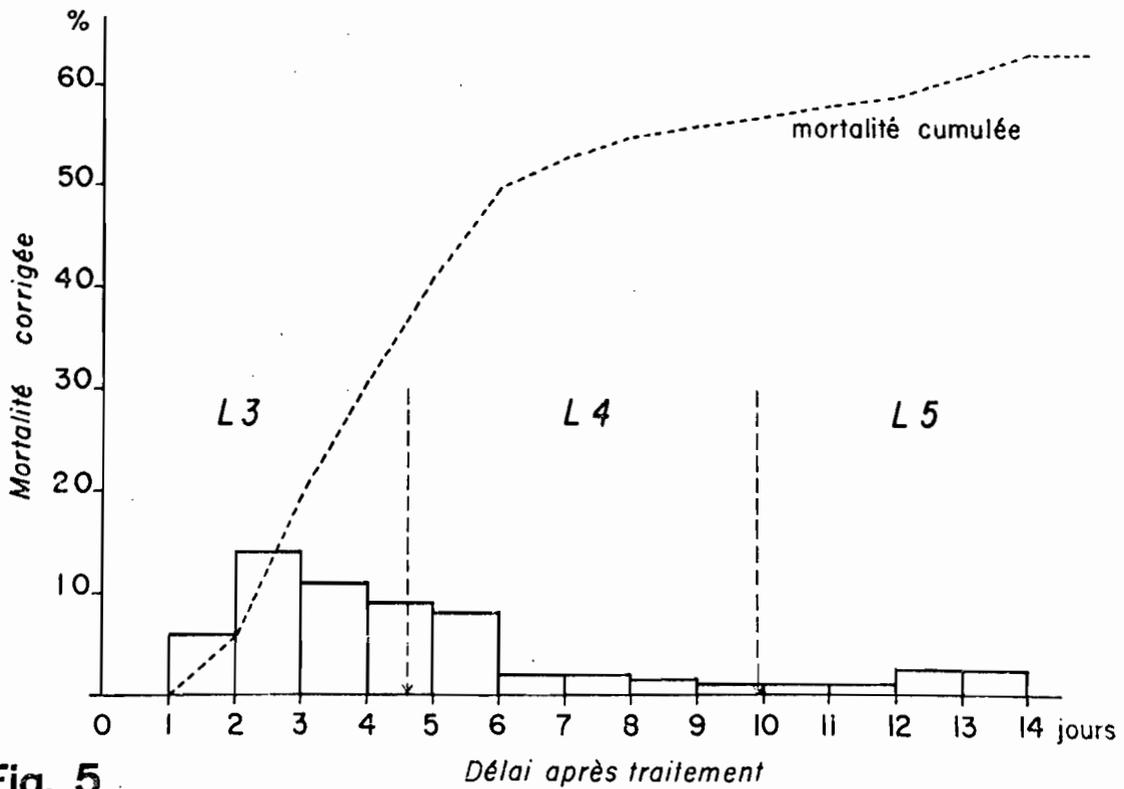


Fig. 5

de la toxine ou des extraits de surnageants.

Après ce délai de deux semaines, il n'est plus possible, en effet, d'attribuer à l'action de la toxine de nouvelles morts car les mortalités journalières observées à partir de ce moment dans les lots traités ne dépassent plus les mortalités du témoin.

Nous constatons notamment (Tableau II) que le traitement effectué en début du troisième stade larvaire, c'est-à-dire 17 ou 18 jours avant la mue imaginale, n'a aucune répercussion sur la longévité des criquets traités qui survivent à la mue imaginale ; les durées moyennes de vie des criquets qui, après traitement, parviennent à l'état adulte, ne présentent aucune réduction par rapport à la durée moyenne de survie des criquets non traités.

TABLEAU II

:Durée moyenne de vie des criquets ayant survécu au-delà de la mue imaginale (durée de vie en jours comptés à partir de l'éclosion)	
:Criquets témoins non traités	:Moyenne \pm erreur-type
:	: 67,13 \pm 1,62
:Criquets traités en début du 3 ^e stade larvaire par l'éluat nucléotidique E 14	:
: à la dose de 100 μ g/g	: 66,80 \pm 2,11
: " " " " 140 μ g/g	: 66,86 \pm 1,90
: " " " " 200 μ g/g	: 68,27 \pm 2,24

En ce qui concerne, par contre, les criquets qui succombent avant la mue imaginale, le délai durant lequel s'échelonnent leurs mortalités est d'autant plus long que la quantité de toxine ingérée est importante.

D - RELATION ENTRE LA DOSE ET LA MORTALITE

Nous avons également constaté (fig. 2) que les proportions de criquets tués par la toxine dans les différents lots traités sont d'autant plus élevées que les doses qui leur sont appliquées sont plus fortes.

Lorsque l'on représente par des points (fig. 6) le taux de mortalité en fonction des doses de toxine, la courbe que l'on trace au plus près de ces points est une sigmoïde dissymétrique (fig. 6b).

A tout criquet correspond une dose de toxine, la "dose-seuil", à partir de laquelle la toxine entraîne la mort du criquet ; la courbe 6-b tracée représente donc la distribution des fréquences cumulées des doses-seuils pour l'ensemble de la population de criquets dont sont extraits les lots soumis à l'expérimentation.

De cette courbe des fréquences cumulées dérive la courbe de distribution des fréquences des doses-seuils (6-a) ; celle-ci a la forme typique dissymétrique des courbes de distribution de fréquences des doses-seuils que l'on obtient d'une manière classique en toxicologie lorsqu'on emploie comme abscisse la dose réelle de poison.

Lorsqu'on utilise comme abscisse le logarithme de la dose (fig. 7), cette distribution devient normale (7-a) et la courbe en S de distribution des fréquences cumulées devient une courbe sigmoïde normale (7-b).

Si les proportions de morts sont transformées en probits et reportées sur le graphique selon l'échelle de droite de

Relation entre la dose ingérée et la mortalité provoquée par B.t. β - exotoxine chez Locusta migratoria migratorioides traité au début du troisième stade larvaire.

Fig. 6 - 6 - a - Courbe de distribution des fréquences des doses-seuils de la B.t. β - exotoxine pour Locusta traité au début de son 3^e stade larvaire.

6 - b - Courbe de distribution des fréquences cumulées des mêmes doses-seuils ou courbe représentative des mortalités en fonction des doses.

Fig. 7 - 7 - a - Courbe représentant la distribution des fréquences des mêmes doses-seuils après transformation logarithmique des doses.

7 - b - Courbe représentant les mortalités en fonction des doses après transformation logarithmique des doses (mortalités mesurées en % selon l'échelle de gauche de la figure 7).

7 - c - Droite mortalité-dose après transformation logarithmique des doses et évaluation des mortalités en probits (Cf échelle de droite de la figure 7).

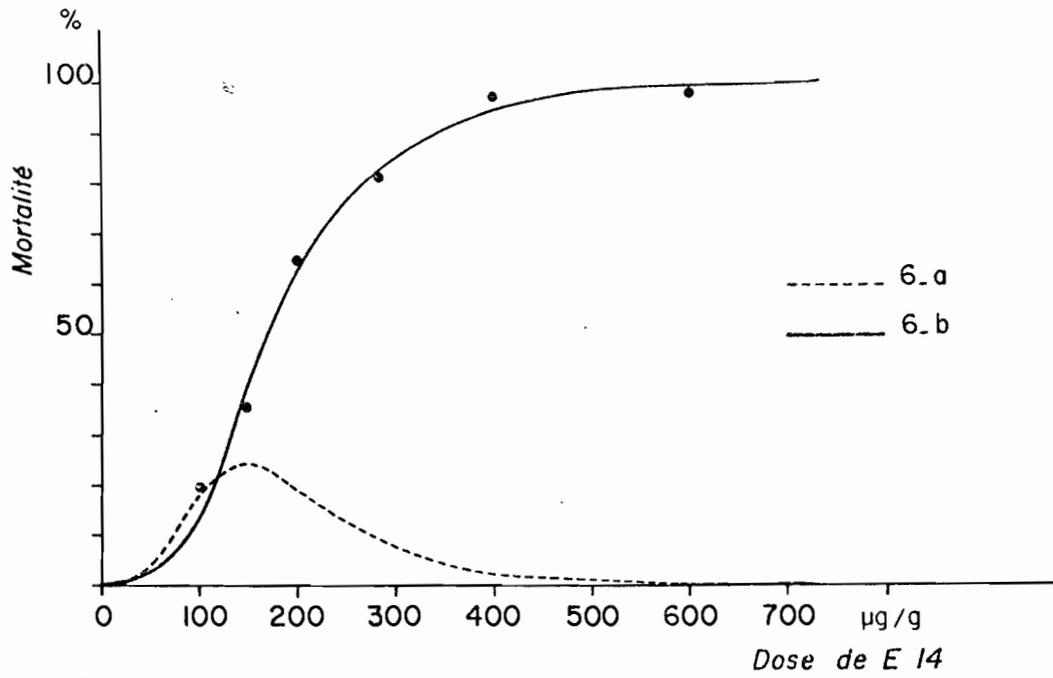


Fig. 6

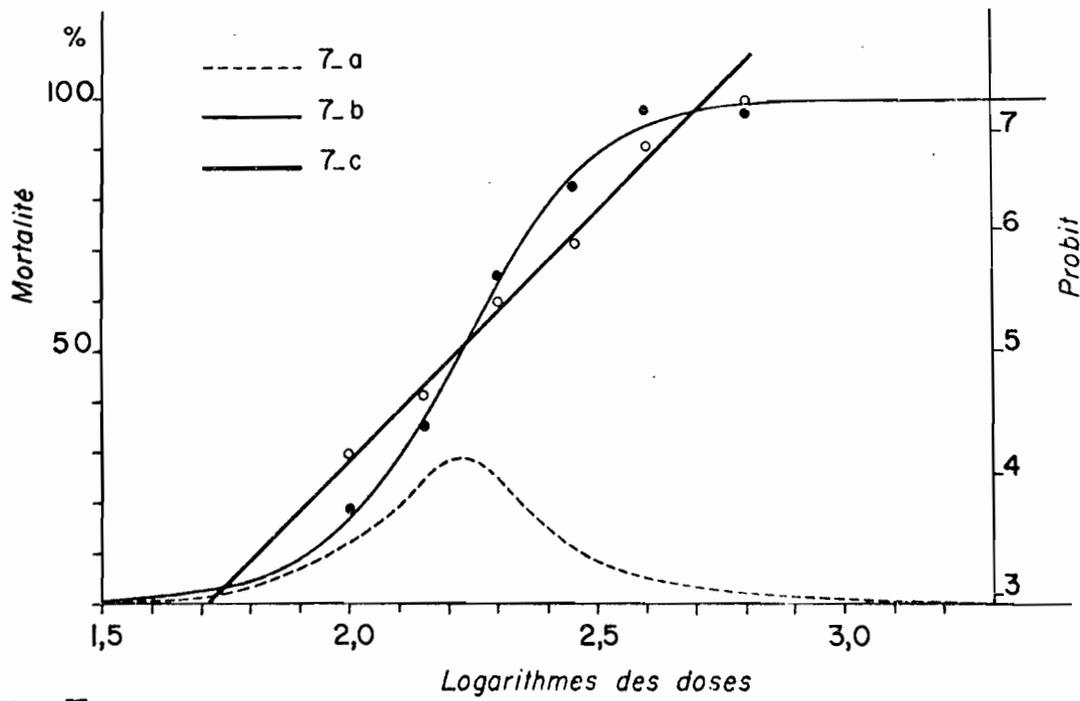


Fig. 7

la figure 7, la courbe sigmoïde normale est transformée en une droite (7-c).

C'est cette transformation de la courbe dose-mortalité en droite, décrite par Mather en 1943, que nous utilisons pour étudier le pouvoir insecticide de la toxine et des extraits du surnageant des cultures de Bacillus thuringiensis.

E - DOSE LETALE ET DOSAGE BIOLOGIQUE DE LA TOXINE

Dès l'instant où l'on connaît la droite qui représente la relation entre la dose et la mortalité dans le système de coordonnées où les doses sont exprimées par leurs logarithmes et les pourcentages de morts par les probits, on doit pouvoir déterminer quel taux de mortalité provoque toute dose quelle qu'elle soit ; le "poids" que l'on peut attribuer aux probits des mortalités qui se rapportent aux différentes doses, c'est-à-dire la précision avec laquelle ces probits sont estimés, varie cependant avec la valeur de la proportion de morts ; la précision est maximum lorsque le pourcentage de morts approche 50 % ; elle diminue d'autant plus que le taux de mortalité s'éloigne de part et d'autre de ce pourcentage de 50 %.

Inversement, on peut, à partir de la droite, déterminer quelle dose est nécessaire pour entraîner un taux de mortalité donné ("dose létale").

Nous évaluons le pouvoir insecticide du surnageant et de ses extraits par la dose létale 50 % ou DL 50, c'est-à-dire par la dose qui provoque 50 % de mortalité ; c'est en effet la dose létale qui est déterminée avec le plus de sécurité.

Nous appliquons à l'essai de l'éluat nucléotidique E 14, substance chimiquement pure, isolée du surnageant, le procé-

dé du "maximum de vraisemblance" de Finney (1952) qui permet d'introduire le maximum de précision dans la détermination de la DL 50.

L'analyse des résultats de cet essai, présentés dans le tableau III, donne, pour l'éluat E 14 ingéré par Locusta en début de troisième stade larvaire, une valeur estimée de la DL 50 de 165,5 microgrammes par gramme d'insecte.

Pour une probabilité de 5 %, les limites de confiance entre lesquelles se tient la vraie valeur de la DL 50 sont estimées par ce calcul à 143 et 191 microgrammes par gramme d'insecte.

La droite représentative de la loi dose-mortalité de la toxine est tracée en fig. 8 ainsi que la parallèle à l'axe des abscisses d'ordonnée 5, probit qui correspond à la mortalité de 50 % ; la valeur de l'abscisse du point d'intersection de ces deux droites est le logarithme de la DL 50.

Concurremment à la méthode mathématique du maximum de vraisemblance de Finney que nous réservons à l'étude de substances chimiquement pures telles que l'éluat nucléotidique isolé de surnageant, nous disposons ainsi d'un procédé graphique d'évaluation de la DL 50 ; celui-ci consiste donc à reporter les résultats de l'essai en coordonnées probit-logarithme, à tracer à vue la droite de régression au plus près des points ayant le plus de "poids" et à lire l'abscisse correspondante au point d'intersection de cette droite avec l'horizontale d'ordonnée probit 5 (fig.9).

C'est un procédé beaucoup plus simple qui donne des résultats d'une approximation tout à fait acceptable pour des produits de la nature des surnageants non purifiés des cultures bactériennes qui sont de composition complexe, assez mal définie et plus ou moins variable.

Fig. 8 - Droite de régression pondérée du probit de la mortalité sur le logarithme de la dose, déterminée pour l'éluat nucléotidique E 14 ingérée par Locusta migratoria migratorioides au début de 3^e stade larvaire.

TABLEAU III

Doses (µg/g)	Logarithmes	Effectifs	Morts au 14 ^e j.	Mortalités		Probits
				observées	corrigées	
200	2,30	50	34	68 %	63 %	5,33
140	2,15	49	22	45 %	36 %	4,64
100	2,00	53	17	32 %	21 %	4,19
0	-	52	7	13 %	-	-

Equation de la droite de régression : $Y = 4,256 x - 4,444$

Pente de la droite : $b = 4,256 \pm 1,006$

DL 50 (intervalle de confiance à 5%) : 143,2 < 165,5 < 191,3 µg/g

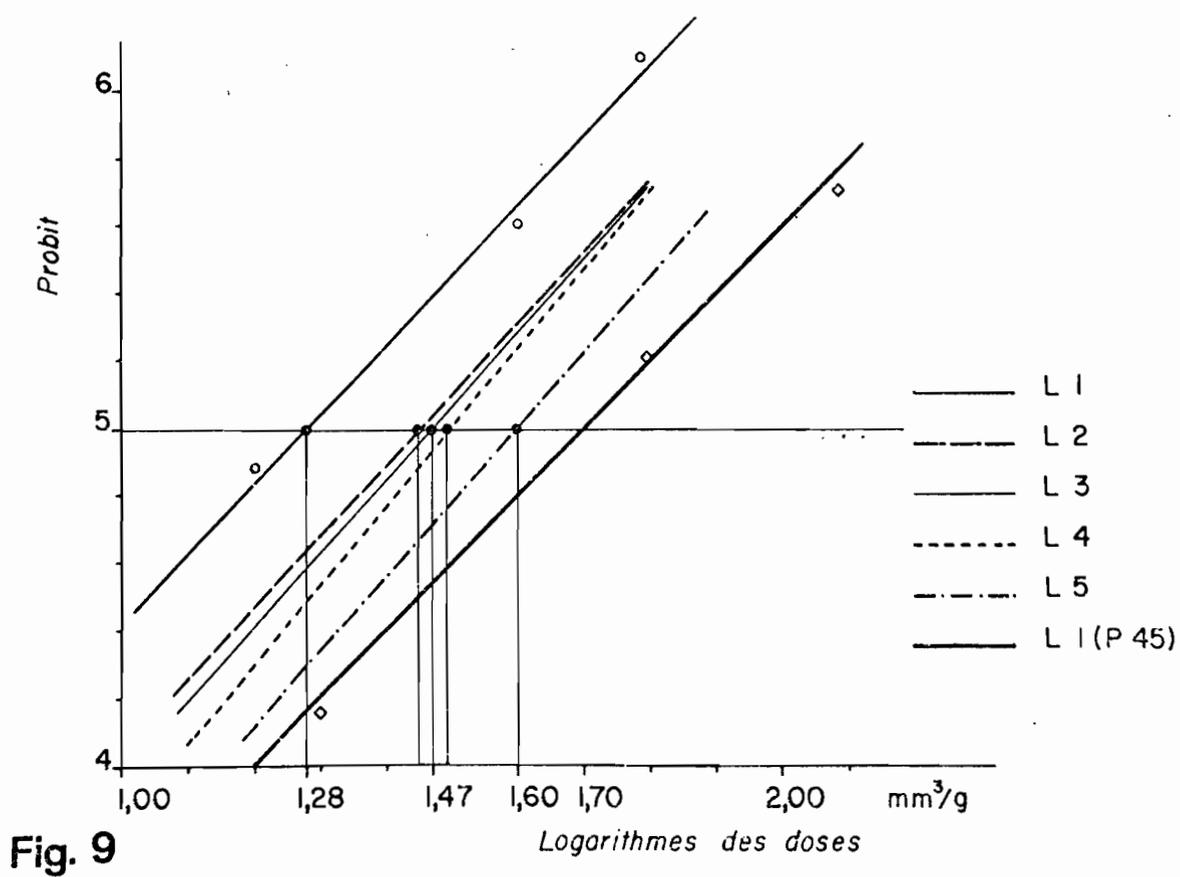
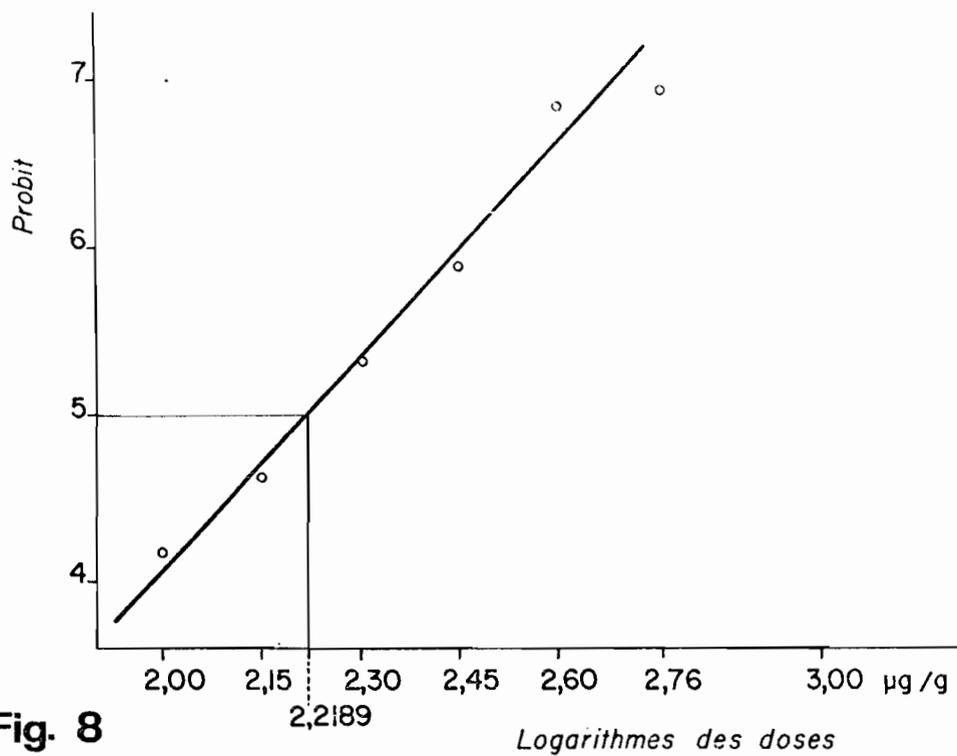
Fig. 9 - Détermination graphique des DL 50 du surnageant 24 fois concentré de B.t. et d'une solution à 5 mg/cc de l'extrait P 45.

1) Surnageant 24 fois concentré, ingéré au début du
 1^{er} stade larvaire : $\log DL 50 = 1,28$ d'où $DL 50 = 19 \text{ mm}^3/g$
 2^e " " : " = 1,45 " = 28 "
 3^e " " : " = 1,47 " = 29,5 "
 4^e " " : " = 1,49 " = 31 "
 5^e " " : " = 1,60 " = 40 "

2) Log DL 50 de la solution à 5 mg/cc de P45 en ingestion au début du 1^{er} stade larvaire : $\log DL 50 = 1,70$ d'où DL 50 de la solution 5 mg/cc = $50 \text{ mm}^3/g$

Poids de P45 dans 50 mm^3 de la solution :

$$\frac{5 \times 50}{1000} = \frac{250}{1000} = 0,250 \text{ mg, d'où : DL 50 de P45} = 250 \text{ µg/g}$$



Le surnageant du milieu de culture liquide de Bacillus thuringiensis dont est extrait le nucléotide a été concentré 24 fois par évaporati n sous vide.

La méthode d'analyse graphique (fig. 9) en coordonnées probit-logarithme des résultats d'essais effectués sur criquets en début de leur troisième stade larvaire donne pour le surnageant concentré une estimation de la DL 50 de 29,5 millimètres cubes du liquide per gramme d'insecte; la DL 50 du surnageant non concentré est donc de $29,5 \times 24 = 708 \text{ mm}^3/\text{g}$.

La DL 50 de l'éluat nucléotidique étant de 165,5 microgrammes/grammes, 708 millimètres cubes de surnageant correspondent à 165,5 microgrammes d'éluat et un litre de surnageant correspond à 234 milligrammes d'éluat.

L'éluat étant identifié à la B.t. β - exotoxine, on peut donc estimer à 234 milligrammes par litre la teneur du surnageant en toxine.

P 45 est l'extrait sec pulvérulent de surnageant que les Laboratoires Roger Bellon nous fournirent avant d'avoir réussi à isoler le nucléotide ; en ingestion au début du premier stade larvaire, la DL 50 de P 45 est de 250 microgrammes par gramme d'insecte ; en ingestion au début du troisième stade larvaire, elle est de 375 microgrammes.

En comparant cette dernière DL 50 avec l'estimation de 165,5 microgrammes calculée pour la DL 50 du nucléotide en ingestion au troisième stade larvaire, l'extrait P 45 peut être considéré comme ne contenant que 44 % de la matière active nucléotidique.

3 - EFFET DE LA TOXINE
SUR L'EVOLUTION PONDERALE
DU CRIQUET

A - EVOLUTION PONDERALE DES CRIQUETS PLACES DANS LES CONDI-
TIONS DE L'ELEVAGE DE MASSE

1) Représentation graphique

Pour apprécier l'effet de la toxine thermostable sur la croissance du criquet, nous suivons journallement sur insectes de même sexe, participant à un même essai au même âge, l'évolution du poids vif de criquets non traités et de criquets traités à différentes doses de la toxine ; les criquets sont strictement soumis aux conditions expérimentales précises au chapitre I.

La courbe de la figure 10 représente l'évolution pondérale des criquets femelles d'un lot d'insectes témoins et de trois lots traités en début du troisième stade larvaire par des doses de 100, 140 et 200 microgrammes de l'éluat nucléotidique E 14 par gramme d'insecte.

Le tableau IV regroupe une partie des moyennes des poids relevés journallement qui ont servi à tracer les courbes, ainsi que les erreurs-types de ces moyennes.

Il apparaît nettement que, dans les trois stades larvaires qui succèdent au traitement, en dehors des jours qui correspondent aux différentes mues, les moyennes des poids relevés à date donnée dans les lots traités sont inférieures à la moyenne des poids relevés à la même date pour les criquets non traités.

Au moment d'une mue, le criquet interrompt brusquement sa croissance ; chaque criquet subit alors une rapide perte

Fig. 10 - Evolution pondérale de la femelle de Locusta migratoria migratorioides à la suite d'une ingestion de B.t. β - exotoxine au début du troisième stade larvaire.

Moyenne des poids des criquets femelles en milligrammes.

Fig. 11 - Pourcentage de réduction de la moyenne des poids des criquets femelles traités par rapport à la moyenne des poids des criquets femelles témoins.

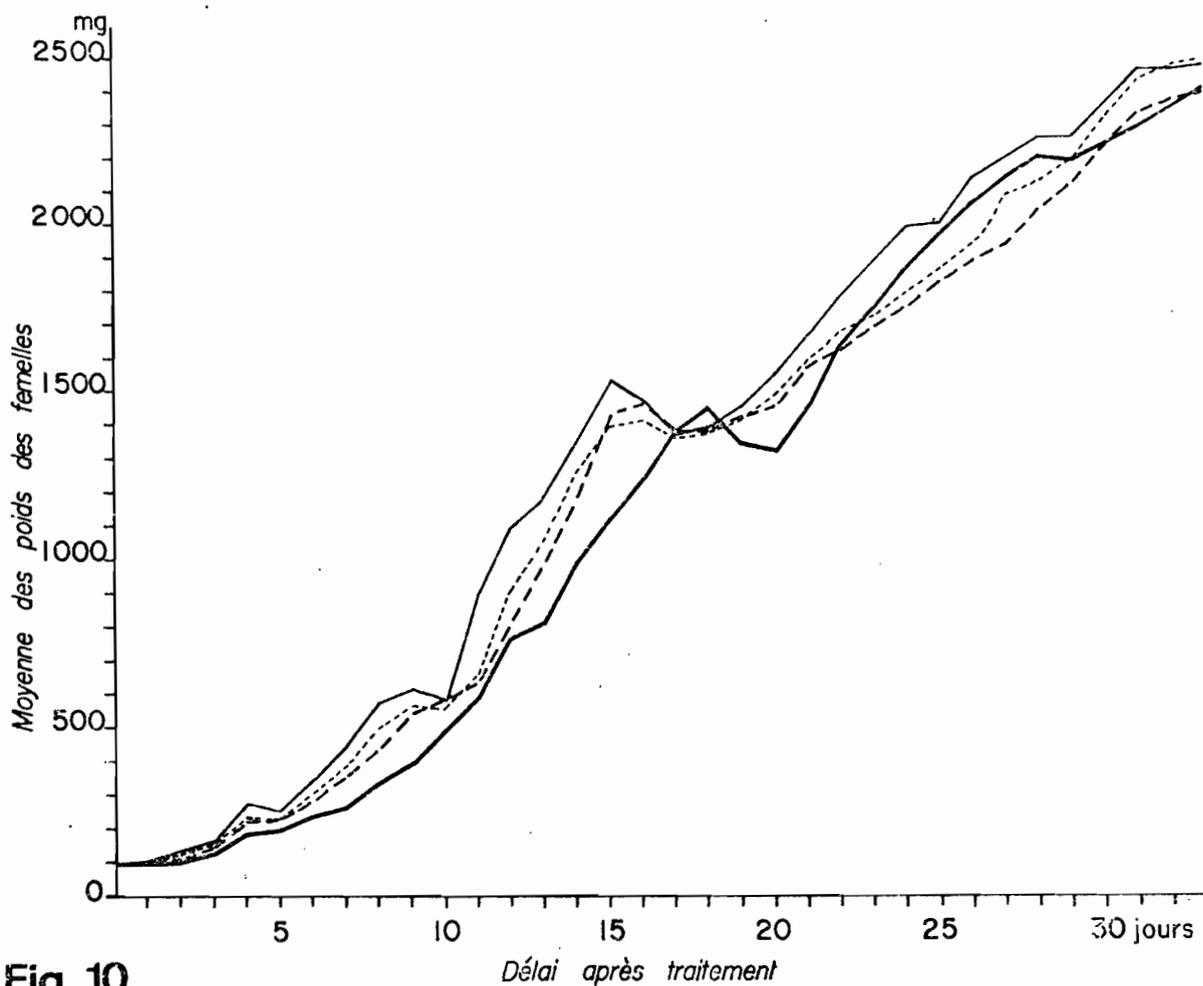


Fig. 10

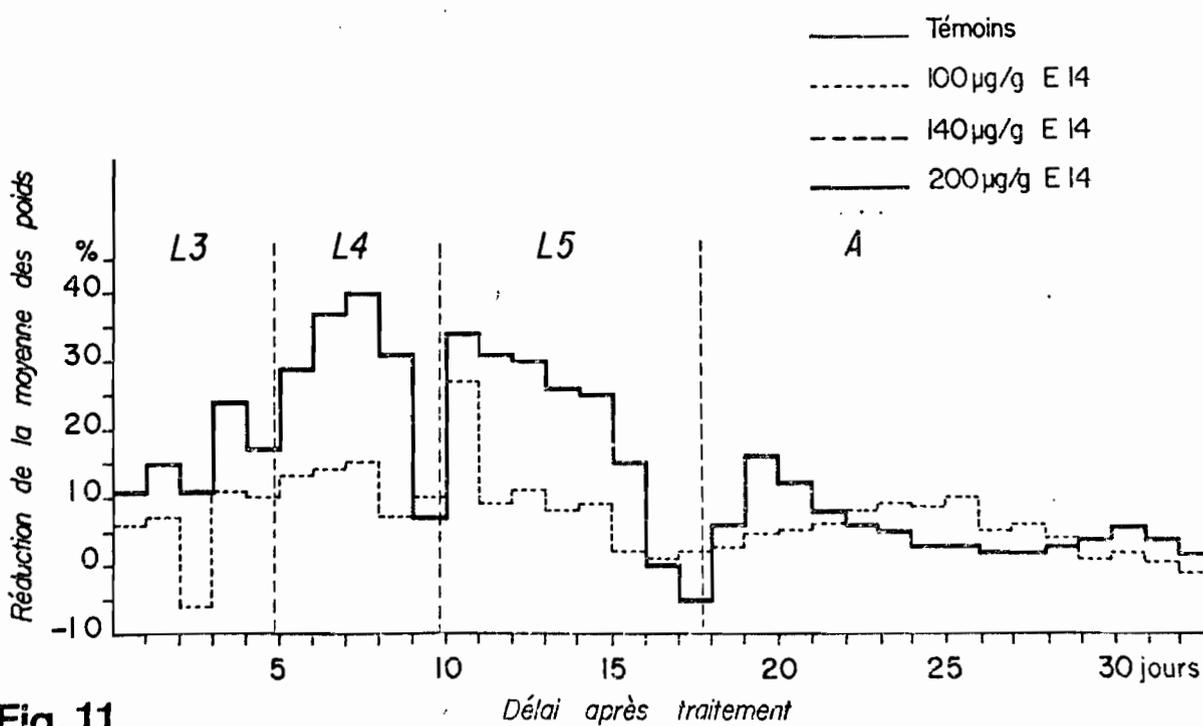


Fig. 11

T A B L E A U I V

Evolution pondérale du criquet migrateur après traitement par la toxine thermostable

Nb. de jours après éclosion	Nb. de jours après traitement	Femelles non traitées		Femelles traitées par l'éluat nucléotidique E 14 aux doses de					
				100 µg/g		140 µg/g		200 µg/g	
		Efficatif	Moyenne des poids en mg ± erreur-type	Efficatif	Moyenne des poids en mg ± erreur-type	Efficatif	Moyenne des poids en mg ± erreur-type	Efficatif	Moyenne des poids en mg ± erreur-type
7	0	24	95,0 ± 1,6	28	95,0 ± 1,6	21	95,0 ± 1,5	48	95,0 ± 1,6
9	2	23	140,6 ± 3,0	27	132,2 ± 3,4	20	131,7 ± 2,7	48	118,7 ± 5,6
12	5	22	257,8 ± 6,9	25	232,2 ± 6,7	20	239,2 ± 5,2	32	214,3 ± 9,2
13	6	22	355,6 ± 9,2	25	307,7 ± 12,0	19	296,2 ± 15,8	27	250,4 ± 14,8
14	7	22	450,2 ± 10,7	25	389,2 ± 13,2	19	363,7 ± 16,3	27	276,2 ± 20,2
15	8	22	582,4 ± 12,8	25	493,8 ± 18,7	19	450,8 ± 22,4	23	348,3 ± 28,9
16	9	22	618,0 ± 13,8	25	569,8 ± 20,0	19	549,2 ± 28,3	21	424,0 ± 30,4
19	12	22	994,9 ± 20,3	25	904,7 ± 31,8	19	818,7 ± 54,0	20	685,1 ± 53,4
20	13	22	1 190,8 ± 24,9	25	1 061,7 ± 39,6	17	1 004,6 ± 36,8	18	827,0 ± 68,7
21	14	22	1 376,0 ± 29,6	25	1 266,0 ± 35,1	17	1 192,0 ± 38,3	18	1 003,7 ± 76,6
22	15	22	1 544,0 ± 22,8	25	1 400,0 ± 44,5	17	1 440,0 ± 36,3	18	1 146,4 ± 73,8
23	16	22	1 482,0 ± 32,8	24	1 449,0 ± 34,6	17	1 452,0 ± 33,3	18	1 258,7 ± 50,1
26	19	21	1 457,7 ± 34,2	24	1 418,5 ± 35,6	17	1 414,9 ± 31,7	18	1 358,0 ± 65,8
28	21	21	1 683,0 ± 33,3	24	1 599,5 ± 42,3	17	1 581,8 ± 41,8	17	1 471,9 ± 82,7
29	22	21	1 789,6 ± 33,3	24	1 684,4 ± 40,8	17	1 634,9 ± 44,2	17	1 644,7 ± 79,8
30	23	21	1 839,6 ± 39,6	24	1 730,8 ± 41,6	17	1 702,4 ± 39,7	17	1 630,9 ± 71,3
35	28	21	2 264,7 ± 39,1	24	2 136,1 ± 31,5	17	2 076,8 ± 62,8	17	2 208,4 ± 76,7
36	29	21	2 261,2 ± 89,4	24	2 161,5 ± 43,8	17	2 130,9 ± 55,0	17	2 195,9 ± 77,0
38	31	21	2 460,8 ± 67,2	24	2 428,6 ± 52,8	17	2 329,7 ± 68,0	17	2 298,0 ± 73,2
40	33	21	2 470,4 ± 85,2	24	2 493,1 ± 72,5	17	2 391,4 ± 89,5	17	2 409,1 ± 78,0
44	37	21	2 396,0 ± 78,5	24	2 432,2 ± 75,7	17	2 358,0 ± 88,2	17	2 445,4 ± 91,8
48	41	20	2 274,5 ± 72,7	24	2 248,5 ± 55,5	14	2 220,6 ± 103,1	17	2 279,8 ± 75,8
51	44	19	2 412,4 ± 74,1	23	2 475,6 ± 70,8	14	2 363,4 ± 112,2	17	2 337,9 ± 80,5

de poids qui est de l'ordre de 10 % pour chaque individu ; ceci apparaît diversement, suivant les lots considérés, sur le tracé de la courbe représentant l'évolution de la moyenne des poids de l'ensemble des criquets.

a) Témoins.

Un freinage modéré de la croissance se traduit par une diminution passagère de la pente de la courbe ; celle-ci présente alors une inflexion dans la région correspondant à la date moyenne de la mue.

Un arrêt plus marqué de la croissance, tel que celui qui se produit à la mue imaginaire, se traduit par un renversement de la pente ; la courbe emprunte à ce moment un tracé nettement descendant ; elle passe par un minimum avant de redevenir ascendante dans la phase d'active croissance du début du nouveau stade.

b) Traités.

Chez les criquets traités par la toxine thermostable, le temps moyen d'apparition des mues (Tableau I) est plus tardif que chez les criquets non traités ; de plus, les exuviations des divers criquets d'un même lot traité s'effectuent de façon moins groupée ; elles s'échelonnent sur plus d'une journée ; il en résulte que lorsque l'on exécute la pesée journalière à la date qui correspond au temps moyen d'apparition d'une mue, il n'y a, dans un lot traité, qu'une proportion réduite d'insectes se trouvant simultanément, juste après l'exuviation, au minimum de leur poids.

Les autres insectes du lot traité sont, au moment de cette même pesée, soit en avance, soit en retard sur ce temps moyen, c'est-à-dire qu'ils peuvent avoir déjà repris leur alimentation et amorcé la croissance du nouveau stade, ou se trouver seulement en fin du stade précédent sans avoir encore subi les effets du jeûne qui accompagne la mue.

Les décalages qui s'observent ainsi entre les moments d'apparition des mues dans le même lot traité atténuent l'amplitude des effets que peuvent avoir sur la moyenne des poids de l'ensemble du lot les diminutions de poids subies au moment de leur exuviation par les différents individus qui constituent ce lot ; en conséquence, au moment des pesées qui correspondent aux périodes de mue (flèches verticales de la fig. 10), la moyenne des poids accuse, dans les lots traités, un fléchissement moins marqué et un peu plus tardif que celui que l'on observe au moment de chacune des mues du lot non traité.

Les courbes de l'évolution pondérale des lots traités présentent des inflexions moins profondes ; elles apparaissent plus tendues et moins flexueuses que celle du lot non traité.

2) Variation du poids du criquet en fonction de la dose ingérée

Le diagramme de la fig. 11 représente la variation du pourcentage de réduction de la moyenne des poids établie tous les jours à partir du moment du traitement pour les criquets femelles des lots traités par les doses de 100 et de 200 microgrammes du nucléotide E 14 ; cette réduction est calculée par rapport à la moyenne établie aux mêmes dates pour les poids des criquets témoins :

$$\text{Pourcentage de réduction de la moyenne des poids} = \frac{\text{moyenne des poids des criquets témoins} - \text{moyenne des poids des criquets traités}}{\text{moyenne des poids des criquets témoins}} \times 100 \%$$

Entre le 3^e et le 13^e jour après le traitement, la réduction moyenne des poids est de 10 à 15 % pour les criquets traités à la dose de 100 microgrammes et de 25 à 40 % pour les criquets traités à la dose de 200 microgrammes.

Sur le graphique de la fig. 12, nous représentons les moyennes des poids atteints par les criquets femelles au treizième jour qui suit l'ingestion de différentes doses de toxine, c'est-à-dire lorsque cessent les mortalités provoquées par la toxine ; nous calculons et traçons la droite de régression du poids des criquets sur la dose.

L'analyse de variance permet de conclure que la toxine thermostable produit un effet statistiquement significatif et que la variation du poids en fonction de la dose ne s'écarte pas significativement d'une ligne droite dans les limites des doses administrées.

3) Durée de l'effet inhibiteur

Pour établir sur quel intervalle de temps la toxine thermostable manifeste réellement un effet inhibiteur sur la croissance du criquet, nous comparons journellement (Tableau V), à partir du moment du traitement, les moyennes des poids entre un lot traité par une dose de 200 microgrammes du nucléotide E 14 par gramme d'insecte et un lot non traité.

On constate que les différences entre les moyennes des poids des criquets traités et celles des criquets témoins sont significatives à partir du deuxième jour qui suit le traitement ; la signification des différences est maximale entre le sixième et le neuvième jour ; elle diminue d'une façon assez régulière au cours des différents stades larvaires qui se succèdent après le traitement.

Après le seizième jour qui suit le traitement, les différences entre les moyennes des poids des criquets traités et celles des criquets non traités ne sont plus significatives.

Fig. 12 - Poids des femelles de Locusta migratoria migrato-
rioides 13 jours après ingestion de doses croissan-
tes de B.t.β- exotoxine au début de leur troisième
stade larvaire.

Régression du poids du criquet femelle sur la dose
de toxine ingérée.

ANALYSE DE VARIANCE

Analyse de la variance des données :

Origine	Somme des carrés	d. d. l.	Variance
entre doses	13.548	3	
résiduelle	28.047	78	359,6
Total	41.595	81	

Analyse de la variance entre doses :

Origine	Somme des carrés	d. d. l.	Variance
Régression linéaire	12.628,6	1	
Dévi- ation par rap- port à la droite	919,4	2	459,7
Entre doses	13.548,0	3	

$$F = \frac{459,7}{359,6} = 1,27 < F_{78}^2$$

Conclusion : hypothèse de linéarité admissible.

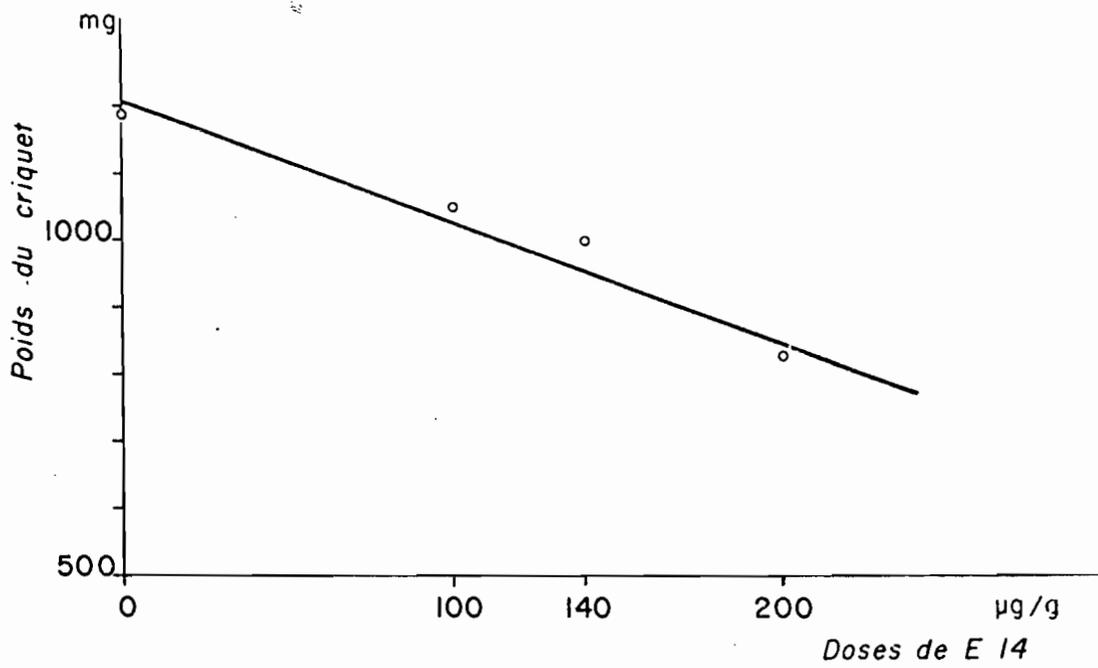


Fig. 12

T A B L E A U V

Comparaison des moyennes des poids des femelles témoins et des femelles traitées en début du 3^e stade larvaire par 200 µg de toxine (E 14)

Stades	Nombre de jours après		Lot témoin			Lot traité			test
	éclo-sion	trai-tement	Effec-tif	Moyenne des poids en mg ± erreur-type		Effec-tif	Moyenne des poids en mg ± erreur-type		
3 ^e stade larvaire	7	0	23	95,0 ± 1,6		48	95,0 ± 1,6		5,0
	9	2	23	140,6 ± 3,0		48	118,7 ± 3,4		
4 ^e stade larvaire	12	5	22	257,8 ± 6,9		32	214,3 ± 9,2		3,8
	13	6	22	355,6 ± 9,2		27	250,4 ± 14,8		6,2
	14	7	22	450,2 ± 10,7		27	276,2 ± 20,2		7,8
	15	8	22	582,4 ± 12,8		23	348,3 ± 28,9		7,5
5 ^e stade larvaire	19	12	22	994,9 ± 20,3		20	685,1 ± 53,4		5,6
	20	13	22	1 190,8 ± 24,9		18	827,0 ± 68,7		5,1
	21	14	22	1 376,0 ± 29,6		18	1 003,7 ± 76,6		4,7
	22	15	22	1 544,0 ± 22,8		18	1 146,4 ± 73,8		5,4
	23	16	22	1 481,7 ± 32,8		18	1 258,7 ± 50,1		3,8
stade adulte immature	26	19	21	1 457,0 ± 34,2		18	1 358,0 ± 65,8		1,4
	29	22	21	1 789,6 ± 33,3		17	1 644,2 ± 79,8		1,7
	35	28	21	2 264,7 ± 39,1		17	2 208,4 ± 76,7		0,7
période de ponte	38	31	21	2 460,8 ± 67,2		17	2 298,0 ± 73,2		1,7
	40	33	21	2 470,4 ± 85,2		17	2 409,1 ± 78,0		0,5
	44	37	21	2 396,0 ± 78,5		17	2 445,4 ± 91,8		0,4

B - VARIATIONS DE L'ACTIVITE DE PRISE DE NOURRITURE ET EVOLU-
TION PONDERALE CONCOMITANTE CHEZ DES CRIQUETS SOUMIS
A LA TEMPERATURE CONSTANTE DE 30° C

En apportant à notre dispositif expérimental les modifications décrites aux paragraphes III A1b et III B2, nous suivons simultanément les variations de l'activité de prise de nourriture des criquets et l'évolution pondérale concomitante. Nous contrôlons la croissance des criquets individu par individu et nous procédons à leur pesée quotidienne un nombre double de fois entre deux mues successives ; nous pouvons ainsi observer de façon plus suivie comment fluctue le poids des criquets à l'intérieur de chacun des stades larvaires qui succèdent au traitement.

1) Témoins

Nous représentons en fig. 19 et 20 l'évolution de la consommation journalière moyenne de feuilles fraîches de blé et les augmentations journalières de la moyenne des poids des criquets femelles dans un lot témoin.

Chaque fois que les criquets passent d'un stade au suivant, il y a arrêt de la prise de nourriture ; au moment de chaque mue, la courbe de consommation journalière est alors entaillée d'une profonde dépression.

Lorsque le criquet reprend son alimentation, la consommation journalière croît jusqu'à un certain niveau.

Après s'être maintenue quelques temps sans grandes variations aux alentours de ce niveau, la consommation retombe brusquement au dernier jour du stade.

Dans l'un et l'autre des deux derniers stades larvaires, la consommation journalière se stabilise à peu près, au niveau maximum observé dans le stade, pendant 5 à 8 jours, c'est-à-dire pendant plus de la moitié de la durée de ces stades.

Fig. 13 - Consommation journalière de blé vert par criquet femelle non traité (t = 30° C).

Consommation totalisée par stade	:	Moyenne \pm erreur-type
au cours du 3 ^e stade larvaire	:	1 860 \pm 77,1 mg
" 4 ^e "	:	3 946 \pm 147,1 mg
" 5 ^e "	:	13 800 \pm 733,0 mg

Fig. 14 - Accroissements journaliers de la moyenne des poids des criquets femelles non traitées (t = 30° C).

Accroissements totalisés par stade	:	Moyenne \pm erreur-type
au cours du 3 ^e stade larvaire	:	152,9 \pm 6,89 mg
" 4 ^e "	:	235,1 \pm 24,28 mg
" 5 ^e "	:	789,3 \pm 50,20 mg

Fig. 15 - Consommation journalière de blé vert par criquet femelle après traitement à la 2^e mue par 120 µg/g du nucléotide E 14 (t = 30° C).

Consommation totalisée par stade	:	Moyenne \pm erreur-type
au cours du 3 ^e , stade larvaire	:	1 860 \pm 69,8 mg
" 4 ^e "	:	3 958 \pm 185,6 mg
" 5 ^e "	:	13 725 \pm 661,5 mg

Fig. 16 - Accroissements journaliers de la moyenne des poids des criquets femelles traités à la 2^e mue par 120 µg/g du nucléotide E 14 (t = 30° C)

Accroissements totalisés par stade	:	Moyenne \pm erreur-type
au cours du 3 ^e stade larvaire	:	146,2 \pm 5,05 mg
" 4 ^e "	:	219,4 \pm 27,81 mg
" 5 ^e "	:	897,5 \pm 43,24 mg

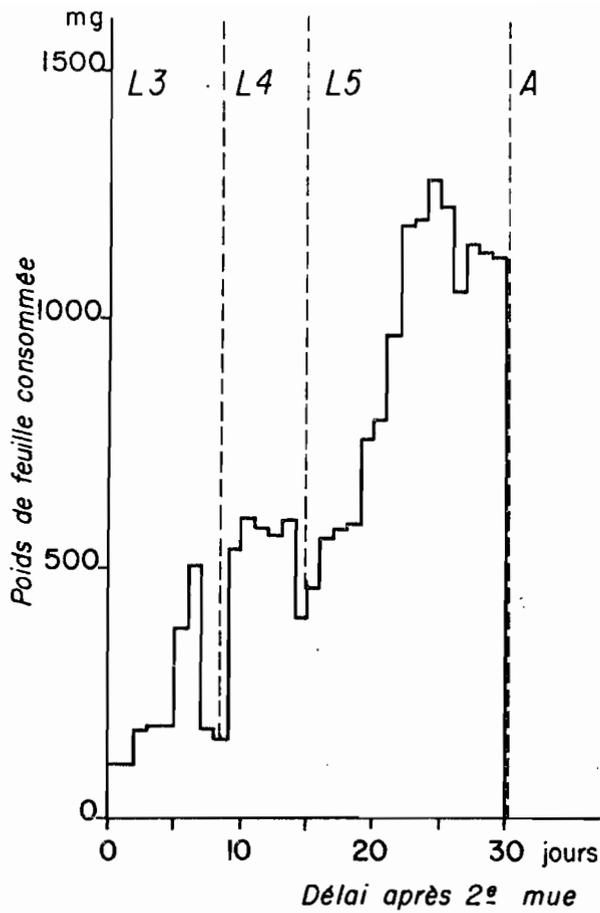


Fig. 13

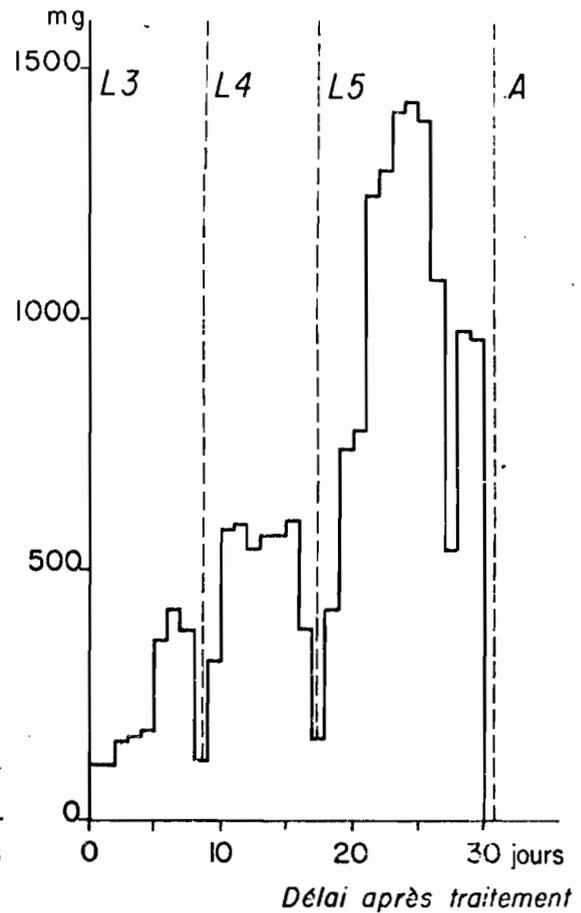


Fig. 15

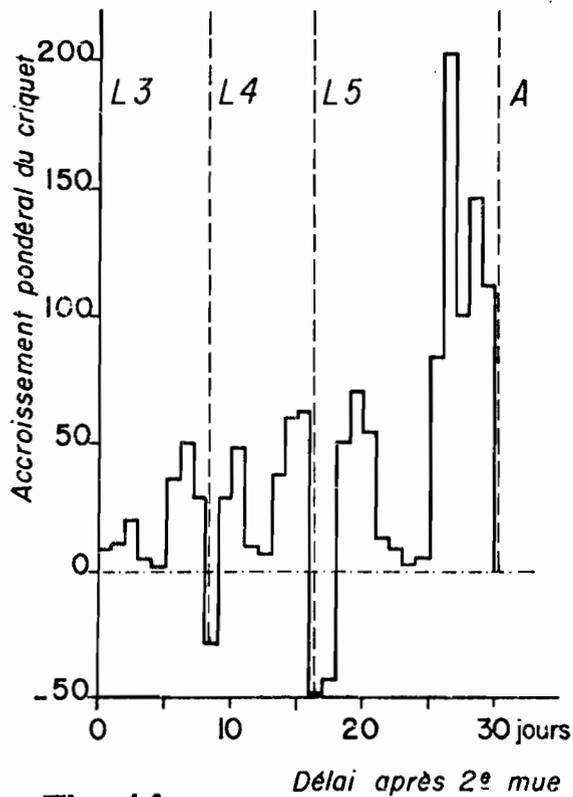


Fig. 14

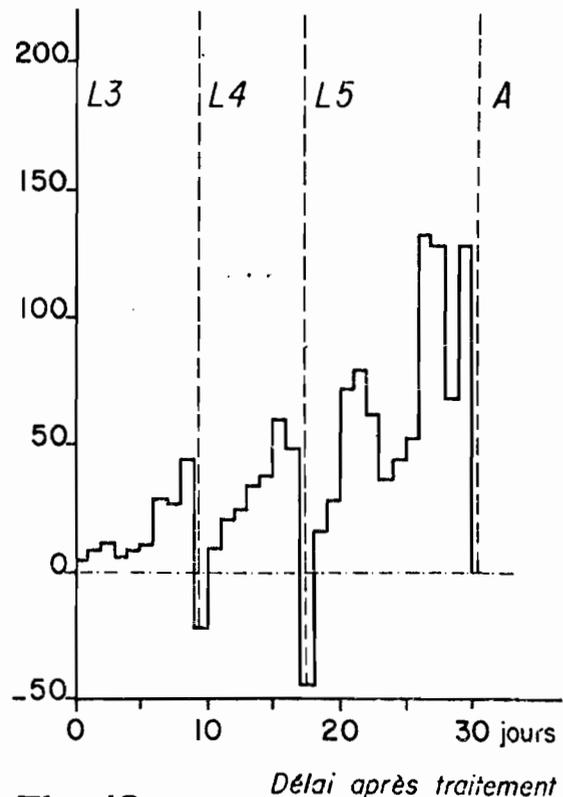


Fig. 16

La courbe de consommation journalière a, ainsi, une allure beaucoup plus régulière et moins heurtée que celles des accroissements pondéraux des criquets ; notamment, aux deux instants bien précis du stade (3^e jour du stade et fin du stade) où survient une soudaine, brève et très forte augmentation du poids de l'insecte, on ne remarque, sur la courbe des consommations journalières, aucune exaltation momentanée de la consommation qui coïnciderait manifestement avec l'un et l'autre des deux pics qui hérissent, à chaque stade, la courbe de l'évolution pondérale du criquet (fig. 20).

2) Traités

- a) Infirmité d'une action directe de la toxine sur la prise de nourriture.

En relevant les moyennes des poids de feuille fraîche de blé journallement ingérée par les criquets femelles qui ont été traités en début de leur troisième stade larvaire par 120 microgrammes par gramme de nucléotide E 14, on obtient un diagramme (fig. 21) de forme très voisine de celle du diagramme de la consommation des criquets non traités (fig. 19).

En regard de l'une et l'autre de ces courbes, nous indiquons les moyennes des quantités totales de matière verte consommée au cours de chacun des trois derniers stades larvaires par les criquets appartenant à l'un et l'autre lot ; quel que soit le stade larvaire pour lequel est faite la comparaison, il n'y a pas de différence significative entre la moyenne des poids de feuille ingérée durant tout le stade par les criquets traités et la moyenne des poids de feuille consommée au cours du même stade par les criquets non traités. Il n'y a donc aucune action directe de la toxine sur la prise de nourriture.

b) Situation chronologique de l'activité inhibitrice de la toxine dans le cours du développement cyclique du criquet.

On a vu que la croissance des insectes non traités démarre, après chaque mue, de façon très accélérée ; les augmentations journalières de la moyenne des poids passent par un premier maximum vers le troisième jour du stade ; la croissance ralentit ensuite, puis s'accélère à nouveau pour atteindre enfin un deuxième maximum juste avant la fin du stade (fig. 20).

Nous nous apercevons, par contre, que le diagramme de la croissance pondérale journalière des criquets traités (fig. 22) est radicalement différent : nous n'observons plus, chez les insectes qui ont ingéré la toxine, la brusque poussée de croissance qui, en absence de traitement, se produit au début de chaque stade ; dans la première moitié des stades larvaires qui succèdent au traitement, les accroissements journaliers de la moyenne des poids des criquets traités n'augmentent, en effet, que de façon assez progressive.

Dans la deuxième moitié de l'intermue, l'action inhibitrice de la toxine paraît suspendue ; après le tassement de la croissance observée dans la première moitié du stade chez les criquets traités, les augmentations journalières de leur poids rattrapent celles que l'on enregistre chez les criquets témoins ; elles passent par un unique maximum avant la diminution brutale qui précède l'exuviation en fin de stade.

L'effet inhibiteur de la toxine ne se manifeste donc distinctement qu'entre le moment où s'achève la croissance du criquet en fin de stade et le milieu de stade larvaire suivant. Plus précisément, l'action inhibitrice semblerait intéresser tout spécialement la période correspondant, chez les criquets témoins, à la croissance intense qui marque la première moitié du stade, c'est-à-dire à une époque où l'anabolisme prédomine nettement.

A la dose relativement faible de 120 microgrammes de matière active, on voit que l'action inhibitrice de la toxine s'exerce nettement sur les troisième et quatrième stades larvaires ; par contre, au cinquième stade, le diagramme des accroissements pondéraux journaliers (fig. 22) reprend la forme typique du lot non traité (fig. 20), caractérisé par les deux pointes d'activité qui surgissent en début et fin de stade.

c) Accélération compensatrice de la croissance en fin d'inhibition.

Nous donnons en regard des diagrammes (fig. 20 et 22) les valeurs des accroissements pondéraux journaliers totalisés pour chacun des trois derniers stades larvaires ; nous constatons que le gain de poids du criquet entre le quatrième et le cinquième stades est plus important dans le lot des insectes traités que dans le lot des insectes non traités.

Nous avons déjà vu dans le cas du traitement à la dose de 200 microgrammes dont les résultats ont été analysés dans le tableau V que pendant une certaine période (16 jours) succédant au traitement, la moyenne des poids des criquets traités se montre nettement inférieure à la moyenne calculée pour les insectes témoins ; ces moyennes, prises à date déterminée simultanément pour les lots traités et les lots témoins, finissent, au bout d'un certain temps, par ne plus présenter de différence significative.

Après un traitement de 120 microgrammes, la croissance subit un effet de freinage dans les deux premiers stades qui suivent le traitement. Au contraire, dans le troisième stade succédant au traitement, elle s'accélère par rapport à la croissance du lot témoin ; cette accélération tardive compense le ralentissement antérieur et permet au criquet de récupérer un poids normal.

4 - FECONDITE ET FERTILITE DES CRIQUETS

Lorsque la toxine thermostable est ingérée à des doses suffisantes au cours de la vie larvaire, son action sur le développement du criquet se manifeste sur la totalité des stades larvaires qui succèdent au traitement ; cependant, au moment de la mue imaginale, l'effet dépressif de la toxine sur la croissance s'atténue considérablement et, avant que le criquet soit parvenu à la maturité sexuelle, il n'est plus possible de mettre en évidence aucune incidence du traitement sur l'évolution pondérale de l'adulte.

On peut se demander, néanmoins, si l'action exercée par la toxine sur le criquet au cours de sa vie larvaire ne serait pas susceptible d'avoir des répercussions sur l'état physiologique de l'insecte adulte et plus particulièrement sur la reproduction.

Nous donnons au tableau VI l'exemple d'un contrôle de fécondité et de fertilité effectué sur les femelles des quatre lots d'un même essai comprenant respectivement des criquets témoins et des criquets ayant ingéré, 7 jours après leur éclosion (c'est-à-dire en début de leur troisième stade larvaire), 100, 140 et 200 microgrammes du nucléotide E 14 par gramme du poids de leur corps.

Les trois premiers lots sont constitués, au moment du traitement, d'un effectif de 24 à 28 femelles chacun et d'un effectif de criquets mâles de même importance. La dose de 200 µg/g ayant donné dans un essai préliminaire de très fortes mortalités, le lot destiné à l'essai de cette dose est constitué par des effectifs mâle et femelle doubles de ceux des autres lots.

A la suite des mortalités naturelles survenues en cours

Fig. 17 - Evolution de la ponte et de la mortalité en période de ponte chez les criquets femelles traités au début de leur troisième stade larvaire par la B.t. β - exotoxine :

Echelle sur l'axe des ordonnées de gauche :
Pourcentage de survie des femelles.

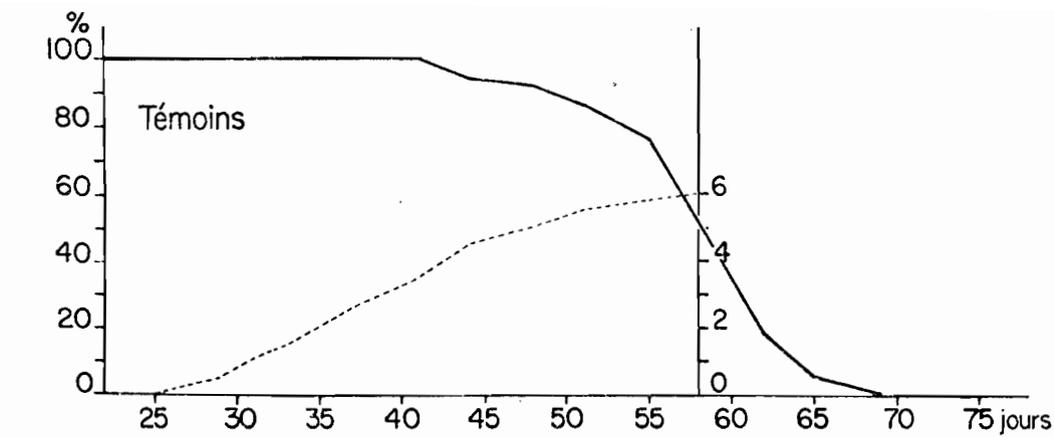
Echelle sur l'axe des ordonnées de droite :
Nombre moyen d'oothèques pondues par femelle depuis le début de la ponte.

a - Lot témoin.

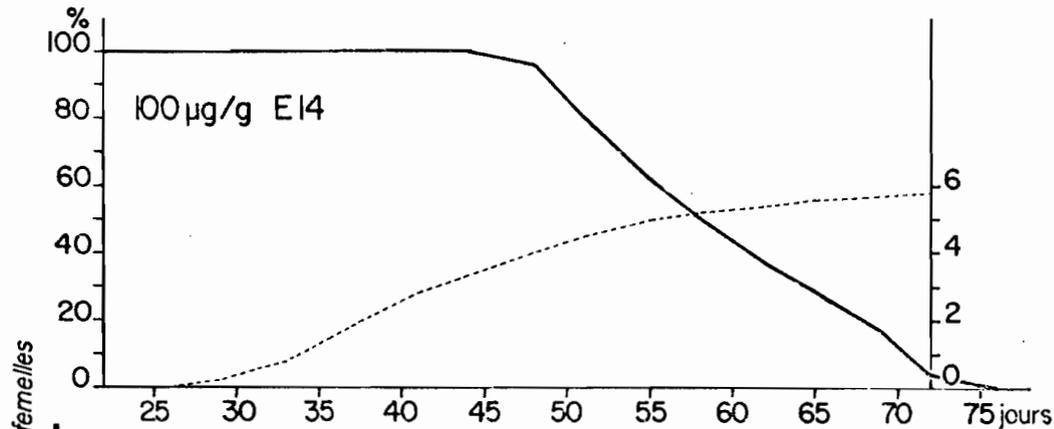
b - Lot traité par 100 $\mu\text{g/g}$ du nucléotide E 14.

c - Lot traité par 140 $\mu\text{g/g}$ du nucléotide E 14.

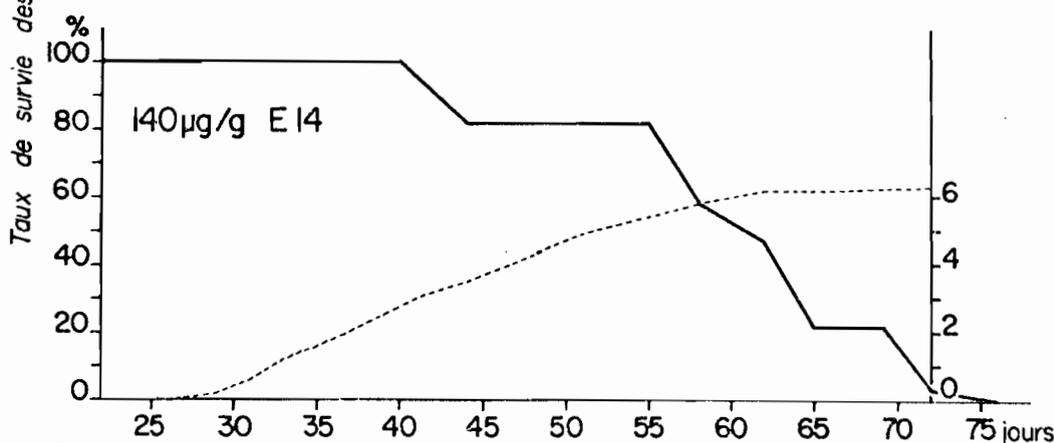
d - Lot traité par 200 $\mu\text{g/g}$ du nucléotide E 14.



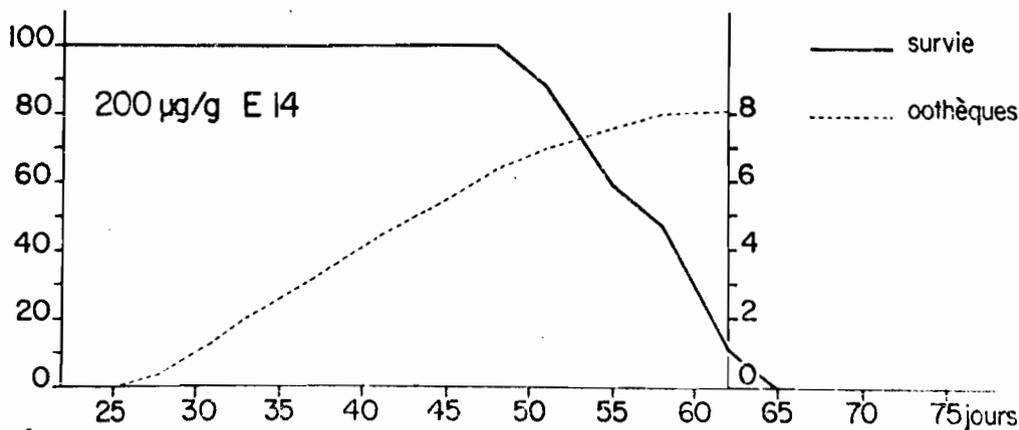
a



b



c



d

Nombre moyen d'oothèques pondues par femelle depuis le début de la ponte

Décali après traitement

Fig. 17

T A B L E A U VI

=====

Nombre d'oothèques et d'éclosions obtenues à partir de criquets migra-
teurs traités par la toxine thermostable en début de leur troisième
stade larvaire.

	Lot té- moin	Lots traités par le nu- cléotide E 14 en début du 3 ^e stade larvaire (7 jours après après l'é- closion		
		100 µg	140 µg	200 µg
Dose de nucléotide ingérée par gramme d'insecte	0	100 µg	140 µg	200 µg
Effectif des femelles (L3) au moment du traite- ment	24	28	24	48
Effectif des femelles en début des pontes	21	24	17	17
Durée moyenne du temps de ponte (en jours)	30,6 j	32,4 j	30,1 j	26,9 j
Nombre total d'oothèques pondues	127	138	107	137
Nombre total d'oothèques pondues par femelle (femelle en vie au début des pontes)	6,05	5,75	6,29	8,06
Cadence de ponte : Intervalle moyen de temps (en jours) entre 2 pontes successives	5,06j	5,63j	4,78j	3,34j
Nombre moyen d'oothèques pondues dans la même journée par lot de 100 femelles	19,78	17,76	20,94	29,98
Nombre total de larves écloses à partir de tou- tes les oothèques pondues par l'ensemble des femelles du lot	4 300	4 482	4 142	6 159
Nombre moyen de larves écloses par femelle (femelle en vie au début des pontes)	204,8	186,8	243,6	362,3
Nombre moyen de larves écloses par oothèque pondue	33,9	32,5	38,7	45,0

de vie larvaire et de l'action insecticide du nucléotide ingéré, les nombres des femelles survivantes de ces divers lots sont, en début des pontes, compris entre 17 et 24.

Nous représentons en fig. 26 l'évolution du pourcentage de survie de ces femelles au cours de la période de ponte ainsi que la moyenne des pontes cumulées p.r femelle ; la ponte cumulée moyenne d'un lot à une date donnée est le rapport :

Nombre total d'oothèques pondues dans le lot entre le début de la ponte et la date donnée

Effectif des femelles survivant en début des pontes dans le lot

La durée moyenne des temps de ponte, calculée pour les femelles des différents lots, varie de 27 à 32 jours, la moyenne la plus basse étant celle de la période de ponte des femelles traitées par la dose de 200 microgrammes.

La cadence de ponte est représentée de façon plus précise par la courbe de la fig. 27 représentant l'évolution des pontes journalières moyennes dans les différents lots. Pendant trois semaines consécutives, dans le lot traité par la dose de 200 microgrammes, la ponte journalière se maintient d'une façon très constante à un niveau supérieur d'environ 50 % à celui des pontes des autres lots ; la cadence de ponte de la femelle traitée par la plus forte dose est environ d'une oothèque tous les trois jours un tiers tandis qu'elle est d'une oothèque tous les cinq jours par femelle des lots témoin ou traités aux doses plus faibles.

La production totale moyenne d'oothèques est, pour ces derniers lots, d'environ six oothèques par femelle; elle est de 8 oothèques par femelle pour le lot traité par la dose de 200 microgrammes.

L'évolution de la fertilité des femelles des différents lots est représentée fig. 28. Les premières oothèques pondues donnent chacune naissance à environ 70 larves ; le nombre de

Fig. 18 - Evolution de la fécondité des criquets traités au début de leur troisième stade larvaire par la B.t. β -exotoxine :

Pontes journalières exprimées en nombre moyen d'oothèques pondues dans la journée par 100 femelles =

$$\frac{\text{Nombre d'oothèques pondues entre le jour du contrôle et le jour précédent}}{\text{Nombre de femelles vivantes à la date du contrôle}} \times 100$$

a - Lot témoin.

b - Lot traité par 100 $\mu\text{g/g}$ du nucléotide E 14.

c - Lot traité par 140 $\mu\text{g/g}$ du nucléotide E 14.

d - Lot traité par 200 $\mu\text{g/g}$ du nucléotide E 14.

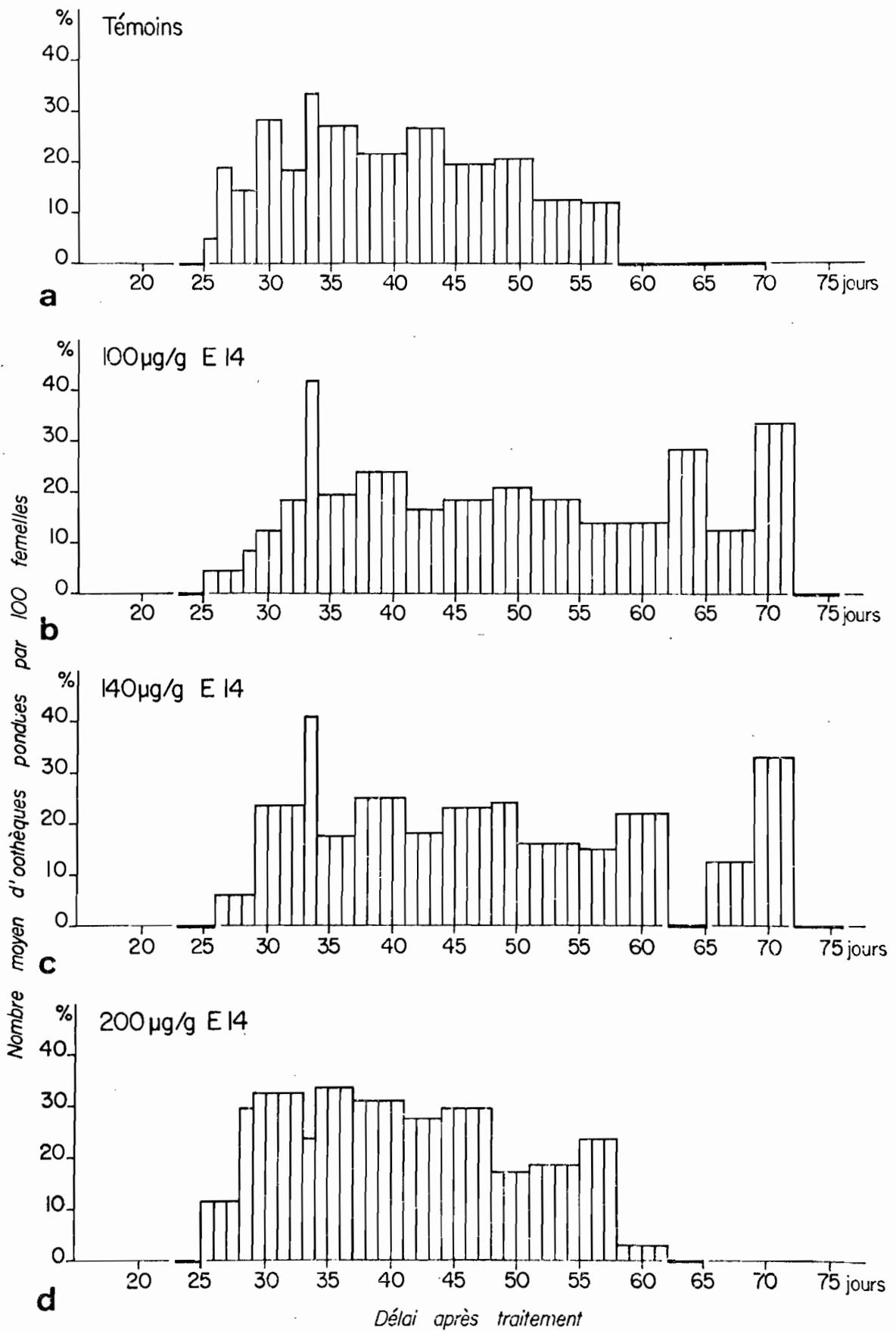


Fig. 18

larves qui éclosent à partir des oothèques pondues par les suite diminue plus ou moins graduellement ; au bout de 9 à 10 jours et pendant environ 3 semaines consécutives, la moyenne des éclosions oscille entre 30 et 40 par oothèques dans le lot témoin et dans le lot traité par la dose de 100 microgrammes de nucléotide ; la moyenne des éclosions se tient entre 40 et 50 éclosions par oothèque pour les pontes effectuées pendant 2 semaines consécutives dans le lot traité par la dose de 140 microgrammes et pendant 3 semaines dans le lot traité par la dose de 200 microgrammes.

Si l'on fait le rapport entre le nombre total de larves écloses à partir de toutes les oothèques pondues par les femelles du lot et le nombre de femelles qui se trouvent en vie lorsque commencent les pontes, on obtient pour le lot témoin et les lots traités par les doses de 100 et 140 microgrammes les moyennes respectives de 205, 187 et 244 éclosions par femelle ; pour le lot traité par la dose de 200 microgrammes la moyenne est de 362 éclosions par femelle ; l'excédent que représente cette moyenne par rapport aux éclosions des autres lots est respectivement de 75 %, 100 % et 50 % des moyennes précédentes.

David et Vago (1967) ont montré que l'ingestion d'un extrait concentré de surnageant par les drosophiles dans le stade adulte provoquent une nette diminution de leur ponte ; Van Herrewege (1969) a établi que cette réduction de ponte est proportionnelle à la concentration et que, de plus, la toxine diminue le pourcentage d'éclosion des oeufs.

En traitant les criquets vers le milieu de leur vie larvaire avec des doses qui perturbent leur développement jusqu'au début de la vie imaginale, nous obtenons des résultats opposés qui semblent mettre en cause le moment auquel la toxine est administrée. Ceci serait à rapprocher de certaines observations que Carlisle et Ellis (1967) ont faites en uti-

Fig. 19 - Evolution de la fertilité des criquets traités au début de leur troisième stade larvaire par B.t. β - exotoxine :

Nombre moyen de larves écloses par oothèque.

a - Lot témoin.

b - Lot traité par 100 $\mu\text{g/g}$ du nucléotide E 14.

c - Lot traité par 140 $\mu\text{g/g}$ du nucléotide E 14.

d - Lot traité par 200 $\mu\text{g/g}$ du nucléotide E 14.

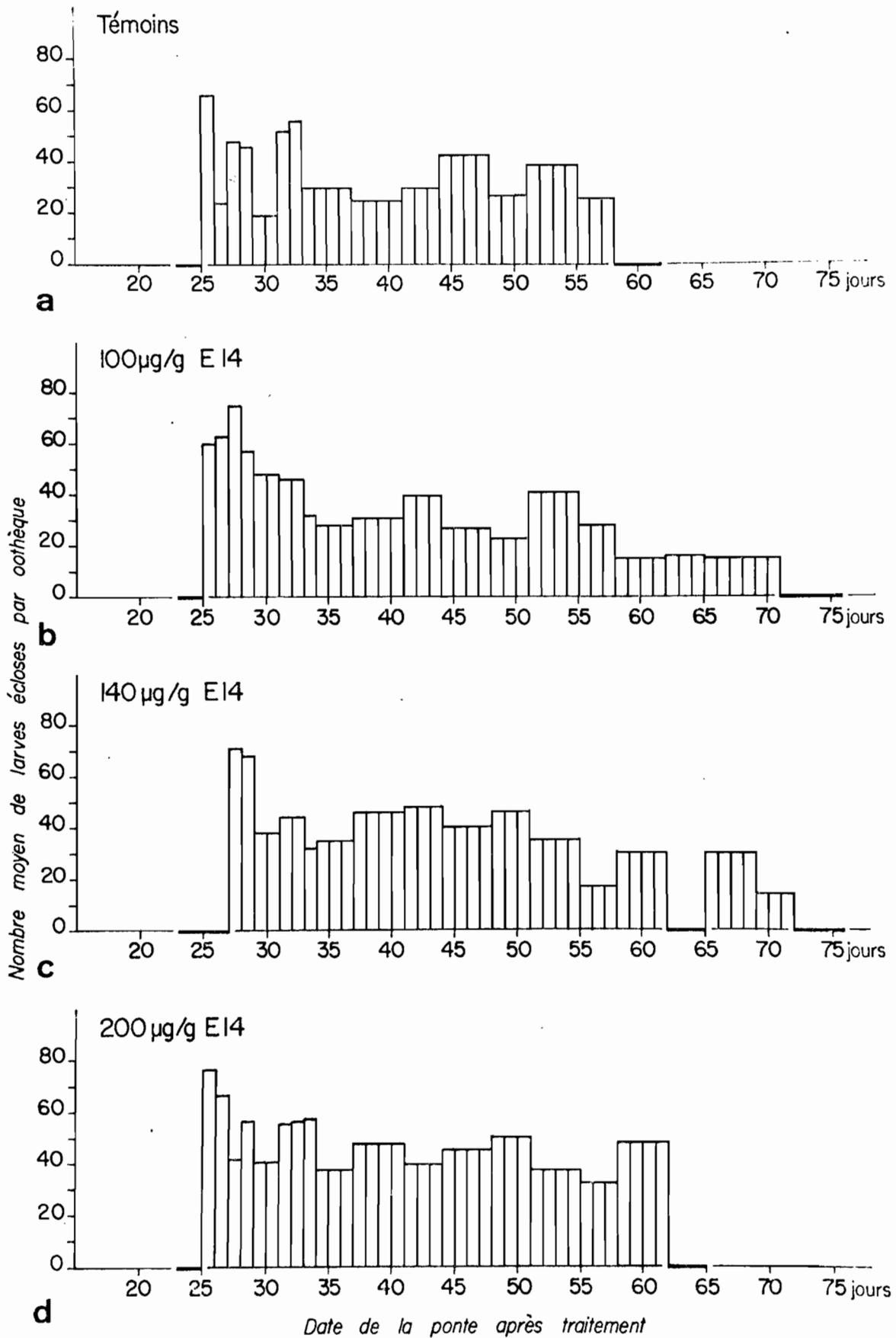


Fig. 19

lisant d'autres substances perturbant également le développement de l'insecte ; en appliquant à certains moments de la vie de l'insecte certaines doses de mimétiques de l'hormone juvénile, ils constatent, en effet, un raccourcissement du délai de maturation et un accroissement du nombre des oeufs pondus chez des Pyrrhocoridae.

DISCUSSION

=====

INTERPRETATIONS POSSIBLES DU MECANISME D'ACTION ET DEGRE DE SPECIFICITE DE LA TOXINE

I - RAPPEL SOMMAIRE DU CARACTERE CYCLIQUE DE L'ACTIVITE INHIBITRICE DE LA TOXINE

La B.t. β - exotoxine se montre nettement inhibitrice aux alentours de chacune des mues, plus précisément entre le moment où le criquet, au terme de sa croissance dans un stade, cesse de se nourrir et le milieu de l'intermue suivant ; l'activité de la toxine apparaît ainsi liée au déroulement cyclique des événements qui, sous le contrôle de sécrétions hormonales, permettent au criquet de passer d'un stade au stade suivant.

A chaque mue, ces sécrétions hormonales ont la propriété de mettre tout spécialement en fonctionnement au niveau du noyau des cellules épidermiques, selon une séquence bien déterminée, un ensemble de gènes commandant la synthèse des enzymes responsables des différenciations tégumentaires qui donnent à l'insecte, après la mue, les caractères distinctifs du nouveau stade (Beermann, 1966) ; aussi, toute inhibition dans la synthèse de ces sécrétions hormonales ou de ces enzymes ne peut-elle qu'entraîner un retard de la mue ; le retard avec lequel s'effectue l'exuviation des criquets traités par la B.t. β - exotoxine pourrait s'expliquer par un effet inhibiteur qu'exercerait la toxine sur des biosynthèses impliquées dans la mise en place et la croissance préecdysiale de la nouvelle cuticule.

Les cellules épidermiques de la paroi du corps du criquet continuent pendant un certain temps après le rejet de l'exuvie à sécréter, sous la cuticule déposée avant la mue, de nouvelles couches d'endocuticule.

Nous avons vu que, lorsqu'il se rapporte à des lots de criquets témoins, le diagramme des accroissements journaliers de la moyenne des poids (fig. 14) présente deux maxima par intermue ; le premier maximum observé en l'absence de traitement coïncide avec la brève croissance post-ecdysiale de la cuticule.

Or, sur le diagramme des accroissements pondéraux journaliers établi pour les insectes qui ont ingéré la toxine (fig. 16), on n'observe plus la première pointe d'activité qui correspondait, chez les criquets non traités, à la croissance accélérée de leur cuticule dans les premiers jours qui suivent leur exuviation ; il apparaît ainsi que l'action inhibitrice de la toxine qui a retardé la mue du criquet se poursuit encore quelque temps au-delà de l'exuviation ; elle semble s'exercer aussi bien sur la croissance post-ecdysiale du nouveau tégument que sur sa croissance pré-ecdysiale.

II - DONNEES BIOCHIMIQUES SUR L'INHIBITION

L'action de la B.t. β - exotoxine a été rapprochée de celle d'antimétabolites inhibiteurs des synthèses nucléiques ou protéiniques tels que les analogues des purines, pyrimidines, nucléosides et nucléotides (Benz, 1966) et de l'acide folique (Burgerjon et Biache, 1967) ; on a mis en évidence, sur des insectes, l'activité inhibitrice de la 6-mercaptopurine et du 5-fluoro-uracile (Perry et Miller, 1965), de l'acide 5-fluoro-orotique (La Brecque, 1943), de la puromycine (Kroeger et Lezzi, 1966), de l'aminoptérine (Perry et Miller, 1965 - David, 1966) etc...

On a pu, dans certains cas, déterminer quelles sont, dans le cours des synthèses nucléiques ou protéiniques, les étapes auxquelles interviennent ces inhibiteurs (Mahler et Cordes, 1967) ; c'est ainsi que l'aminoptérine et la 6-mercaptapurine inhibent la synthèse de précurseurs d'ADN ou d'ARN : acides adénylique, guanylique ou thymidylrique ; le 5-fluoro-uracile et l'acide fluoro-orotique s'incorporent à l'ARN et adultèrent les protéines formées; la puromycine bloque, au niveau du ribosome, l'incorporation des acides aminés à la chaîne polypeptidique en formation

La nature et le mode d'action de la B.t.β- exotoxine ont été élucidés par Šebesta, Horská et Vanková (1968). Ces auteurs identifient la toxine à un analogue de nucléotide de l'adénine ; ils établissent qu'elle n'agit ni sur la synthèse de l'ADN, ni sur celle des protéines, mais sur la synthèse de l'ARN. L'inhibition porte surtout sur la synthèse de l'ARN messenger ; elle a lieu à l'étape de la polymérisation des ribonucléosides-triphosphates.

L'ARN-polymérase est inhibée par l'exotoxine ; mais cette inhibition est partiellement levée lorsque le milieu dans lequel se trouvent en présence l'une de l'autre l'enzyme et la toxine a une teneur en adénosine triphosphate (ATP) très nettement supérieure à celles des triphosphates de guanosine, de cytosine et d'uridine ; l'inhibition exercée par l'exotoxine sur la synthèse de l'ARN n'est renversée par un excès d'aucun des trois derniers nucléotides ; c'est exclusivement l'ATP qui entre en compétition avec l'exotoxine ; celle-ci montre pour l'enzyme une affinité au moins égale à celle de l'ATP (Šebesta et Horská, 1969).

III - PROCESSUS BIOLOGIQUES INHIBES CHEZ LE CRIQUET PAR LA TOXINE

Les périodes du cycle de développement du criquet au cours desquelles intervient activement la β -exotoxine de Bacillus thuringiensis sont précisément celles où le criquet se dote en très peu de temps de tout le nouvel assortiment des enzymes nécessaires à la catalyse des réactions qui se succèdent très rapidement dans les processus de remaniement et de différenciation aboutissant à la réalisation du nouveau stade.

La formation de chacune de ces enzymes exige la synthèse préalable d'un ARN particulier ; on peut supposer que l'activité inhibitrice de la toxine s'exerce sur cette intense synthèse des ARN messagers qui commandent, aux alentours de chaque mue, le renouvellement de l'équipement enzymatique impliqué dans la morphogénèse du nouveau tégument.

On peut envisager également que la toxine perturbe aussi la synthèse des peptides et des protéines intervenant très peu de temps après chaque mue durant la "période critique" dans le mécanisme endocrine qui déclenche la mue suivante ; l'inhibition de la synthèse de ces hormones peptidiques ou protéiques dans la phase initiale du mécanisme endocrine peut entraîner un retard dans le déroulement chronologique de tout le mécanisme (BERREUR, 1971).

Les époques auxquelles la toxine se manifeste par un effet inhibiteur dans le cours de l'évolution cyclique du développement larvaire du criquet sont, de plus, celles où se produit une très forte consommation d'ATP.

Une partie de l'ATP utilisé intervient dans l'activité nerveuse et musculaire du criquet, notamment au moment de l'exuviation où se produit une longue série de violentes con-

tractions de la musculature abdominale.

Cependant, il y a surtout grande consommation d'ATP dans les activations et les phosphorylations de nucléosides, d'acides aminés et de sucres au cours des biosynthèses d'acides nucléiques, d'enzymes et autres protéines, de polysaccharides et des divers autres constituants du tégument qui ont lieu pendant les croissances pré-ecdysiale et post-ecdysiale, à une époque où le criquet a interrompu toute prise de nourriture. A ce moment, les réserves du criquet s'amenuisent en raison de l'arrêt de son alimentation et de l'intensité des biosynthèses engagées.

De plus, ainsi que Bouques et Berreur (1969) l'ont montré chez Calliphora, les échanges respiratoires sont peu intenses ou même absente au moment de la mue et ceci se répercute sur le pool d'ATP qui diminue de façon importante pendant cette période.

On peut alors supposer que la concentration de l'ATP au niveau des noyaux des cellules synthétisant l'ARN devient insuffisante pour que cet ATP puisse entrer avantageusement en compétition, chez le criquet traité avec la B.t. β - exotoxine, et lever l'inhibition que cette toxine exerce sur l'ARN-polymérase.

IV - PROCESSUS DE RECUPERATION ET DE DETOXICATION

Alors que l'épiderme de la paroi du corps et la musculature intersegmentaire croissent de façon intermittente en suivant les variations cycliques des sécrétions hormonales de la mue, l'ensemble des autres tissus du criquet croît d'une façon continue (Halbwachs et Joly, 1957 - Staal et de Wilde, 1962) en fonction des disponibilités de l'organisme en maté-

rioux alimentaires. Une telle continuité dans la croissance implique dans ces tissus des processus biochimiques assez constants ne nécessitant pas, au long des stades successifs, de renouvellements importants de l'équipement enzymatique ni, par conséquent, d'intenses synthèses préalables d'ARN ; si la toxine n'intervient que sur les étapes du développement comportant d'importantes synthèses d'ARN, elle n'exercera pas d'action inhibitrice notable sur l'évolution de tissus tels que ceux de la musculature du vol et de la marche, le corps gras et même l'épiderme des ébauches alaires qui croissent d'une façon ininterrompue tant que l'insecte s'alimente.

Hill et Goldsworthy (1968), par une série de pesées et d'analyses quantitatives précises effectuées à intervalles réguliers, ont fait ressortir la corrélation qui apparaît durant chaque période d'intense prise de nourriture entre les poids secs des matériaux alimentaires ingérés par Locusta migratoria migratorioides et les poids secs du criquet et des différents constituants de son corps.

Bien qu'une grande part des métabolites élaborés participe à l'édification de matière vivante nouvelle dans les tissus en croissance, les quantités totales d'acides aminés et de protéines de l'hémolymphe et du corps gras augmentent au fur et à mesure que le criquet ingère de grandes quantités d'aliments. Il se reconstitue ainsi dans l'organisme des réserves d'acides aminés dont l'utilisation commencera juste avant la mue ; elles permettront à l'insecte, à un moment où il ne reçoit plus de nourriture de l'extérieur, d'effectuer la synthèse des protéines qui assure la croissance pré-ecdysiale d'une nouvelle cuticule ; les teneurs en acides aminés et en protides du corps gras et de l'hémolymphe commenceront alors à diminuer.

Pendant toute la période d'alimentation intense, les teneurs en glycogène et en lipides du corps gras et la

teneur en tréhalose de l'hémolymphe augmente également (Hill et Goldsworthy, 1968).

En même temps qu'il reforme ainsi ses réserves glucidiques et lipidiques et grâce à l'énergie fournie par certaines étapes de la dégradation des métabolites qu'il accumule durant chaque époque d'intense prise de nourriture, le criquet reconstitue périodiquement ses réserves de tout l'ATP dont il a besoin au cours des importantes réactions biochimiques consommatrices d'énergie qui ont lieu aussi bien pendant les périodes où l'insecte ne s'alimente pas que pendant celles où il se nourrit.

Il en résulte qu'au cours de la deuxième moitié des intermues durant laquelle le criquet s'alimente abondamment, il y a probablement davantage d'ATP qui entre en compétition avec la B.t.β- exotoxine au niveau de l'ARN-polymérase ; on peut penser que la quantité d'ATP devient suffisante pour lever, en totalité ou en grande partie, l'inhibition de l'enzyme et permettre la reprise de certaines synthèses d'ARN qui avaient été bloquées par la toxine ; les freinages que la toxine fait subir à la croissance du tégument lors d'un certain nombre de mues s'atténuent puis cessent complètement ; les intervalles entre mues successives raccourcissent ; au bout d'un certain temps, le développement du criquet traité finit par rattraper celui du criquet non traité ; à partir de ce moment, la croissance se poursuit chez l'un et l'autre en parfait synchronisme et leur longévité est identique.

On peut penser que la déperdition progressive de l'activité de la toxine s'effectue en partie par élimination de la substance avec les fèces sans aucune altération de sa structure ainsi que Schmid et Benz (1968) l'ont montré dans le cas de Galleria mellonella ; le reste est inactivé dans le corps de l'insecte, la simple déphosphorylation par voie enzymatique de la substance suffisant pour assurer sa complè-

te détoxification (Sebesta et al., 1968).

Il est probable que la dégradation enzymatique de la toxine déphosphorylée se poursuit à l'intérieur de l'insecte et finit par libérer l'adénine qui sera réutilisée à la formation de nouveaux nucléotides ; on peut se demander si cet appoint de nucléotides normaux non toxiques qui seraient disponibles pour la vitellogenèse n'expliquerait pas l'augmentation sensible de la fécondité et de la fertilité que nous constatons (fig. 17-19) chez les criquets qui survivent aux fortes doses qui leur sont administrées au milieu de leur vie larvaire ; les nucléotides reconstitués à partir de la dégradation de la toxine pourraient, en effet, s'incorporer aux oocytes dès leur phase de croissance ; cette phase se caractérise par une importante élévation de la teneur des oocytes en ARN ; elle correspond, par conséquent, à une période où la femelle a un fort besoin de nucléotides.

Il n'est cependant pas exclu que si la même toxine était administrée plus tardivement , vers la fin de la vie larvaire ou au début de la vie imaginale du criquet, elle n'aurait encore subi qu'une déphosphorylation moins avancée au moment précis où se déclenche normalement l'intense synthèse d'ARN dans les oocytes ; la toxine pourrait alors s'y trouver en concentration suffisante pour inhiber cette synthèse et provoquer une baisse de fécondité et de fertilité telle que celle qu'observent David et Vago (1967) sur drosophile traitée en début de vie imaginale.

V - POSSIBILITES D'ACTION TERATOGENE

Sur les adultes qui apparaissent dans les lots de criquets que nous avons traités dans le courant de leur vie larvaire avec la B.t. β - exotoxine, nous n'observons aucune des atrophies ou des malformations que Burgerjon, avec Galichet (1965), Biache (1967), Biache et Cals (1969), ainsi que Mayas (1969) ont obtenues de façon très retardée sur des imagos après administration de doses sublétales du surnageant bactérien à des larves de Diptères, de Lépidoptères et de Coléoptères.

Il est à noter que les insectes sur lesquels des effets tératologiques ont pu être observés sont des Holométaboles ; dans les derniers stades larvaires de ces insectes, certains tissus, d'abord très peu différenciés, subissent en peu de temps des transformations considérables avant de s'extérioriser à la mue imaginale sous la forme définitive de pièces buccales, d'antennes, de pattes etc... du stade adulte.

L'élaboration des multiples enzymes et protéines diverses par lesquelles se réalisent ces transformations implique des synthèses extrêmement diversifiées d'ARN ; on peut concevoir qu'au moment où doit se réaliser l'intense incorporation de nucléotides dans ces ARN, la structure nucléotidique de la toxine la prédispose à intervenir au niveau des cellules en cours de division et de différenciation très actives ; elle pourra alors y provoquer des inhibitions dans la synthèse de certains ARN qui se traduiront par des atrophies d'organes.

Chez les criquets, comme dans l'ensemble des insectes Hétérométaboles, les différents organes ne se transforment tout au long des stades larvaires successifs que d'une façon très progressive de l'état embryonnaire à l'état adulte ;

leur développement ne nécessite à aucun moment des incorporations de nucléotides dans les ARN et des divisions mitotiques aussi intenses que celles qui ont lieu en fin de vie larvaire chez les Holométaboles ; on conçoit donc que l'action de la toxine puisse être beaucoup moins marquée chez les criquets que chez les Holométaboles.

VI - DEGRE DE SPECIFICITE DE LA TOXINE

Les effets inhibiteurs de la B.t. β - exotoxine sur la croissance du criquet, la correspondance chronologique que nous établissons entre les fluctuations rythmiques de l'intensité de cette inhibition et les processus cycliques du développement larvaire, de même que le caractère léthargique (Bond et Boyce, 1970) du syndrome que présente l'insecte succombant à l'intoxication, permettent d'attribuer à la toxine un mode d'action radicalement différent de ceux des insecticides actuellement utilisés en protection des cultures ; c'est, précisément, cette singularité de l'activité de la nouvelle substance qui souleva le plus d'intérêt dans la découverte de Mac Connels et Burgerjon.

En tenant compte du fait que la toxine se trouve manifestement impliquée dans les phénomènes de la mue (Burgerjon et de Barjac, 1960 ; Charles, 1965 ; Heimpel, 1967) et en absence de toute indication d'accidents graves imputables à la toxine sur Vertébrés (Galichet, 1966 - Martouret, 1967), on avait, en effet, l'espoir que se révélait ainsi un nouveau type d'activité toxique intervenant dans un processus physiologique bien propre aux insectes ; la toxine constituerait, par conséquent, un poison tout à fait spécifique des insectes ; elle ne présenterait donc aucun danger à l'égard des animaux supérieurs (Benz, 1966, Burgerjon sous presse) à la différence

de maints insecticides usuels organochlorés ou organophosphorés tels que la dieldrine et le parathion-méthyle que l'on considère jusqu'à présent comme les meilleures armes de la lutte antiacridienne ; la dieldrine a la même affinité pour les centres nerveux des mammifères et des insectes (Matsumura et Hayashi - 1969) et le parathion-méthyle inhibe aussi intensément chez l'homme et chez l'insecte le même système enzymatique de la cholinestérase (Fukuto - 1969).

Or, les résultats des essais biochimiques de Sebesta et al. (1969) et l'interprétation que nous sommes amenés à donner des modifications que nous observons dans le développement des criquets traités montrent qu'en réalité, la phase précise du métabolisme qui est directement altérée par la toxine chez les insectes n'est pas un processus qui leur est propre mais, au contraire, un processus absolument général et fondamental pour la totalité des êtres vivants ; c'est, en effet, l'inhibition de la synthèse de l'ARN qui est la cause primaire de la toxicité de l'exotoxine ; cette inhibition et la toxicité concomitante s'observent aussi bien sur mammifères que sur insectes.

C'est ainsi que sur souris, en injection intrapéritonéale, la DL 50 de la toxine a pu être évaluée à 18 microgrammes par gramme du poids du corps ; cette toxicité à l'égard des mammifères est du même ordre de grandeur que celle d'autres analogues de nucléotides tels que 5 - azacytidine dont la DL 50 en injection intrapéritonéale est de 11,5 µg/g pour la souris (Sebesta et coll. - 1969). En ce qui concerne ce même mode d'administration par injection, la DL 50 de la toxine est supérieure à celle du parathion-méthyle (DL 50 = 5,8 µg/g) mais inférieure à celle d'autres esters phosphoriques également réputés dangereux tels que l'EPN dont la DL 50 intrapéritonéale est de 33 µg/g sur rats (Kimmerle et Lorke, 1968).

En toxicité orale aiguë à l'égard du rat, la DL 50 de l'exotoxine est de 17 µg/g (Desmoras, 1971) ; elle est donc très voisine de celle du parathion-méthyle (DL 50 per os = 14 µg/g) ; l'exotoxine est trois fois et demi plus toxique par ingestion que la dieldrine (DL 50 per os de la dieldrine à l'égard du rat = 46 µg/g).

Les évaluations de la DL 50 de la B.t.β-exotoxine en injection dans l'hémolymphe des chenilles de Galleria mellonella se situent entre 0,5 (Sebesta et al., 1969) et 1,5 µg/g (Schmid et Benz, 1968) ; en ingestion libre, la toxine est beaucoup moins active puisque sa DL 50 orale à l'égard de la teigne des ruches est de l'ordre de grandeur de la DL 50 que nous avons déterminée pour le criquet.

Cette DL 50 per os est de 165 µg/g à l'égard de Locusta m.m. ; elle correspond à un pouvoir insecticide médiocre puisque les valeurs de la DL 50 orale des produits utilisés actuellement en lutte antiacridienne sont comprises entre 1 et 7 µg/g (Gry et Coquard, 1966 ; Mac Cuaiq, 1966).

Certains insectes sont, cependant, considérablement plus sensibles à l'exotoxine par voie orale que ne le sont Locusta et Galleria ; c'est, par exemple, le cas de la chenille de la noctuelle du chou, Mamestra brassicae, à l'égard de laquelle la DL 50 de la toxine n'est que 6 µg/g en ingestion libre (de Barjac et Dedonder, 1965).

VII - POSSIBILITES D'ACTION INSECTICIDE
PLUS SPECIFIQUE
DANS CERTAINS TYPES DE SUBSTANCES
A MECANISME D'ACTION VOISIN

Puisqu'une substance nucléotidique telle que la B.t. β -exotoxine se montre beaucoup plus toxique pour certaines espèces animales que pour d'autres, il n'est pas exclu que d'autres analogues de structure de constituants des acides nucléiques aient des spécificités d'action très différentes et qu'il puisse se trouver parmi eux des substances ayant un pouvoir insecticide nettement plus élevé à l'égard des Acridiens et, par contre, une toxicité très réduite à l'égard des animaux supérieurs.

Ceci pourrait être envisagé en résultat d'une expérimentation insecticide et toxicologique à laquelle seraient systématiquement soumis les divers analogues de nucléotides que l'on peut obtenir par synthèse (Cramer et al. - 1968) ainsi que certains antibiotiques ; par son origine microbienne et par sa propriété d'agir par inhibition de la croissance, la B.t. β -exotoxine se rapproche, en effet, beaucoup des antibiotiques et, plus spécialement, de ceux assez nombreux qui sont des analogues de structure de constituants des acides nucléiques possédant, comme la toxine, un adénosine dans leur molécule ; bien qu'ils interviennent également dans la chaîne des réactions des synthèses nucléiques et protéiques, plusieurs de ces antibiotiques se montrent sans grand danger pour l'homme.

Nous n'avons pu mettre en évidence d'action dépressive de la toxine thermostable sur la fécondité et la fertilité des criquets traités ; on devrait pouvoir, cependant, découvrir parmi d'autres analogues de structure des nucléotides

ou des nucléosides, tels que le 6 - azauracilriboside dont Landa et Rezabova (1964) suivent les effets sur l'appareil génital de la mouche domestique, des substances qui inhiberaient le développement ou le fonctionnement des organes reproducteurs des criquets et perturberaient gravement la gamétogénèse. David et Vago (1967) constatent que, lorsqu'elle est appliquée à la drosophile adulte, la toxine thermostable elle-même perturbe l'ovogénèse de la mouche en agissant directement sur ses ovaires.

El Dakroury et Mac Cuaig (1968) cherchent à provoquer la chimiostérilisation des acridiens au moyen d'agents d'alkylation ; les résultats de leurs traitements de Locusta m.m. par l'apholate et le tépa ne sont guère encourageants ; seuls les mâles deviennent stériles ; les doses nécessaires pour obtenir cette stérilisation provoquent une forte mortalité et affectent trop sévèrement les insectes traités qui survivent pour leur permettre d'entrer efficacement, par la copulation, en compétition avec les criquets mâles qui échappent au traitement.

La DL 50 à l'égard de Locusta m.m. est de 150 µg/g pour l'apholate et de 130 µg/g pour le tépa ; elle est donc de l'ordre de grandeur de celle de la B.t. β - exotoxine ; il faut que la dose de l'agent d'alkylation appliquée au criquet dépasse le tiers de la DL 50 pour déclencher une baisse notable de la fertilité.

A l'égard du rat, la DL 50 orale aiguë du tépa est de 37 mg/kg ; l'apholate, injecté à la dose de 2,5 mg/kg, tue les veaux en 7 jours (Campion - 1965).

Les deux classes de substances, antimétabolites et agents d'alkylation, que nous suggérons comme source éventuelle de nouvelles matières actives pour la lutte contre les insectes

nuisibles, font l'objet d'investigations extrêmement étendues dans les laboratoires de recherche de chimiothérapie anticancéreuse; le travail accompli dans ces laboratoires faciliterait la sélection, parmi les substances déjà étudiées pour leur activité antinéoplasique, d'un certain nombre de produits qui sembleraient mériter d'être retenus pour une expérimentation sur insectes en raison, notamment, d'un pouvoir inhibiteur particulièrement intense.

Mais il est surtout indispensable de faire le plus grand cas des résultats des contrôles toxicologiques auxquels sont soumis les produits étudiés à des fins chimiothérapeutiques, tout spécialement en ce qui concerne leur toxicité chronique; les substances qui agissent sur le développement des tumeurs et pourraient éventuellement perturber efficacement la physiologie de l'insecte en inhibant la croissance dans certains de ses tissus risquent, en effet, d'affecter tout autant chez l'homme la division cellulaire dans certains organes essentiels tels que ceux de l'hématopoïèse (Fournier et Gervais, 1970) et produire des effets tératogènes et mutagènes (Clavel, 1967 et Privat de Garilhe, 1970).

L'activité tératogène de la toxine thermostable elle-même, mise en évidence sur insectes holométaboles par Burgerjon et Biache (1967), est signalée également sur mammifères par Desmoras (1971). De plus, Burgerjon (1971), après élevage de deux générations successives, constate sur doryphore, Leptinotarsa decemlineata, la transmission héréditaire des caractères tératologiques apparus à la suite d'un traitement par le surnageant de la culture de Bacillus thuringiensis.

Il peut paraître extrêmement tentant de rechercher pour la lutte contre les criquets de nouvelles armes sans danger pour l'homme parmi les substances analogues ou mimétiques des hormones de la croissance et du développement de l'insecte;

Williams (1967) les annonçait comme la "troisième génération de pesticides", caractérisée par une spécificité d'action à l'égard des insectes telle que ces substances n'auraient absolument aucun effet sur toute autre forme de vie. Malgré une constitution chimique tout à fait différente, ces substances ne sont cependant pas sans présenter de troublantes analogies d'activité avec certains effets de la toxine ; en particulier, Carayon (1966), sur Pyrrhocoridae, obtient de profondes déformations des pièces buccales; il signale (1970), de plus, une action mutagène extrêmement importante de substances mimétiques de l'hormone juvénile. En outre, Carlisle constate la formation de tumeurs néoplasiques sur Pyrrhocoridae traités par des doses sublétales de certains de ces produits.

CONCLUSION

=====

Dans la plupart des travaux antérieurs, la β - exotoxine de Bacillus thuringiensis, incorporée à l'aliment de l'insecte, est appliquée en intoxication chronique ; on observe d'une expérience à l'autre une extrême variabilité dans les résultats ; parmi les facteurs qui paraissent être à l'origine de variations importantes de l'activité de la toxine, on peut citer la température ambiante, le poids et le sexe des insectes (Van Herrewege, 1969), leur âge au moment du traitement (Burgerjon et Biache, 1967 - Mayas, 1969), le mode d'application de la toxine (Schmid et Benz, 1969) et la nature de l'aliment (Galichet, 1967 - Benz et Perron, 1967) ; la diversité des effets obtenus ne permet pas d'élucider le mécanisme de l'intoxication ; néanmoins l'observation d'un certain mode d'action à retardement assez caractéristique retient l'attention des expérimentateurs et les amène à envisager que la substance peut interférer avec les hormones responsables de la mue et de la métamorphose.

Nous nous sommes appliqués à réaliser dans nos essais de la B.t. β - exotoxine sur Locusta migratoria migratorioides des conditions expérimentales très étroitement définies et rigoureusement uniformes ; chaque criquet ingère une quantité très exactement connue de toxine pure ; le temps de cette ingestion est limité à une courte période unique, strictement localisée tout au début d'un stade larvaire, et nous soumettons les criquets à des contrôles journaliers dès leur traitement et tout au long de leurs stades successifs. C'est la précision du nouveau dispositif expérimental adopté qui nous a permis de caractériser quantitativement et chronologiquement les fluctuations de l'inhibition exercée par la toxine sur la croissance et le développement du criquet

et de contribuer par là à une meilleure compréhension du mode d'action de la substance.

Nous établissons, en effet, que l'activité inhibitrice de la toxine s'exerce essentiellement aux moments où se préparent et s'effectuent les dépôts pré-ecdysiaux et post-ecdysiaux de chaque nouvelle cuticule ; ce sont les époques des très intenses synthèses d'ARN messagers responsables des différenciations morphogénétiques des divers stades.

Nous rattachons cette chronologie bien particulière de l'activité inhibitrice cyclique de la toxine à la découverte faite, *in vitro* et dans les cellules de foie de Mammifères, par Sebesta et coll. (1968-1969) de la propriété de cette substance d'inhiber la polymérisation des ribonucléotides au moment des synthèses d'ARN en entrant en compétition avec l'ATP au niveau de l'ARN-polymérase.

La toxicité de la B.t. β - exotoxine et l'inhibition qu'elle exerce sur la croissance et le développement du criquet paraissent donc être la conséquence des déficiences que cette inhibition des synthèses d'ARN entraîne obligatoirement dans la formation des protéines et notamment dans celles d'enzymes impliquées dans la croissance et de multiples autres processus vitaux.

Ce mode d'action ayant un caractère universel pour l'ensemble du règne animal ne répond pas à l'espoir que l'on avait d'une toxicité bien spécifique à l'égard des insectes.

L'intensité des synthèses d'ARN varie énormément au cours de la vie post-embryonnaire de l'insecte ; elle diffère également beaucoup d'un groupe d'insectes à l'autre ; étant fonction de l'intensité de ces synthèses, l'activité de la toxine elle-même varie également d'une façon considérable d'un moment à l'autre de la vie de l'insecte et selon

son mode de développement ; les effets de la toxine sont ainsi nettement plus marqués chez les Holométaboles que chez le criquet ; ils doivent se manifester essentiellement au moment des plus actives biosynthèses de différenciations morphogénétiques des divers stades et des processus de maturation sexuelle, d'ovogénèse et de vitellogénèse.

La toxine est un analogue de structure de l'ATP ; métabolite constamment indispensable pour tous les processus vitaux, celui-ci fait, à certains moments, l'objet d'une utilisation et d'un renouvellement, simultanés ou successifs, extrêmement intenses en fonction des besoins très changeants de l'animal, de son développement, de son activité, de son alimentation et des conditions ambiantes ; il en résulte de grandes variations de la teneur des cellules en ATP ; la synthèse de l'ATP dont a besoin l'insecte peut être perturbée par l'action de la toxine mais, inversement, une élévation de la concentration de la cellule en ATP à un certain niveau peut permettre au nucléotide d'entrer en compétition avec la toxine et de lever l'inhibition que celle-ci exerce sur les biosynthèses ; ceci, sans doute, explique en partie la surprenante variabilité des effets de la toxine signalés par maints expérimentateurs ; la recherche d'une efficacité pratique, exigera donc que l'on définisse les conditions, probablement assez étroites, dans lesquelles devront être exécutés les traitements.

Il s'en faut, cependant, de beaucoup que le mécanisme d'action de la toxine soit pleinement élucidé et que l'on puisse dès maintenant juger de ses possibilités d'utilisation en lutte insecticide. La diversité des résultats expérimentaux et certains effets tels que des actions tératogènes et mutagènes montrent la complexité des modes d'intervention de la toxine en tant qu'analogue de structure d'un constituant

des acides nucléiques ; nous constatons que la toxine présente aussi certaines analogies d'effets avec certaines substances hormonales, antimétabolites, antibiotiques et chimiostérilisantes ; devant l'importance des problèmes qui restent à résoudre avant que l'on puisse envisager l'emploi en protection des cultures de produits agissant au niveau du matériel génétique de l'animal, il serait prématuré d'abandonner toute recherche de nouvelles matières actives plus spécifiques parmi certains types classiques d'insecticides, tels que les esters phosphoriques, dont le mécanisme d'action, beaucoup plus simple, commence à être bien connu et dont le danger peut donc être plus facilement circonscrit.

BIBLIOGRAPHIE

=====

- ABBOTT, W.S. - 1925 - A method of computing the effectiveness of an insecticide. J. Econ. Ent. 18, pp. 265 - 267.
- ANGUS, T.A. - 1954 - A bacterial toxin paralyzing silkworm larvae. Nature, 173, pp. 545 - 546.
- ARNOLD, A.J. - 1965 - Arnold microapplicator. J. Sci. Instrum. 42, N° 5, pp 350 - 351.
- BARJAC de, H. et BONNEFOI, A. - 1962 - Essai de classification biochimique et sérologique de 24 souches de Bacillus du type Bacillus thuringiensis. Entomophaga, 7, pp. 5 - 32.
- BARJAC de, H. et DEDONDER, R. - 1965 - Isolement d'un nucléotide identifiable à la toxine thermostable de Bacillus thuringiensis var. BERLINER. C. R. Acad. Sc. Paris, 260, pp. 7 050 - 7 053.
- BARJAC de, H., BURGERJON, A. et BONNEFOI, A. - 1966 - The production of heat-stable toxin by the nine serotypes of Bacillus thuringiensis. J. Invert. Pathol., 4, pp. 537 - 538.
- BARJAC de, H. et BONNEFOI, A. - 1968 - A classification of strains of Bacillus thuringiensis BERLINER with a key to their differentiation. J. Invertebrate Pathol., 11, pp. 335 - 347.
- BARJAC de, H. et DEDONDER, R. - 1968 - Purification de la toxine thermostable de B. thuringiensis var. thuringiensis et analyses complémentaires. Bull. Soc. Chimie. Biol., 50, N° 4, pp. 941 - 944.
- BEERMANN, W. - 1966 - Differentiation at the level of the chromosomes. Cell differentiation and morphogenesis. North. Holl. Publ. Cy. Amsterdam, pp. 24 - 54.

- BENZ, G. - 1966 - On the chemical nature of the heat-stable exotoxin of B.thuringiensis.
Experientia, 22, 81, pp. 1-4
- BENZ, G. et PERRON, J. M. - 1967 - Action toxique de l'"exotoxine" de Bacillus thuringiensis sur drosophile élevée sur milieu contenant de la levure et des milieux ne contenant pas de levure. Experientia, 23, p. 871.
- BERREUR, P. - 1971 - Communication personnelle.
- BOND, R.P.M. et BOYCE, C. B. C. - sous presse - The Bacillus thuringiensis - exotoxin in microbial control of insects and mites edited by Burges, H.D. et Hussey, N. W. Academic Press.
- BONNEFOI, A. et BARJAC de, H. - 1963 - Classification des souches du groupe Bacillus thuringiensis par la détermination de l'antigène flagellaire (2è mémoire)
Entomophaga, t. 6. n° 3, pp. 223 - 229.
- BONNEFOI, A. et BARJAC de, H. - 1964 - Identification et classification des souches du groupe Bacillus thuringiensis.
Rap. Symp. C.I.L.B. 5 - 7 mars 1964.
- BOUGUES, R. et BERREUR, P. - 1969 - Evolution de la teneur en ATP au cours du développement post-embryonnaire de Calliphora erythrocephala. C.R. Acad. Sc. Paris, 269, pp 2 007 - 2 010.
- BURGERJON, A. et BARJAC de, H. - 1960 - Essais préliminaires sur le rôle insecticide de la toxine thermostable produite par Bacillus thuringiensis BERLINER. Compt. Rend. Congr. Intern. Entomol., XIth, Vienna, t. 2, pp. 835 - 839.
- BURGERJON, A. et BARJAC de, H. - 1960 - Nouvelles données sur le rôle de la toxine thermostable produite par Bacillus

thuringiensis BERLINER. C.R. Acad. Sci., 251, pp. 911-912.

BURGERJON, A. et BARJAC de, H. - 1964 - Etude de la toxine thermostable chez différentes souches de Bacillus thuringiensis BERLINER. C. R. Coll. Int. Path. insectes lutte microb., Paris, 1962, Entomophaga, Mem. Hors série, 2, pp. 222 - 226.

BURGERJON, A. et BIACHE, G. - 1964 - The activity of the heat-stable toxin of Bacillus thuringiensis BERLINER use in nature against the larvae of Diprion pini LINNAEUS. Journal of Insect Pathology, 6 (4), pp. 538 - 541.

BURGERJON, A., GRISON, P. et KACHKOULI, A. - Activity of the heat-stable toxin of Bacillus thuringiensis BERLINER in Locusta migratoria LINNAEUS (Locustidae, Orthoptera). J. Insect Pathol., 6 (3), pp 381 - 383.

BURGERJON, A. et GALICHET, P.F. - 1965 - The effectiveness of the heat-stable toxin of Bacillus thuringiensis var. thuringiensis BERLINER on larvae of Musca domestica LINNAEUS. J. Insect Pathol., 7 (2), pp. 263 - 264.

BURGERJON, A. et BIACHE, G. - 1967 - Effets tératologiques chez les nymphes et les adultes d'insectes dont les larves ont ingéré des doses sublétales de toxine thermostable de Bacillus thuringiensis BERLINER - C.R. Ac. Sc. Paris, 264, pp 2 423 - 2 425.

BURGERJON, A. et BIACHE, G. - 1967 - Divers effets spéciaux et symptômes tératologiques de la toxine thermostable de B.thuringiensis en fonction de l'âge physiologique des insectes. Ann. Soc. Ent. Fr. (N.S.), 3 (4) pp 929 - 952.

BURGERJON, A., BIACHE, G. et CALS, Ph. - 1969 - Teratology of the colorado potato beetle, Leptinotarsa decemlineata, as

provoked by larval administration of the thermostable toxin of Bacillus thuringiensis. J. Invertebrate Path. 14, pp 274 - 278.

BURGERJON, A. - 1971 - Les effets physiologiques de la toxine thermostable de Bacillus thuringiensis BERLINER sur les insectes. C.R. Congr. Int. Microbiol. Mexico (sous-pressé)

BURGERJON, A. - 1971 - Quelques effets physiologiques de la toxine thermostable de Bacillus thuringiensis sur le doryphore, Leptinotarsa decemlineata SAY (sous presse).

CAMPION, D.G. - 1965 - The present status of research on chemosterilants in the United States and Central America for the control of insect pests. Pest Articles and News Summaries, 11 (4), pp 467 - 491.

CARAYON, J. et THOUVENIN, M. - 1966 - Emploi d'une substance mimétique de l'hormone juvénile pour la lutte contre les Dysdercus, hémiptères nuisibles au cotonnier. C.R. Acad. Agric. France. Séance 2 mars 1966, pp 340 - 346.

CARAYON, J. - 1970 - Intervention à la discussion de la communication sur les Dysdercus au Colloque Phytosanitaire de l'IRCT du 16 - 20 mars 1970.

CARLISLE, D.B. et ELLIS, P.E. - 1967 - Abnormalities of growth and metamorphosis in some pyrrhocorid bugs : the paper factor. Bull. of Entom. Research, 57 (3), pp 405 - 417.

CHARLES, P.J. - 1965 - Note sur l'application des méthodes de lutte microbiologique contre les Acridiens. Congrès de la Protection des Cultures Tropicales. Compte-rendu des travaux. C.C.I.M. pp 851 - 854.

CLAVEL, B. - 1967 - Chimiothérapies anticancéreuses - Feuillets du praticien, 276, pp 761 - 772.

- CLAVEL, B. - 1967 - Indications et modalités d'emploi des principaux agents de la chimiothérapie anticancéreuse - Feuillets du praticien, 276, pp 773 - 783.
- CRAMER, F., GAUB, D. et ECKSTEIN, F. - 1968 - Synthèse des esters phosphoriques du type des acides nucléiques. Pflanzenschutz - Nachrichten Bayer 21/1968, 1, pp 45 - 51
- DAVID, J. - 1966 - Influence d'un antagoniste de l'acide folique sur l'ovogénèse de la drosophile. Archives des Sciences Physiologiques, XX (3).
- DAVID, J. - 1966 - Rôle physiologique de l'acide folique chez la drosophile étudié au moyen d'un antagoniste spécifique. Ann. Nutr. et Alim., 4, pp 339 - 347.
- DAVID, J. et VAGO, G. - 1967 - Influence des toxines de Bacillus thuringiensis sur divers caractères physiologiques de drosophiles adultes. Entomophaga, 12, pp 153 - 159.
- DESCAMPS, M. et WINTREBERT, D - 1966 - Possibilités d'utilisation des facteurs bio-écologiques de limitation des acridiens migrants. Entomophaga, 11 (2), pp 217 - 229.
- DESMORAS, . - 1971 - Communication personnelle.
- EL-DAKROURY, M.S.I. et MAC CUAIG, R.D. - 1968 - Fecundity and hatch of eggs from locusts treated with Apholate and Tapa Bull. Soc. ent. Egypte, LII, pp 457 - 466.
- FARKAS, J., SEBESTA, K., HORSKA, K., SAMEK, Z., DOLEJS, L. et SORM, F. - 1969 - The structure of exotoxin from Bacillus thuringiensis var. gelechia. Collection Czechoslov. Chem. Commun., Sect. 34, pp 1 118 - 1 120.
- FINNEY, D.J. - Probit analysis, a statistical treatment of the sigmoid response curve. 2nd edition. Cambridge University Press, 318 p.

- FOURNIER, E. et GERVAIS, P. - 1970 - Dictionnaire des intoxications Dr J. Garnier. Ed. Heures de France. Paris. 669 p.
- FUKUTO, T.R. - 1969 - Physico - organic chemical approach to the mode of action of organophosphorus insecticides. Residue Reviews, 25, pp 327 - 339.
- GALICHET, P.F. - 1966 - Administration aux animaux domestiques d'une toxine thermostable sécrétée par Bacillus thuringiensis BERLINER en vue d'empêcher la multiplication de Musca domestica dans les fèces. Ann. Zootechnie, 15, pp 135 - 145.
- GALICHET, P.F. - 1967 - Influence de la nature du milieu d'élevage sur la sensibilité des stades larvaires de Musca domestica LINNAEUS à la toxine thermostable de Bacillus thuringiensis BERLINER. Phytiatrie - Phytopharmacie, 16, pp 97 - 104.
- GRY, J. et COQUARD, G. et J. - 1966 - Appréciation en laboratoire de l'activité des insecticides à l'égard du criquet migrateur. L'Agronomie Tropicale, n° 6-7, pp 837 - 855.
- HALBWACHS, M.C., JOLY, L. et JOLY, P. - 1957 - Résultats d'implantations de "glandes ventrales" à Locusta migratoria L. J. Ins. Physiol., 1, pp 143 - 149.
- HANNAY, C.L. - 1953 - Crystalline inclusions in aerobic spore-forming bacteria. Nature, 172, p. 1 004.
- HEIMPEL, A.M. - A critical review of Bacillus thuringiensis var. Thuringiensis BERLINER and other crystalliferous bacteria. An. Rev. Ent. 12, pp 287 - 322
- HILL, L. et GOLDSWORTHY, G. J. - 1968 - Growth, feeding activity, and the utilization of reserves in larvae of

- Locusta.
J. Insect Physiol. 14, 8 pp 1 085 - 1 098.
- HUNTER-JONES, P., - 1961 - Rearing and breeding locusts in the laboratory. Anti-Locust Research Centre. London p 11.
- JOLY, P., JOLY, L. et HALBWACHS, M. - 1956 - Contrôle humoral du développement chez Locusta migratoria. Ann. des Sc. Nat., Zool., 11^e série, pp 257.
- KIMMERLE, G. et LORKE, D - 1968 - La toxicologie des esters phosphoriques insecticides. Pflanzenschutz Nachrichten Bayer, année XXI - 1968/1, pp 111 - 144.
- KROEGER, H. et LEZZI, M. - 1966 - Regulation of gene action in insect development in An. Rev. of Entomol., 11, pp 1 - 22
- LA BRECQUE, G.C. - Chemosterilants for the control of houseflies. New approaches to pest control and eradication. Advances in chemistry series 41, pp 42 - 46.
- LE BERRE, J.R. - 1963 - Examen critique des méthodes de l'alimentation chez les insectes. Ann. Nutr. Alim., 17 (1), pp 249 - 282.
- MAC CONNELL, E. et RICHARDS, A.G. - 1959 - The production by Bacillus thuringiensis BERLINER of a heat-stable substance toxic for insects. Canad. J. Microbiol., 5, pp 161 - 168.
- MAC CUAIG, R.D. - 1966 - Répertoire des insecticides - PNUD - FAO. (PL : CP/66/2) Rome, Italie. 92 p.
- MAHLER, H.R. et CORDES, E.H. - 1967 - Biological Chemistry. Harper and Row, New York, 872 p.
- MARTOURET, D. - 1961 - Les toxines de Bacillus thuringiensis et leur processus d'action chez les larves de Lépidoptères. XIII^e Symp. Phytopharm. et Phytiairie, Gand, 8, pp 1 - 14.

MARTOURET, D. - 1967 - Etat de nos connaissances sur l'activité des toxines de Bacillus thuringiensis sur les Vertébrés.

Phytiatrie - Phytopharmacie, 16, pp 75 - 82.

MATHER, K. - 1943 - Statistical analysis in biology. London : Methuen in traduction française par Lefebvre, M. : Analyse statistique en biologie. Paris Gauthier-Villars 1965. 327 p.

MATSUMURA, F. et HAYASHI, M. - 1969 - Comparative mechanisms of insecticide binding with nerve components of insects and mammals. Residue Reviews, 25, pp 265 - 273.

MAYAS, I. - 1969 - Contribution à l'étude du mode d'action de Bacillus thuringiensis BERLINER sur Laspeyresia pomonella L. Thèse Doct. 3è Cycle Fac. Sc. Paris. 92 p.

NICOLAS, G. - 1969 - Action du gaz carbonique chez Locusta migratoria L. Thèse Doct. 3è Cycle Fac. Sc. Rennes 48 p.

PERRY, A.S. et MILLER, S. - 1965 - The essential role of folic acid and the effect of antimetabolites on growth and metamorphosis of house fly larvae Musca domestica L. J. Insect. Physiol., 11, pp 1 277 - 1287.

PRIVAT DE GARILHE, M. - 1970 - La chimiothérapie. Paris. Presses Universitaires de France, 127 p.

SCHMID, E. et BENZ, G. - 1969 - Toxicité par ingestion orale et par injection de l'exotoxine de Bacillus thuringiensis et son inactivation chez les larves de Galleria mellonella. Experientia 25, 96.

SEBESTA, K. et HORSKA, K. - 1968 - Inhibition of DNA - dependent RNA polymerase by the exotoxin of Bacillus thuringiensis var. golechiae, Biochim. biophys. Acta. 169, 1, pp 281 - 282.

- SEBESTA, K., HORSKA, K. et VANKOVA, J. - 1969 - Inhibition of de novo RNA synthesis by the insecticide exotoxin of Bacillus thuringiensis var. gelechiae. Collection Czechoslov. Chem. Commun., 34, pp 1 786 - 1791.
- SEBESTA, K., HORSKA, K. et VANKOVA, J. - 1969 - Isolation and properties of the insecticide exotoxin of Bacillus thuringiensis var. gelechiae. Collection Czechoslov. Chem. Commun, 34, pp 891 - 900.
- STAAL, G.B. et DE WILDE, J. - 1962 - Endocrine influences on the development of phase characters in Locusta. Colloques Internationaux du CNRS. n° 114. Paris 9 - 10 avril 1962. pp 89 - 105.
- TOUMANOFF, C. - 1953 - Description de quelques souches entomophytes de Bacillus cereus FRANK et FRANK. avec remarques sur leur action et celle d'autres bacilles sur le jaune d'oeuf. Ann. Inst. Pasteur 85, pp 90 - 99.
- VAN HERREWEGE, J. - 1969 - La toxine thermostable de Bacillus thuringiensis BERLINER (Sérotypé 1) : effets sur Drosophila melanogaster MEIGEN : Thèse Fac. Sc. Lyon. Doct. 3è cycle 90 p.
- VENKATRAMAN, T.V., MATHUR, V.K. et CHANDER, R. - 1962 - Experiments on the possible use of Bacillus thuringiensis BERLINER in the control of crop pests. I. tests with two spore formulations of Bacillus thuringiensis against some insect pests. Indian J. Entomology (New Dehli), 24, pp 274 - 277.
- WIGGLESWORTH, V.B. - 1963 - The action of moulting hormone and juvenile hormone at the cellular level in Rhodnius prolixus. J. Insect Physiol. 9, pp 105 - 119.

WILLIAMS, C.M. - 1967 - Third-generation pesticides. Scientific American, 217, 1, pp 13 - 17.

R E S U M E

=====

Les principaux effets de la β - exotoxine de Bacillus thuringiensis ingérée au début du troisième stade larvaire par le criquet migrateur africain, Locusta migratoria migratorioides, sont les suivants :

Une certaine proportion de criquets succombe lorsque la quantité administrée atteint une dose suffisante ; mais, quelle que soit la quantité de toxine ingérée, il y a toujours un certain temps de latence entre l'ingestion et la manifestation de la toxicité ; les criquets ne meurent jamais en masse dans les premiers jours qui suivent le traitement ; les mortalités s'échelonnent sur une période d'une à deux semaines.

Chez les survivants, pendant plusieurs stades successifs après le traitement, on observe, au cours de chaque intermue, des périodes où la croissance pondérale est nettement ralentie par rapport à celle des criquets témoins.

Un certain nombre de mues apparaissent avec du retard.

L'inhibition de la croissance et du développement du criquet se manifeste toujours dans les lots traités conjointement avec un certain pourcentage de mortalité ; le taux de mortalité et la réduction du poids des criquets sont d'autant plus importants que la dose ingérée est élevée ; c'est ainsi que l'ingestion de doses croissantes de 100 à 360 microgrammes de toxine par gramme de poids du corps de l'insecte entraînent pour le poids du criquet, dans les deux premières semaines qui suivent le traitement, des réductions moyennes allant de 15 % à 55 %, ces mêmes doses provoquant de 20 % à 95 % de mortalité.

La DL 50 établie pour Locusta m.m. après délai de 15 jours après traitement en début de troisième stade larvaire est de 165 $\mu\text{g/g}$.

La durée du temps pendant lequel s'exercent l'action mortelle de la toxine et son pouvoir inhibiteur est d'autant plus longue que la dose ingérée est forte ; cependant, après être passés par un maximum entre le deuxième jour et le sixième jour qui suivent le traitement, les mortalités journalières et les retards de développement diminuent graduellement par la suite ; la toxine n'a plus aucune action mortelle deux semaines après l'ingestion ; au bout de trois semaines, il n'y a plus aucun retard, ni pour la croissance pondérale des criquets traités, ni pour leur maturation sexuelle. La longévité des criquets qui ont survécu à la mue imaginale est la même dans les lots traités et dans les lots témoins.

Contrairement à ce qui a pu être observé chez des Holométaboles, on ne constate aucune atrophie ou malformation sur adulte ni aucune baisse de fécondité et de fertilité.

La B.t.β-exotoxine n'inhibe pas la prise de nourriture. L'activité inhibitrice sur la croissance se relâche dans la deuxième moitié des intermues, à la période du stade où le criquet s'alimente le plus abondamment.

Par contre, la toxine se montre nettement inhibitrice aux alentours de chacune des mues, plus précisément entre le moment où le criquet, au terme de sa croissance dans un stade, cesse de se nourrir et le milieu de l'intermue suivant ; l'activité de la toxine apparaît ainsi liée au déroulement cyclique des événements qui, sous le contrôle des sécrétions hormonales, permettent au criquet de passer d'un stade au stade suivant ; l'inhibition s'exerce essentiellement aux moments où se préparent et s'effectuent les dépôts pré-ecdysiaux et post-ecdysiaux de chaque nouvelle cuticule ; ce sont les époques des très intenses synthèses d'ARN messagers responsables des différenciations morphogénétiques des divers stades.

Nous rattachons cette chronologie bien particulière de l'activité inhibitrice cyclique de la toxine à la découverte récente de la propriété de cette substance d'inhiber la polymérisation des ribonucléotides au moment des synthèses d'ARN en entrant en compétition avec l'ATP au niveau de l'ARN-polymérase.