

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

**MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE**

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

**ECOLE NATIONALE SUPERIEURE VETERINAIRE -
ALGER**

الجزائر - المدرسة الوطنية العليا للبيطرة

**PROJET DE FIN D'ETUDES
EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLOME DE DOCTEUR VETERINAIRE**

*Effets du champignon entomopathogène
Métarhisiium anisopliae sur un aspect
histologique du rat (Wistar)*

**Présenté par: HABET Farid
ELHABOUCI Adel**

Le jury :

Présidente : M^{elle} AISSI.M

Professeur

Promotrice : Mme Haddadj.F

Maitre assistante classe A

Examinatrice : Mme Zouambi .A

Maitre assistante classa A

Examinatrice : Mme Derdour.S

Maitre assistante classe A

Remerciements

Tout d'abord, nous tenons à remercier DIEU, le tout puissant qui a éclairé notre chemin.

Nous tenons à exprimer notre profonde gratitude et nos sincères remerciements à :

Notre promotrice M^{me} haddadj .f pour avoir accepté de diriger ce travail avec patience et compétence et pour ses précieux conseils et toute l'attention qu'elle nous a accordé tout au long de ce travail.

Madame, Aisi.M de nous avoir honore en acceptant la presidence de ce jury de notre projet fin d'étude.

Mes dames : Zouambi.A et Derdour.S, D'avoir fait partie de jury de ce travail.

Nous remercions vivement Madame HAMDI.S, responsable de service mycologie à l'INPV.

A monsieur kaddour Rachid, technicien au Laboratoire danatomie pathologique, qui nous ont aides beaucoup.

En fin nous remercions toutes les personnes qui ont aidé de près ou de loin pour la réalisation de ce travail.

Dédicace

*Au nom de dieu le tout puissant et le très miséricordieux par la grâce duquel j'ai pu réaliser
ce travail que je dédie à :*

MES CHÈRES PARENTS

*qui m'a soutenu pendant toute ma vie et qui a veillé au bon déroulement de mes études, dieu
les protèges.*

*A mes frères HICHAME, DJALAL, LOUVENES et à ma sœurs AZIZA, sans oublier ma
chère future femme DJAMILA ,qui grâce à leurs encouragement, je suis devenue ce qui j'ai
toujours souhaité.*

A mon collègue Binôme : ADEL.

A toute ma grande famille HABET.

A tous mes amis.

A mes amis de Bouraoui.

A mes chère amis de l'ENSV.

A tout mes collègues de la promotion de l'ENSV.

FARID.

Dédicace

*Au nom de dieu le tout puissant et le très miséricordieux par la grâce duquel j'ai pu réaliser
ce travail que je dédie à :*

Ma grande mère

*Mes parents qui m'a soutenu pendant toute ma vie et qui a veillé au bon déroulement de mes
études, dieu la protège.*

*A mes frères, et a mes sœurs Siham, qui grâce a leurs encouragement, je suis devenue ce qui
j'ai toujours souhaité.*

A mon collègue Binôme : farid.

A toute ma grande famille.

A mes amis du quartier.

A mes amis de Bouraoui.

A mes chère amis de l'ENSV.

A tout mes collègues de la promotion de l'ENSV.

ADEL.

Liste des tableaux

Tableau 1 : Poids des rats avant la réalisation des traitements.

Tableau 2 : Poids des rat avant la dissection.

Liste des figures

Figure 1 : Elevage des rats

Figure 2 : Aspect cultural de *M.anisopliae*

Figure 3 : Gavage gastrique

Figure 4 : Injection sous cutané

Figure 5 : Cloche a ether

Figure 6 : Dissection des rats

Figure 7 : Ecarrissage des blocs

Figure 8 : Microtome

Figure 9 : Bain marie

Figure 10 : Porte lames

Figure 11 : Protocole de coloration

Figure 12 : Histologies des organes du rat témoin

SOMMAIRE

Introduction.....	1
-------------------	---

Chapitre I. Données bibliographiques sur le champignon et le rat

I. Donnés bibliographique sur le champignon entomopathogène <i>Metarhizium anisopliae</i> ...	2
I.1.DESCRPTION.....	2
I.2. Classification	2
I.3. Mode d'infection de <i>Metarhizium anisopliae</i>	2
I-3-A- L'adhésion.....	2
I-3-B- La germination.....	2
I-3-C- La différenciation.....	2
I-3-D- La pénétration.....	2
I-4- Formulation et application.....	3
I-5- Conservation.....	3
I-6-Lutte biologique	3

Chapitre II. Matériels et méthodes

I-1 - Matériel et Méthode	6
I- Matériel et méthode.....	6
I-1- Matériel biologique.....	6
I-1-1- Le rat wistar.....	6
I-1-2- La souche fongique	6
I-1-3- Matériel de laboratoire.....	6
II- Méthode.....	7
II-1- La préparation du champignon.....	7
II-2- La préparation de l'inoculum.....	7
II-3- Réalisation des inoculations.....	8
II-3-1- Gavage gastrique	8

SOMMAIRE

II-3-2- Injection sous cutanée.....	8
II-3-3- Réalisation des coupes histologiques.....	8
II-3-3-1- La dissection.....	8
II-3-3-2- Microtomie.....	9
II-3-3-2-1- Fixation.....	9
II-3-3-2-2- L'inclusion et l'encordage.....	10
II-3-3-2-3- Déshydratation.....	10
II-3-3-2-4- Le coulage du bloc ou encrobage dans la paraffine	10
II-3-3-2-5- La microtomisation et le collage des coupes sur lames.....	10
II-3-3-2-6- La coloration : coloration topographique HEMALUN EOSINE.....	11
II-3-3-2-6-1- Principe	12
II-3-3-2-6-2- Réactifs	12
II-3-3-2-6-3- Mode opératoire	12
II-3-3-2-6-4- Résultat de la coloration	12

Chapitre III- RESULTAS ET DISCUSSION

III-1- RESULTATS	13
III-1-1- Effets de <i>M.anisopliae</i> sur le poids des rats.....	13
III-2- DISCUSSION.....	15

Chapitre IV- CONCLUSION

CONCLUSION.....	16
-----------------	----

Introduction

Le domaine agricole connu de nombreux ennemis naturels mais la stratégie de lutte consiste qu'en épandage de produit chimiques qui s'avèrent néfaste pour l'environnement.

L'utilisation de produits chimiques pendant les situations d'urgence s'avère incontournable pour juguler le phénomène en raison de la rapidité d'action de ces derniers. Cependant, il est évident que pour se prémunir durablement contre les invasions de ce locuste il paraît impératif de privilégier la lutte préventive. Dans le souci de préserver l'environnement des effets néfastes des pesticides chimiques, le projet LUBILOSA a mis au point un bio pesticide appelé « Green Muscle » à base de spores du champignon *Metarhizium anisopliae* dans le cadre d'une lutte intégrée contre les criquets. En effet son application à grande échelle a montré qu'il était possible de maintenir ou de réduire les populations à un seuil inférieur de nuisibilité.

Parmi les travaux ayant fait l'objet de ces études dans le monde, citons ceux réalisés par BATEMAN et al. (1998), GILLESPIE et al. (1999), ARTHURS & THOMAS (2000), BLANFORD & THOMAS (2001), SEYMOUN et al. (2002), OUEDRAOGO et al, (2004), VAN DER VALK (2007). En Algérie, un certain nombre d'auteurs ont également suivi l'efficacité ainsi que l'action de la matière active de ce bio pesticide sur les perturbations physiologiques chez le criquet pèlerin tels que HEMOUR (2005), OUTTAR (2006), KAIDI (2007) et DJEZZAR (2007).

C'est dans ce contexte que nous avons réalisé ce présent travail dans lequel une dose du *Metarhizium anisopliae* a été utilisée afin de nous permettre de suivre l'effet de cet entomopathogène sur un aspect histologique du rat.

Ce document comporte 3 chapitres, le 1^{er} consiste en une synthèse de quelques données bibliographiques sur le rat (Wistar) et le (*Metarhizium anisopliae*). Le 2^{ème} résume la méthodologie adoptée pour la réalisation de notre expérimentation. Quant au 3^{ème} chapitre, il réunit les résultats obtenus de l'influence du *Metarhizium anisopliae* sur l'aspect histologique du rat et les discussions de nos résultats.

I. Données bibliographique sur le champignon entomopathogène *Metarhizium anisopliae*:

I.1.DESCRPTION

Le *Metarhizium anisopliae* est un champignon qui pousse naturellement dans les sols à travers le monde et cause des maladies chez une gamme variée d'insectes en agissant comme un parasite; il appartient ainsi aux champignons entomopathogènes. Il a été utilisé comme insecticide biologique pour lutter contre certains insectes nuisibles comme les sauteriaux, les termites, les thrips, etc. Son utilisation dans la lutte contre la transmission du paludisme par les moustiques est sous investigation (ANONYME, 2006b).

I.2. Classification : Selon GREATHEAD (1994)

Règne : Fungi
Division : Ascomycota
Classe : Sordariomycetes
Ordre : Hypocreales
Famille : Clavicipitaceae
Genre : *Metarhizium*
Espèce : *Metarhizium anisopliae*

I.3. Mode d'infection de *Metarhizium anisopliae*

Selon KOUASSI (2001), le mode d'infection des microchampignons entomopathogènes se divise en quatre étapes distinctes qui sont l'adhésion, la germination, la différenciation et la pénétration.

I-3-A- L'adhésion : est caractérisée par un mécanisme de reconnaissance et de compatibilité des conidies avec les cellules tégumentaires de l'insecte. Cette phase se scinde en deux étapes distinctes, la première passive ou l'attachement à la cuticule est réalisée grâce à des forces hydrophobiques et électrostatiques et la seconde active caractérisée par la production d'un mucilage qui va engendrer une modification épicuticulaire aboutissant à la germination.

I-3-B- La germination : va être dépendante des conditions environnantes et aussi de la physiologie de l'hôte (composition biochimique de la cuticule) qui peut favoriser ou inhiber la germination.

I-3-C- La différenciation : est caractérisée par la production d'appressoria; structures terminales qui vont servir de point d'encrage, de ramollissement de la cuticule et favoriser la pénétration. La production des appressoria est très dépendante de la valeur nutritive de la cuticule de l'hôte. Une cuticule nutritive va stimuler la croissance myceliale plutôt que la pénétration.

I-3-D- La pénétration : se fait par la combinaison de pression mécanique et enzymatique telles que les lipases, les protéases et les chitinases, la plus importante dans la pénétration étant les protéases.

La colonisation de l'hôte se fait lorsque le champignon parvient à surmonter les mécanismes immunitaires de défense de l'insecte et envahit l'hémolymphe. Les microchampignons entomopathogènes sont des agents de lutte très intéressants du fait de leur aptitude à infecter l'hôte par ingestion ou par simple contact pendant tous les stades, œuf, larve et adulte sensibles.

I-4- Formulation et application :

La plupart des utilisateurs, des paysans du Sahel et même des spécialistes du traitement aérien ont expliqué qu'une formulation en concentré liquide est de loin préférable à une poudre sèche qui doit être mélangée aux ingrédients de formulation. En réponse, il a été mis au point deux formulations, un concentré huileux qui a toujours besoin d'être dilué avec du pétrole, et une suspension huileuse qui peut être pulvérisée directement au sortir de l'emballage.

Ces formulations sont consistantes, avec très peu ou sans décantation, et peuvent être appliquées à l'aide des pulvérisateurs à disque rotatif de divers types : à main, monté sur un véhicule ou sur un avion (LOMER, 1997).

I-5- Conservation :

L'une des principales contraintes à l'utilisation des biopesticides est le fait qu'ils doivent être stockés à faible température et pendant peu de temps. Pour améliorer les conditions de stockage des spores de *Metarhizium* au-dessus du maximum biologique, il existe de nombreux points communs entre les conditions d'entreposage des spores et celles des graines. Ainsi, en inspirant des informations existantes un modèle de stockage a été créé. Ce modèle a confirmé que les spores doivent être séchées jusqu'à 5% de teneur en eau, puis enfermées dans un récipient hermétique pour un stockage optimum. Ainsi, les spores peuvent être conservées pendant plusieurs années à une température de moins de 20°C.

Dans le sud du Bénin, la température moyenne au niveau des stocks était de 30°C. Les spores peuvent garder leur viabilité à cette température pendant plus d'un an. Cependant, les températures maximales des magasins de stockage de pesticides dans le Sahel peuvent atteindre 50 ou 60°C, et la température moyenne tourne autour de 35°C; la période la plus chaude de l'année est le mois d'avril, juste avant les premières pluies (et les infestations de sautériaux). A de telles températures, les spores ne survivent que quelques semaines. (ANONYME, 2004b).

I-6-Lutte biologique :

M. anisopliae infecte une large gamme d'insectes y inclus des insectes nuisibles. Par conséquent, des entreprises partout dans le monde ont développé des biopesticides contenant les spores de ce champignon. Généralement il y a une souche efficace pour chaque groupe d'insectes, par exemple les termites, les mouches des fruits, les thrips, les moustiques etc. Le champignon n'infecte pas les humains ni les animaux et est considéré comme un insecticide sans danger. Les spores microscopiques sont appliquées telles quelles dans les champs affectés; le plan pour la lutte contre le paludisme est d'enduire des moustiquaires ou des tissus de coton fixés au mur.

II. Données bibliographiques sur le rat wistar

II-1-Description :

Le rat (Wistar) est un rongeur nocturne, docile, intelligent, omnivore et coprophage. Il possède une tête large, de petites oreilles, des yeux rouges globuleux et une petite queue écaillée. Le pelage du jeune rat est d'un blanc soyeux mais il devient progressivement plus rugueux et décolore avec l'âge.

II-2-Classification :

Règne : *Animal.*

Embranchement : *Vertébrés.*

Sous-classe : *Placentaires.*

Famille : *Muridés.*

Ordre : *Rongeurs.*

Genre : *Rattus.*

Espèce : *Rattus norvegicus.*

II-3-Particularité biologiques et physiologiques :

Le raton à la naissance pèse à peu près 5 grammes, est aveugle mais très actif et il atteint rapidement 35-50 grammes en trois semaines. Le mâle adulte pèsera 400-500 grammes, alors que la femelle adulte pèsera environ 100 grammes en moins. Un rat en santé peut vivre de 2 1/2 à 3 ans dépendant de la souche, du sexe, des conditions environnementales et d'autres variables. Les poils des jeunes rats albinos sont d'un blanc soyeux mais ils deviennent progressivement plus rugueux et décolorés (gris jaunâtre) avec l'âge.

-Les rats d'expérimentation sont généralement dociles et, si on les manipule fréquemment et gentiment ils deviennent apprivoisés et faciles à dresser. Ils se battent rarement entre eux alors qu'ils vivent et élèvent leurs petits collectivement. Souvent en partageant les responsabilités des soins.

-Les rats sont des animaux intelligents qui démontrent une grande variété de caractéristiques comportementales représentant un intérêt en recherche psychophysiologique, et ils supportent bien la chirurgie.

II-4-Installations et entretien :

Chapitre I- Données bibliographiques sur le champignon et le rat

II-4-1-Cages: La cage représente la résidence principale dans laquelle le rat passe sa vie. Sa forme, sa fabrication et son contenu influencent le micromilieu qui se crée à l'intérieur de la cage, et influence aussi profondément les réponses expérimentales.

II-4-2-Température et humidité:

-Les variations de température et d'humidité suggérées pour les rats sont de 20°-25°C (68°-77°F) et 50-55 % respectivement.

Cependant, la température et l'humidité doivent être maintenues relativement constantes pendant la durée d'une expérience afin de minimiser les effets indirects considérables des fluctuations sur les résultats de la recherche,

II-4-3-Nutrition :

- Le rat est un animal très coprophage et cette habitude peut fausser et masquer les effets d'un régime sur les résultats expérimentaux. Il y a possiblement jusqu'à 50-65% des matières fécales de rats nourris avec des régimes alimentaires adéquats qui peuvent être réingérées par coprophagie .

-La majorité des rats d'expérimentation sont nourris avec des aliments secs en cubes d'origine commerciale.

- Les rats adultes mangent de 12-30 grammes d'aliments secs en cube quotidiennement et, si le régime est complet, ils n'ont pas besoin de suppléments alimentaires.

- Les rats boivent 140 millilitres d'eau par kilogramme de poids corporel par jour. Ils boivent en moyenne 2 ml d'eau pour chaque gramme de nourriture sèche qu'ils mangent

II-4-4-Reproduction :

-La puberté survient entre 50 et 60 jours après la naissance chez les deux sexes, Les rats se reproduisent tout au cours de l'année.

- L'accouplement se produit au moment où la femelle est âgée d'au moins 90 jours et qu'elle pèse 200-275 g et les jeunes mâles ne devraient pas être utilisés comme géniteurs avant l'âge de trois mois ou bien avant d'avoir atteint 274-350 g de poids corporel.

-Les rats sevrés doivent être séparés sexuellement vers l'âge de sept semaines afin d'éviter la reproduction précoce.

-Les rattes sont polyoestriennes et elles acceptent le mâle à tous les 4 ou 5 jours au moment de l'ovulation qui dure chaque fois de 12-14 heures.

La gestation dure de 21-23 jours. Cependant, la période entre la fécondation et la naissance peut être allongée jusqu'à 30 jours et plus à cause du délai d'implantation lors de la reproduction post-partum.

I-Matériels et méthodes :

I-1-Matériel Biologique :

I-1-1- Le rat wistar :

Notre étude est réalisée sur des rats de moins de 3mois d'âge d'un élevage de masse. Son maintien ainsi réalisés au laboratoire à l'école nationale supérieure vétérinaire d'El Harrach.



Figure n°1 - Elevage des rats

Original

I-1-2-La souche fongique :

Metarhizium anisopliae var. *acidum*. Cette souche à été obtenue du département de lutte antiacridienne de l'institut National de la protection des végétaux (INPV) d'El Harrach, sous forme d'un biopesticide appelé "Green muscle" formulé en concentration huileuse de spores.



Figure n°2 - Aspect cultural de *M.anisopliae*

Original

I-1-3-Matériel de laboratoire :

- Des cages ; thermomètre ; des peux en plastic stériles ; formol
- La hote ; bec benzène ; briquet ; bistouri ; microscope optique ; des bécchers ; des boîtes de Pétri en plastique stérilisées ; Autoclave ;coton ; parafilm ; étuve ; ; des fiole de 100 ml (préparation des solutions) .

II – Méthode :

II-1- La préparation du champignon :

La préparation de la souche fongique de *M. anisopliae* est faite sur un milieu de culture nutritif (PDA) . Pour ce-la, nous avons suivis les étapes suivantes :

- Stérilisation du milieu de culture dans un autoclave.
- Ecoulement du milieu de culture dans des boites de Pétri en plastique stériles remplies à moitié.
- Laisser ces boites pendant 24h pour le refroidissement et la solidification du milieu.
- Ensemencement de champignon dans ces boites et fermeture de ces dernières par un parafilm.
- Incubation de champignon à une température de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$.

Toutes ces étapes sont effectuées dans un milieu stérile, à proximité d'un bec benzène sous une hôte pour éviter toute sorte de contamination.

Avant de cultiver le champignon il faut l'isoler la souche apartire de suspension huileuse.

II-2- Préparation de l'inoculum (solution entomopathogène) :

Après 10 jours d'ensemencement du champignon, on prélève quelques fragments de la culture qu'on met dans un Erlens mayer contenant 250 ml d'eau distillée stérile. Ensuite, on agite cette suspension énergiquement pendant 10 minutes afin de libérer une quantité maximale des spores.

Dans notre cas nous avons retenus deux doses :

- Une faible dose : 4.4×10^6 spores /ml.
- Une forte dose : $1,1 \times 10^7$ spores /ml.

II-3-La réalisation de l'inoculation :

Nous avons pesés les animaux avant et après le traitement et les résultats obtenues sont mentionnées dans les tableaux 1 et 2 montrés dans la partie résultats et discussion.

II-3-1-Gavage gastrique :

Pour réaliser ce test nous avons utilisé 02 lot de rats de sexe confondu (03 individus par dos).

Et un rat comme témoin. Pour ce faire nous avons procédés comme suite :

- mise à jeun les animaux la veille du test.
- administration intra-gastrique (gavage) de 0,5ml d'une solution de *M.anisopliae* a chaque rat.
- suivie des animaux durant 07 jours.



Figure n° 3 -Gavage gastrique
Original

II-3-2-Les injections sous cutané :

Sur les animaux qui reçoivent le gavage gastrique et en même temps, on a fait des injections sous cutané :

De 0,025 ml de l'inoculum a chaque rat, le rat témoin 0,025ml d'eau distillée stérilisée.



Figure n° 4 -Injection sous cutané
Original

II-3-3-La réalisation des coupes histologiques :

II-3-3-1-La dissection :

07 jours après la réalisation des testes nous avons réalisé la dissections des sujets aux laboratoire de l'autopsie (ENSV), par la technique suivante :

- euthanasier des animaux par l'inhalation de l'éther éthylique dans une cloche a éther.



Figure n° 5 - Cloche a ether
Original

-l'animal repose sur le dos sur une plaque de liège fixée, les pattes sont écartées et fixées par des épingles. la peau est incisée, disséquée et rabattue a droite et a gauche . la paroi abdominale est ouverte, puis la cavité thoracique.

Nous avons prélevé : le foie, la rate, l'estomac, l'ovaire, le rein, la peau. on met tout dans un fixateur (formol) afin de la réalisation des coupes histologiques.



Figure n° 6 -Dissection des rats
Original

II-3-3-2-Microtomie : au niveau de laboratoire d'anatomopathologie :

II-3-3-2-1-La fixation :

Procédure :

La fixation doit être immédiate après le prélèvement au laboratoire, pour empêcher une putréfaction du tissu par autolyse et par altération microbienne . Le volume du fixateur doit être de 20 à 50 fois celui du prélèvement . En routine , les pièces séjourneront de 12 à 24 heures dans le fixateur et y seront totalement immergées, aucune pièce ne doit flotter au dessus du fixateur car la fixation sera ni bonne ni homogène . Ce temps est toutefois à adapter selon la consistance et la taille du tissu (vitesse de pénétration de formol 10% est de 1 à 2 mm/h).

II-3-3-2-2-L'inclusion et l'enrobage :

Procédure :

Le prélèvement fixé , Chaque morceau est bien identifié par un code (association de lettres et d'un nombre). Les prélèvements sont ensuite déposés dans des cassettes avec leur identification sur le bord des cassettes (inscription avec un crayon) .

II-3-3-2-3-La déshydratation :

Le prélèvement est d'abord déshydraté (immersion dans des bains successifs d'alcool à concentrations croissantes jusqu'à l'alcool absolu).

-deux bains d'alcool 70° pendant une heure chacun

-deux bains d'alcool 90° pendant une heure chacun

-deux bains d'alcool 100° pendant une heure chacun

- l'utilisation d'un solvant de la paraffine (éclaircissement).

-cette solvant de la paraffine est destiné à chasser l'alcool par deux bains successifs de toluène.

-l'inclusion proprement dite dans la paraffine fondue qui prend la place du solvant .

II-3-3-2-4-Le coulage du bloc ou encrobage dans la paraffine :

La préparation du bloc de paraffine (encrobage) se fait au moyen d'un petit moule préalablement chauffé dans lequel on verse de la paraffine fondue grâce à un distributeur de paraffine .Dans celle-ci en place rapidement la pièce en l'orientant convenablement suivant les coupes transversales ou longitudinales pré-envisagées, puis on laisse refroidir la paraffine .

Après refroidissement complet , le bloc de paraffine est démoulé, la durée totale de l'opération d'inclusion est de 24 à 48 heures suivant l'épaisseur du prélèvement.

II-3-3-2-5-La microtomisation et le collage des coupes sur lames :

Procédure :

L'équarrissage par l'enlèvement à l'aide d'un couteau, de l'exsudent de paraffine. Il ne doit rester qu'environ 5mm de paraffine autour de la pièce.



Figure n°7 -Ecarissage des blocs
Original



Figure n° 8 -Microtome
Original

- Le montage du bloc sur son support :

Vous devez prêter une attention particulière au montage du bloc sur un support. Sa bonne orientation par rapport à la lame est primordiale. Le bloc doit rester parallèle à la lame. La lame est extrêmement tranchante. Suivez bien son installation par le moniteur sur le microtome.

- Le bloc obtenu est taillé au scalpel jusqu'à éliminer l'excédent de paraffine environnant l'organe. Il est commode de donner à la surface des coupes la forme d'un trapèze ou d'un reilage dont au moins deux cotés soit parallèle.

- La coupe proprement dite s'obtient par passage régulier de la pièce à coupé devant le rasoir ou couteau du microtome. A chaque passage, celui-ci enlève une tranche d'épaisseur réglable. On peut effectuer des coupes isolées ou bien pour la reconstitution totale d'un prélèvement, réaliser des coupes sériées, disposées en forme de ruban.

-Le collage des coupes sur une lame de verre :

Sur chaque lame de verre porte-objet est gravé le numéro d'identification du bloc. Pour l'étalement de la coupe, on la met dans un bain marie pendant 1 minute (T 41 C), on la dépose sur un la lame puis l'utilisation de la platine chauffante pour assécher, veiller à laisser la paraffine se détendre. Les coupes égouttées et mises dans des portoirs.



Figure n° 9 -Bain marie
Original

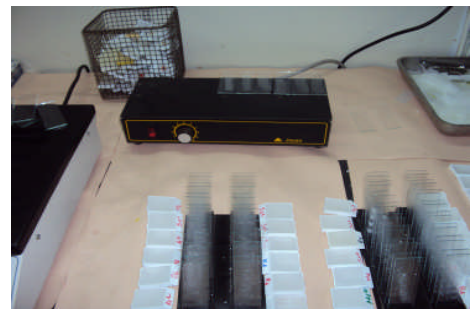


Figure n°10 –Porte lames
Original

II-3-3-2-6- La coloration : coloration topographique HEMALUN EOSINE :



Figure n° 11 - Protocole de coloration
Original

II-3-3-2-6-1-Principe :

Coloration des noyaux par une laque aluminique l'hémalum, et des fonds par un seul colorant acide : l'éosine.

II-3-3-2-6-2- Réactifs :

Hématoxyline de Harnis

Eosine à 1%

II-3-3-2-6-3- Mode opératoire :

* **Déparaffiner** : par le toluène

-1 bain pendant 5 min

-2 bain pendant 7 min

* **Réhydrater** :

- Alcool 100 60 à agitation

- Alcool 90 60 à agitation

- Alcool 7060 à agitation

- Eau distillé..... 3 min

* **Coloration** :

- L'hématine 1 min et 15

- laver pendant 3 min à l'eau courante

- Colorer 3 min à l'éosine (pour la différence se fait par l'alcool 70 et 90)

* **Déshydrater** :

- Alcool 70 30 à agitation

- Alcool 90..... 30 à agitation

- Alcool 100.....1 min à agitation

* **Eclaircir** :

- 1 bain au toluène pendant 5 min

- 2 bain au toluène pendant 5 min

* **Monter** :

Procédure :

Après coloration, on dépose sur chaque coupe d'un milieu permanent, iso-réfringent avec le verre (résine) à l'aide d'une aiguille puis on recouvre la coupe d'une lamelle couvre-objet

Lors de la manipulation, aucun bulle d'air ne doit s'insérer entre la lame et la lamelle.

Après le montage, les coupes sont rangées dans des boites a l'abri de la poussière, puis on fait la lecture en microscope.

II-3-3-2-6-4-Résultat de la coloration :

Les noyaux apparaitre colorés en violet et le fond est coloré en rose.

III-RESULTAS ET DISCUTION :

III-1- RESULTATS :

III-1-1- Effet de *M.anisopliae* sur le poids des rats :

Lots		Numéro du rat	Poids (g)
Témoins		1	41.50
Les rats destinés au traitement	Par la dose D1	1	40.20
		2	41.32
		3	40.60
	Par la dose D2	4	40.56
		5	41.41
		6	41.04

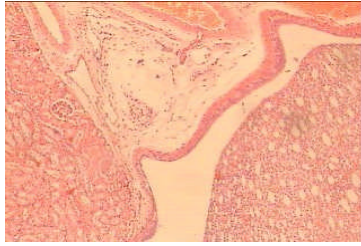
Tableau n° 1- poids des rats avant la réalisation des traitements.

Lots		Numéro du rat	Poids (g)
Témoins		1	90
Les rats destinés au traitement	Par la dose D1	1	90.22
		2	90.30
		3	55
	Par la dose D2	4	89.56
		5	90.41
		6	90.04

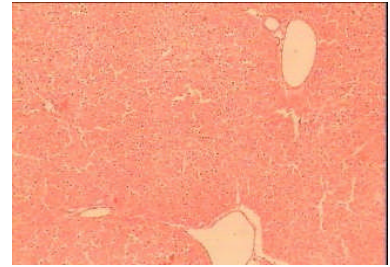
Tableau n° 2- poids des rat avant la dissection.

D'après ces résultats obtenues on observe que pendant la durée de 10 jours que les rat sont continués de prendre le poids de façon normal, mais on souligne que le poids de tous les est presque le même autour de 90g à l'exception d'un rat mort (55g).

On a constaté que la cause de la mort d'un individu est le phénomène de cannibalisme ou a une cause incunne.



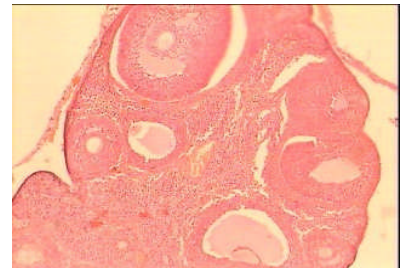
Rein (Gr x 400)



Rate (Gr x100)



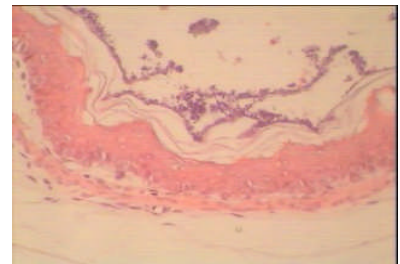
Peau (Gr x 400)



Ovaire (Gr x 400)



Partie glandulaire de l'estomac
(Gr x 400)



Partie lisse de l'estomac
(Gr x 400)

Figure n° 12 -Histologie des organes du rat témoin

-Vu les événements qu'a connu l'ENSV, il nous était quasiment impossible de poursuivre la suite de notre partie expérimentale à cet effet nous essayant de discuter sur les résultats obtenus par le travail des autres chercheurs scientifiques.

III-2-Discussion :

Nos résultats concernant la continuité et la normalité de la prise de poids sont en accord avec ceux de beaucoup de travaux sur l'étude de l'effet d'un champignon entomopathogène utilisés en deux doses, sur l'histologie du rat. En effet (HALOUANE. F., 2008) et (KADI et Khames, 2009) signalent que l'effet d'un champignon entomopathogène n'a engendré aucune perturbation au niveau des différentes structure a savoir : foie, rate , estomac et la peau, comparativement a celle du sujet témoin chez lequel cette structure apparait identique.

.

Conclusion :

Ce travail a été entrepris dans le but d'approfondir quelques connaissances sur l'utilisation des champignons entomopathogènes et leur effet sur l'environnement. Le *M.anisopliae* fait partie d'une large gamme d'entomopathogène, utilisé surtout dans la lutte antiacridienne pour son efficacité prouvée.

Notre travail visait une contribution à l'étude de l'effet de *M.anisopliae* sur le poids et l'histologie du rat, un petit animal très étudié ; dit organisme modèle qui sert à réaliser de nombreuses expériences permettant de faire avancer la recherche. Les résultats obtenus concernant l'effet de *M.anisopliae* sur le poids des rats ne révèle aucune perturbation sur l'évolution de la prise du poids chez l'ensemble des individus traités comparativement aux témoins.

En perspective, on peut suggérer qu'il serait intéressant à l'avenir d'approfondir les recherches sur *M.anisopliae*, afin de minimiser les traitements chimiques dont les conséquences sont fâcheuses pour l'environnement. et ces effets sur d'autres paramètres physiologiques de ce mammifère.

Il serait souhaitable d'évaluer le degré de toxicité pour le rat et l'effet causé sur d'autres paramètres physiologiques de ce mammifère par ce champignon afin d'évaluer son efficacité: soit dans le cadre de zoonoses, ou dans la lutte biologique.

Références bibliographiques :

- HADDADJ Fairouz ; Ing. Agro. Inst. Nat. Agro, El Harrach.

- HALOUANE ; 1997: Cycle biologique de *Schistocerca gregaria* (Forskal, 1997) et de *Locusta migratoria* (Linn, 1758) (Orthoptera, Acrididae), Efficacité de *Metarhizium anisopliae* (Metch) (Hyphomycete, Deuteromycotina) et effet sur quelques paramètres physiologiques de *Schistocerca gregaria*.

- WADE V., 2007- *Atelier international sur l'avenir des biopesticides dans la lutte contre le criquet pèlerin (Sénégal, 12-15 février 2007)*. Ed. The orthopterist's society

- VAN DER VALK, 2007- *Review of the efficacy of Metarhizium anisopliae var acridum against the Desert Locust*. Ed. FAO, AGP/DL/TS, DESERT LOCUST TECHNICAL SERIES n°34, Rome.

- SIEGLAFF D. H., PEREIRA. R. M. and CAPINERA J. L., 1997- Pathogenicity of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium flavoviride* (Deuteromycotina) to *Schistocerca americana* (Orthoptera: Acrididae). [*Journal of Economic Entomology*, V. 90, N° 6 \(7\)](#).

- SEYMOUN E., BATEMAN R.P. and CHARNLEY A.K., 2002- The effect of *Metarhizium anisopliae* var *acridum* on haemolymph energy reserves and flight capability in the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *J. Appl. Ent.*

- QUESADA-MORAGA E., RUIZ-GARCIA A. and SANTIAGO-ALVAREZ C., 2006- Laboratory Evaluation of Entomopathogenic Fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* Against Puparia and Adults of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *Journal of Economic Entomology*, V.99(6): 1955-1966.

- QUESADA-MORAGA E., SANTOS-QUIROS R., VALVERDE-GARCIA P. and SANTIAGO-ALVAREZ C., 2004- Virulence, horizontal transmission, and sublethal reproductive effects of *Metarhizium anisopliae* (Anamorphic fungi) on the German cockroach (Blattodea: Blattellidae). [*Journal of Invertebrate Pathology*, V. 87\(1\):51-58](#).

- OUTTAR F., 2006 - *Effet de deux entomopathogènes, Beauveria bassiana Bals. et Metarhizium anisopliae var. acridum Metch. (Hyphomycetes, Deuteromycotina) sur l'état embryonnaire du criquet pèlerin Schistocerca gregaria (Forskål, 1775) (Cyrtacanthacridinae, Acrididae)*. Thèse, Ing Sci. Agro. Inst. Nati. Agro. El Harrach, 102 p.

- OUEDRAOGO R. M., CUSSON M., GOETTEL M. S. and BRODEUR J., 2003- Inhibition of fungal growth in thermoregulating locusts, *Locusta migratoria* infected by the fungus *Metarhizium anisopliae* var *acridum*. *Journal of invertebrate pathology*, V. 82, n°2, pp. 103-109.

- MILNER R., 2000- *Metarhizium* biopesticides registered in Australia. Biocontrol. News and Information 21(2). (Disponible sur <http://pest.cabweb.org/Journals/BNI/BNI21-2/Gennews.htm>).

-LOMER C. J., BATEMAN R. P., DENT D., DE GROOTE H., DOURO-KPINDOU O. K., KOOYMAN C., LANGEWALD J., OUAMBAMA Z., PEVELING R. and THOMAS M.,1999- Development of strategies for the incorporation of biological pesticides into the integrated management of locusts and grasshoppers. *Agricultural and Forest Entomology*, N° 1, pp. 71-88.

- MAGOR J., 2007- Atelier international sur l'avenir des biopesticide dans la lutte contre le criquet pèlerin. (12-15 février, 2007), Saly, Sénégal. Ed. FAO/AGPP., Rome, 37p.

-LOMER C., 1999- *Phase 3 final report. LUBILOSA (LUtte BIologique contre les LOcustes et les Sauteriaux). Biological Locust and Grasshopper Control Project*. Ed. CABI, IITA, Cotonou, Benin, 73p.

- KRALL S. et NASSEH O.M., 1991- La lutte biologique contre les criquets et les sautériaux , projet de recherche de la G.T.Z., pp. :44-49 cités par LOMER C. J. et PRIOR C., 1991 : *Lutte biologique contre les acridiens. Compte rendu d'un atelier* (29 avril – 1er mai), Bénin. Ed. C.A.B. International, Royaume Uni, 399 p.

- LANGEWALD, 1999- Green Muscle User Hand Book LUBILOSA (LUtte BIologique contre les LOcustes et les Sauteriaux). Biological Locust and Grasshopper Control Project Ed. CABI, IITA, CILSS, GTZ, Cotonou, Benin, 13 pp.

- KAIDI N., 2007- *Bioécologie de Schistocerca gregaria Forskal, 1775 (Orthoptera, Cyrtacanthacridinae) dans la région de l'Ahaggar. Essais de lutte biologique au moyens de champignons entomopathogènes : Beauveria bassiana et Metarhizium anisopliae var. acridum*. Thès. Mag. sci. agro., Inst. nat. agro., El Harrach, 145 p.

- KOOYMAN C, 2007- *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*, la matière active du Green Muscle®, pp :11-13 cité par WADE V. : *Atelier international sur l'avenir des biopesticides dans la lutte contre le criquet pèlerin* (Sénégal, 12-15 février 2007). Ed. The orthopterist's society, 32p.

-HEMOUR S., 2005 - *Etude morphométrique et effet de deux champignons entomopathogènes Beauveria bassiana Bals. et Metarhizium anisopliae (Deuteromycotina, Hyphomycètes) sur quelques paramètres physiologiques de Schistocerca gregaria (Forskal, 1775) (Cyrtacanthacridinae, Acrididae)*. Mém. Ing. Agro., Int. nati. agro., El-Harrach, 103p.

- HERNANDEZ-VELAZQUEZ V.M., BERLANGA-PADILLA A. and TORIELLO C., 2007- Reduction of feeding by *Schistocerca piceifrons piceifrons* (Orthoptera: Acrididae), following infection by *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. *Florida Entomologist*, 90(4) : 786-789.

- HUNTER D.M., 2007- Application de *Green Guard*® (*Metarhizium anisopliae* var. *acridum*) contre le Criquet migrateur oriental (*Locusta migratoria manilensis*) en Chine, p. 29 cité par WADE V. : *Atelier international sur l'avenir des biopesticides dans la lutte contre le criquet pèlerin (Sénégal, 12-15 février 2007)*. Ed. The orthopterist's society, 32p.
- EKESI S. & MANIANIA N.K., 1999- Susceptibility of *Megalurothrips sjostedti* developmental stages to *Metarhizium anisopliae* and the effects of infection on feeding, adult fecundity, egg fertility and longevity. *Entomol. Experim. Applic. V. 94 (3)* : 229 – 236.
- FAO, 2007- *Guidelines : Field efficacy trials with the entomopathogen Metarhizium anisopliae var. acridum (Green MuscleTM) against the Desert Locust (Schistocerca gregaria) and Monitoring of its operational use*. Ed. FAO/AGPP, Rome, 33 p.
- BATEMAN, R. P. (1997) The development of a mycoinsecticide for the control of locustsand grasshoppers. *Outlook on Agriculture* 26:13–18.
- ROBINSON, R. 1979. Taxonomy and Genetics. In: *The Laboratory Rat, Vol. I, Biologyand Diseases* (H.J. Baker, J.R. Lindsey, S.H. Weisbroth, eds.). Academic Press, NewYork, NY. pp. 37-54.
- FESTING, M.F.W. 1979. Suitability of the Rat for Different Investigations. In: *Inbred andGenetically Defined Strains of Laboratory Animals, Part I, Mouse and Rat* (P.L Altman,D.D. Katz, eds.). Fed. Am. Soc. Exper. Biol. Bethesda, MD. pp. 237-238.
- LINDSAY, J.R. 1979. Historical Foundations. In: *The Laboratory Rat, Vol. I, Biology andDiseases* (H.J. Baker, J.R. Lindsey, S.H. Weisbroth, eds.). Academic Press, New York,NY. pp. 2-36.
- BAKER, H.J., LINDSEY, J.R., WEISBROTH, S.H. (eds.). 1980. *The Laboratory Rat, Vol. II,Research Applications*. Academic Press, New York, NY.
- NAVIA, J.M., NARKATES, A.J. 1980. Dental Research. In: *The Laboratory Rat, Vol. II,Research Applications* (H.J. Baker, J.R. Lindsey, J.R. Weisbroth, eds.). Academic Press,New York, NY. pp. 59-74.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL (U.S.). Committee on Care and Use of SpontaneouslyHypertensive (SHR) Rats. 1976. *Spontaneously Hypertensive (SHR) rats: Guidelines forbreeding, care and use*. ILAR News 19, G1-20.
- BASKERVILLE, M., SEAMER, J.H. 1982. *Use of portable filter units to control the animal house environment*. *Lab. Anim.* 16, 356.
- THIGPEN, J.E., ROSS, P.W. 1983. *Viral cross contamination of rats maintained in a fabric-walled mass airflow system*. *Lab. Anim. Sci.* 33, 446.
- ANVER, M.R., COHEN, B.J. 1979. *Lesions Associated with Aging*. In: *The Laboratory Rat Vol. I, Biology and Diseases* (H.J. Baker, J.R. Lindsay, S.H. Weisbroth, eds.). Academic Press, New York, NY. pp. 378-399.

- NAYFIELD, K.C., BESCH, E.L 1981. *Comparative responses of rabbits and rats to elevated noise. Lab. Anim. Sci.* 31, 386.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL (U.S.). 1978. *Nutrient Requirements of Laboratory Animals, No. 10, (3rd Revised Ed.). National Academy of Sciences, Washington, DC.*
- ROGERS, H.E. 1979. *Nutrition. In: The Laboratory Rat, Vol. I, Biology and Diseases (H.J. Baker, J.R. Lindsay, S.H. Weisbroth, eds.). Academic Press, New York, NY. pp. 123-152.*
- FORD, D.J., WARD, R.J. 1983. *The effect on rats of practical diets containing different protein and energy levels. Lab. Anim.* 17, 330.
- NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES. *Committee on Laboratory Animal Diets. 1978. Control of diets in laboratory animal experimentation. ILAR News* 21, A1-12.
- NEALE, R.J. 1982. *Coprophagy in iron-deficient rats. Lab. Anim.* 16, 204.
- WAYNFORTH, H.B. 1980. *Experimental and Surgical Technique in the Rat. Academic Press, London, UK. pp. 84.*
- SANSONE, E.B., FOX, J.G. 1977. Potential chemical contamination in animal feeding studies: Evaluation of wire and solid bottom caging systems and gelled feed. *Lab. Anim. Sci.* 27, 457.
- YOUNG, W.C., BOLING, J.L, BLANDAU, R.J. 1941. The vaginal smear picture, sexual receptivity and time of ovulation in the albino rat. *Anat. Rec.* 80, 37.
- BERTHOLET, J.Y. 1981. Mating method to produce accurate timed pregnancies in rats. *Lab. Anim. Sci.* 31, 180.
- LANE-PETTER, W., LANE-PETTER, M.E. 1971. Toward Standardized Laboratory Rodents. The Manipulation of Rat and Mouse Litters. In: *Defining the Laboratory Animal. National Academy of Sciences, Washington, DC. pp. 3-13.*
- SHARPE, R.M., MORRIS, A., WYATT, A.C., 1973. The effect of the sex of littermates on the subsequent behaviour and breeding performance of cross-fostered rats. *Lab. Anim.* 7, 51.
- DAVIS, D.R., YEARY, R.A. 1979. Impaired fertility in the jaundiced female (Gunn) rat *Lab. Anim. Sci.* 29, 739.
- LANE-PETTER, W. 1972. The Laboratory Rat. In: *The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory Animals (4th 95 Ed.). Churchill Livingstone, London, UK. pp. 204-211.*
- BAKER, D.E.J. 1979. Reproduction and Breeding. In: *The Laboratory Rat. Vol. I, Biology and Diseases (H.J. Baker, J.R. Lindsey, S.H. Weisbroth, eds.). Academic Press, New York, NY. pp. 154-168.*

-LANE-PETTER, W., PEARSON, A.E.G. 1971. The Laboratory Animal. Principles and Practice. Academic Press, New York, NY.