

BURKINA FASO

Unité - Progrès - Justice

**MINISTERE DES ENSEIGNEMENTS SECONDAIRE, SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE**

**UNIVERSITE POLYTECHNIQUE
DE BOBO – DIOULASSO**

**INSTITUT DU DEVELOPPEMENT
RURAL**

**CENTRE NATIONAL DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE ET
TECHNOLOGIQUE**

**INSTITUT DE L'ENVIRONNEMENT
ET DE RECHERCHES AGRICOLES**

**CENTRE REGIONAL DE
RECHERCHES
ENVIRONNEMENTALES ET
AGRICOLES DE L'OUEST**

STATION DE FARAKO-BA

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

**Présenté en vue de l'obtention du diplôme d'Ingénieur du
Développement Rural**

Option : Agronomie

**EVALUATION DE L'EFFICACITE DE DEUX DELTA-
ENDOTOXINES DE *BACILLUS THURINGIENSIS* (CRY1Ac
ET CRY2Ab) SYNTHETISEES PAR LE COTONNIER
TRANSGENIQUE (COTON BT) DANS LA GESTION DE LA
RESISTANCE DE *HELICOVERPA ARMIGERA* (HUBNER) A
LA DELTAMETHRINE**



**Directeur de mémoire : Dr Bernard BACYE
Codirecteur de mémoire : M. Begue DAO
Maître de stage : M. Omer S. A. HEMA**

Juin 2005

DRABO Abdoulaye

TABLE DES MATIERES

Dedicaces	i
Remerciements	ii
Liste des Sigles et abréviations	iii
Liste des tableaux	iv
Liste des figures	v
Liste des photos	vi
Résumé	vii
Abstract	vii
Introduction generale.....	1

PREMIERE PARTIE: GENERALITES

Chapitre 1: Le cotonnier et ses ravageurs.....	3
1.1 Le cotonnier.....	3
1.1.1 Botanique	3
1.1.2 Morphologie	3
1.1.3 Cycle biologique du cotonnier	3
1.2 Principaux ravageurs du cotonnier.....	4
1.2.1 Systématique de <i>Helicoverpa armigera</i> (Hübner)	5
1.2.2 Description morphologique de l'insecte	5
1.2.2.1 Les adultes.....	5
1.2.2.2 Les œufs	5
1.2.2.3 Les larves.....	5
1.2.2.4 Les chrysalides	6
1.2.3 Cycle biologique de <i>H. armigera</i>	7
1.2.4 Plantes hôtes et dégâts.....	8
1.2.5 Mobilité et répartition de l'insecte dans le monde	8
Chapitre 2: La bactérie <i>Bacillus thuringiensis</i> (Berliner).....	9
2.1 Description et cycle vital.....	9
2.2 Classification des delta-endotoxines de <i>B. thuringiensis</i>	11
2.3 Structure des delta-endotoxines	12
2.4 Mode d'action des toxines.....	12

2.5 Sensibilité de <i>H. armigera</i> aux toxines	14
Chapitre 3: Protection phytosanitaire du cotonnier et résistance	
des insectes aux insecticides.....	15
3.1 Protection phytosanitaire.....	15
3.1.1 Familles d'insecticides	15
3.1.2 Mode d'action des insecticides	16
3.2 Résistance des insectes aux insecticides	17
3.2.1 Définition et problématique de la résistance	17
3.2.1.1 Définition	17
3.2.1.2 Problématique de la résistance	17
3.2.2 Apparition de la résistance	18
3.2.3 Mécanismes de résistance	18
3.2.4 Résistance de <i>H. armigera</i> à la deltaméthrine dans le monde	19
3.2.5 Résistance des insectes aux toxines de <i>B. thuringiensis</i>	20
Chapitre 4: Elevage de <i>H. armigera</i> et pré-test.....	
4.1 Elevage de l'insecte.....	22
4.1.1 Souches utilisées	22
4.1.2 Récolte et élevage des larves.....	23
4.2 Pré-tests	23
4.2.1 Matériel	24
4.2.2 Méthodes	25
4.2.2.1 Préparation des solutions de toxine.....	25
4.2.2.2 Méthode de traitement.....	25
4.2.3 Résultats et discussion.....	26
Conclusion	28
Chapitre 5 : Tests de sensibilité de <i>H. armigera</i> à la deltaméthrine.....	
Introduction	29
5.1 Matériel et méthodes	29
5.1.1 Matériel	29
5.1.2 Méthodes	29
5.1.2.1 Pesée des larves.....	29

5.1.2.2 Préparation des solutions.....	30
5.1.2.3 Application topique.....	30
5.1.2.4 Analyses des données.....	31
5.2 Résultats.....	31
5.3 Discussion.....	33
Conclusion partielle.....	35
Chapitre 6: Etude de l'efficacité des deux delta-endotoxines de <i>B. thuringiensis</i> (Cry1ac et Cry2ab) synthétisées par le coton bt sur <i>H.armigera</i>	36
Introduction.....	36
6.1. Matériel et méthodes.....	36
6.1.1 Matériel.....	36
6.1.2 Méthodes.....	37
6.1.2.1 Préparation des solutions insecticides.....	37
6.1.2.2 Méthode de traitement.....	37
6.2 Résultats.....	38
6.3 Discussion.....	40
Conclusion partielle.....	42
Chapitre 7 : Effet de l'association des toxines Cry1Ac et Cry2Ab sur les larves de <i>H. armigera</i>	43
Introduction.....	43
7.1 Matériel et méthodes.....	43
7.1.1 Matériel.....	43
7.1.2 Méthodes.....	43
7.2 Résultats.....	44
7.3 Discussion.....	46
Conclusion partielle.....	47
Conclusion générale et perspectives.....	48
Références bibliographiques.....	50
Annexes.....	57

DEDICACES

*A
ma famille,
à la famille Nafoni
et aux amis
je dédie ce mémoire.*

REMERCIEMENTS

La présente étude a pu être menée grâce au soutien de plusieurs personnes, à qui nous aimerions témoigner notre profonde gratitude. Ainsi, nous adressons nos sincères remerciements :

- au **Dr Ouola TRAORE**, chef du Programme Coton qui nous a accepté dans le laboratoire d'entomologie dudit Programme ;

- à **Monsieur Omer S. A. HEMA**, notre maître de stage qui, malgré ses multiples occupations a bien voulu nous encadrer et nous apporter ses conseils tout au long de notre stage ;

- au **Dr Bernard BACYE**, notre directeur de mémoire qui a accepté de diriger notre étude et consacrer une grande partie de son temps à la correction du mémoire ;

- à **Monsieur Begue DAO**, codirecteur de mémoire pour ses conseils et ses corrections ;

- au **Dr Seydou N. TRAORE** et au **Dr Doulaye TRAORE** qui nous ont toujours soutenu et conseillé ;

- au **Dr Idrissa DICKO** pour la documentation et ses nombreux conseils combien importants ;

- aux chercheurs **Hugues SOME**, **Claude TIEMTORE**, **Gaspard VOGNAN** et **Bazoumana KOULIBALY** pour leurs conseils et critiques ;

- à tout le personnel du Programme Coton et plus particulièrement l'équipe du laboratoire d'entomologie : **Messieurs Blaise K. ZAGRE**, **Moumouni YE** et **Samou HANDE** pour leur franche collaboration ;

- au corps professoral de l'IDR pour sa rigueur dans notre formation ;

- à ma famille, à mon ami **TRAORE Aly Nafony** et à tous ceux dont la complicité a permis la réalisation de ce travail.

LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS

BIT04	:	Souche de <i>H. armigera</i> récoltée à Bittou en 2004
BK77	:	Souche sensible de référence de <i>H. armigera</i> récoltée à Bouaké en 1977 et maintenue en élevage à Montpellier à des fins de tests
C.I.R.A.D.	:	Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement
C.I.R.D.E.S.	:	Centre International de Recherche-Développement sur l'Elevage en Zones Subhumides
CL50	:	Concentration létale pour 50% de la population testée
Cry	:	Crystal
Cyt	:	Protéine de petite taille synthétisée par <i>B. thuringiensis</i> ayant une action cytolytique non spécifique
ddl	:	Degré de liberté
D.D.T.	:	Dichloro-Diphényl-Trichloréthane
DAT04	:	Souche de <i>H. armigera</i> récoltée à Datomo en 2004
DL50	:	Dose létale pour 50% de la population testée
I.G.R.	:	Insect Growth Regulator
Kda	:	Kilodalton
P.B.S.	:	Phosphate-Buffered Saline
P.I.B.	:	Produit Intérieur Brut
SID04	:	Souche de <i>H. armigera</i> récoltée à Sidéradougou en 2004
U.V.	:	Ultra-violet
V.I.P.	:	Vegetative Insecticidal Protein

LISTE DES TABLEAUX

	Pages
Tableau I : Classification des delta-endotoxines de <i>B. thuringiensis</i>	11
Tableau II : Résultats des tests réalisés sur <i>H. armigera</i> et <i>H. virescens</i> avec différentes toxines de <i>B. thuringiensis</i>	14
Tableau III : DL50 de la deltaméthrine obtenues par différents auteurs.....	19
Tableau IV: DL50 de la deltaméthrine obtenues sur des souches de Côte d'Ivoire.....	20
Tableau V: Concentrations des solutions insecticides utilisées dans les pré-tests.....	25
Tableau VI: Valeurs des DL50 de la deltaméthrine obtenues sur les souches BK77, BIT04, DAT04 et SID04.....	32
Tableau VII : Analyse de la déviance des droites de régression dose-mortalité de la deltaméthrine utilisée sur les souches BK77, BIT04, DAT04 et SID04.....	33
Tableau VIII : Analyse de la déviance des droites de régression dose-mortalité de la deltaméthrine utilisée sur les souches BIT04, DAT04 et SID04.....	33
Tableau IX : Concentrations retenues pour les tests de sensibilité de <i>H. armigera</i> aux toxines.....	37
Tableau X : CL50 des toxines Cry1Ac et Cry2Ab obtenues sur les souches BK77, BIT04, DAT04 et SID04.....	38
Tableau XI : Analyse de la déviance des droites de régression dose-mortalité du Cry1Ac utilisé sur les souches BK77, BIT04, DAT04 et SID04.....	40
Tableau XII : Analyse de la déviance des droites de régression dose-mortalité du Cry2Ab utilisé sur les souches BK77, BIT04, DAT04 et SID04.....	40
Tableau XIII : Concentrations retenues pour les tests avec l'association Cry1Ac/Cry2Ab.....	44
Tableau XIV : Activité insecticide du mélange des toxines Cry1Ac et Cry2Ab sur les larves de <i>H. armigera</i>	44
Tableau XV : Analyse de la déviance des droites de régression dose-mortalité du mélange des toxines sur la souche SID04.....	46

LISTE DES FIGURES

	Pages
Figure 1 : Cycle biologique de <i>H. armigera</i>	7
Figure 2 : Carte de répartition géographique de <i>H. armigera</i> dans le monde.....	8
Figure 3 : Cycle biologique de <i>B. thuringiensis</i>	10
Figure 4 : Mode d'action des delta-endotoxines de <i>B. thuringiensis</i>	13
Figure 5 : Sites de récolte des larves de <i>H. armigera</i>	22
Figure 6 : Taux de mortalité relevés 7 jours après le traitement des larves de <i>H. armigera</i> avec le Cry1Ac.....	27
Figure 7 : Taux de mortalité relevés 7 jours après le traitement des larves de <i>H. armigera</i> avec le Cry2Ab.....	27
Figure 8 : Comparaison des droites de régression dose-mortalité de la deltaméthrine utilisée sur les souches BK77, BIT04, DAT04 et SID04.....	32
Figure 9 : Comparaison des droites de régression dose-mortalité du Cry1Ac utilisé sur les souches BK77, BIT04, DAT04 et SID04.....	39
Figure 10 : Comparaison des droites de régression dose-mortalité du Cry2Ab utilisé sur les souches BK77, BIT04, DAT04 et SID04.....	39
Figure 11 : Comparaison des droites de régression dose-mortalité des mélanges de Cry1Ac et Cry2Ab utilisés sur la souche SID04.....	45

LISTE DES PHOTOS

	Pages
Photo 1 : <i>H. armigera</i>	6
Photo 2 : <i>B. thuringiensis</i>	10
Photo 3 : Structure tridimensionnelle des delta-endotoxines.....	12
Photo 4 : Larves sur milieu nutritif.....	24
Photo 5 : Boîte plastique à logettes.....	24
Photo 6 : Micro-applicateur muni de seringue.....	31
Photo 7 : Mortalité des larves après 48 heures.....	31
Photo 8 : Différence entre larve morte et vivante après 7 jours.....	38

RESUME

La présente étude a porté sur l'évaluation du niveau de résistance de *H. armigera* à la deltaméthrine et l'activité insecticide des deux delta-endotoxines de *B. thuringiensis* (Cry1Ac et Cry2Ab) synthétisées par le cotonnier transgénique intégrant le gène BOLLGARD®II sur les larves de l'insecte. Trois (3) souches de terrain récoltées à Bittou, Datomo et Sideradougou ont été testées et comparées à la souche sensible de référence (BK77).

Les trois (3) souches locales ont montré un niveau moyen de résistance à la deltaméthrine, avec des coefficients de résistance variant entre 40 et 58. Cependant on n'a pas observé de différence statistique entre la sensibilité des souches de terrain et celle de la BK77 vis-à-vis des deux (2) toxines. Les bio-essais réalisés avec le mélange des toxines dans les proportions (Cry1Ac/Cry2Ab) de 75/25 ; 50/50 et 25/75 ont montré un effet additif de l'association du Cry1Ac et du Cry2Ab. On n'a pas observé de différence significative entre les trois ratios de mélange.

Mots clés : Résistance, *Helicoverpa armigera*, deltaméthrine, delta-endotoxines.

ABSTRACT

The present study was about the evaluation of *H. armigera*'s resistance level to deltamethrin and the insecticidal activity of two *B. thuringiensis* toxins (Cry1Ac and Cry2Ab) expressed by the transgenic Cotton containing the gene BOLLGARD®II on the insect larvae. Three (3) field strains from Bittou, Datomo and Sideradougou and the reference susceptible strain (BK77) were used.

Laboratory bioassays showed a mean level of resistance to deltamethrin for the three (3) field strains, with resistance factors varying from 40 to 58. However, we didn't notice statistical difference between the susceptibility of the field strains and the reference one to the two (2) toxins. Bioassays with the association of these toxins in the proportion (Cry1Ac/Cry2Ab) of 75/25; 50/50 and 25/75 showed that the interaction of Cry1Ac and Cry2Ab was additive. There was no significant difference between the three (3) ratios of association.

Key words: Resistance, *Helicoverpa armigera*, deltamethrin, delta-endotoxins.

INTRODUCTION GENERALE

A l'instar de la plupart des pays africains, le Burkina Faso a une économie basée sur l'agriculture. Parmi les spéculations, le coton demeure la principale source d'entrée de devises pour le pays. En effet, il représente 40 à 50% des exportations totales et sa contribution au P.I.B. est d'environ 50% (VOGNAN *et al.*, 2002).

La culture cotonnière subit cependant d'importants dégâts provoqués par un large complexe de ravageurs comprenant une centaine d'arthropodes (AHMAD *et al.*, 1997 ; HOY, 1998 ; KRANTHI *et al.*, 2001). Un Lépidoptère de la famille des Noctuidae, *Helicoverpa armigera*, insecte très polyphage et vorace attaquant les organes fructifères, est responsable d'une partie importante de ces dégâts (GUINNING *et al.*, 1996 ; HECKEL *et al.*, 1997 ; HEAD *et al.*, 1998 ; NIBOUCHE, 1999 ; SUN *et al.*, 2002). En 1996, les pertes dues à l'insecte étaient estimées à 300 millions de dollars en Inde et à 35 millions de dollars en Australie (KRANTHI *et al.*, 2002). Selon NIBOUCHE (1994), au Burkina Faso, les infestations de ce ravageur en 1991 ont conduit à des pertes de récolte d'environ 50000 tonnes de coton, correspondant à près de quatre (4) milliards de francs CFA.

Cette forte pression des ravageurs justifie la dépendance de la culture cotonnière vis-à-vis de la lutte chimique. En effet, 30% du marché mondial des insecticides chimiques sont consacrés à cette culture (URAICHUEN, 2002). En Inde, 50% des pesticides sont appliqués sur le cotonnier et 75% de ces produits visent *H. armigera* (KRANTHI *et al.*, 2002).

De nos jours, ces insecticides ne garantissent plus une protection efficace et durable du cotonnier ; leur utilisation prolongée ayant entraîné outre l'élimination des ennemis naturels et la pollution de l'environnement, l'apparition de la résistance chez la noctuelle (McCAFFERY et AHMAD, 1988 ; HEAD *et al.*, 1998 ; MENOZZI *et al.*, 2002 ; HEMA, 2004).

Les échecs de traitements répétés au champ couplés à un souci de réduire l'utilisation des produits chimiques ont conduit à la mise au point du cotonnier génétiquement modifié par la biotechnologie. Les premières générations de ces plantes intègrent un seul gène de la bactérie *Bacillus thuringiensis* codant pour une protéine (Cry1Ac), toxine efficace contre les Lépidoptères (HECKEL *et al.*, 1999 ; HALCOMB *et al.*, 2000). Cependant, la culture à grande échelle de ces plantes transformées, synthétisant une seule toxine tout au long de leur cycle de développement augmente le risque de sélection d'individus résistants (AKHURST *et*

al., 2001). Dans le but d'améliorer l'efficacité du cotonnier transgénique, et surtout de retarder l'apparition de la résistance chez les ravageurs, un second gène codant pour la toxine Cry2Ab fut introduit dans ces plantes (CHITKOWSKI *et al.*, 2003). Celles-ci synthétisent donc deux delta-endotoxines de *B. thuringiensis*.

Bien qu'aucune résistance sur le terrain n'ait été observée jusqu'à nos jours chez *H. armigera* (MAHON *et al.*, 2004), des précautions sont prises partout où ces plantes sont cultivées pour une éventuelle gestion de la résistance de l'insecte aux toxines synthétisées.

Au Burkina Faso, cette nouvelle technologie est en expérimentation mais aucune donnée n'existe sur le niveau initial de sensibilité des souches locales de *H. armigera* aux deux toxines Cry1Ac et Cry2Ab. Ces données sont pourtant nécessaires pour détecter une baisse de la sensibilité de l'insecte sur le terrain, après l'adoption du cotonnier transgénique. C'est dans ce cadre que la présente étude a été initiée.

Elle poursuit les objectifs suivants :

- évaluer le niveau de résistance de *H. armigera* à la deltaméthrine au Burkina Faso ;
- évaluer l'efficacité des deux toxines sur nos souches locales ;
- évaluer l'effet de l'association du Cry1Ac et du Cry2Ab sur les larves.

Le présent mémoire qui rend compte des résultats de l'étude comprend deux (2) parties :

- la première porte sur les généralités concernant le cotonnier et ses ravageurs, la bactérie *B. thuringiensis*, la protection phytosanitaire du cotonnier et la résistance des insectes aux insecticides chimiques ;
- dans la deuxième partie nous présentons les tests de sensibilité de *H. armigera* à la deltaméthrine, à chacune des deux toxines et à leur association (Cry1Ac/Cry2Ab).

PREMIERE PARTIE : GENERALITES

CHAPITRE 1 : LE COTONNIER ET SES RAVAGEURS

1.1 LE COTONNIER

1.1.1 Botanique

Le cotonnier est une dicotylédone appartenant à la famille des Malvaceae, à la tribu des Hibisceae et au genre *Gossypium* (CALAN, 1966).

Quatre (4) espèces, caractérisées par la présence sur les graines de poils cellulosiques utilisés par l'industrie chimique, constituent le groupe des cotonniers cultivés (FRYXELL, 1984) :

- deux espèces diploïdes (*Gossypium herbaceum* et *G. arboreum*) ;
- deux espèces tétraploïdes (*G. hirsutum* et *G. barbadense*).

Au Burkina Faso, l'espèce cultivée est *G. hirsutum* (PARRY, 1982).

1.1.2 Morphologie

Le cotonnier est une plante arbustive, recouverte souvent de poils et parsemée de glandes. Il possède une racine pivotante, une tige principale portant des branches végétatives et fructifères (FRYXELL, 1984). Les fruits sont des capsules rondes ou ovoïdes, composées de quatre (4) à cinq (5) loges, contenant chacune six (6) à douze (12) graines (SEMENT, 1986). Les graines sont recouvertes de poils dont les plus longs correspondent à la fibre. Les poils courts forment une sorte de duvet appelé linter (MAUNEY, 1984).

1.1.3 Cycle biologique du cotonnier

Sur le plan physiologique, le cotonnier est une plante pérenne qui s'est adaptée aux conditions d'une culture annuelle (CALAN, 1966). Le cycle biologique du cotonnier comprend quatre (4) phases (PARRY, 1982) :

- le stade de la levée qui va du semis à l'étalement des cotylédons dure six (6) à dix (10) jours en conditions normales ;

- le stade végétatif s'étale de la plantule à l'ouverture de la première fleur ; cette phase est marquée par un développement rapide du système racinaire, l'apparition des monopodes et des branches fructifères. Sa durée est de 40 à 60 jours ;
- le stade reproducteur, il débute à la floraison et prend fin lorsque le développement végétatif s'arrête ; il dure environ 50 jours et est marqué surtout par la fécondation ;
- le stade de maturation allant de l'arrêt du développement végétatif à la fin de l'ouverture des fleurs ; au cours de ce stade, la capsule se forme, grossit et atteint sa taille définitive. Sa durée varie entre 50 et 80 jours.

La durée totale du cycle du cotonnier varie entre 140 et 250 jours (PARRY, 1982).

1.2 PRINCIPAUX RAVAGEURS DU COTONNIER

De nombreux insectes attaquent le cotonnier tout au long de son cycle, occasionnant des dommages en terme de rendement et de qualité de la fibre produite.

Selon leur régime alimentaire, les ravageurs sont classés en cinq (5) groupes (STIMAMIGLIO et CHABERT, 2004) :

- les carpophages, ce sont des insectes de l'ordre des Lépidoptères dont les larves attaquent les boutons floraux, les fleurs, et les capsules. Très nuisibles, ils peuvent anéantir la récolte en absence de traitement. Dans ce groupe on trouve des exocarpiques : *H. armigera* (Hübner), *Diparopsis watersi* (Rothschild), *Earias biplaga* (Walker) et *E. insulana* (Boisduval) ; et des endocarpiques qui sont peu fréquents au Burkina Faso : *Pectinophora gossypiella* (Saunders), *Cryptophlebia leucotreta* (Meyrick) ;
- les phyllophages, ce sont des Lépidoptères dont les larves attaquent le système foliaire ; ils sont représentés par *Spodoptera littoralis* (Boisduval), *Syllepte derogata* (Fabricius) et *Anomis flava* (Fabricius) ;
- les piqueurs-suceurs, ce sont des Homoptères ; les dégâts sont causés par les larves et les adultes de *Aphis gossypii* (Glover), *Bemisia tabaci* (Gennadius) et *Jacobiella* sp.. Ces insectes sont aussi des vecteurs de certaines maladies du cotonnier (CAUQUII., 1986) ;

- les Hétéroptères piqueurs de capsules regroupent *Dysdercus volkeri* (Schmidt), *Nezara* sp. ;
- les acariens, dans ce groupe l'espèce la plus courante est *Polyphagotarsonemus latus* (Banks). Elle cause généralement une déformation des organes.

De tous ces ravageurs, *H. armigera* est le plus nuisible en Afrique, en Asie et en Océanie (CARON, 1991).

1.2.1 Systématique de *Helicoverpa armigera* (Hübner)

H. armigera appartient à l'embranchement des Arthropodes, à la classe des Insectes, à l'ordre des Lépidoptères, à la famille des Noctuidae et à la sous-famille des Heliiothinae (KING, 1994).

La première description de l'insecte a été réalisée par Fabricius en 1794 sous le nom de *Noctua barbara* (HARDWICK, 1965) ; ensuite la noctuelle fut désignée successivement sous les noms de *Noctua armigera*, *Heliothis armigera* et enfin, *Helicoverpa armigera* par HARDWICK.

1.2.2 Description morphologique de l'insecte

1.2.2.1 Les adultes

Ce sont des papillons de nuit de 30 à 40 mm d'envergure. Il n'existe pas de différence de taille entre les deux sexes, le dimorphisme sexuel étant basé essentiellement sur la couleur : le mâle est gris-vert tandis que la femelle est brun-orangé (NIBOUCHE, 1994) (photo 1-A).

1.2.2.2 Les œufs

Ils sont subsphériques, avec une taille variant entre 0,4 et 0,5 mm. De couleur blanchâtre à la ponte, ils virent au brun avant l'éclosion (TOGUEBAYE et COUILLOUD, 1982) (photo 1-C).

1.2.2.3 Les larves

La couleur des larves de premier et de deuxième stade est grisâtre, puis jaunâtre ; la capsule céphalique est brun-noir à brun-foncé. A partir du troisième stade, la capsule céphalique prend une couleur orangée. La couleur générale du corps varie du gris au jaunâtre et des séries de

fines bandes longitudinales alternées claires et sombres ornent la face dorsale. Sur les flancs, on observe une large bande blanchâtre (TOGUEBAYE et COUILLOUD, 1982) (photo 1-B).

1.2.2.4 Les chrysalides

Sans cocon, les chrysalides se trouvent dans le sol dans une loge nymphale. Elles ont une couleur marron et mesurent environ 15 mm (DELATTRE, 1973) (photo 1-D). A ce stade on peut déterminer le sexe de l'insecte en examinant la face ventrale des derniers segments abdominaux à la loupe (NIBOUCHE, 1999) (annexe 1).



Source: <http://www.leps.it/images/Noctuidae>

Photo 1 : *H. armigera* (Hübner)

(A) Adultes : femelle (à gauche), mâle (à droite)

(B) Larves sur une capsule de cotonnier

(C) Œuf

(D) Chrysalide

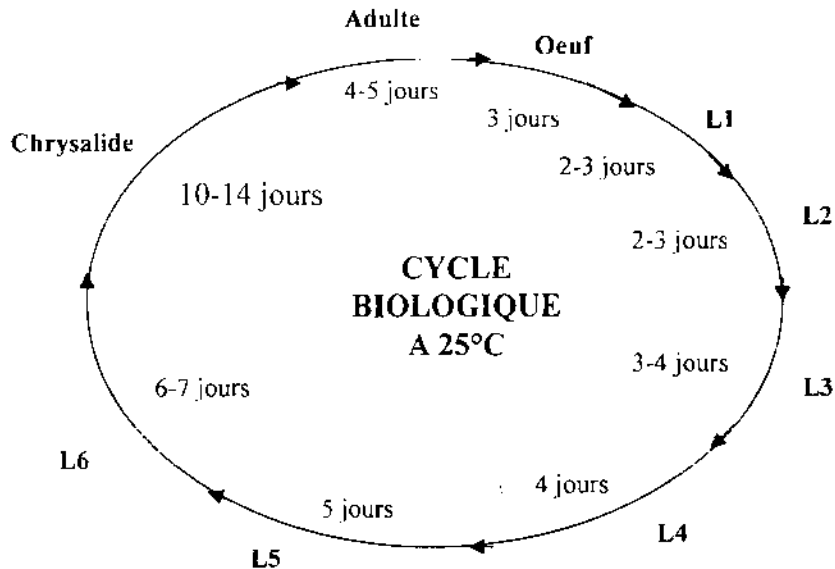
1.2.3 Cycle biologique de *H. armigera*

La durée du cycle de l'insecte est fonction de la température (ULRICHS, 2002). Elle est d'environ 40 jours à 25°C et à 70% d'humidité (CASTELLA, 1996) (figure 1).

Dans les régions tempérées, *H. armigera* hiverne à l'état de chrysalide, enfoui dans le sol à plusieurs centimètres (cm) de profondeur ; cela réduit le nombre de générations à deux (2) ou trois (3) par an dans ces régions. En zone tropicale, lorsque le régime des pluies permet la présence permanente des plantes hôtes cultivées ou spontanées, l'activité de la noctuelle est continue (KING, 1994).

Les larves passent par cinq (5) ou six (6) stades de développement puis s'enfouissent dans le sol pour nymphoser ; la durée du stade larvaire est d'environ 25 jours. L'émergence des papillons intervient 10 à 14 jours plus tard (PARRY, 1982).

On peut bloquer le développement de l'insecte en plaçant les larves du stade pré-nymphal à une température de 15°C (GIRET et COUILLOUD., 1982).



Source : URAICHUEN (2002).

Figure 1 : Cycle biologique de *H. armigera*

1.2.4 Plantes hôtes et dégâts

La noctuelle *H. armigera* est un insecte polyphage qui attaque plus de 200 espèces végétales appartenant à une cinquantaine de familles (NIBOUCHE, 1999 ; DON et CROSSLEY, 2001). Elle est l'un des principaux ennemis du cotonnier mais ses dégâts peuvent être importants sur les plantes potagères telles que la tomate, les légumineuses, les cucurbitacées (KRANTHI et RUSSELL, 2004).

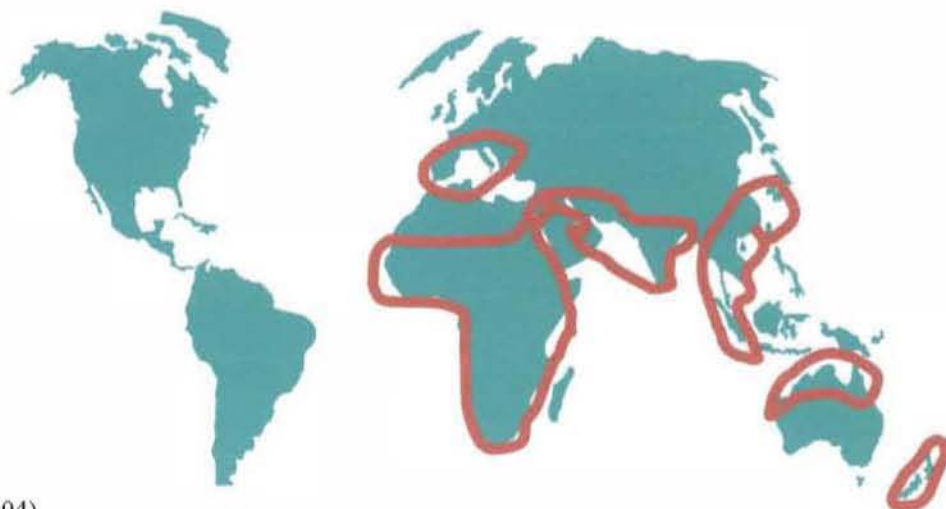
Sur le cotonnier, l'insecte attaque les boutons floraux, les capitules des fleurs, les capsules, mais rarement les feuilles (BUES *et al.*, 2004).

1.2.5 Mobilité et répartition de l'insecte dans le monde

Alors que chez les Noctuidae les mécanismes de diapause et de migration tendent à s'exclure, *H. armigera* fait partie des exceptions car il est capable à la fois de rentrer en diapause et de migrer. On distingue plusieurs types de déplacements motivés essentiellement par l'alimentation, la ponte ou la recherche d'un abri diurne (VAISSAYRE, 2000) :

- les mouvements sur de courtes distances ;
- les vols sur un (1) à dix (10) kilomètres (km) entre différents habitats ou entre zones de ponte ; ces vols sont orientés et restent limités en altitude ;
- les vols sur de longues distances (plusieurs centaines de km), s'effectuant au-delà de la couche biologique et orientés selon le sens du vent.

L'insecte présente une large répartition géographique (figure 2) ; on le retrouve en Afrique, en Australie, en Asie et en Europe (CAUQUIL, 1986). Sa présence n'a pas encore été signalée en Amérique où *Heliothis virescens* occupe la niche (CAUQUIL, 1986 ; BUES *et al.*, 2004).



Source : HEMA (2004)

Figure 2 : Carte de répartition géographique de *H. armigera* dans le monde.

CHAPITRE 2 : LA BACTERIE *BACILLUS THURINGIENSIS* (BERLINER)

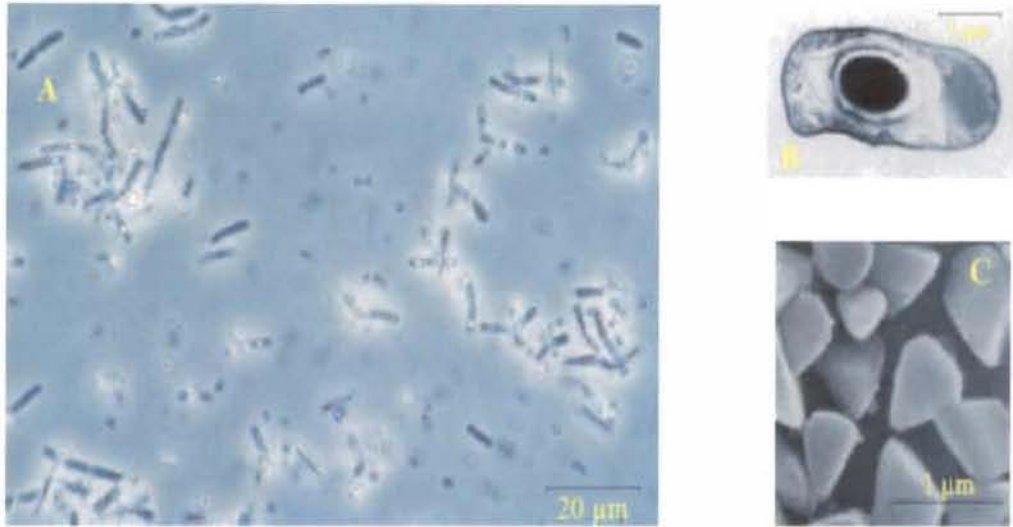
Le nom *Bacillus thuringiensis* a été introduit en 1911 par le biologiste allemand E. BERLINER, pour désigner la bactérie pathogène trouvée dans les pupes d'insectes familiers des silos à graine en Thuringe (SCHNEPF *et al.*, 1998 ; YOUNG *et al.*, 1998). Depuis plus de 40 ans, elle est utilisée comme insecticide biologique et représente de nos jours plus de 90% du marché total des biopesticides (VASSAL, 2004).

2.1 DESCRIPTION ET CYCLE VITAL

B. thuringiensis, communément appelé Bt est une bactérie collective du sol, gram-positive appartenant à la famille des Bacillaceae (FEITELSON *et al.*, 1992 ; SCHNEPF *et al.*, 1998 ; HECKEL *et al.*, 1999 ; LIU *et al.*, 2002 ; SUN *et al.*, 2002) (photo 2-A et 2-B).

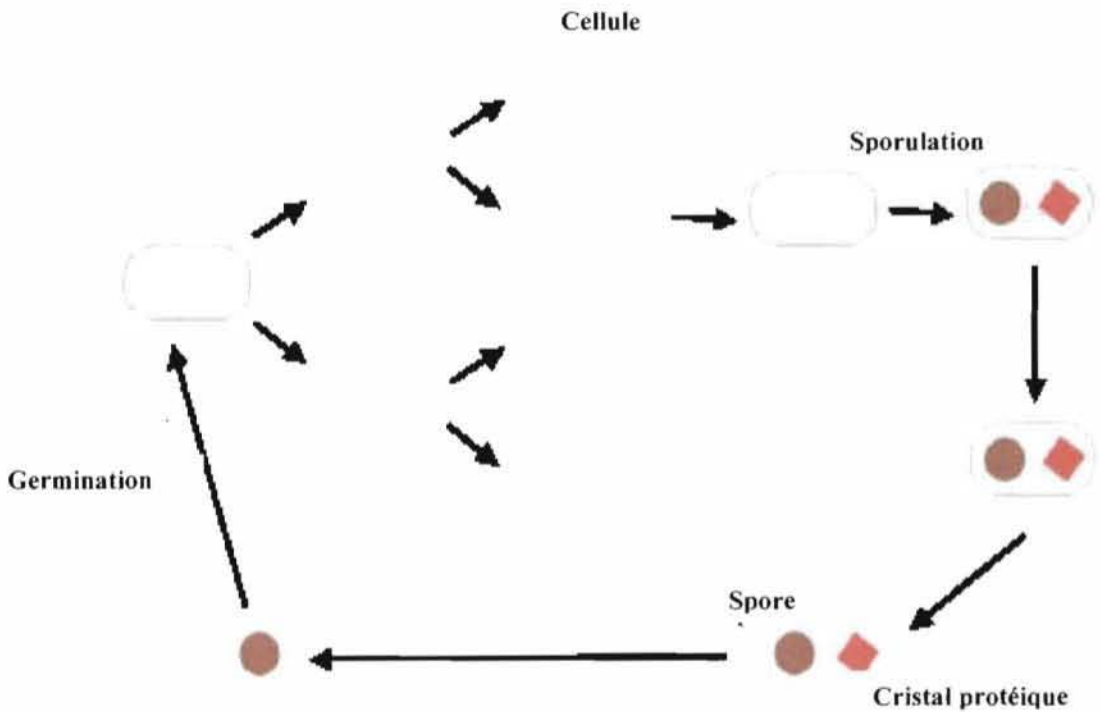
Son cycle de vie comporte deux (2) phases (YOUNG *et al.*, 1998) (figure 3) :

- une phase végétative observée lorsque les conditions du milieu sont favorables. Dans ce cas, la bactérie se multiplie de façon exponentielle par scissiparité. Elle synthétise pendant cette phase une exotoxine thermosensible appelée Vegetative Insecticidal Protein ou V.I.P. (VASSAL, 2004) ;
- une phase stationnaire qui se présente lorsque les nutriments essentiels du milieu se raréfient. Elle se caractérise par une différenciation des cellules bactériennes, aboutissant à la formation des spores. C'est aussi au cours de cette phase qu'intervient la synthèse des delta-endotoxines, substances protéiques conférant à la bactérie un pouvoir pathogène vis-à-vis de certains insectes. Ces protéines s'accumulent dans la cellule bactérienne pour former un cristal (photo 2-C) qui est ensuite libéré dans le milieu (MENON et DEMESTRAL, 1985).



Source : http://www.inapg.inra.fr/ens_rech/bio/biotech/textes/applicat/agricult/vegetal/btpart1.ht

Photo 2 : (A) : *B. thuringiensis* vue par microscope de contraste de phase ;
 (B) : Corps de cellule ; (C) : Cristaux de forme bipyramidale vue par microscope électronique.



Source : <http://www.new.gouv.qc.ca/pesticides/virus/nil/bti/ chap3.htm>

Figure 3 : Cycle biologique de *B. thuringiensis*.

2.2 CLASSIFICATION DES DELTA-ENDOTOXINES DE *B. THURINGIENSIS*

Les delta-endotoxines de *B. thuringiensis* encore appelées Cry (venant de crystal) ont été classifiées selon leur spécificité insecticide en cinq groupes par HÖFTE et WHITELEY (1989) (tableau I):

- CryI, ce sont des toxines spécifiques aux Lépidoptères ; les cristaux ont une forme bipyramidale ;
- CryII, les toxines sont spécifiques aux Lépidoptères et aux Diptères ; les cristaux ont une forme cubique ;
- CryIII, spécifiques aux Coléoptères, les cristaux sont rhomboédriques ;
- CryIV, les toxines ont pour cibles les Diptères et les cristaux ont une forme sphérique ;
- CryV, efficaces contre les Lépidoptères et les Coléoptères les cristaux ont une forme bipyramidale.

CRICKMORE *et al.* (1998) ont révisé la nomenclature des delta-endotoxines en prenant en compte, en plus de leur spécificité, l'homologie des séquences en acides aminés des protéines (annexe 2).

De nos jours, environ 225 toxines sont identifiées et classées en 37 groupes (URAICHUEN, 2002). En plus des delta-endotoxines, *B. thuringiensis* synthétise une autre famille de protéines de petite taille ayant une action cytolytique non spécifique appelée Cyt (THOMAS et ELLAR, 1983).

Tableau I : Classification des delta-endotoxines de *B. thuringiensis*.

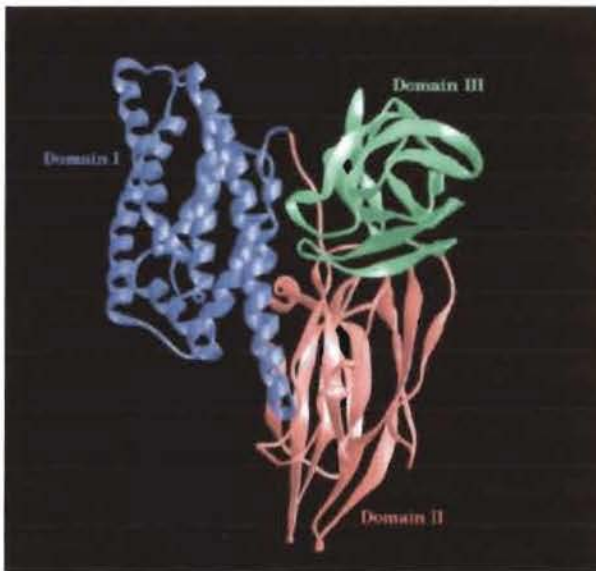
Classe	δ-endotoxines Taille (KDa)	Insectes sensibles	Structure des cristaux
CryI	A	Lépidoptères	Bipyramidale
	B		
	C		
	D		
	E		
	F		
CryII	A	Diptères et Lépidoptères	Cubique
	B	Lépidoptères	
CryIII	A	Coléoptères	Rhomboédrique
	B		
CryIV	A	Diptères	Sphérique
	B		
CryV	A	Lépidoptères et Coléoptères	Bipyramidale
Cyt	A	Diptères	Sphérique
	B		

Source : HÖFTE et WHITELEY (1989).

2.3 STRUCTURE DES DELTA-ENDOTOXINES

Les delta-endotoxines présentent trois domaines (LI *et al.*, 1991) (photo 3) :

- le domaine I constitué de sept (7) hélices alpha, il est à l'extrémité NH₂-terminale et est responsable de la formation des pores ;
- le domaine II, comprenant trois (3) feuilletts bêta, il permet la reconnaissance des récepteurs membranaires intestinaux ;
- le domaine III, du côté C-terminal, il n'a pas un effet direct sur les insectes ; cependant, il joue un rôle important dans la stabilité du cristal.



Source : <http://www.nal.usda.gov/bic/BTTOX/bttox.htm>

Photo 3 : Structure tridimensionnelle des delta-endotoxines.

2.4 MODE D'ACTION DES TOXINES

Contrairement aux pyréthriinoïdes, les delta-endotoxines ne sont pas des insecticides de contact (VASSAL, 2004). C'est suite à une ingestion par les insectes sensibles que la toxine agit (HECKEL *et al.*, 1997 ; KAMRIN, 1997).

Plusieurs étapes sont nécessaires avant que la toxine puisse acquérir son pouvoir insecticide (figure 4).

- Solubilisation et activation

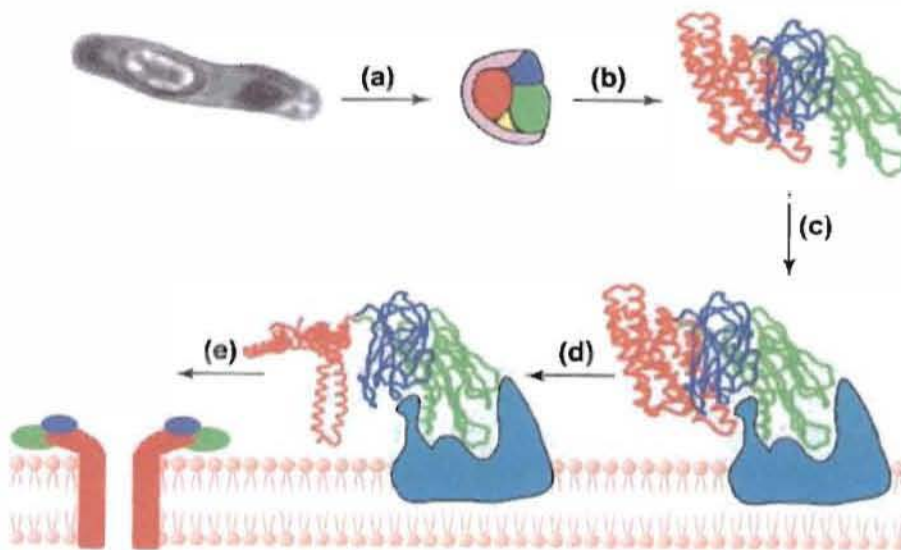
Une fois ingérées, les protéines cristallines sont solubilisées dans l'intestin de l'insecte à un pH basique (10–12). Les protoxines libérées sont par la suite transformées en toxines actives après une lyse partielle par les enzymes du tube digestif (WHALON et McGAUGHEY, 1998).

- Liaison sur le site récepteur

La toxine activée traverse la membrane péritrophique. Elle se fixe sur des récepteurs spécifiques, présents à la surface des microvillosités des cellules épithéliales de l'intestin moyen de l'insecte (SCHNEPT *et al.*, 1998).

- Formation des pores

L'interaction toxine-récepteur aboutit à la formation d'un pore dans la cellule cible. Cela entraîne une perturbation des échanges ioniques, une modification du pH intestinal, puis la lyse de la cellule épithéliale de l'intestin. Cette lyse provoque une paralysie du tube digestif de l'insecte qui cesse de s'alimenter (GILL *et al.*, 1992) et meurt affamé un à trois jours après l'ingestion du cristal (WHALON et McGAUGHEY, 1998).



TRENDS in Genetics

Source : VASSAL (2004).

Figure 4 : Mode d'action des delta-endotoxines de *B. thuringiensis*

(a) : Solubilisation ; (b) : Activation ; (c) et (d) : Liaison avec le site récepteur ; (e) : Formation des pores.

2.5 SENSIBILITE DE *H. ARMIGERA* AUX TOXINES

URAICHUEN (2002) a étudié l'efficacité de plusieurs toxines sur les larves de *H. armigera* (BK77) et *Heliothis virescens*. Les résultats (tableau II) indiquent une sensibilité élevée de ses deux espèces au Cry1Ac ; la CL50 (concentration létale pour 50% des larves testées) de cette toxine est de 0,27 µg/cm² pour *H. armigera* et 0,06 µg/cm² pour *H. virescens*.

Tableau II : Résultats des tests réalisés sur *H. armigera* et *H. virescens* avec différentes toxines de *B. thuringiensis*.

Toxines	Insectes	CL50 (µg/cm ²)
Cry1Aa	<i>H. armigera</i>	3,95
	<i>H. virescens</i>	7,19
Cry1Ab	<i>H. armigera</i>	1,36
	<i>H. virescens</i>	0,81
Cry1Ac	<i>H. armigera</i>	0,27
	<i>H. virescens</i>	0,06
Cry1Ba	<i>H. armigera</i>	> 120
	<i>H. virescens</i>	> 120
Cry2Aa	<i>H. armigera</i>	1,82
	<i>H. virescens</i>	0,37
Cyt1Aa	<i>H. armigera</i>	> 120
	<i>H. virescens</i>	> 120

Source : URAICHUEN (2002).

CHAPITRE 3 : PROTECTION PHYTOSANITAIRE DU COTONNIER ET RESISTANCE DES INSECTES AUX INSECTICIDES

3.1 PROTECTION PHYTOSANITAIRE

L'extrême sensibilité du cotonnier aux maladies et aux ravageurs, couplée à l'importance économique du coton font de la plante l'une des plus protégées. La protection du cotonnier est essentiellement basée sur l'utilisation des produits chimiques appartenant à plusieurs familles d'insecticides (GUINNING *et al.*, 1999 ; BEYO *et al.*, 2002).

3.1.1 Familles d'insecticides

- Les organochlorés

Ils contiennent du chlore dans leur composition et se caractérisent par une forte rémanence et une toxicité élevée pour l'homme (CASTELLA, 1996). L'endosulfan utilisé comme alternatif dans le cadre de la gestion de la résistance des insectes aux pyréthriinoïdes et le DDT appartiennent à ce groupe.

- Les organophosphorés et les carbamates

Ils sont relativement peu rémanents mais très toxiques avec un large spectre d'action. Les insectes cibles sont généralement les piqueurs-suceurs et les broyeurs (RODRIGUEZ *et al.*, 1993).

- Les pyréthriinoïdes

Ce sont des insecticides synthétisés à l'image du pyrethrum naturel (PINCHARD, 1993 ; EYANATI *et al.*, 2001). Très sélectifs, ils demeurent la famille de pesticides la plus utilisée dans le contrôle des ravageurs en agriculture (MILLER, 1988). Comme la plupart des insecticides, les pyréthriinoïdes sont neurotoxiques ; sur le plan moléculaire, ils peuvent interagir avec le canal sodium qui est leur cible principale (DELORME, 1985 ; EYANATI *et al.*, 2001).

Dans cette famille, la deltaméthrine est la plus connue actuellement et aussi la plus utilisée dans la culture cotonnière ; elle agit par contact et par ingestion.

- Les nouvelles familles d'insecticides

• **Les Néonicotinoïdes** : ils agissent par contact et par ingestion sur les Homoptères et les Coléoptères. Leur action nocive est très réduite sur les ennemis naturels ; l'imidacloprid, l'acétamiprid et le thiamethoxam appartiennent à cette famille.

• **Les Naturalites** : neurotoxiques, elles agissent par ingestion et par contact. Elles sont très efficaces vis-à-vis des Lépidoptères, mais leur effet est négligeable sur les piqueurs-suceurs et les mammifères ; il s'agit du spinosad et de l'indoxacarb.

• **Les I.G.R. (Insect Growth Regulator)** : ce sont les régulateurs de croissance des insectes. Ils regroupent des insecticides ayant divers sites d'action ; on peut citer le pyriproxifen, le benzoyl-phenyl-urée, le buprofezin, le fenoxycarb, l'halofenozide...

3.1.2 Mode d'action des insecticides chimiques

Selon ALAUX (1994), un insecticide agit sur les insectes selon le schéma suivant :

- l'absorption par diverses voies (cutanée, orale, respiratoire), la pénétration et la distribution du produit à l'intérieur des cellules ;
- la métabolisation qui transforme l'insecticide liposoluble en molécule hydrosoluble ;
- l'action du produit sur la cible qui est généralement le système nerveux et la membrane axonique pour les organochlorés et les pyréthrinoïdes (EYANATI *et al.*, 2001), les synapses pour les organophosphorés et les carbamates (DENHOLD *et al.*, 1997).

Les programmes de protection classique développés sur le cotonnier dans la sous région Ouest Africaine comptaient quatre (4) à cinq (5) traitements, espacés de 14 jours (à partir de 50 jours après la levée du cotonnier) (HEMA, 2004). De nos jours, ces programmes ne permettent plus de maîtriser les populations des insectes, notamment celles de *H. armigera* qui sont devenues résistantes aux pyréthrinoïdes.

3.2 RESISTANCE DES INSECTES AUX INSECTICIDES

3.2.1 Définition et problématique de la résistance

3.2.1.1 Définition

Selon GUILLET (1997), la résistance correspond à l'apparition dans une population de gènes « nouveaux » ou de surproduits, entraînant une métabolisation accrue des insecticides ou une modification de leurs cibles.

Avant de parler de résistance, quatre critères doivent être vérifiés (WILSON et ASHOK, 1998 ; MENOZZI *et al.*, 2002 ; STIMAMIGLIO et CHABERT, 2004) :

- le ravageur incriminé doit avoir été bien maîtrisé par l'insecticide dans le passé ;
- l'échec du produit ne doit pas être la conséquence d'un mauvais stockage ou d'une mauvaise application ;
- la perte d'efficacité du produit doit être établie ;
- il doit être montré que la sensibilité du ravageur envers le produit a été altérée.

3.2.1.2 Problématique de la résistance

La résistance des insectes aux insecticides qui s'est développée chez certains ravageurs du cotonnier s'est imposée comme un défi majeur ces dernières années. En effet, les paysans se sentent démunis devant des insectes qui ne disparaissent plus après des interventions réalisées selon les normes d'utilisation (TRAORE, 1997).

Dans le court terme, cela se traduit par une baisse du rendement de la culture (MENOZZI *et al.*, 2002) et une augmentation du coût de contrôle des ravageurs (ROUSH et TABASHNIK, 1990). A long terme, la résistance des insectes conduit à un abandon des systèmes culturaux (CARON, 1991).

Outre de compromettre l'efficacité des mesures de lutte, le développement d'une résistance entraîne des problèmes sanitaires et écologiques graves par l'accroissement de la quantité des insecticides utilisés (BEYO *et al.*, 2002).

3.2.2 Apparition de la résistance

Les produits chimiques ont longtemps été utilisés dans la culture cotonnière. C'est l'exposition progressive des insectes à ces insecticides qui est à l'origine de l'apparition de la résistance. En effet, les pesticides créent une pression de sélection qui concentre divers facteurs génétiques préexistants au sein des populations et confère ainsi la résistance (BERRADA *et al.*, 1994 ; AHMAD *et al.*, 1997 ; KRANTHI *et al.*, 2002 ; STIMAMIGLIO et CHABERT, 2004). On peut donc dire que toute espèce est potentiellement résistante, et ce, vis-à-vis de n'importe quel type d'insecticide (EYANATI *et al.*, 2001 ; KRANTHI *et al.*, 2001 ; MENOZZI *et al.*, 2002).

3.2.3 Mécanismes de résistance

En réponse à l'action nocive des insecticides, plusieurs mécanismes de résistance ont été développés par les insectes (RODRIGUEZ *et al.*, 1993 ; FRENCH-CONSTANT *et al.*, 1998 ; DJHINTO, 2000 ; RUSSELL *et al.*, 2004 ; AHMAD, 2004).

- **La modification du comportement** : dans ce cas, l'insecte devient résistant en évitant simplement les produits. Peu d'informations existent sur le déterminisme de ce mécanisme (ROUSH et TABASHNIK, 1990 ; DENHOLD *et al.*, 1997).

- **La réduction de la pénétration de l'insecticide dans l'organisme et l'excrétion accélérée des produits** : ce mécanisme empêche l'atteinte de la cible par les insecticides.

- **La modification de la cible** : elle empêche l'intégration de la substance active dans le processus de transfert de l'information nerveuse (BERRADA *et al.*, 1994 ; HEAD *et al.*, 1998). Selon PLAPP (1986), elle serait due à des mutations dans un gène donné. HECKEL *et al.* (1997) confirment cette affirmation et attribuent la modification du canal sodium à une mutation du gène *kdr* (knock down resistance).

- **La métabolisation des produits dans l'organisme ou détoxification** : elle altère la structure de la substance active et la rend inoffensive pour l'insecte (HEAD *et al.*, 1998). Les enzymes impliquées dans ces réactions sont des estérases, des mono-oxygénases et les glutathions-transférases (GUILLET, 1997 ; DENHOLD *et al.*, 1997). Si l'activité d'une de ces enzymes augmente, cela peut entraîner le développement d'une résistance (GUINNING *et al.*, 1999).

La modification du site d'action et la détoxification sont les deux mécanismes les plus importants de la résistance des insectes aux insecticides (TRAORE, 1997 ; DENHOLD *et al.*, 1997 ; RU *et al.*, 1998).

3.2.4 Résistance de *H. armigera* à la deltaméthrine dans le monde

Depuis plusieurs années, la résistance de l'insecte aux trois principales familles d'insecticides (organophosphorés, carbamates, pyréthriinoïdes) a été identifiée en Afrique, en Australie, en Asie et plus récemment en Europe (BUES *et al.*, 2004).

Le tableau III présente la comparaison des DL50 (dose létale pour 50% de la population testée) de la deltaméthrine obtenues par différents auteurs. Tous les tests ont été réalisés sur *H. armigera* avec un protocole de test comparable. Les DL50 se situent entre 0,01 µg/g en Espagne et 27,2 µg/g en Inde (BUES *et al.*, 2004).

Tableau III : DL50 de la deltaméthrine obtenues par différents auteurs.

Auteurs	Origine	DL 50 (µg/g de l'insecte)
BUES et BOUDINHON (2003)	France	0,23
MARTIN <i>et al.</i> (2003)	Afrique	0,416
TORRES-VILLA <i>et al.</i> (2003)	Espagne	0,01 – 1,32
KRANTHI <i>et al.</i> (1999 ; 2001 ; 2002)	Inde du Sud	27,2
GUINNING <i>et al.</i> (1999)	Australie	0,13
FORRESTER <i>et al.</i> (1993)	Australie	0,154

Source : BUES *et al.* (2004).

En Afrique francophone, la sensibilité du ravageur aux insecticides a été suivie depuis les années 1980. Cela a permis de déceler en 1996 une perte de sensibilité aux pyréthriinoïdes (VAISSAYRE, 2002).

Au Bénin, DJIHINTO (2000) a obtenu une DL50 de 13,65 µg/g d'insecte sur une souche locale et 0,06 µg/g pour la souche sensible de référence BK77, soit un coefficient de résistance de 227,5. On appelle coefficient de résistance le rapport de la DL50 de la souche étudiée sur la DL50 de la souche sensible de référence.

En Côte d'Ivoire, MARTIN *et al.* (2000) ont trouvé des coefficients de résistance variant entre 11,8 pour la souche KON 99/11C et 37,8 pour la souche BK 99/10C (tableau IV).

Tableau IV : DL50 de la deltaméthrine obtenues sur des souches de Côte d'Ivoire.

Souches	DL50 (µg/g)	Coefficient de résistance
BK 99/03C	0,938	17,7
BK 99/10C	2,003	37,8
BK 99/11C	0,959	18,1
KON 99/11C	0,625	11,8

Source : MARTIN *et al.* (2000).

TOGOLA (2003) a obtenu au Mali des coefficients de résistance variant entre 12,08 et 26,5.

Au Burkina Faso, YARA (1999) a obtenu un coefficient de résistance de 36 sur la souche de Sidéradougou. HEMA (2004) a trouvé des coefficients de résistance de 14 et 43 sur les souches récoltées en 2003 respectivement à Bittou et à Datomo.

3.2.5 Résistance des insectes aux toxines de *B. thuringiensis*

La résistance aux delta-endotoxines de *B. thuringiensis* a été remarquée pour la première fois au laboratoire en 1985 chez un Lépidoptère du nom de *Plodia interpunctella*. Cet insecte est devenu résistant au Dipel®, produit commercial formulé à partir *B. thuringiensis* sérotype *kurstaki*. En 15 générations, les individus survivants étaient 100 fois plus résistants que les témoins (McGAUGHEY, 1985). Par la suite d'autres cas de résistance ont été signalés chez des Lépidoptères, des Coléoptères et des Diptères. Le plus haut niveau de résistance obtenu par pression de sélection au laboratoire est observé chez la souche YAD2 qui est 10000 plus résistante au Cry1Ac (HECKEL *et al.*, 1997). Dans une étude sur le déterminisme génétique de la résistance, URAICHUEN (2002) a trouvé un coefficient de résistance de 160 à la 27^{ème} génération sous pression de sélection au Cry1Ac chez *H. armigera*. Selon AKHURST *et al.* (2001), 26 espèces de ravageurs ont montré des capacités de développer une résistance aux toxines de *B. thuringiensis*.

Les formulations de cristaux et spores de *B. thuringiensis* sont utilisées dans la protection des végétaux il y a plusieurs années. Le premier cas de résistance dans la nature a été détecté au sein d'une population de *Plutella xylostella* sur l'île d'Hawaii. La résistance observée après

plus de 50 pulvérisations de DIPEL® en plein champ était de l'ordre de 25 à 30 fois (TABASHNIK *et al.*, 1990). Ensuite d'autres cas ont été observés chez la même espèce aux Etats-Unis, aux Philippines, en Thaïlande et en Malaisie. Au Japon, une résistance de *P. xylostella* à une préparation formulée à partir d'une souche du sérotype *kurstaki* a été aussi mise en évidence au sein d'une population de serre ; cette résistance était de l'ordre de 700 fois (TABASHNIK, 1994 cité par URAICHUEN, 2002).

Sur le terrain, aucune résistance aux cotonniers transgéniques n'a été observée chez *Helicoverpa armigera* (MAHON *et al.*, 2004). Cependant une culture à grande échelle de ces plantes transformées sans mesure de gestion appropriée peut bien conduire à une résistance. La stratégie de refuges a donc été préconisée pour accompagner toute culture de cotonnier transgénique. Ces refuges sont des superficies cultivées en cotonnier non transgénique ou toute spéculation hôte des ravageurs du cotonnier. Leur rôle est de permettre la dilution du gène de résistance aux toxines chez les survivants en favorisant leur croisement avec des insectes n'ayant pas été en contact avec ces toxines.

DEUXIEME PARTIE : TESTS DE SENSIBILITE

CHAPITRE 4 : ELEVAGE DE *H. ARMIGERA* ET PRE-TESTS

4.1 ELEVAGE DE L'INSECTE

4.1.1 Souches utilisées

Quatre souches de *H. armigera* ont été utilisées:

- une souche sensible de référence dénommée BK77, récoltée à Bouaké en Côte d'Ivoire depuis 1977 et maintenue en élevage (au CIRAD à Montpellier) sans aucun traitement insecticide ;
- trois souches de terrain, DAT04, BIT04 et SID04, récoltées en 2004 respectivement à Datomo (province du Mouhoun) dans le bassin cotonnier du Burkina Faso, à Bittou (province du Boulgou) dans la zone frontalière avec le Togo et le Ghana et à Sidéradougou dans la province de la Comoé (figure 5).

Ces sites ont été choisis sur la base de leur ancienneté dans le domaine de la culture cotonnière. En effet, à Datomo on cultive le coton depuis les années 1960 tandis que Bittou découvre cette culture à grande échelle avec le plan de relance adopté par la filière coton, il y a environ dix ans ; à Sidéradougou, la réapparition de la culture cotonnière à grande échelle est relativement récente.

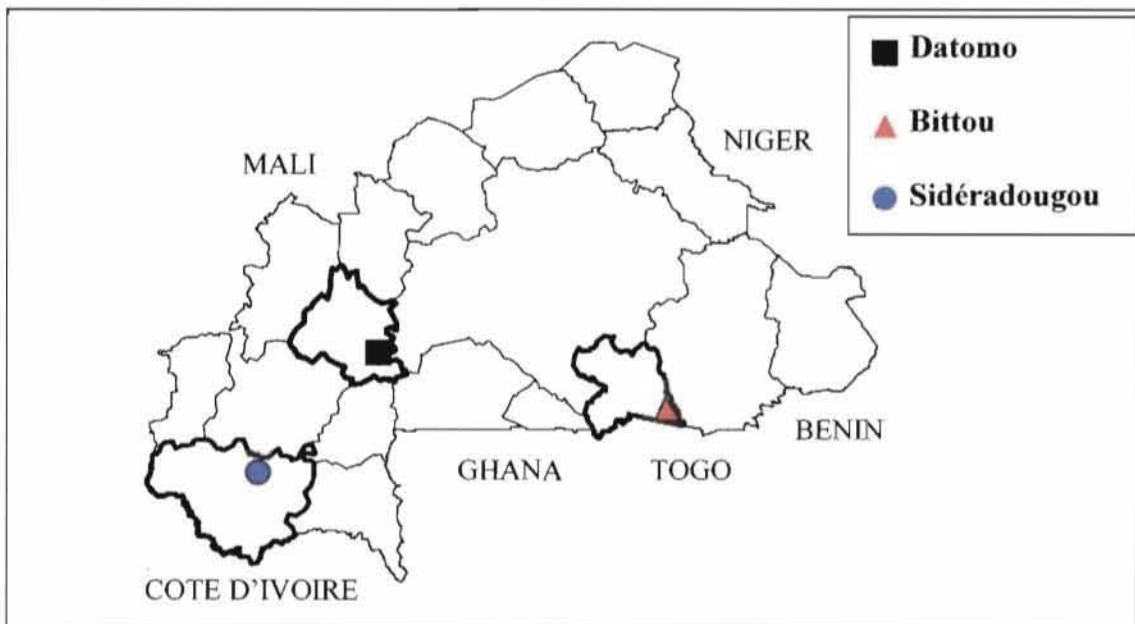


Figure 5 : Localisation des sites de récolte de *H. armigera* utilisées dans les tests.

4.1.2 Récolte et élevage des larves

Sur le terrain, les larves de différents stades de développement ont été récoltées sur le cotonnier dans les champs des paysans et nourries avec du milieu nutritif artificiel. La préparation et la composition de ce milieu figurent en annexe 3.

L'élevage a été conduit selon la méthode de COUILLOUD et GIRET (1980). Les larves récoltées ont été d'abord mises en quarantaine au laboratoire où elles sont nourries jusqu'à la nymphose. Les chrysalides sont récupérées au fur et à mesure et placées à 15°C pour ralentir leur développement, en attendant la nymphose de toutes les larves qui composent la souche.

Pour chaque souche, les chrysalides sont désinfectées, sexées et placées dans deux pots ; l'un pour les mâles et l'autre pour les femelles puis on attend l'émergence des adultes (papillons). Après leur émergence, ils sont placés dans des boîtes cylindriques en polystyrène, renfermant un abreuvoir d'eau sucrée à 10% et servant de pondoirs. Chaque pondoir contenant une dizaine de couples est recouvert à sa partie supérieure par une gaze servant de support de ponte. Une fois la ponte effectuée, la gaze est récupérée chaque jour avec les œufs ; cela permet d'obtenir des larves de même stade. Les œufs sont ensuite désinfectés et placés dans un pot portant le nom de la souche et la date de récupération des œufs. L'éclosion intervient généralement trois jours après la ponte. Les larves néonates sont nourries avec le milieu nutritif artificiel (photo 4).

La première génération obtenue au laboratoire a été utilisée pour tous les tests de sensibilité.

La BK77 a été élevée au laboratoire selon le même procédé.

L'élevage est conduit dans une salle sous les conditions suivantes :

- température = 25°C ± 1 ;
- humidité relative = 70% ± 5 ;
- photopériode/ scotopériode = 12 heures/ 12.

4.2 PRE-TESTS

Le logiciel WINDL utilisé pour l'analyse des données ne prend pas en compte les concentrations qui provoquent 0 et 100% de mortalité. La réalisation d'un pré-test pour déterminer ces doses limites est donc nécessaire dans les tests de sensibilité. Pour la deltaméthrine nous n'avons pas fait de pré-test car ce produit avait déjà été utilisé par HEMA (2004) qui a défini les doses inférieures et supérieures.

4.2.1 Matériel

- Matériel biologique

La première souche récoltée fut celle de Bittou, elle a donc été retenue pour les pré-tests ; les larves de la première génération au deuxième stade de leur développement ont été utilisées.

- Toxines

Les deux toxines (sous formulation poudreuse) ont été fournies par la firme américaine MONSANTO. Leur concentration en substance active est de 19,1% et 0,5727% pour le Cry1Ac et le Cry2Ab respectivement.

- Tampon de dilution

Pour la dilution des toxines nous avons utilisé du tampon phosphate (10 mM PBS et 100 mM NaCl) fourni par le CIRDES.

- Boîtes plastiques à logettes

Elles comportent 60 logettes chacune (photo 5).

- Autre matériel

Il s'agit de la verrerie et du matériel classique de laboratoire.



Photo 4 : Larves sur milieu nutritif

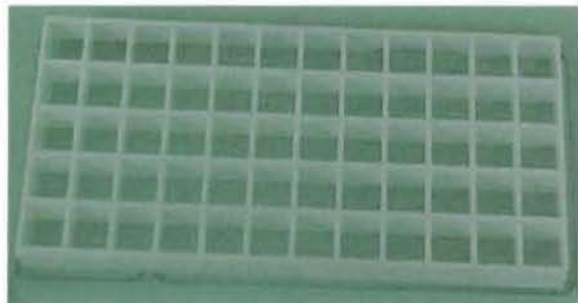


Photo 5 : Boîte plastique à logettes

4.2.2 Méthodes

4.2.2.1 Préparation des solutions de toxine

Pour chaque toxine, nous avons d'abord préparé une solution mère de concentration élevée car toutes les autres solutions sont préparées à partir de cette première. Ainsi les concentrations 1000 µg/ml et 120 µg/ml ont été retenues pour le Cry1Ac et le Cry2Ab respectivement.

Une série de sept (7) solutions a été ensuite préparée pour chaque toxine par dilution de la solution mère. Les concentrations retenues figurent dans le tableau V.

Tableau V : Concentrations des solutions insecticides utilisées dans les pré-tests.

	Concentrations (µg/ml)						
	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7
Cry1Ac	100	80	70	60	0,5	0,1	0,05
Cry2Ab	120	100	80	5	2	1	0,5

Pour la préparation d'une solution de concentration C_n le volume de la solution mère à prélever est déterminé à partir de la formule suivante :

$$V_i = (C_n \cdot V_n) / C_i$$

C_i = concentration de la solution mère (1000 µg/ml pour le Cry1Ac et 120 µg/ml pour le Cry2Ab).

V_i = volume de la solution mère à prélever pour préparer la solution de concentration C_n .

C_n = concentration de la solution de rang n.

V_n = volume de la solution de rang n.

4.2.2.2 Méthode de traitement

Les bio-essais ont été réalisés dans les boîtes plastiques à logettes (1,69 cm² par logette) contenant des tranches de milieu nutritif.

Pour chaque toxine, nous avons constitué huit (8) lots de 15 larves chacun ; sept (7) lots ont été traités avec les sept (7) solutions insecticides préparées et le huitième lot qui sert de témoin a été traité avec le tampon de dilution.

Un volume de 100 µl de chaque dilution de la toxine a été appliqué à l'aide d'une pipette automatique, à la surface du milieu artificiel préalablement placé dans les logettes ; l'excès

d'humidité est éliminé par évaporation. Les larves de deuxième stade, privées de nourriture pendant au moins 5 heures ont été déposées individuellement dans les logettes. Les boîtes fermées ont été placées dans les conditions d'élevage décrites précédemment.

Le comptage de mortalité a été effectué 7 jours après le traitement.

4.2.3 Résultats et discussion

Les taux de mortalité des larves en fonction des concentrations du Cry1Ac sont présentés à la figure 6. A 0,05 et 0,1 $\mu\text{g/ml}$ le Cry1Ac n'a aucun effet sur les larves de *H. armigera* ; on ne peut donc pas retenir une concentration inférieure à 0,1 $\mu\text{g/ml}$ dans la réalisation de nos tests de sensibilité. Par contre, on observe 100% de mortalité à partir de 70 $\mu\text{g/ml}$; toute concentration supérieure à cette valeur ne peut pas être prise en compte dans les bio-essais. Dans notre cas, les concentrations des solutions insecticides du Cry1Ac peuvent être choisies entre 0,5 $\mu\text{g/ml}$ (provoquant 13,3% de mortalité) et 60 $\mu\text{g/ml}$ (provoquant 93,3% de mortalité). L'objectif premier du pré-test est la détermination des concentrations donnant des taux de mortalité compris entre 0 et 100% ; cependant, le choix des concentrations limites pour le test proprement dit dépend de l'expérimentateur (VAISSAYRE, 2002). Selon MENOZZI *et al.* (2002), la plus faible peut être choisie pour obtenir environ 10% de mortalité et la plus forte, 90% de mortalité. Ainsi, nous avons choisi 0,5 et 50 $\mu\text{g/ml}$ comme les concentrations limites dans les tests de sensibilité de *H. armigera* au Cry1Ac.

Les résultats obtenus avec le Cry2Ab (figure 7) montrent que les concentrations 0,5 ; 1 et 2 $\mu\text{g/ml}$ donnent 0% de mortalité. Cependant, avec 5 $\mu\text{g/ml}$ le taux de mortalité est de 20% ; cette concentration est légèrement élevée pour servir de limite inférieure ; cela nous a conduit à choisir 4 $\mu\text{g/ml}$. La plus forte concentration (120 $\mu\text{g/ml}$) provoque 86,7% de mortalité ; selon MENOZZI *et al.* (2002), elle peut être utilisée comme la concentration limite supérieure pour les bio-essais.

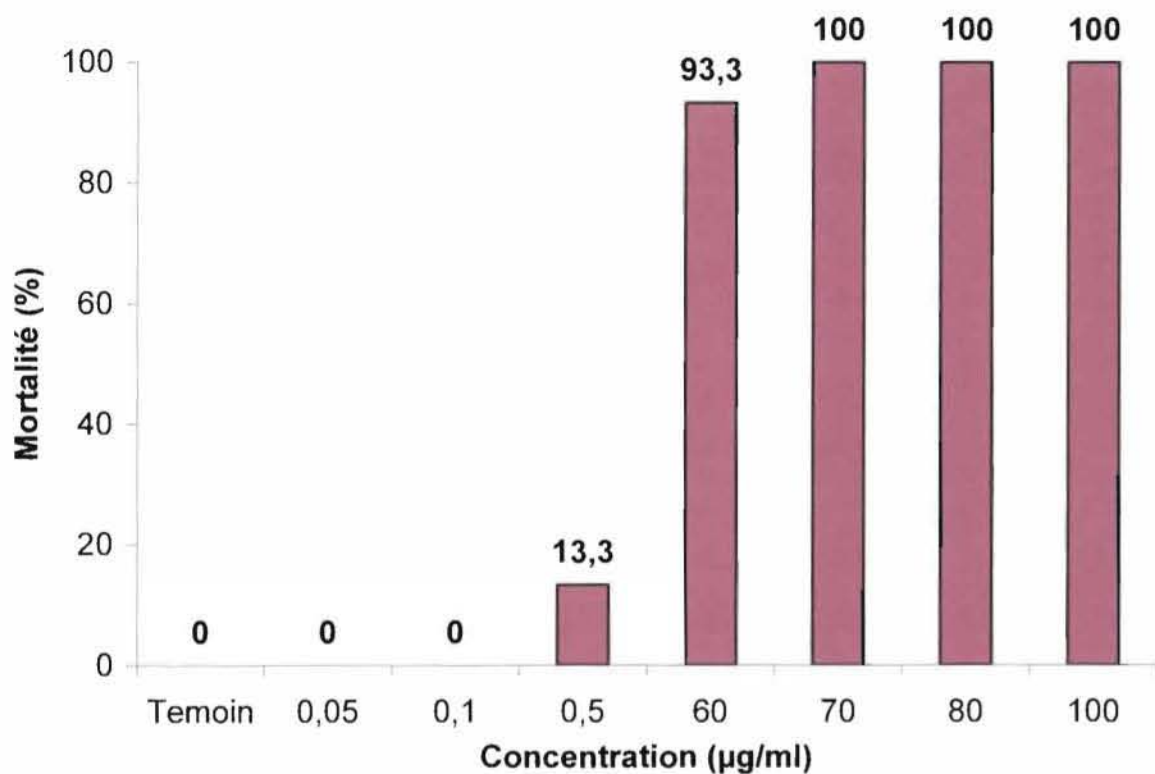


Figure 6 : Taux de mortalité relevés 7 jours après le traitement des larves de *H. armigera* avec le Cry1Ac.

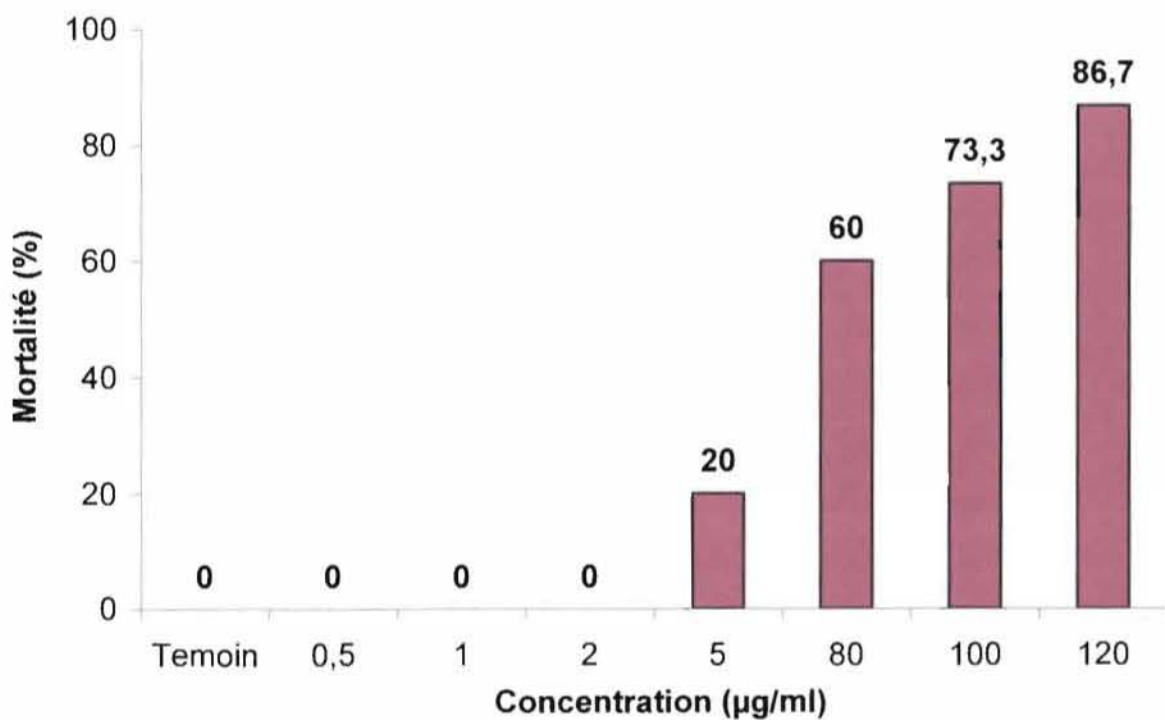


Figure 7 : Taux de mortalité relevés 7 jours après le traitement des larves de *H. armigera* avec le Cry2Ab.

CONCLUSION PARTIELLE

Les pré-tests réalisés sur la souche BIT04 nous ont permis de choisir 0,5 et 50 µg/ml comme les concentrations limites du Cry1Ac. Pour le Cry2Ab, nous avons considéré 4 et 120 µg/ml comme concentrations inférieure et supérieure respectivement. Une autre souche aurait pu être retenue pour les pré-tests ; la souche BIT04 a été choisie à cause de sa disponibilité.

CHAPITRE 5 : TESTS DE SENSIBILITE DE *H. ARMIGERA* A LA DELTAMETHRINE.

INTRODUCTION

Dans le cadre de la gestion de la résistance de *H. armigera* aux insecticides utilisés en culture cotonnière, des tests de sensibilité sont réalisés chaque année au laboratoire d'Entomologie du Programme Coton de l'INERA à la station de Farakô-bâ. Ces bio-essais ont pour but d'évaluer le niveau de la résistance de la noctuelle aux produits chimiques dans les différentes zones cotonnières du Burkina Faso. Pour notre étude, nous nous sommes intéressés à la deltaméthrine qui, dans la famille des pyréthrinoïdes, est l'une des plus utilisées par les producteurs.

5.1 MATERIEL ET METHODES

5.1.1 Matériel

• Matériel biologique

Pour ces tests, nous avons utilisé les trois souches de terrain (BIT04, DAT04 et SID04) et la souche sensible de référence (BK77).

• Autre matériel

- la deltaméthrine (matière technique) de concentration 99,3% ;
- le solvant (acétone) ;
- les boîtes plastiques à logettes ;
- la balance électrique de précision de marque METTLER ;
- le micro-applicateur de marque BURKARD de RICKMANSWORTH.

5.1.2 Méthodes

5.1.2.1 Pesée des larves

Les larves ont été pesées individuellement sur une balance de précision ; celles qui ont un poids compris entre 35 et 45 mg (stade 3) sont retenues pour les tests. Sept (7) lots de 30 individus chacun ont été ainsi constitués.

5.1.2.2 Préparation des solutions

A partir de la matière technique, nous avons d'abord préparé une solution mère dont la concentration correspond à 6 µg/g de larve. La quantité de substance technique à peser pour cette préparation est donnée par la formule de GRY (1972) :

$$Q = \lambda \cdot V \cdot 100 / v \cdot c$$

Q = quantité de matière technique à peser ;

λ = dose de substance active de la solution-mère en µg/g d'insecte ;

V = volume total de la solution mère en ml ; v = volume de la solution à appliquer en µl/g d'insecte ;

c = pourcentage de pureté de la matière technique.

Sur la base du pré-test réalisé par HEMA (2004), nous avons retenu 0,6 et 6 µg/g comme les doses limites de notre test. Les doses intermédiaires ont été calculées selon une progression géométrique de raison r telle que :

$$\log r = (\log x_a - \log x_b) / n - 1$$

r = raison géométrique ; x_a = plus forte dose ;

x_b = plus faible dose ; n = nombre de doses.

Nous avons ainsi retenu six (6) doses pour les tests de sensibilité : 0,6 ; 0,95 ; 1,51 ; 2,39 ; 3,79 et 6 µg/g. Le volume de solution mère à prélever pour la préparation des solutions correspondantes est donné par la formule de GRY (1972) :

$$V_n = \lambda_n \cdot 10 / \lambda$$

V_n = volume de solution-mère à prélever pour la dose de rang n ;

λ_n = dose de substance active de la solution de rang n.

Les dilutions sont faites dans de l'acétone.

5.1.2.3 Application topique

C'est la méthode utilisée pour appliquer le produit sur la larve. Elle est réalisée à l'aide d'un micro-applicateur automatique muni d'une seringue coudée (photo 6). Cet appareil permet d'appliquer 1 µl de solution insecticide sur le thorax de la larve.

Parmi les sept (7) lots de larves constitués, six ont été traités avec les six solutions insecticides et le septième lot qui sert de témoin a été traité avec le solvant (acétone).

L'application est faite de la faible à la forte concentration afin d'éviter toute erreur due au dépôt de la substance active sur la paroi de la seringue ou à l'intérieur de l'aiguille (ALAUX, 1994). Après l'application, les larves ont été placées individuellement dans les logettes contenant le milieu nutritif.

Les mortalités ont été relevées à 24, 48 et 72 heures après le traitement (photo 7) ; seules les mortalités à 48 heures après l'application ont été prises en compte dans l'analyse des données. On considère comme morte une larve qui ne bouge pas et qui, placée sur le côté ne se retourne plus. Le test est rejeté si le taux de mortalité dans le témoin dépasse 10%.

5.1.2.4 Analyses des données

Les données ont été analysées à l'aide du logiciel WINDL version 2.0 du CIRAD, suivant la méthode dite du maximum de vraisemblance ou méthode des probits de travail. L'échelle probit représente la projection linéaire des pourcentages cumulés d'une courbe de distribution normale (courbe de GAUSS) (ALAUX, 1994). Les transformations, les calculs de DL10, DL50 et DL90, les droites de régression linéaire et l'analyse de la déviance de ces droites sont réalisés par ce logiciel.

La comparaison des différentes souches étudiées est faite sur la base des DL50 ; si les intervalles de confiance ne se recoupent pas, les souches sont considérées comme étant différentes.



Photo 6 : micro-applicateur muni de seringue **Photo 7** : mortalité des larves après 48 heures

5.2 RESULTATS

Les résultats des bio-essais conduits sur les quatre souches sont consignés dans le tableau VI. La DL50 de la deltaméthrine est de 0,056 $\mu\text{g/g}$ pour la souche sensible de référence BK77 ; 2,512 $\mu\text{g/g}$ pour la souche BIT04 ; 3,228 $\mu\text{g/g}$ pour la souche DAT04 et 2,270 $\mu\text{g/g}$ pour la

souche SID04. Les intervalles de confiance indiquent que les souches de terrain présentent des DL50 statistiquement différentes de celle trouvée sur la souche sensible de référence : elles présentent donc toutes les trois un niveau de résistance élevé à la deltaméthrine en comparaison avec la BK77.

Tableau VI : Valeurs des DL50 de la deltaméthrine obtenues sur les souches BK77, BIT04, DAT04 et SID04.

Souches	DL50 (µg/g)	Intervalle de confiance à 95%	Pentes ± E.T. ¹	Coefficient de résistance
BK77	0,056	0,030 - 0,099	2,32±0,19	-
BIT04	2,512	1,055 - 5,316	1,31±0,27	45
DAT04	3,228	1,087 - 5,584	1,63±0,24	58
SID04	2,270	1,049 - 3,385	2,43±0,11	40

¹ : Ecart-type

La figure 8 présente les droites de régression linéaire dose de toxique (en logarithme) et mortalité des larves en (probit) des quatre souches.

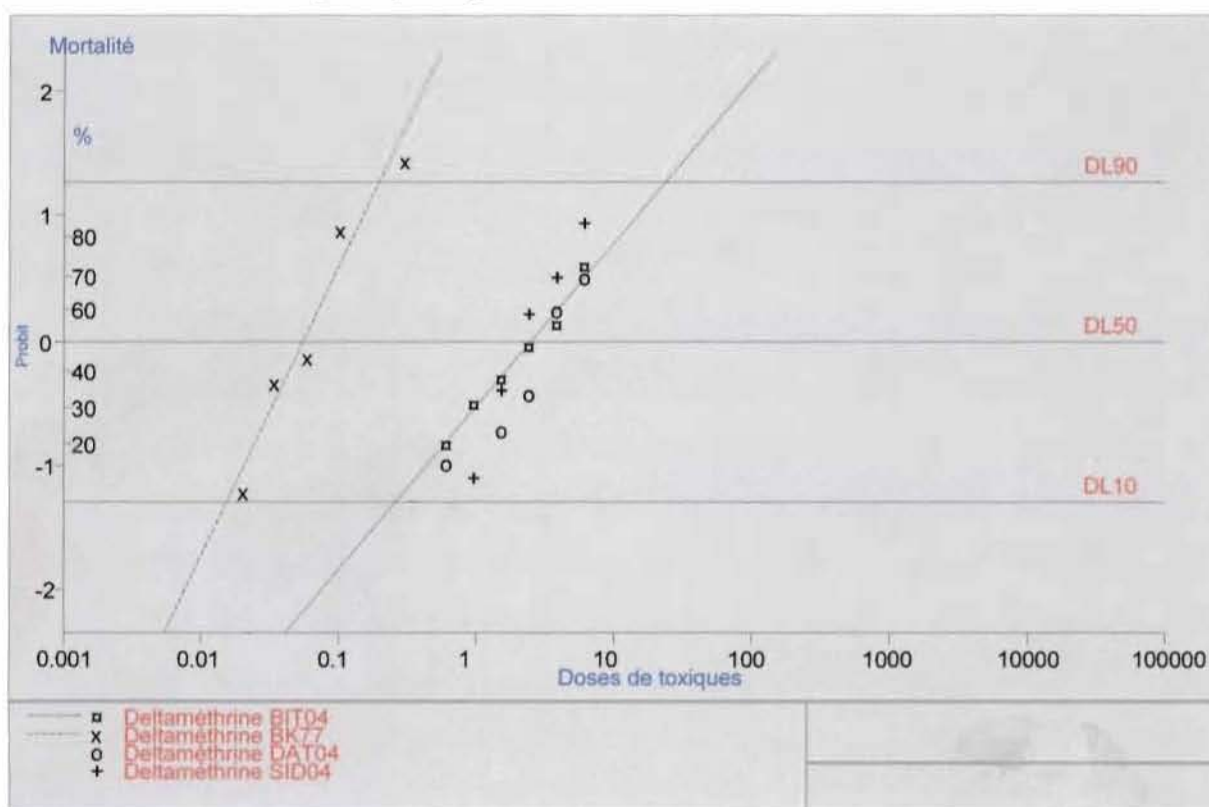


Figure 8 : Comparaison des droites de régression dose-mortalité de la deltaméthrine utilisée sur les souches BK77, BIT04, DAT04 et SID04.

L'analyse de la déviance de ces quatre droites de régression (tableau VII) indique que :

- l'hypothèse d'ajustement du modèle est acceptée au seuil de 5%, on a donc un bon ajustement du modèle pour toutes les droites ;

- les pentes sont semblables car l'hypothèse du parallélisme des droites est acceptée au seuil de 5% ; cela montre que les souches ont le même degré d'homogénéité et qu'une comparaison de leur sensibilité à la deltaméthrine n'est pas aberrante ;

- l'hypothèse des droites identiques est rejetée au seuil de 0,1% : le test est donc très hautement significatif. La souche BK77 contient les individus les plus sensibles à la deltaméthrine ; cela se traduit par le déplacement de sa droite de régression vers l'axe des ordonnées, indiquant des mortalités élevées pour des faibles doses de deltaméthrine. Quant aux souches de terrain, leur sensibilité à cet insecticide ne diffère pas significativement (tableau VIII), d'où le regroupement des trois droites de régression.

Tableau VII : Analyse de la déviance des droites de régression dose-mortalité de la deltaméthrine utilisée sur les souches BK77, BIT04, DAT04 et SID04.

Hypothèses à tester	Chi carré	ddl ¹	P (X>Chi carré)
Les points sont bien sur les droites	7,00927	13	0,9017
Les droites sont identiques	91,00305	9	0,0000
Les pentes sont identiques	6,46411	3	0,0911

¹ : degré de liberté

Tableau VIII : Analyse de la déviance des droites de régression dose-mortalité de la deltaméthrine utilisée sur les souches BIT04, DAT04 et SID04.

Hypothèse à tester	Chi carré	ddl ¹	P (X>Chi carré)
Les points sont bien sur les droites	3,902893	10	0,9516
Les droites sont identiques	7,457642	6	0,2806
Les pentes sont identiques	4,399597	2	0,1108

¹ : degré de liberté

5.3 DISCUSSION

Les résultats indiquent un niveau de résistance moyennement élevé des larves de Bittou, Datomo et Sidéradougou à la deltaméthrine. Les coefficients de résistance obtenus par YARA (1999) sur la souche de Sidéradougou (36) et HEMA (2004) sur les souches de Bittou (14) et

de Datomo (43) semblent plus faibles que ceux obtenus dans notre étude. Cela indique une baisse de sensibilité de la noctuelle à ce produit dans les différentes localités.

Le niveau de résistance de la souche de Bittou a connu une augmentation significative cette année. Cela s'explique difficilement dans le contexte actuel de la gestion de la résistance de *H. armigera* aux pyréthriinoïdes. En effet, la recherche a proposé ces dernières années l'emploi des alternatives pendant les deux premiers traitements du programme de protection chimique en vigueur au Burkina Faso (SOU, 2004). Ces alternatives que sont l'endosulfan (organochloré) et le profenofos (organophosphoré) devraient permettre de retarder l'évolution de la résistance de la noctuelle aux pyréthriinoïdes. Nous pensons donc que la baisse de sensibilité de la souche BIT04 est due à la capacité migratoire de l'insecte qui peut parcourir des centaines de kilomètres (VASSAYRE, 2000). La localisation du site de récolte (frontière Togo et Ghana) nous amène à supposer que des insectes résistants seraient venus de ces deux pays limitrophes. La polyphagie de *H. armigera* (BUFS *et al.*, 2004) appuie cette hypothèse car ses hôtes sont indéniablement présentes dans ces pays qui d'ailleurs produisent du coton dans les zones limitrophes avec le Burkina Faso.

Quant aux deux autres souches de terrain (DAT04 et SID04), leur niveau de sensibilité n'a pas considérablement varié. Cependant, les larves de Datomo restent toujours les plus résistantes à la deltaméthrine ; cela s'explique par l'ancienneté de cette zone dans le domaine de la culture cotonnière mais aussi par la pratique de la culture maraîchère. La deltaméthrine est largement utilisée contre les ravageurs de ces cultures qui hébergent aussi la noctuelle. Ainsi *H. armigera* est soumis à une pression de sélection continue tout au long de l'année, d'où son niveau de résistance élevé.

Bien qu'élevés, les coefficients de résistance des souches locales n'ont pas atteint le seuil critique car selon MENOZZI *et al.* (2002), des échecs d'application au champ ne sont observés que pour des valeurs supérieures à 100.

H. armigera a développé des mécanismes de résistance à la deltaméthrine un peu partout dans le monde ; au Mali, les coefficients de résistance trouvés en 2002 variaient entre 10 et 30 (TOGOLA, 2003). En Côte d'Ivoire, une souche de Bouaké récoltée en 2002 était 25 fois plus résistante que la souche sensible de référence BK77 (MARTIN *et al.*, 2003). En Afrique de l'Ouest, c'est le Bénin qui présente les niveaux de résistance les plus élevés ; PRUDENT *et al.* (2000) y ont trouvé des souches 250 fois plus résistantes que la BK77. Dans le monde,

l'Inde et la Chine détiennent le record en terme de résistance de *H. armigera* à la deltaméthrine avec des coefficients supérieurs à 1000 dans certaines zones (REGUPATHY, 2004 ; RUSSELL *et al.*, 2004).

CONCLUSION PARTIELLE

Cette étude a confirmé l'existence du phénomène de résistance à la deltaméthrine constatée au Burkina Faso depuis les années 1998 chez *H. armigera*. On n'a pas observé une différence significative entre les trois (3) souches qui proviennent de zones agro-écologiques différentes. Les coefficients de résistance restent encore au-dessous du seuil fixé par MENOZZI *et al.* (2002) ; cependant, force est de reconnaître qu'ils sont en progression.

CHAPITRE 6: ETUDE DE L'EFFICACITE DES DEUX DELTA- ENDOTOXINES DE *B. THURINGIENSIS* (CRY1Ac ET CRY2Ab) SYNTHETISEES PAR LE COTON BT SUR *H.* *ARMIGERA*.

INTRODUCTION

Commercialisé depuis 1996 aux Etats-Unis, le cotonnier transgénique synthétisant des delta-endotoxines de *B. thuringiensis* occupe de nos jours plusieurs millions d'hectares dans le monde (BRICKLE *et al.*, 2001). En Afrique, en Asie et en Australie *H. armigera* demeure la principale cible de ces plantes transgéniques (KRANTHI *et al.*, 1999). Le Burkina Faso expérimente pour la première fois en Afrique de l'Ouest cette nouvelle technologie, mais aucune étude n'a été menée pour l'instant sur le niveau de sensibilité de la noctuelle aux toxines synthétisées par la plante.

La présente étude a été réalisée pour d'une part évaluer la sensibilité des larves de *H. armigera* récoltées au Burkina Faso, dans diverses localités à ces toxines et d'autre part, comparer cette sensibilité à celle de la souche sensible de référence BK77. L'objectif final étant de constituer une base de données qui permettrait de suivre le niveau de sensibilité des souches de terrain, dans l'éventualité d'un développement du cotonnier transgénique au Burkina Faso.

6.1. MATERIEL ET METHODES

6.1.1 Matériel

- Matériel biologique

Les tests ont porté sur les souches BK77, BIT04, DAT04 et SID04 et les larves de deuxième stade ont été utilisées.

- Toxines et tampon de dilution

Les toxines et le tampon de dilution utilisés dans ces bio-essais sont ceux qui ont servis aux pré-tests.

6.1.2 Méthodes

6.1.2.1 Préparation des solutions insecticides

Les concentrations limites étant fixées à partir des pré-tests, nous avons calculé les concentrations intermédiaires suivant une progression géométrique de raison r . Pour la préparation d'une solution de concentration C_n le volume de la solution mère à prélever est déterminé à partir de la formule :

$$V_i = (C_n \cdot V_n) / C_i$$

Une série de sept (7) solutions a été préparée pour chaque toxine ; les concentrations retenues sont inscrites dans le tableau IX.

Tableau IX: Concentrations retenues pour les tests de sensibilité de *H. armigera* aux toxines.

	Concentrations ($\mu\text{g/ml}$)						
	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7
Cry1Ac	50	23,21	10,77	5	2,32	1,08	0,5
Cry2Ab	120	68,08	38,62	21,91	12,43	7,05	4

6.1.2.2 Méthode de traitement

Les essais ont été réalisés dans les boîtes plastiques composées de 60 logettes ($1,69 \text{ cm}^2$ par logette) dans lesquelles sont placées des tranches de milieu nutritif. Pour chaque souche nous avons constitué huit (8) lots de 30 larves chacun et sept (7) concentrations ont été retenues par toxine. Chaque lot a été traité avec une concentration et le huitième lot qui sert de témoin a été testé avec le tampon de dilution.

Un volume de $100 \mu\text{l}$ de chaque dilution de la toxine a été appliqué à la surface du milieu artificiel préalablement placé dans les logettes et l'excès d'humidité est éliminé par évaporation. Les larves privées de nourriture pendant au moins 5 heures ont été placées individuellement dans les logettes. Les boîtes sont ensuite fermées et placées dans les conditions d'élevage.

Le comptage de mortalité des larves a été fait 7 jours après le traitement (photo 8) ; le test est rejeté si le taux de mortalité dans le témoin dépasse 10%. Les données ont été analysées avec le logiciel WINDL.

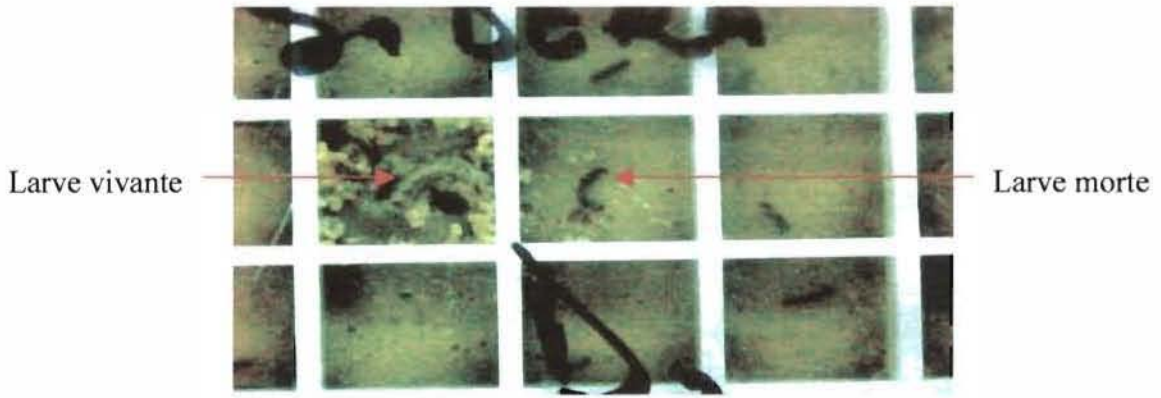


Photo 8: Différence entre larve morte et larve vivante (7^{ème} jour)

6.2 RESULTATS

Tableau X: CL50 des toxines Cry1Ac et Cry2Ab obtenues sur les souches BK77, BIT04, DAT04 et SID04.

Toxine	Souche	CL50 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Intervalle de confiance	Pente \pm ET ¹
Cry1Ac	BK77	0,344	0,165 - 0,665	1,31 \pm 0,20
	BIT04	0,343	0,083 - 0, 631	1,36 \pm 0,18
	DAT04	0,413	0,105 - 0,750	1,30 \pm 0,17
	SID04	0,377	0,058 - 0,754	1,25 \pm 0,21
Cry2Ab	BK77	0,955	0,130 - 2,451	1,49 \pm 0,34
	BIT04	1,024	0,147 - 5,921	1,47 \pm 0,39
	DAT04	0,873	0,016 - 2,075	1,61 \pm 0,30
	SID04	0,938	0,500 - 2,260	1,56 \pm 0,31

¹ Ecart-type

Les résultats obtenus (tableau X) montrent que toutes les souches testées sont sensibles aux deux delta-endotoxines de *B. thuringiensis*, Cry1Ac et Cry2Ab. Les CL50 du Cry1Ac sont de 0,344 ; 0,343 ; 0,413 et 0,377 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ pour les souches BK77, BIT04, DAT04 et SID04 respectivement. Quant à la toxine Cry2Ab, elle a donné 0,955 ; 1,024 ; 0,873 et 0,938 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ pour les mêmes souches respectivement. Les larves de Bittou, Datomo, et Sidéradougou présentent le même niveau de sensibilité que la souche sensible de référence BK77 à chacune des toxines synthétisées par le cotonnier transgénique (compte tenu du recoupement des intervalles de confiance). Cela est d'ailleurs confirmé par le regroupement des droites de régression linéaire dose-mortalité du Cry1Ac (figure 9) et du Cry2Ab (figure 10) et aussi par l'analyse de la déviance de ces droites (tableaux XI et XII).

MENTION BIEN

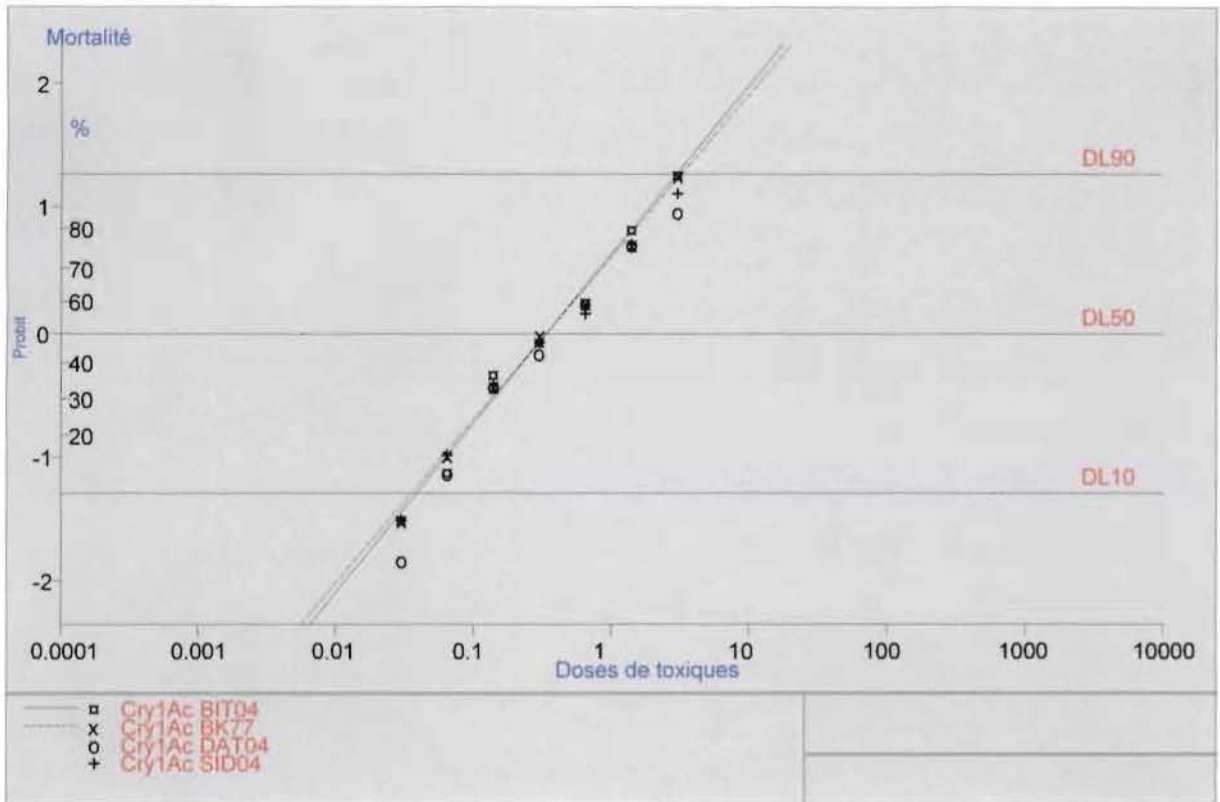


Figure 9: Comparaison des droites de régression dose-mortalité du Cry1Ac utilisé sur les souches BK77, BIT04, DAT04 et SID04.

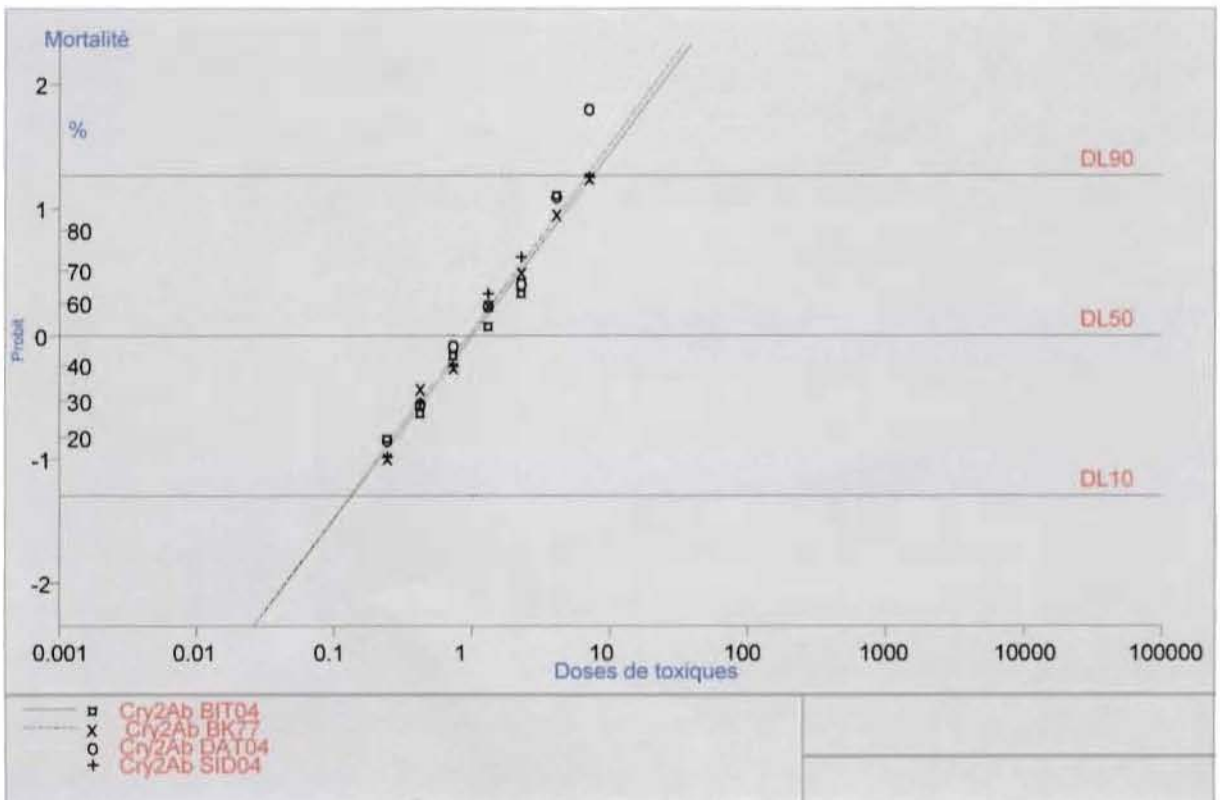


Figure 10: Comparaison des droites de régression dose-mortalité du Cry2Ab utilisé sur les souches BK77, BIT04, DAT04 et SID04.

En effet, l'hypothèse d'ajustement du modèle est acceptée au seuil de 5% ; les pentes sont semblables à ce même seuil, ce qui rend la comparaison des souches plus fiable puisqu'elles sont homogènes au même degré. Enfin, l'hypothèse des droites identiques est acceptée au seuil de 5% ; contrairement à la deltaméthrine, la droite de régression de la BK77 se confond à celle des souches de terrain dans les deux cas.

Tableau XI : Analyse de la déviance des droites de régression dose-mortalité du Cry1Ac utilisé sur les souches BK77, BIT04, DAT04 et SID04.

Hypothèses à tester	Chi carré	ddl ¹	P (X>Chi carré)
Les points sont bien sur les droites	4,296204	20	0,9999
Les droites sont identiques	0,994873	9	0,9994
Les pentes sont identiques	0,223938	3	0,9736

¹ : degré de liberté

Tableau XII : Analyse de la déviance des droites de régression dose-mortalité du Cry2Ab utilisé sur les souches BK77, BIT04, DAT04 et SID04.

Hypothèses à tester	Chi carré	ddl ¹	P (X>Chi carré)
Les points sont bien sur les droites	4,514526	20	0,9994
Les droites sont identiques	0,899597	9	0,9996
Les pentes sont identiques	0,250000	3	0,9691

¹ : degré de liberté

6.3 DISCUSSION

La BK77 utilisée pour les bio-essais est une souche sensible de référence élevée au CIRAD à Montpellier depuis plus de 20 ans. Depuis sa date de récolte, elle n'a jamais reçu de traitement insecticide, ni de toxines de *B. thuringiensis*. Cependant elle présente le même niveau de sensibilité que les souches de terrain vis-à-vis des deux toxines. Cela est dû au fait que les larves de Bittou, Datomo et Sidéradougou n'ont jamais été en contact avec ces produits ; il n'y a donc pas eu de pression de sélection à ces toxines. L'étude précédente a montré que ces mêmes souches étaient résistantes à la deltaméthrine ; cette résistance ne change pas la sensibilité de l'insecte aux toxines : ainsi, il n'existe pas de résistance croisée à ces deux catégories d'insecticides chez la noctuelle. Cela s'avère normal puisqu'elles n'ont pas le même mode d'action ; en effet, la deltaméthrine est un insecticide neurotoxique

(AHMAD, 2004) alors que les delta-endotoxines de *B. thuringiensis* agissent au niveau des microvillosités intestinales (OLSEN et DALY, 2000). Le Cry1Ac et le Cry2Ab synthétisés par le cotonnier transgénique seraient donc efficaces dans la gestion de la résistance de *H. armigera* à la deltaméthrine.

L'efficacité des delta-endotoxines de *B. thuringiensis* a été démontrée par plusieurs auteurs. Ainsi, VASSAL (2004) a montré que la CL50 du Cry1Ac sur la BK77 (stade 2) varie entre 0,11 et 0,50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Ce résultat confirme celui que nous avons obtenu avec la même souche. URAICHUEN (2002) et GIBAN (2004) ont obtenu des CL50 légèrement inférieures à la nôtre avec le Cry1Ac extrait d'une suspension de *B. thuringiensis* et préalablement solubilisée puis activée avant l'essai sur la BK77 ; ces CL50 sont de 0,27 et 0,24 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ respectivement. Selon LE TAN-DUMANOIS (1994), la CL50 du Cry1Ac varie entre 0,02 et 0,05 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ pour les larves néonates de *H. armigera*. Cette fluctuation des CL50 s'expliquerait par les origines diverses des toxines et aussi par les stades larvaires utilisés. En effet, selon KARIM *et al.* (1999) et OLSEN et DALY (2000), les modes opératoires, le choix de l'insecte, son stade, et les méthodes utilisées pour la production des toxines sont des facteurs de variation importante des CL50. Sur des souches de terrain, la CL50 du Cry1Ac variait entre 0,01 et 0,67 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de diète en Chine et entre 0,091 et 9,093 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de diète en Inde entre 2001 et 2003 (KRANTHI et RUSSELL, 2004).

Si le Cry1Ac a fait l'objet de nombreuses études depuis des dizaines d'années (VASSAL, 2004), l'intérêt pour le Cry2Ab est né ces dernières années avec l'insertion du gène correspondant dans le cotonnier (CHITKOWSKI *et al.*, 2003) ; cela explique la rareté des informations sur ce dernier. Avec cette toxine, GIBAN (2004) a obtenu une CL50 de 0,421 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ sur le premier stade larvaire de la BK77. Cette concentration létale est en dessous de celle que nous avons obtenu sur le deuxième stade. En revanche, URAICHUEN (2002) a évalué la sensibilité de la même souche à la toxine Cry2Aa qui présente 88% d'homologie avec le Cry2Ab (GREENPLATE *et al.*, 2003) ; il a obtenu une CL50 de 1,82 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. L'espèce américaine voisine de *H. armigera* (*Heliothis virescens*) semble être plus sensible à la toxine Cry1Ac car elle présente une CL50 de 0,06 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (URAICHUEN, 2002).

La quantification du Cry1Ac et du Cry2Ab dans le cotonnier transgénique indique un niveau de synthèse élevé qui diminue avec l'âge de la plante (RUSSELL *et al.*, 2004). Selon GREENPLATE (1999), la quantité de Cry1Ac varie de 110,6 $\mu\text{g}/\text{g}$ (au 53^{ème} jour après semis) à 20,6 $\mu\text{g}/\text{g}$ de poids sec de feuille (au 116^{ème} jour après semis) pour le cotonnier synthétisant uniquement cette toxine. Pour la deuxième génération synthétisant simultanément les deux

toxines, le niveau optimal de synthèse est de 10,2 µg/g de poids sec de feuille pour le Cry1Ac et 542,6 µg/g pour le Cry2Ab (GREENPLATE *et al.*, 2003). Selon KRANTHI et RUSSELL (2004), cela correspond à une concentration de 0,041 µg/cm² de feuille pour le Cry1Ac et 2,17 µg/cm² pour le Cry2Ab. En comparaison avec nos résultats, le niveau d'expression du Cry1Ac par le cotonnier transgénique est inférieur à la CL50 trouvée sur les différentes souches ; par contre, celui du Cry2Ab est deux fois supérieur à la CL50 de la toxine pour les quatre souches.

En considérant les CL50 obtenues sur les larves néonates par LE TAN-DUMANOIS (1994) avec le Cry1Ac et celle obtenue par GIBAN (2004) avec le Cry2Ab, on peut déduire que le niveau d'expression de ces toxines est assez élevé pour contrôler efficacement la noctuelle. Toutefois, cette comparaison donne seulement une idée sur le rapport cotonnier transgénique et mortalité des larves. En effet, dans notre cas les feuilles ont été remplacées par le milieu nutritif et les toxines ont été utilisées séparément alors que chez le cotonnier transgénique les deux toxines sont synthétisées simultanément. Cela montre donc toute l'importance de l'étude de l'effet de l'association des deux toxines.

CONCLUSION PARTIELLE

A l'issue de l'étude de l'efficacité des deux delta-endotoxines de *B. thuringiensis*, nous pouvons retenir que toutes les souches testées montrent une sensibilité élevée aux deux toxines. Les souches de terrain et la souche sensible de référence présentent le même niveau de sensibilité car elles n'ont jamais subi de pression de sélection à ces produits. Une résistance à la deltaméthrine n'induit pas une résistance ni au Cry1Ac ni au Cry2Ab ; il n'y a donc pas de résistance croisée vis-à-vis de ces deux catégories d'insecticides.

CHAPITRE 7 : EFFET DE L'ASSOCIATION DES TOXINES CRY1Ac ET CRY2Ab SUR LES LARVES DE *H. ARMIGERA*

INTRODUCTION

La deuxième génération de cotonnier transgénique synthétise simultanément le Cry1Ac et le Cry2Ab. Ces toxines, considérées individuellement sont efficaces vis-à-vis des larves de *H. armigera*. Cependant l'activité insecticide de leur association n'est pas connue.

C'est dans ce contexte que l'étude de l'effet de l'association des deux toxines (Cry1Ac et Cry2Ab) a également été réalisée sur *H. armigera*.

7.1 MATERIEL ET METHODES

7.1.1 Matériel

Une seule souche (SID04) était disponible pour ces tests par l'importance de sa population. Les bio-essais ont été réalisés sur des larves de stade 2 et les mélanges des toxines ont été faits à partir des solutions mères des deux toxines.

7.1.2 Méthodes

Nous avons préparé trois mélanges de base dans les rapports en masse de substance active (Cry1Ac/Cry2Ab) de 75/25 ; 50/50 et 25/75. Pour chaque mélange de base, on a calculé la CL50 théorique selon TABASHNIK (1992) :

$$CL50_{(m)} = [r_a/CL50_{(a)} + r_b/CL50_{(b)}]^{-1}$$

$CL50_{(m)}$ = CL50 théorique du mélange ;

$CL50_{(a)}$ et $CL50_{(b)}$ = valeurs individuelles des CL50 des toxines a et b respectivement ;

r_a et r_b = proportion de toxines a et b respectivement dans le mélange.

Six (6) autres concentrations ont été calculées selon une progression géométrique de raison r de façon à encadrer la CL50 théorique. La formule de TABASHNIK (1992) a été utilisée pour le calcul des raisons géométriques :

$$R_{(m)} = [r_a/R_{(a)} + r_b/R_{(b)}]^{-1}$$

$R_{(m)}$ = raison théorique

$R_{(a)}$ et $R_{(b)}$ = raison calculée pour la toxine a et b respectivement.

Sept (7) concentrations ont été ainsi testées par ratio (CL50 théorique incluse) (tableau XIII).

Tableau XIII : Concentrations retenues pour les différents ratio (Cry1Ac/Cry2Ab).

	Concentrations (µg/ml)						
	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7
75/25	59,18	29,05	14,26	7,00	3,43	1,69	0,82
50/50	65,26	33,72	17,42	9,00	4,64	2,39	1,23
25/75	68,94	37,39	20,27	11,00	5,96	3,23	1,75

La méthode utilisée pour la réalisation des tests et pour l'évaluation des résultats est identique à celle du chapitre 6.

7.2 RESULTATS

Les CL50 des mélanges de toxines dans les proportions (Cry1Ac/Cry2Ab) : 75 /25 ; 50 /50 et 25 /75 sont respectivement de 0,486 ; 0,629 et 1,052 µg/cm² (Tableau XIV). Ces concentrations ne diffèrent pas significativement car les intervalles de confiance se recoupent dans les trois cas.

Tableau XIV : Activité insecticide du mélange des toxines Cry1Ac et Cry2Ab sur les larves de *H. armigera*

Ratio (en masse) Cry1AC/Cry2Ab	CL50 expérimentale (µg/cm ²)	CL50 théorique (µg/cm ²)	Intervalle de confiance à 95%	Pente±E.T ¹	Facteur synergique
75 / 25	0,486	0,443	0,173 – 0,803	1,53 ± 0,20	0,911
50 / 50	0,629	0,538	0,189 – 1,209	1,40 ± 0,21	0,855
25 / 75	1,052	0,684	0,139 – 2,118	1,28 ± 0,23	0,650

¹ Ecart-type

La figure 11 présente les droites de régression dose-mortalité de chaque ratio de mélange sur la souche SID04.

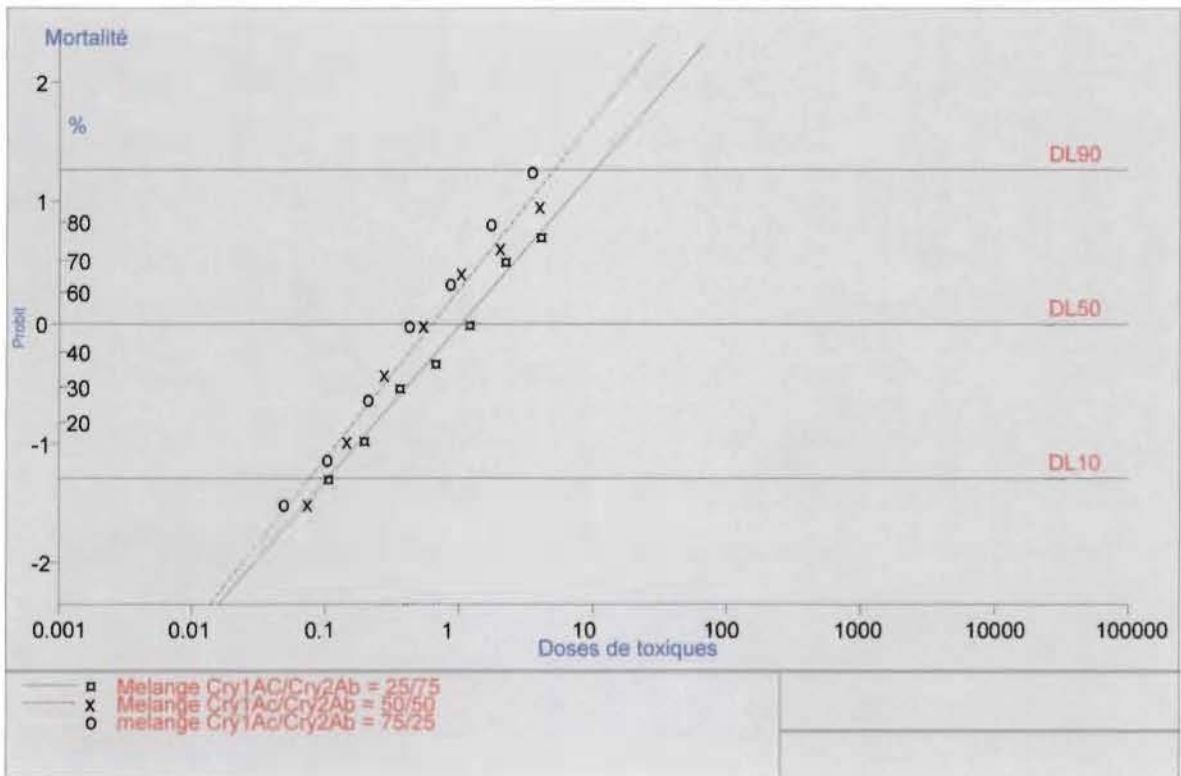


Figure 11 : Comparaison des droites de régression dose-mortalité des mélanges de Cry1Ac et Cry2Ab sur la souche SID04.

L'analyse de la déviance de ces droites (tableau XV) indique que l'ajustement du modèle est accepté au seuil de 5% ; les pentes et les droites sont identiques au même seuil.

Les facteurs synergiques sont de 0,911 pour le ratio 75/25 ; 0,855 pour le ratio 50/50 et 0,650 pour le ratio 25/75. Selon TABASHNIK (1992), si les CL50 théoriques ont les mêmes valeurs que les CL50 observées, l'effet du mélange des toxines est considéré comme additif et le facteur synergique est voisin de 1. Par contre, si la CL50 théorique est plus grande que la limite supérieure de l'intervalle de confiance de la valeur expérimentale, il y a un phénomène de synergie et le facteur synergique est supérieur à 1. Dans le cas contraire, si la valeur théorique est plus petite que la limite inférieure de l'intervalle de confiance de la valeur expérimentale, il y a un phénomène d'antagonisme et le facteur synergique est inférieur à 1.

Les résultats de notre étude montrent que les valeurs des CL50 théoriques sont incluses dans les intervalles de confiance quel que soit le ratio. Même si dans le cas du ratio 25/75 le facteur synergique est assez loin de 1, on peut dire qu'il n'y a pas de phénomène statistiquement synergique, ni antagoniste entre le Cry1Ac et le Cry2Ab dans les trois cas. Ainsi, l'effet de l'association de ces deux toxines est additif sur la souche étudiée.

Tableau XV : Analyse de la déviance des droites de régression dose-mortalité des mélanges de toxine utilisés sur la souche SID04.

Hypothèses à tester	Chi carré	ddl	P (X>Chi carré)
Les points sont bien sur les droites	2,183228	15	0,9999
Les droites sont identiques	0,899597	2	0,0648
Les pentes sont identiques	0,250000	2	0,6422

7.3 DISCUSSION

Les CL50 obtenues avec les trois (3) ratios ne diffèrent pas significativement, mais l'efficacité du mélange augmente avec l'accroissement de la proportion de la toxine Cry1Ac. Cela s'explique par les résultats obtenus dans l'étude précédente sur l'efficacité des deux toxines vis-à-vis de *H. armigera*. On pourrait ainsi penser que la faible concentration du Cry1Ac chez le cotonnier génétiquement modifié synthétisant les deux delta-endotoxines (GREENPLATE *et al.*, 2003) est due à son efficacité élevée vis-à-vis de la noctuelle.

La CL50 obtenue avec le ratio 25/75 est inférieure à la concentration du Cry2Ab seul dans le cotonnier transgénique donné par GREENPLATE *et al.* (2003) ; ainsi avec cette toxine seule, la plante pourrait lutter efficacement contre *H. armigera*. La présence de deux toxines dans la plante s'explique donc plus par un souci de diversification de substances insecticides qui retarde l'apparition de la résistance que par un souci d'augmenter la quantité de toxines synthétisées.

Cette étude a permis aussi de montrer l'effet additif de l'association des deux toxines sur la souche de Sidéradougou. Le Cry1Ac et le Cry2Ab synthétisés par le cotonnier transgénique agiraient donc indépendamment l'un de l'autre sur les larves de la noctuelle. Cette double action du cotonnier transgénique augmente considérablement son efficacité sur les larves. L'absence de résistance croisée aux deux toxines (AKHURST *et al.*, 2001) couplée à la stratégie de refuge préconisée par la recherche permettraient de retarder l'apparition de la résistance de *H. armigera* à ces plantes transgéniques puisque la résistance de la noctuelle à une des toxines serait masquée par la sensibilité à l'autre.

Dans le but d'associer deux toxines différentes de *B. thuringiensis* pour diminuer et retarder le phénomène d'apparition de la résistance chez les insectes, des études similaires ont déjà été

réalisées ; ainsi GREENPLATE *et al.* (2003) ont montré l'effet additif de la combinaison du Cry1Ac et du Cry2Ab. Par contre, des cas de synergie ont déjà été mis en évidence entre les toxines Cry et Cyt chez différentes espèces de moustiques (PONCET *et al.*, 1995).

CONCLUSION PARTIELLE

Cette étude a montré l'effet additif de l'association des toxines synthétisées par le cotonnier transgénique. Les CL50 diminuent avec l'augmentation de la proportion de Cry1Ac dans le mélange. On n'a pas observé une différence significative entre les trois ratios.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Dans le cadre du suivi de la sensibilité de *H. armigera* aux insecticides chimiques vulgarisés dans la culture cotonnière au Burkina Faso, des bio-essais sont réalisés chaque année au laboratoire d'entomologie du Programme Coton. La première partie de notre étude a porté sur la détermination du niveau de résistance à la deltaméthrine de trois souches de terrain provenant respectivement de Bittou, Datomo et Sidéradougou. La BK77 a été utilisée comme souche sensible de référence. Les résultats ont montré qu'il n'y a pas de différence de sensibilité entre les souches de *H. armigera* récoltées dans ces trois zones cotonnières ; cependant, elles présentent toutes les trois un certain niveau de résistance à la deltaméthrine.

Les phénomènes de résistance des ravageurs du cotonnier aux insecticides chimiques ont conduit à l'adoption dans plusieurs pays des plantes transgéniques qui synthétisent des delta-endotoxines de la bactérie *B. thuringiensis*. La deuxième partie de notre travail avait pour but d'évaluer la sensibilité *in vivo*, des trois souches locales à ces toxines. Les tests ont mis en évidence une sensibilité élevée de la noctuelle au Cry1Ac et au Cry2Ab puisque les souches de terrain présentent le même niveau de sensibilité que la souche sensible de référence BK77. Ainsi ces toxines sont efficaces vis-à-vis des larves de *H. armigera* ayant fait l'objet de tests, dans nos conditions de travail.

L'effet additif de l'association du Cry1Ac et du Cry2Ab a été aussi montré sur la souche de Sidéradougou.

Notre étude a montré l'efficacité des toxines synthétisées par le cotonnier transgéniques vis-à-vis des larves de *H. armigera*. Cependant les résultats ne peuvent pas être généralisés au niveau national à cause du nombre de souches utilisées. Ainsi il serait intéressant de poursuivre cette étude en considérant l'ensemble des zones cotonnières du Burkina Faso.

Bien que cet insecte soit le plus nuisible en culture cotonnière dans notre pays, il serait opportun d'étendre l'étude sur d'autres ravageurs tels que *Diparopsis watersi*, *Earias* sp. et *Syllepte* sp. qui peuvent aussi causer des dégâts importants.

L'obtention de souches résistantes aux toxines étant possible en laboratoire, on pourrait envisager des études sur le déterminisme génétique de la résistance de nos souches de *H. armigera* au Cry1Ac et au Cry2Ab. Cela permettrait de mettre en place des programmes

efficaces de gestion de la résistance de l'insecte aux plantes transgéniques ; des études biotechnologiques peuvent aussi être entreprises afin de caractériser la résistance au niveau moléculaire.

Pour les tests de sensibilité de la noctuelle aux toxines il serait intéressant d'adopter au niveau international un seul protocole expérimental pour faciliter la comparaison des résultats.

En attendant les résultats définitifs de la recherche sur le cotonnier transgénique dans notre pays, les mesures de gestion de la résistance de *H. armigera* aux insecticides en vigueur doivent se poursuivre en intégrant les méthodes de lutte sur seuil et en privilégiant la lutte biologique. L'utilisation des delta-endotoxines de *B. thuringiensis* en tant que biopesticides est une alternative intéressante à condition qu'elle soit rentable pour le producteur.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AHMAD M., 2004. Current IPM/IRM programmes for *Helicoverpa armigera* (Hübner) in Pakistan. Atelier Projet GERICO du 06 au 10 Décembre 2004 (CDROM).
- AHMAD M., ARIF M. I. & ATTIQUE M. R., 1997. Pyrethroid resistance of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) in Pakistan. *Bulletin of Entomological Research*, **87**, 343-347.
- AKHURST R., JAMES B. & BIRD L., 2001. Resistance to Inguard cotton by the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner). CSIRO Entomology, Canberra, 5 p.
- ALAUX T., 1994. Prévention de la résistance aux pyréthrinoïdes chez *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1808) (Lepidoptera : Noctuidae) en Côte d'Ivoire. Thèse de doctorat, Institut National Polytechnique de Toulouse, 133 p.
- BERRADA S., FOURNIER D., CUANY A. & NGUYEN T. X., 1994. Identification of resistance mechanisms in a selected laboratory strain of *Cacopsylla pyri* (Homoptera: Psyllidae): altered acetylcholinesterase and detoxifying oxidases. *Pesticide biochemistry and physiology*, **48**, 41-47.
- BEYO J., BREVAULT T., NIBOUCHE S. & ASFOM P., 2002. Sensibilité aux insecticides pyréthrinoïdes chez *Helicoverpa armigera* (Hübner) au Nord Cameroun. Acte de l'atelier sur la résistance des insectes aux insecticides en Afrique de l'Ouest et du Centre, Mars 2002, Maroua, Cameroun. Prasac, N'Djamena, Tchad, **2**, 31-43.
- BRICKLE D. S., TURNIPSEED S. G. & SULLIVAN M. J., 2001. Efficacy of insecticides of different chemistries against *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) in transgenic *Bacillus thuringiensis* and conventional cotton. *Journal of Economic Entomology*, **94** (1), 86-92.
- BUES R., KOUASSI A. S. & TOUBON J. F., 2004. La noctuelle *Helicoverpa armigera* (Hübner) : cycle évolutif, dégâts en France 2003 et résistance aux insecticides. *Phytoma-La Défense des Végétaux*, **568**, 29-33.
- CALAN P., 1966. Le cotonnier et l'industrie cotonnière. Presse Universitaire de France, 126 p.
- CARON H., 1991. Un exemple de résistance aux insecticides : *Helicoverpa* spp dans les agrosystèmes cotonniers. Mémoire de stage, IRCT/ CIRAD Montpellier, 32 p.
- CASTELLA J. C., 1996. Stratégies de luttes contre les insectes ravageurs dans les systèmes de culture cotonnière en Thaïlande : logique actuelle et proposition pour une gestion durable. IRCT, éd. Paris, France 282 p.
- CAUQUIL J., 1986. Maladies et ravageurs du cotonnier en Afrique au Sud du Sahara. *Coton et Fibres Tropicales*. IRCT-CIRAD, 92 p.
- CHITKOWSKI R. L., TURNIPSEED S. G., SULLIVAN M. J. & BRIDGES W. C., 2003. Field and laboratory evaluations of transgenic cottons expressing one or two *Bacillus thuringiensis* var. *Kurstaki* Berliner proteins for management of Noctuid (Lepidoptera) pests. *Journal of Economic Entomology*, **03**, 0755-0762.

- COUILLOUD R. & GIRET M., 1980.** Multiplication de *Heliothis armigera* (Hübner) (Lepidoptera : Noctuidae) : Amélioration possible grâce à l'adoption d'une technique d'élevage en groupe des chenilles. *Coton et Fibres Tropicales*, **35**, 217-224.
- CRICKMORE N., ZEIGLER D. R., FEITELSON J., SCHNEPF E., VAN J., LERECLUS D., BAUM J. & DEAN D. H., 1998.** Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **62**, 807-813.
- DELATTRE R., 1973.** Parasites et maladies en culture cotonnière. IRCT, éd. Paris, France, 146 p.
- DELORME R., 1985.** Les phénomènes de résistance, mécanismes biochimiques et physiologiques. Colloque national mode d'action et utilisation des insecticides, Angers, 19-22 novembre 1985, 257-273.
- DENHOLM I., PICKETT J. A. & DEVONSHIRE A. L., 1997.** Insecticide resistance: from mechanism to management. CABI publishing, ISBN 0-85199-367-2, 121 p.
- DJIHINTO C. A., 2000.** Résistance aux pyréthrinoïdes observée chez *Helicoverpa armigera* (Hübner) : ravageur du cotonnier, au Nord du Bénin. Mémoire de DEA, option : Protection des plantes et environnement, Ecole Nationale Supérieure Agronomique, Montpellier, France, 33 p.
- DON H-E. & CROSSLEY S., 2001.** *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1808) : Corn Earworm, Tomato Grub, Tobacco Budworm, Cotton Bollworm. <http://linus.socs.uts.edu.au/don/larvae/noct/armi.html>
- EBANATI A. A., VONTAS J. S., SMALL G. J., MCCAROLL L. & HEMINGWAY J., 2001.** Quantification of pyrethroid insecticides from treated bednet using a mosquito recombinant glutathione S-transferase. *Medical and Veterinary Entomology*, **15** (1), 58-63.
- FEITELSON J. S., PAYNE J. & KIM L., 1992.** *Bacillus thuringiensis*, insects and beyond. *Bio-technology*, **1**, 271-275.
- FRENCH-CONSTANT R. H., PITTENDRIGH B., VAUGHAN A. & ANTHONY N., 1998.** Why are there so few resistance-associated mutations in insecticide target genes? *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* **353**, 1685-1693.
- FRYXELL P. A., 1984.** Taxonomy and germplasm resources. Cotton, Eds., American Society of Agronomy, Madison, USA, 27-57.
- GIBAN M., 2004.** Les plantes transgéniques résistantes aux insectes : caractéristiques des variétés actuelles. Atelier Projet GERICO du 06 au 10 Décembre 2004 (CDROM).
- GILL S. S., COWLES E. A. & PIETRATONIO P. V., 1992.** The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. *Ann. Rev. Ent.*, **37**, 615-636.
- GIRET M. & COUILLOUD R., 1982.** Effet de la température sur le stade nymphal d'*Heliothis armigera* (Hübner) (Lepidoptera : Noctuidae) : technique de conservation par arrêt de développement à 15°C. *Coton et Fibres Tropicales*, **37**, 271-276.
- GREENPLATE J. T., 1999.** Quantification of *Bacillus thuringiensis* insect control protein Cry1Ac over time in Bollguard cotton fruit and terminals. *Journal of Economic Entomology*, **92** (6), 1377-1383.

- GREENPLATE J. T., MULLINS J. W., PENN S. R., DAHM A., REICH B. J. & SHAPPLEY Z. W., 2003.** Partial characterization of cotton plants expressing two toxin proteins from *Bacillus thuringiensis*: relative toxin contribution, toxin interaction and resistance management. *J. Appl. Ent.*, **127**, 340-347.
- GRY J., 1972.** Techniques d'essais insecticides par traitement individuel et détermination des DL50. PG/Orsay, France, Fasc. n°2 et 3.
- GUILLET P., 1997.** La détection de la résistance aux insecticides chez les moustiques. Actes des journées coton du CIRAD-CA, 132-137.
- GUNNING R. V., MOORES G. D. & DEVONSHIRE A. L., 1996.** Esterase and fenvalerate resistance in Australian *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). *Pesticide biochemistry and physiology*, **54** (1), 12-23.
- GUNNING R. V., MOORES G. D. & DEVONSHIRE A. L., 1999.** Esterase's inhibitors synergise the toxicity of pyrethroids in Australian *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera, Noctuidae). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **63**, 50-62.
- HALCOMB J. L., BENEDICT J. H., COOK B., RING D. R. & CORREA J. C., 2000.** Feeding behaviour of Bollworm and Tobacco Budworm (Lepidoptera: Noctuidae): Larvae in mixed stands of nontransgenic and transgenic cotton expressing an insecticidal protein. *Journal of Economic Entomology*, **93** (4), 1300-1307.
- HARDWICK D. F., 1965.** The corn earworm complex. Memoirs Entomological Society of Canada, **40**, 247 p.
- HEAD D. J., McCAFFERY A. R. & CALLAGHAN A., 1998.** Novel mutations in the para-homologous sodium channel gene associated with phenotypic expression of nerve insensitivity resistance to pyrethroids in Heliothine Lepidoptera. *Insect Molecular Biology*, **7** (2), 191-196.
- HECKEL D. G., GAHAN L. J., LIU Y-B. & TABASHNIK B. E., 1999.** Genetic mapping of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in diamondback moth using biphasic linkage analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci*, **96**, 8373-8377.
- HECKEL D. J., GAHAN L. J., GOULD F., DALY J. C. & TROWELL S., 1997.** Genetics of *Heliothis* and *Helicoverpa* resistance to chemical insecticides and to *Bacillus thuringiensis*. *Pest. Sci.*, **51**, 251-258.
- HEMA S. A. O., 2004.** Contribution à la caractérisation biochimique de la résistance de *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1808) (Lepidoptera, Noctuidae) au Burkina Faso. Mémoire de D.E.A., Ecole Doctorale Régionale de Biotechnologie, 37 p.
- HÖFTE H. & WHITELEY H. R., 1989.** Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiological Reviews*, **53**, 242-252.
- HOY A. M., 1998.** Myths, models and mitigation of résistance to pesticides. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.*, **353**, 1787-1795.
- KAMRIN M. A., 1997.** Pesticide profiles: toxicity, environmental impact and fate. CRC, Boca Raton, FL, 535-539.
- KARIM S., RIAZUDDIN S. & DEAN D. H., 1999.** Interaction of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins with midgut brush border membrane vesicles of *Helicoverpa armigera* (Hübner). *Journal of Asia-Pacific Entomology*, **2**, 153-162.

- KING A. B. S., 1994.** *Heliothis/ Helicoverpa* (Lepidoptera : Noctuidae). Insect pests of cotton. CAB International, Wallingford, UK, 39-106.
- KRANTHI K. R. & RUSSELL D., 2004.** Resistance to Bt in India *Helicoverpa armigera* (Hübner). Atelier Projet GERICO du 06 au 10 Décembre 2004 (CDROM).
- KRANTHI K. R., JADHAV D., WANJARI R., KRANTHI S. & RUSSELL D., 2001.** Pyrethroid resistance and mechanisms of resistance in field strains of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Economic Entomology*, **94** (1), 253-365.
- KRANTHI K. R., RUSSELL D., WANJARI R., KHERDE M. & MUNJE S., 2002.** In season-changes in resistance to insecticide in *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) in India. *Journal of Economic Entomology*, **143** (2), 1-24.
- KRANTHI S., KRANTHI K. R. & LAVHE N. V., 1999.** Baseline toxicity of Cry1A toxins to the spotted bollworm, *Earias vittella* F. *Crop Protection*, **18**, 551-555.
- LE TAN-DUMANOIS V., 1994.** Défense du cotonnier contre les insectes ravageurs : étude d'une stratégie basée sur l'expression conjointe d'inhibiteur de protéases et de toxines de *Bacillus thuringiensis* dans la plante. Thèse de doctorat, Université Paris-Sud Centre d'Orsay. 91 p.
- LI J., CAROLL J. & ELLAR D. J., 1991.** Crystal structure of insecticidal delta-endotoxins from *Bacillus thuringiensis*. *Nature*, **353**, 815-821.
- LIU Y. B., TABASHNIK B. E., DENNEHI T. J., CARRIERE Y., SIMS M. A. & MEYER K. S., 2002.** Oviposition on and mining in bolls of Bt and Non-Bt Cotton by resistant and susceptible pink bollworm (Lepidoptera: Gelechiidae). *Journal of Economic Entomology*, **95** (1), 143-148.
- MAHON R., OLSEN K., YOUNG S., GARSIA K. & LAWRENCE L., 2004.** Resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in *Helicoverpa armigera* (Hübner). *CSIRO Entomology*, **24**, 1-6.
- MARTIN T., OCHOU G. O., VAISSAYRE M. & FOURNIER D., 2003.** Suivi de la résistance aux insecticides de *Helicoverpa armigera* (Hübner) en Côte d'Ivoire. Rapport-synthèse de la 5^{ème} reunion-bilan du PR-PRAO, 25-27 mars 2003 à Lomé, Togo, 42-48.
- MARTIN T., YOBO-TITIAHY P. A., OCHOU G. O. & NIERE K., 2000.** Suivi de la résistance aux pyréthrinoides de *Helicoverpa armigera* (Hübner) dans la zone cotonnière de Cote d'Ivoire. Rapport de synthèse PR-PRAO, 1999-2000, 169-170.
- MAUNEY J. R., 1984.** Anatomy and morphology of cultivated cotton. Cotton, Eds., American Society of Agronomy, Madison, USA, 59-81.
- McCAFFERY A. R. & AHMAD M., 1988.** Resistance to insecticides in Thailand strains of *Heliothis armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Economic Entomology*, **81** (1), 45-48.
- McGAUGHEY W. H., 1985.** Insect resistance to the biological insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Science*, USA, **229**, 193-195.
- MENON A. S. & DEMESTRAL J., 1985.** Survival of *Bacillus thuringiensis* var. Kustaki. *Water, Air and Soil Pollution*, **25**, 265-274.
- MENOZZI P., VAISSAYRE M. & VASSAL J. M., 2002.** La résistance des insectes aux insecticides neurotoxiques. Acte de l'atelier sur la résistance des insectes aux insecticides en

Afrique de l'Ouest et du Centre, Mars 2002, Maroua, Cameroun. Prasac, N'Djamena, Tchad, 2, 5-17.

MILLER T. A., 1988. Mechanisms of resistance to pyrethroid insecticides. *Parasitology Today*, 4, 8-12.

NIBOUCHE S., 1994. Cycle évolutif de *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1808) (Lepidoptera, Noctuidae) dans l'Ouest du Burkina Faso: biologie, écologie et variabilité géographique des populations. Thèse de doctorat, Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier, 130 p.

NIBOUCHE S., 1999. *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1808) (Lepidoptera, Noctuidae, Heliiothinae). Les déprédateurs du cotonnier en Afrique Tropicale et dans le reste du monde n°12, CIRAD-CA, Paris, France, 49 p.

OLSEN K. M. & DALY J. C., 2000. Plant-toxin interactions in transgenic Bt Cotton and their effect on mortality of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Economic Entomology*, 93 (4), 1293-1299.

PARRY G., 1982. Le cotonnier et ses produits. Technique agricole et productions tropicales. Maisonneuve et Larose, Paris, France, 502 p.

PINCHARD V., 1993. Etude des mécanismes de résistance chez un ravageur du cotonnier : *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Lepidoptera, Noctuidae). 187 p.

PLAPP F. W., 1986. Genetics and biochemistry of insecticide resistance in Arthropods: prospects for the future. Pesticide Resistance: Strategies and tactics for management. National Academy Press, Washington, D.C. 75-86.

PONCET S., DELECLUSE A., KLIER A. & RAPPORT G., 1995. Evaluation of synergistic interactions among the CryIVA, CryIVB and CryIVC toxin components of *Bacillus thuringiensis* crystals. *Journal of Invertebrate Pathology*, 66, 131-135.

PRUDENT P., KATARY A., DJIHINTO A. & PATHINVO E., 2000. Résultats des études conduites sur la résistance de *Helicoverpa armigera* (Hübner) aux pyréthriinoïdes au Bénin. Rapport de synthèse PR-PRAO 1999-2000, 2-27.

REGUPATHY A., 2004. Resistance: history and current status in the region. Atelier Projet GERICO du 06 au 10 Décembre 2004 (CDROM).

RODRIGUEZ M., ORTIZ E., BISSET J. A., HEMINGWAY J. & SALEDO E., 1993. Changes in malathion and pyrethroid resistance after cypermethrin selection of *Culex quinquefasciatus* field population of Cuba. *Medical and Veterinary Entomology*, 7, 117-121.

ROUSH R. & TABASHNIK T., 1990. Pesticide resistance in Arthropods. Chapman and Hall, New York, and London, 58-75.

RU L., WIE C., ZHAO J. Z. & LIU A., 1998. Differences in resistance to fenvalerate and cyhalothrin and inheritance of knockdown resistance to fenvalerate in *Helicoverpa armigera* (Hübner). *Pesticide biochemistry and physiology*, 61 (2), 79-85.

RUSSELL D., KRANTHI K. R., REGUPATHY A. & AHMAD M., 2004. Current insecticide resistance management programme for *Helicoverpa armigera* (Hübner) in India. Atelier Projet GERICO du 06 au 10 Décembre 2004 (CDROM).

SCHNEPF E., CRICKMORE N., VAN J., LERECLUS D., BAUM J., FEITELSON J. S., ZEIGLER D. R. & DEAN D. H., 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Molecular Biol.*, **62**, 775-806.

SEMENT G., 1986. Le cotonnier en Afrique Tropicale. Maisonneuve et Larose, 133 p.

SOU S., 2004. Programme de protection phytosanitaire pour la gestion de la résistance des ravageurs en culture cotonnière au Burkina Faso. Rapport de la 6^{ème} réunion-bilan du Projet Régional de Prévention et de gestion de la Résistance de *Helicoverpa armigera* (Hübner) aux pyrèthrinoïdes en Afrique de l'Ouest (PR-PRAO), 51-57.

STIMAMIGLIO F. & CHABERT F., 2004. Utilisation efficace et sans risque des produits phytosanitaires. Programme de formation des agents d'encadrement de la Compagnie Cotonnière, avril 2004, 70 p.

SUN J., TANG C., ZHU W. & ZHOU W., 2002: Characterisation of resistance to *Helicoverpa armigera* (Hübner) in three lines of transgenic Bt Upland cotton. *Euphytica*, **123**, 343-351.

TABASHNIK B. E., 1992. Resistance risk assessment: realized heritability of resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae), tobacco budworm (Lepidoptera: Noctuidae) and Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). *Journal of Economic Entomology*, **85**, 1551-1559.

TABASHNIK B. E., CUSHING N. L., FINSON N. & JOHNSON M. W., 1990. Field development of resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). *Journal of Economic Entomology*, **83**, 1671-1676.

THOMAS W. E. & ELLAR D. J., 1983. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* var. *israeliensis* insecticidal delta-endotoxin. *FEBS Letters*, **154**, 362-368.

TOGOLA M., 2003. Statut de la résistance des insectes aux insecticides dans la zone cotonnière du Mali : cas de *Helicoverpa armigera* (Hübner). Rapport-synthèse de la 5^{ème} reunion-bilan du PR-PRAO, 25-27 mars 2003 à Lomé, Togo, 31-36.

TOGUEBAYE B. S. & COUILLOU R., 1982. Etude descriptive de l'œuf et des stades larvaires d'*Heliothis armigera* (Hübner, 1808) (Lepidoptera : Noctuidae) en microscopie électronique à balayage. *Coton et Fibres Tropicales*, **37**, 197-209.

TRAORE D., 1997. La résistance des insectes aux pesticides : une réalité à prendre en compte dans la mise en place d'une lutte intégrée en culture cotonnière. *Publications scientifiques des chercheurs*, 241-251.

ULRICHS C., 2002. Tomato fruitworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner) Lepidoptera : Noctuidae. Rapport de stage, 10 p.

URAICHUEN S., 2002. Etude comparative de la toxicité et des sites récepteurs des δ -endotoxines de *Bacillus thuringiensis* Berliner sur deux ravageurs du cotonnier: *Helicoverpa armigera* (Hübner) et *Heliothis virescens* (Fabricius): relation avec la résistance. Thèse de doctorat, Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier, 149 p.

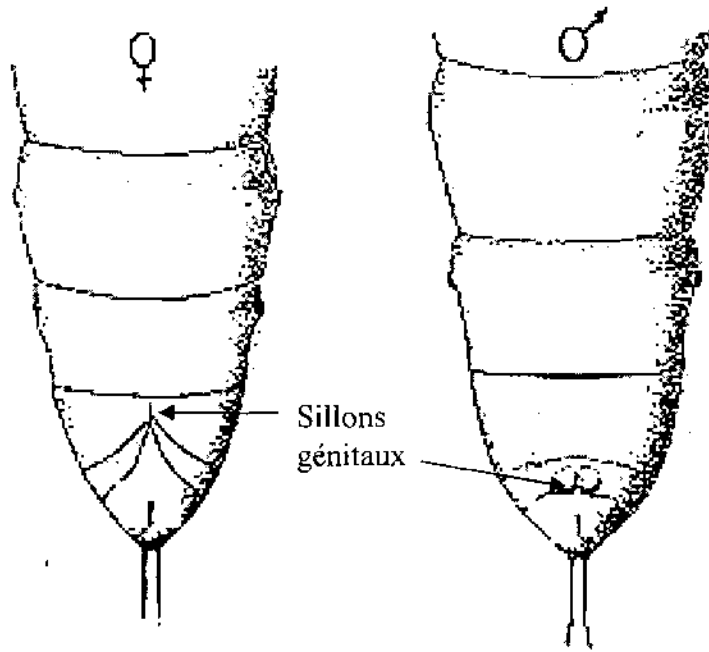
VAISSAYRE M., 2002. Le contrôle chimique de la noctuelle *Helicoverpa armigera* (Hübner) peut-il être durable? Acte de l'atelier sur la résistance des insectes aux insecticides en Afrique de l'Ouest et du Centre, Mars 2002, Maroua, Cameroun. Prasac, N'Djamena, Tchad, **2**, 19-30.

- VAISSAYRE M., 2000.** Protection phytosanitaire du cotonnier dans les systèmes de culture d'Afrique de l'Ouest. Formation phytosanitaire de la SOFITEX, mai 2000, 88 p.
- VASSAL J. M., 2004.** *Bacillus thuringiensis*: mode d'action et résistance. Atelier Projet GERICO du 06 au 10 Décembre 2004 (CDROM).
- VOGNAN G., OUEDRAOGO M. & OUEDRAOGO S., 2002.** Description de la filière cotonnière au Burkina Faso. Rapport intermédiaire, I.N.E.R.A., 34 p.
- WHALON M. E. & McGAUGHEY W. H., 1998.** *Bacillus thuringiensis*: use and resistance management. Insecticide with Novel Mode of Action. Springer-Verlag, 106-137.
- WILSON T. G. & ASHOK M., 1998.** Insecticide resistance resulting from an absence of target-site gene product. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **95** (24), 1404-1408.
- YARA A., 1999.** Prévention et gestion de la résistance de *Helicoverpa armigera* (Hübner) aux pyréthrinoïdes. Mémoire d'ingénieur, Institut du Développement Rural/ Université Polytechnique de Bobo-Dioulasso, 52 p.
- YOUNG J. M., CHILCOTT C. N., BROADWELL A., WIGLEY P. J. & LECADET M. M., 1998.** Identification of serovars of *Bacillus thuringiensis* Berliner 1915 in New Zeland. *New Zeland Journal of Crop and Horticultural Science*, **26**, 63-68.



ANNEXES

ANNEXE 1



Vue ventrale de l'extrémité abdominale des chrysalides de *H. armigera*.

ANNEXE 2 : Nouvelle classification de certaines delta-endotoxines de *B. thuringiensis*

Nom	Ancien nom	Taille (Da)	Activité
Cry1Aa1	Cry IA(a)	133500	Lépidoptères
Cry1Ab1	Cry IA(b)	130615	Lépidoptères
Cry1Ac1	Cry IA(c)	131000	Lépidoptères
Cry1Ad1	Cry IA(d)	131000	Lépidoptères
Cry1Ae1	Cry IA(e)	131000	Lépidoptères
Cry1Ba1	Cry IB	136500	Lép./Coléopt
Cry1Bb1	ET5	136500	Lépidoptères
Cry1Bc1	Cry IB(c)	138000	Lépidoptères
Cry1Ca1	Cry IC	132000	Lépidoptères
Cry1Cb1	Cry IC(b)	130500	Lépidoptères
Cry1Da1	Cry ID	129500	Lépidoptères
Cry1Db1	PrtB	129000	Inconnue
Cry1Ea1	Cry IE	133236	Lépidoptères
Cry1Eb1	Cry IB(b)	130500	Lépidoptères
Cry1Fa1	Cry IF	130500	Lépidoptères
Cry1Fb1	PrtD	131000	Inconnue
Cry1Ga1	PrtA	129500	Inconnue
Cry1Ha1	PrtC	130000	Inconnue
Cry1Ia1	Cry V	81200	Lép./Coléopt
Cry1Ib1	Cry V	80000	Inconnue
Cry1Ja1	ET4	129500	Lépidoptères
Cry1Jb1	ET1	131000	Lépidoptères
Cry1Ka1	Cry I	-	Inconnue
Cry2Aa1	Cry IIA	70500	Lép./Coléopt
Cry2Ab1	Cry IIB	70500	Lépidoptères
Cry2Ac1	Cry IIC	69000	Lépidoptères
Cry3Aa1	Cry IIIA	72500	Coléoptères
Cry3Ba1	Cry IIIB	74300	Coléoptères
Cry3Bb1	Cry IIIBb	72500	Coléoptères
Cry3Ca1	Cry IIID	73000	Coléoptères
Cry4Aa1	Cry IVA	134545	Diptères
Cry4Ba1	Cry IVB	126000	Diptères
Cry5Aa1	Cry VA(a)	153500	Nématodes
Cry5Ab1	Cry VA(b)	143000	Nématodes
Cry5Ba1	PS86Q3	139000	Coléoptères
Cry6Aa1	Cry VIA	52500	Nématodes
Cry6Ba1	Cry VIB	44000	Nématodes
Cry7Aa1	Cry IIIC	126500	Coléoptères
Cry7Ba1	Cry IIIC(b)	126500	Coléoptères
Cry8Aa1	Cry IIIE	128500	Coléoptères
Cry8Ba1	Cry IIIG	130000	Coléoptères
Cry8Ca1	Cry IIIF	127500	Coléoptères
Cry9Aa1	Cry IIG	128500	Lépidoptères
Cry9Ba1	Cry IX	127000	Lépidoptères
Cry9Ca1	Cry IH	129800	Lépidoptères
Cry10Aa1	Cry IVC	75000	Diptères
Cry11Aa1	Cry IVD	71500	Diptères
Cry11Ba1	Jeg80	-	Diptères
Cry12Aa1	Cry VB	139500	Nématodes
Cry13Aa1	Cry VC	89000	Nématodes
Cry14Aa1	Cry VD	132800	Coléoptères
Cry15Aa1	-	38000	Lépidoptères
Cyt1Aa1	CytA	27340	

Source : CRICKMORE *et al.* (1998)

ANNEXE 3

Composition du milieu nutritif

Fractions	Ingrédients	Quantité
A	Eau distillée	2000 ml
	Agar-agar	32,5 g
	Acide sorbique	3 g
	Huile sans cholestérol	2 cuillérées à café
B	Acide ascorbique	25 g
	Acyclovir	1 comprimé
	Rimactan	0,1 g
C	Farine de maïs	285 g
	Levure de bière	75 g
	Germe de blé	75 g

Source : COUILLOUD et GIRET (1980).

Préparation du milieu nutritif

On dissout la fraction B (acide ascorbique, RIMACTAN et ACYCLOVIR) dans de l'eau froide ; pendant ce temps 1000 ml d'eau distillée et les deux cuillérées à café d'huile sans cholestérol sont mis à chauffer jusqu'à 55°C. A partir de cette température, on ajoute l'agar-agar et l'acide sorbique tout en agitant jusqu'à 90°C. Ce mélange est ensuite refroidi jusqu'à 45°C, puis on y ajoute la fraction B dissout et la fraction C préalablement mélangée avec le reste de l'eau distillée. On homogénéise le mélange ainsi constitué à l'aide d'un mixeur et le milieu est coulé dans des boîtes rectangulaires et mis pendant une (1) heure à l'UV afin de le stériliser. Le milieu préparé est conservé à 4 °C.