ANNALES DE PARASITOLOGIE

HUMAINE ET COMPARÉE

Tome 50

1975

N° 6

Annales de Parasitologie (Paris), 1975, t. 50, n° 6, pp. 655 à 668

MÉMOIRES ORIGINAUX

Rôle des spores et des cristaux de *Bacillus thuringiensis* Berliner dans l'infection de *Laspeyresia pomonella* L. (Tortricidae) *

par C. VERVELLE

Laboratoire de Zoologie générale, Université de Paris-Sud, F 91405 Orsay.

Résumé.

L'emploi par ingestion de préparations purifiées de cristaux de *Bacillus thuringiensis* a permis d'établir la sensibilité de *Laspeyresia pomonella* à la toxine cristal. L'action des spores seules est faible et ne peut être traduite par une relation dose-effet. Spores et cristaux montrent une activité plus élevée lorsqu'ils sont associés.

Summary.

The role of spores and crystals of *Bacillus thuringiensis* Berliner in the infection of *Laspeyresia pomonella* L. (Tortricidae).

Susceptibility of *Laspeyresia pomonella* to the crystal toxin of *Bacillus thuringiensis* is demonstrated by forced and free ingestion of purified preparations. The effect of spores alone is weak and cannot be expressed by a relationship between dose and mortality. Crystals and spores exhibit better activity when they are associated.

* Travail réalisé à la Station de Recherches de Lutte biologique, I.N.R.A., La Minière.

I. - Introduction

C'est vers 1940 qu'apparaissent dans nos régions des phénomènes de résistance du Carpocapse des pommes et des poires — *Laspeyresia pomonella* — à divers insecticides chimiques. Ce problème auquel s'ajoutent des effets subsidiaires indésirables, tels que la destruction de l'entomofaune utile et la pollution des récoltes par des résidus toxiques, a justifié l'expérimentation de *Bacillus thuringiensis* contre ce ravageur. Cette bactérie sporulée, pathogène pour les chenilles de Lépidoptères, émet une inclusion cristalline parasporale dont l'action sur *L. pomonella* a été étudiée par Stephens (1952), Roehrich (1964), Mayas (1970).

Toutefois, les modalités de traitement ainsi que la nature des préparations diffèrent d'un auteur à l'autre et rendent difficile l'interprétation comparée de leurs résultats. On sait par ailleurs que des parentés biochimiques et immunologiques existent entre cristaux et protéines des spores (Delafield et al., 1968, Somerville et al., 1968). C'est pourquoi nous nous sommes proposés d'étudier le mode d'action de *B. thuringiensis* sur *L. pomonella* dans des conditions expérimentales définies en analysant la sensibilité de cet insecte aux constituants isolés et purifiés de la bactérie (Vervelle, 1974).

II. - Matériel et méthodes

a) Insectes-test.

L'élevage a été alimenté tantôt sur pomme, tantôt sur milieu artificiel. Pour inhiber la diapause et assurer la continuité des générations, les conditions choisies ont été de 25 °C (± 1 °C), 70 % (± 5 %) d'humidité relative et 17 heures de photopériode : 35 jours sont alors nécessaires à l'évolution d'une génération. Le rendement d'un tel élevage — c'est-à-dire le rapport entre le nombre d'adultes formés et le nombre de chenilles installées sur pomme — est voisin de 100 % en début de conservation des fruits mais il diminue progressivement par la suite. Lorsque les fruits sont inutilisables on emploie le milieu alimentaire semi-synthétique de Sender (1969, 1970). Les chenilles, recueillies à l'éclosion, sont élevées individuellement dans des récipients en matière plastique transparente, non aérés (diamètre : 4,5 cm, hauteur : 1,5 cm).

b) Préparations bactériennes.

La méthode de Goodman et al. (1967), permet la séparation d'une préparation spores-cristaux préalablement lavée et mise en suspension dans un mélange de constituants comprenant notamment du polyéthylène glycol. Une phase surnageante riche en spores est obtenue après addition à ce mélange des mêmes constituants à différentes concentrations et agitation poussée. La phase inférieure contient les cristaux.

Le processus est répété jusqu'à obtention de phases de très haute pureté qui sont alors centrifugées.

Nous avons utilisé 2 préparations de cristaux (références 304 et E 61) de titres respectifs 9 130 et 4 500 Unités d'Activité *Pieris brassicae* (U.A.P.B.) par mg de poudre, l'une isolée d'une culture 304-T (souche 19 Institut Pasteur), l'autre d'une culture de la préparation standard internationale. Une troisième préparation était constituée par des cristaux ayant subi une hydrolyse enzymatique par le chyle de *P. brassicae*. Sa teneur en protéines était de 2,24 mg par ml.

Les 2 préparations de spores provenaient l'une d'une souche cristallogène (sp^{cr+}) E 61 et l'autre d'une souche mutante acristallophore (sp^{cr-}) de référence 22 105. Elles comptaient respectivement 4.10^6 et 33.10^8 spores viables par mg de poudre et étaient conservées à basse température à l'abri de la lumière.

Les suspensions de spores et de cristaux ont été préparées peu avant l'emploi et homogénéisées à l'aide de billes de verre par agitation mécanique. Les témoins sont traités à l'eau stérile.

c) Techniques expérimentales.

Plusieurs modalités de contamination sont décrites dans la littérature : la pulvérisation sur rameau (Tadic et Vasiljevic, 1956), le dépôt sur l'épiderme de la pomme (Fedorintchik et Korostel, 1972), ou dans le fruit (Stephens, 1952), le trempage de feuilles de pommier (Roehrich, 1964), l'ingestion forcée (Mayas, 1970), l'injection (Phillips et al., 1953).

Nous avons adapté la méthode de Roehrich pour contaminer par ingestion libre les chenilles au premier stade larvaire. Les feuilles de pommier sont découpées en rondelles de 1 cm de diamètre, les 2 faces étant traitées. 10 ml de suspension aqueuse à 4 % de sulfosuccinate de sodium (agent mouillant) sont pulvérisés à l'aide de l'appareil de Burgerjon (1956). Après séchage du liquide les rondelles sont disposées dans des piluliers non aérés dont le fond est recouvert de papier filtre très légèrement humide ; les rondelles de feuillage sont renouvelées tous les 2 jours.

Les chenilles au 5^e stade larvaire sont contaminées 2 jours après la 4^e mue par la méthode d'ingestion forcée (Martouret, 1960). Un système microvolumétrique *Agl* permet l'introduction dans l'intestin antérieur d'un volume déterminé.

Les effets du traitement ont été appréciés d'après la consommation des chenilles dont la mesure est peu aisée en raison du comportement endophyte de l'insecte. Les pH du contenu de l'intestin et de l'hémolymphe ont été notés après ingestion des constituants bactériens à l'aide d'un pHmètre *Metrohm* 196 sensible au $1/20^{\circ}$ d'unité pH. La mesure a été effectuée également sur le régurgitat des chenilles du dernier stade. La mortalité est appréciée par l'observation de symptômes liés au comportement (activité, absence de réaction aux stimuli...) et à l'aspect du tégument.

L'évolution pathologique après ingestion de spores et de cristaux a été suivie par des prélèvements d'hémolymphe, de contenu intestinal et de régurgitat. Les observations ont été facilitées par l'incubation du matériel bactérien dans ces milieux déposés

sur lames dans des enceintes maintenues à 80 % d'humidité et 30 °C de température. La présence de *B. thuringiensis* est mise en évidence sur frottis par la coloration au bleu de Loeffler et celle de Smirnof (1962) ainsi que par ensemencement sur milieu nutritif et identification des colonies obtenues.

III. - Étude de l'action des constituants bactériens

a) Les cristaux.

L'incidence sur l'alimentation de l'insecte de l'ingestion des cristaux a été étudiée au 5^e stade larvaire. La contamination n'empêche pas la prise de nourriture des chenilles — appréciée par les morsures de pénétration et les galeries dans le milieu — lorsque l'aliment est présenté après l'ingestion forcée. La pesée 24 h et 48 h après traitement des individus de 3 catégories — témoins avec et sans ingestion d'eau et traités — ne montre pas de différences significatives entre ces 3 groupes.

Le pH de l'hémolymphe et celui du régurgitat ont été suivis après ingestion forcée de cristaux de la préparation 304 (fig. 1). Le poids de cristaux ingérés soit 4 µg a été

FIG. 1. — Variations du pH du régurgitat et de l'hémolymphe après ingestion forcée de cristaux (stade 5). Elevage sur milieu semi-synthétique.

léthal pour les chenilles non sacrifiées. Le pH de l'hémolymphe ne subit pas de changement de sa valeur initiale proche de 6,5 tandis que celui du régurgitat baisse d'1 unité 2 à 4 heures après l'ingestion (à 25 °C) et de 1,5 à 2 unités au bout de 24 heures, la mort des chenilles traitées empêchant de poursuivre les mesures au-delà.

La mortalité a été contrôlée par les 2 méthodes de traitement citées.

ESSAIS PAR INGESTION LIBRE.

La contamination a d'abord été permanente dans un premier essai, tout l'aliment fourni (feuilles) étant traité (50 individus par concentration répartis en 5 lots de 10). La mortalité s'accroît progressivement dès 24 heures après le début du traitement comme le montre la *figure 2*. La concentration létale 50 % (CL 50) au temps $t = 3$ jours, calculée par la méthode de Karber est de 0,250 mg de cristaux par ml de suspension et l'intervalle de confiance au risque 5 % est compris entre 0,147 et 0,423 mg/ml. La mortalité est identique lorsque les insectes sont placés à une température de 20 °C.

FIG. 2. — Evolution de la mortalité après ingestion libre de cristaux (réf. 304) au stade 1.

Une expérimentation de contamination temporaire a eu pour objectif d'établir la durée minimum d'intoxication nécessaire pour assurer la mortalité et d'observer la réaction de l'insecte lorsque l'aliment fourni après contamination consiste en feuillage non traité. Dans cet essai les facteurs variables sont la concentration des suspensions de cristaux (0,5-1 et 2 mg/ml) et la durée d'ingestion de l'aliment contaminé (24, 48 et 72 heures). 30 chenilles au 1^{er} stade larvaire sont soumises à chacune des 9 combinaisons « concentration $\times$ durée d'ingestion » et 3 lots témoins de 20 individus chacun sont alimentés sur feuillage sain pendant 24, 48 et 72 heures.

La figure 3 montre que la différence de mortalité entre témoins et traités croît parallèlement à l'augmentation des concentrations ainsi qu'à la durée de l'ingestion ; elle s'annule lorsqu'une concentration faible de cristaux est offerte pendant une durée limitée (0,5 mg-24 heures). L'interruption de la contamination par retour au feuillage sain n'arrête pas le processus léthal.

FIG. 3. — Mortalité des chenilles (stade 1) en contact temporaire avec le feuillage contaminé par les cristaux (réf. 304). Variations par concentration en fonction des durées de contamination.

ESSAIS PAR INGESTION FORCÉE.

Les conditions d'emploi de cette technique ont été déterminées par une étude préliminaire :

— L'ajustement de la dose de toxine au poids d'insecte, n'a pas paru nécessaire, un essai ayant montré que la mortalité après ingestion d'un même poids de cristaux était voisine dans 3 groupes de chenilles correspondant à 3 classes de poids différentes.

— L'importance de la période d'ingestion par rapport à la mue a déjà été notée par Burgerjon et Biache (1967).

Nous avons cherché à connaître l'incidence de ce facteur chez le Carpopapse par le traitement de 120 (4×30) individus plus ou moins âgés à l'intérieur du 5^e stade

TABLEAU I. — Valeurs des DL 50 par ingestion forcée de 2 préparations de cristaux à 3 périodes de traitement.

Période	1	2		3	
Préparation	304	304	E 61	304	E 61
DL 50 μg par chenille .	0,079	0,216	0,310	0,480	1,280

larvaire. La mortalité qui approche de 70 % dans l'ensemble n'est pas influencée par le moment où survient le traitement dans la 5^e intermue.

— La fourniture éventuelle d'aliment après traitement n'a d'autre part aucune conséquence sur la mortalité.

Les conditions retenues ont alors été les suivantes : volume d'ingestion de 2 μl , choix des individus au 14^e jour du cycle à 25 °C, non réalimentation des chenilles après traitement.

La mortalité par la méthode d'ingestion forcée de cristaux apparaît 48 h après le traitement à la différence de l'ingestion libre (fig. 4). Les taux de mortalité ont donc été notés au bout de ce délai.

Les essais ont été effectués à 3 périodes non consécutives correspondant aux générations n^{os} 1, 4 et 13 de l'élevage souche. Les doses léthales 50 % ou DL 50 définies comme le poids (μg) de cristaux ingéré par insecte — de poids moyen 47 mg — ont été calculées ainsi que leurs intervalles de confiance (tableau I). Il apparaît que la DL 50 augmente de la 1^{re} à la 3^e période. Compte tenu de l'écart qui existe dans le temps entre les traitements (soit 13 générations) et de la stabilité de la souche 304 attestée par un déplacement corrélatif de la DL 50 chez l'étalon E 61, cette manifestation semble indiquer une diminution de la sensibilité de *L. pomonella* maintenu en élevage vis-à-vis des cristaux de *B. thuringiensis*.

L'hypothèse d'une hydrolyse des cristaux par les enzymes intestinaux a été formulée par Martouret (1960) et cet auteur en apporte la démonstration en 1964 chez *P. brassicae*. Le traitement par ingestion forcée de cristaux hydrolysés de 160 chenilles

de Carpocapse (témoins 40, traités 4×30) a permis d'établir une droite de régression 48 heures après le traitement, la DL 50 étant de $0,29 \mu\text{g}$ de protéines ingérées par poids moyen d'insecte de l'élevage sur milieu. Elle est pour l'élevage sur fruit de $0,38 \mu\text{g}$ de protéines non significativement distincte de la première. La molécule toxique libérée par l'hydrolyse a donc une action identique à celle exercée par les cristaux chez *L. pomonella*.

FIG. 4. — Mortalité après ingestion forcée de cristaux (réf. 304) au stade 5. (1) μg de cristaux ingérés par individu.

b) Les spores.

L'utilisation d'un mutant acristallogène permet de juger de l'effet des spores seules en l'absence des cristaux. Après ingestion forcée des spores de cette souche, l'alimentation se poursuit dans 96 % des cas. La mortalité est identique que les chenilles disposent ou non de milieu alimentaire après traitement.

Le pH du régurgitat voisin de 9 chez les chenilles témoins ne montre pas d'écarts sensibles 12 heures après ingestion des spores.

Les principaux symptômes pathologiques observables — dans un faible pourcentage de cas — sont un ralentissement d'activité accompagné d'une absence progressive

de réaction au toucher ainsi que d'une mélanisation des chenilles à la fin du processus morbide. Aucun rejet spontané de contenu intestinal par voie orale ou anale n'a été constaté.

L'action des spores acristallogènes sur le premier stade larvaire a été étudiée pour déterminer si l'évolution de la maladie — lorsque le traitement est pratiqué au 5^e stade — n'est pas arrêtée par la nymphose. L'alimentation à l'aide de feuillage traité pendant 5 jours n'entraîne pas de mortalité supérieure à 17 % et le comportement alimentaire n'est pas perturbé. Un autre essai par contamination temporaire pendant 48 heures sur feuillage puis élevage des chenilles sur pomme a conduit aux mêmes résultats en fin de développement larvaire : mortalité des lots traités proche de celle du lot témoin quelle que soit la concentration employée.

TABLEAU II. — Mortalité cumulée au stade 5 en fonction de la quantité de spores (sp^r—) ingérée et de 3 périodes de traitement (*) P1, P2, P3 : 1^{re}, 2^e, 3^e périodes.

Poids de spores (mg/ml d'eau stérile)	0 témoin			1			2			4		
Nombre de spores viables (× 10 ⁶)	0			66			132			264		
Nombre de jours après traitement	* P1	P2	P3	P1	P2	P3	P1	P2	P3	P1	P2	P3
1	6	0	0	10	3	0	10	0	10	16	16	23
3	10	0	3	20	3	10	26	10	10	30	30	26
5	13	6	10	30	3	20	43	10	30	36	30	33
7	13	6	10	30	10	23	50	10	40	36	30	36

L'action sur les chenilles au 5^e stade a été étudiée à 3 périodes de traitement non consécutives (correspondant aux générations n^{os} 2, 7 et 14) à raison de 30 individus par lot soit 120 par essai comprenant 1 lot témoin et 3 lots traités. Le *tableau II* montre que la mortalité peu élevée dans l'ensemble n'atteint 50 % des effectifs que dans un seul cas ; en moyenne l'écart entre lots traités et témoins n'est que de 20 % au 4^e jour après l'ingestion.

Le développement des individus survivants a été apprécié par le nombre de chrysalides, la durée de la nymphose et le % de papillons. Les valeurs de ces critères sont semblables chez les lots traités et témoins : l'ingestion de spores ne prolonge pas la durée de la nymphose et ne détermine pas de mortalité à la mue imaginale. Par contre, l'injection de 8 µg de spores à pH 6,5 dans la cavité hémocélienne entraîne la mort des 10 individus traités (1 sur 10 dans le lot témoin injecté à l'eau stérile).

Les contrôles bactériologiques ont montré qu'après ingestion forcée les spores sont retrouvées dans le régurgitat ou les fèces (après dilution) dans un délai de 24 à 48 heures en l'absence de formes végétatives. Elles conservent après transit intestinal leur faculté germinative sur milieu gélosé.

L'emploi de préparations soit à base de tuniques, soit à base de spores dont la germination était partiellement ou totalement induite n'a pas amené de mortalité notable après ingestion forcée.

La plupart des contrôles et tests précédents ont été repris à l'aide des spores de souche cristallogène, ils ont donné sensiblement les mêmes résultats.

c) Le complexe cristaux-spores.

Nous nous sommes proposés en réassociant les spores et les cristaux dans des proportions définies de comparer l'action léthale d'un tel complexe à celle de ses constituants.

Après ingestion du complexe, le pH de l'hémolymphe reste voisin de 6,5. Par contre, le pH intestinal d'une valeur initiale proche de 9 s'abaisse en moyenne jusqu'à

TABLEAU III. — Mortalité observée au 5^e stade après ingestion de spores seules, de cristaux seuls et de spores et cristaux associés.

Nature du traitement		Traités					Témoins
		Constituants isolés			Constituants associés		
		* cr	sp	sp	cr + sp	cr + sp	
Poids (μg) ingéré par chenille ..		8	2	8	8 + 2	8 + 8	0
% de Mortalité après .	24 h	10	0	10	85	90	0
	48 h	80	0	10	100	100	5

*cr = cristaux

sp = spores.

7,9-7,2 à la 6^e heure après le traitement. Cette diminution est du même ordre que celle observée après ingestion de cristaux et constitue le premier signe notable d'intoxication.

Les symptômes pathologiques externes ne se manifestent qu'à partir de la 15^e heure après l'ingestion. Ils consistent en une léthargie d'une durée de 3 à 5 heures dont la limite est souvent difficile à apprécier. Elle est marquée par une ataxie locomotrice et des réactions moins vives à des stimuli tels que piqures ou préhension à la pince. Le régurgitat prend parfois une couleur blanchâtre. Une prolifération microbienne y est observée avec la présence de formes végétatives de *B. thuringiensis* et d'autres bacilles de taille inférieure. En fin d'évolution infectieuse une mélanisation cuticulaire apparaît ; les chenilles ont perdu toute aptitude à la locomotion.

Le tableau III compare les résultats de l'action des cristaux (cr) ingérés à la dose de 8 μ g par insecte, celle des spores (sp) à raison de 2 et 8 μ g de poudre par individu et celle de leur association (cr + sp) à des doses identiques sur des lots de 20 chenilles, un lot témoin correspondant à chaque variante traitée. La toxicité du complexe (cr + sp) peut être comparée à la valeur obtenue par addition des taux de mortalité de

chacune des préparations (cr) et (sp) : l'écart entre le taux de mortalité provoqué par la préparation (cr + sp) — soit 85 et 90 % — et celui déterminé par l'association (cr) + (sp) — soit $10 + 0 = 10\%$ et $10 + 10 = 20\%$ — est important 24 heures après le traitement ; il tend à se réduire à partir de 48 heures mais demeure cependant significativement différent.

Un essai complémentaire a eu pour objectif d'étudier la relation dose-effet par ingestion du complexe (cr + sp) lorsqu'une dose de spores variant de 0,01-0,05 et 0,25 μg est associée à un même poids de cristaux (2 μg), l'effectif étant de 20 individus par lot (fig. 5). Il n'a pas été jugé nécessaire de procéder à la contamination à l'aide de spores seules aux 3 doses indiquées, puisqu'il a été démontré que la mortalité déterminée par les spores est au plus égale à celle des témoins.

La signification entre les taux de mortalité Abbot déterminés par le complexe (cr + sp) et la préparation (cr) est donnée par le test χ^2 . La mortalité débute 14 heures après l'intervention. Dès la 24^e heure le complexe (cr + sp) manifeste une toxicité

FIG. 5. — Comparaison des mortalités après ingestion (stade 5) de cristaux seuls et de cristaux + spores (réf. E 61).

(*) cr = cristaux ; sp = spores.

Les valeurs entre parenthèses expriment la dose de chacun des constituants en μg par individu.

élevée ($\alpha \leq 1\%$) lorsque la teneur en spores est la plus grande. Il apparaît toutefois que l'action létale ne peut se traduire par une courbe de type log dose-probit effet puisque la figure montre une inversion des réponses de mortalité pour les doses 0,01 et 0,05 μg de spores.

Les contrôles microscopiques de prélèvement de régurgitat ou de contenu intestinal avant la léthargie montrent le plus souvent la présence de formes végétatives chez les chenilles soumises aux doses de spores les plus élevées, les spores étant rarement observées. Les dissections pendant la phase de léthargie qui précède la mort confirment ces observations. Les prélèvements d'hémolymphe comportent des formes végétatives dans 75 % des cas de mortalité. La liquéfaction du corps gras traduit l'envahissement de la cavité hémocélienne par les formes végétatives alors que le pH est voisin de la neutralité.

IV. - Discussion. Conclusions

La toxicité des cristaux de *B. thuringiensis* pour les chenilles de 1^{er} âge de *L. pomonella* permet d'établir une relation dose-effet. La mortalité au premier stade larvaire établie notamment par Roehrich (1964) est non seulement fonction de la concentration en toxine mais aussi de la durée de l'ingestion.

L'intoxication, qu'elle soit réalisée au début ou à la fin du dernier stade larvaire, ne modifie ni la reprise de l'alimentation après l'ingestion forcée, ni la mortalité. Nous n'avons pas noté de réduction de consommation après ingestion de cristaux comme elle apparaît chez *P. brassicae* (Martouret, 1964). Cependant, de même que chez cet insecte, une baisse du pH intestinal suit cette ingestion, l'hémolymphe ne subissant pas de variation. Benz (1966) observe chez *P. brassicae* la constance du pH de l'hémolymphe liée à son pouvoir tampon élevé.

Mayas (1970) a expérimenté par la même technique d'ingestion forcée au dernier stade une concentration de 0,008 μg de cristaux par gramme d'insecte. Enregistrant un taux de mortalité de 10 % — et le pH intestinal ne subissant pas de variation — il conclut à l'absence d'action des cristaux. Dans l'un des cas (souche E 61, 3^e période) avec l'emploi d'une telle concentration nous obtenons une mortalité voisine de 20 %. Il est probable que la dose unique expérimentée par l'auteur est trop faible : une valeur plus élevée entraîne dans nos essais jusqu'à 100 % de mortalité, celle-ci débutant environ 24 heures après l'intoxication lorsque le pH s'est infléchi vers la neutralité.

La toxicité des spores entières a été montrée par une réduction de consommation significative de *Pieris brassicae* et *Plutella maculipennis* par Somerville et Pockett (1974). Ceux-ci obtiennent un résultat similaire par l'emploi de spores extraites par des réactifs solubilisant les cristaux. La mortalité — 68 % d'individus au 5^e stade — a été notée chez *L. pomonella* 48 heures après l'ingestion de spores acristallogènes (Mayas, 1970).

Quelques travaux faisant mention de l'utilisation de spores désignent en fait des préparations spores-cristaux. Des préparations purifiées sont indispensables : ainsi le

faible pouvoir infectieux des spores chez *Bombyx mori* a-t-il été attribué par Fitz-James et al. (1958), aux cristaux incomplètement éliminés après lavage alcalin. La plupart des observations réalisées dans notre expérimentation après ingestion forcée de spores : poursuite de l'alimentation des chenilles, stabilité du pH intestinal, évolution normale jusqu'aux stades chrysalide puis adulte, contrôles microscopiques..., traduisent l'inactivité des spores dans le milieu intestinal de *L. pomonella* en l'absence des cristaux.

A l'aide de souches de *B. thuringiensis* du sérotype 3, Somerville et al. (1970), comparent l'action des fractions isolées à celle de leur mélange. Ils démontrent chez *Pseudaletia unipuncta* et *Colias eurytheme* une plus grande efficacité des spores et des cristaux lorsque ces éléments sont associés.

Nos observations nous conduisent à des résultats analogues chez un autre Lépidoptère. Le complexe cristaux-spores présente une activité plus importante que celle de préparations constituées seulement de cristaux ou de spores, sa toxicité étant plus élevée et les délais de mortalité plus courts.

Chez le Carpocapse, l'intoxication due aux cristaux suffit à entraîner la mort. L'utilisation de préparations purifiées de cristaux isolés a ainsi permis de montrer que la sensibilité de *L. pomonella* à *B. thuringiensis* est due essentiellement au cristal toxine, les spores n'ayant par elles-mêmes qu'un effet restreint lorsqu'elles ne sont pas associées aux inclusions parasporales. Celles-ci conditionnant la septicémie causée par la germination et engageant une toxico-infection caractéristique (Burgerjon et Martouret, 1971), l'addition des spores aux cristaux ne peut que favoriser le traitement phytosanitaire.

Bibliographie

- BENZ (G.), 1966. — Die Pufferkapazität von Blut und Verdauungssaft von *Pieris brassicae* und der Einfluss von Anoxie und *Bacillus thuringiensis* endotoxin auf die Permeabilität der Darmwand. *J. Insect. Phys.*, 12, 137-151.
- BURGERJON (A.), 1956. — Pulvérisation et poudrage au laboratoire par des préparations pathogènes insecticides. *Ann. Epiphyties*, 7, 677-686.
- BURGERJON (A.) et BIACHE (G.), 1967. — Contribution à l'étude du spectre d'activité de différentes souches de *Bacillus thuringiensis*. *Ent. exp. et appl.*, 10, 211-230.
- BURGERJON (A.) et MARTOURET (D.), 1971. — Détermination and significance of the host spectrum of *Bacillus thuringiensis*. In « Microbial control of insects and mites » (Burges H. D. ed.). *Academic Press, Publ.*, London, 861 p.
- DELAFIELD (F. P.), SOMERVILLE (H. J.) et RITTENBERG (S. C.), 1968. — Immunological homology between crystal and spore protein of *Bacillus thuringiensis*. *J. Bacteriol.*, 96, 713-730.
- FEDORINTCHIK (N. S.) et KOROSTEL (S. I.), 1972. — Influence de *Bacillus thuringiensis* sur la descendance du Carpocapse des pommes lorsqu'il est infecté au stade larvaire. *Sel'skokh Biol.*, 7, 383-386 (en russe).

- FITZ-JAMES (P. C.), TOUMANOFF (C.) et YOUNG (T. E.), 1958. — Localization of a toxicity for silkworm larvae in the parasporal inclusion of *Bacillus cereus* var. *alesti*. *Can. J. Microbiol.*, 4, 385-392.
- GOODMAN (N. S.), GOTTFRIED (R. J.) et ROGOFF (M. H.), 1967. — Biphasic system for separation of spores and crystals of *Bacillus thuringiensis*. *J. Bacteriol.*, 94, 485.
- MARTOURET (D.), 1960. — Etudes préliminaires sur le mode d'action de *Bacillus thuringiensis* Berliner vis-à-vis de *Pieris brassicae* L. *C.R. XI^e Congrès Int. Ent.*, Vienne, 893 p.
- MARTOURET (D.), 1964. — Intoxication chez *Pieris brassicae* L. par une fraction enzymatique de la toxine des cristaux de deux souches de *Bacillus thuringiensis* sérotype I Berliner et *Bacillus thuringiensis* serotype III Anduze. *Entomophaga, Mém. Hors Sér.*, 2, 213-220.
- MAYAS (I.), 1970. — Contribution à l'étude du mode d'action de *Bacillus thuringiensis* Berliner sur *Laspeyresia pomonella*. *Thèse Doctorat 3^e cycle*, Fac. Sci., Paris, 92 p.
- PHILLIPS (C. M.), BUCHER (G. E.) et STEPHENS (J. M.), 1953. — Note on the preliminary field trials of a bacterium to control the codling moth. *Can. Entomologist*, 85, 8.
- RÖHRICH (R.), 1964. — Essais de laboratoire de préparations à base de *Bacillus thuringiensis* Berliner contre les chenilles du Carpocapse (*Laspeyresia pomonella* L.). *Entomophaga, Mém. Hors Sér.*, 2, 309-314.
- SENDER (C.), 1969. — Elevage permanent du Carpocapse des pommes *Carpocapsa* (: *Laspeyresia*) *pomonella* L. sur milieu artificiel simplifié. *Ann. Zool. Ecol. Anim.*, 1, 321-326.
- SENDER (C.), 1970. — Elevage du Carpocapse des pommes sur un nouveau milieu artificiel non spécifique. *Ann. Zool. Ecol. Anim.*, 1, 93-95.
- SMIRNOFF (W. A.), 1962. — A staining method for differentiating spores crystals and cells of *Bacillus thuringiensis* Berliner. *J. Invert. Path.*, 4, 384-386.
- SOMERVILLE (H. J.), DELAFIELD (F. P.) et RITTENBERG (S. C.), 1968. — Biochemical homology between crystal and spore protein of *Bacillus thuringiensis*. *J. Bacteriol.*, 96, 721-726.
- SOMERVILLE (H. J.), TANADA (Y.) et OMI (E. M.), 1970. — Lethal effect of purified spore and crystalline endotoxin preparations of *Bacillus thuringiensis* on several Lepidopterous insects. *J. Invert. Path.*, 16, 241-248.
- SOMERVILLE (H. J.) et POCKETT (H. V.), 1975. — An insect toxin from spores of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus*. *J. Gen. Microbiol.*, 87, 359-369.
- STEPHENS (J. M.), 1952. — Disease in codling moth larvae produced by several strains of *Bacillus cereus*. *Can. J. Zool.*, 30, 30-40.
- TADIC (M.) et VASILJEVIC (L.), 1956. — Results of laboratory investigations on pathogenic effect of some bacteria upon *Carpocapsa pomonella*. *Plant. Prot. Beograd.*, 38, 71-75.
- VERVELLE (C.), 1974. — Contribution à l'étude du mode d'action des constituants de *Bacillus thuringiensis* Berliner sur *Laspeyresia pomonella* L. (Tortricidae). *Thèse Doctorat, 3^e cycle*, Fac. Sci., Paris, 114 p., 20 fig.
-