

**AFPP-CINQUIEME CONFERENCE INTERNATIONALE
SUR LES METHODES ALTERNATIVES DE PROTECTION DES PLANTES
LILLE- 11 AU 13 MARS 2015**

**ACTIVITE INSECTICIDE D'HOMOLOGUES DE PA1B DU POIS (*PISUM SATIVUM* L.)
CONTRE *SITOPHILUS GRANARIUS* L.**

A. MEBARKIA⁽¹⁾ et Y.RAHBE⁽²⁾

(1) Laboratoire de microbiologie et de phytopathologie, département des sciences agronomiques, faculté des sciences de la nature et de la vie, université Sétif 1, Algérie.

mebarkiabba@yahoo.fr

(2) Laboratoire de biologie fonctionnelle, UMR INSA-INRA Lyon, France.

Yvan.Rahbe@lyon.inra.fr

RESUME

Le but de cette étude est d'évaluer la toxicité des homologues de l'albumine du pois PA1b (*Pisum sativum* L.) vis-à-vis de *Sitophilus granarius* L. Les adultes de moins de cinq jours, sont maintenus à $27 \pm 0,2^\circ$ C et 70 ± 5 % RH, sur des boulettes de farine de blé tendre (témoin) et sur farine de pois, lentille, pois chiche, fève, haricot (toxique) pendant 15 jours. Les concentrations en farines de légumineuses utilisées sont 10, 20, 40, 60 et 80 %. Sur la référence en PA1b : pois/blé à 80 % de farine de pois, on observe au 3^{ème} jour un taux de mortalité dépassant les 10 %. À partir de 7 jours, il n'y a plus de survivants. Pour les concentrations de 40 et 60 %, les taux de mortalité, sont de 73 et 93 % respectivement ; par contre à 10 et 20 % de pois, les taux sont faibles ne dépassant pas le seuil des 20 %. Sur la lentille, le haricot et la fève, on note une mortalité totale de l'insecte à 7 jours aussi bien à 60 qu'à 80 % ; par contre sur pois-chiche, on enregistre une plus faible mortalité avec 3 et 23 % respectivement. De plus, une mortalité totale de l'insecte est observée au bout de 14 jours sur toutes les légumineuses.

Mots-clés : Protéine PA1b, légumineuses, bio-insecticide, contrôle, *S. granarius* L.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the toxicity of homologous pea albumin PA1b (*Pisum sativum* L. against *granary weevils* (*Sitophilus granarius* L). Adults of less than five days are maintained at $27 \pm 0.2^\circ$ C and 70 ± 5 % RH, on tender wheat dumpling (witness), and on flour of pea, chickpea, bean, lentil, beans (toxic) during 15 days. The concentrations of legume flour used are 10, 20, 40, 60 and 80 %. On PA1b reference: peas/wheat with 80% pea flour, we observed on the 3rd day, a mortality rate over 10% to 80%. From 7 days there are no survivors. For concentrations of 40 and 60%, the mortality rates were 73 and 93% respectively; but at 10 and 20% of pea, rates are low not exceeding the threshold of 20%. On the lens, beans and bean, there is a total mortality of the insect to 7 days as well as 60 to 80%; but chickpeas, is recorded with a lower mortality of the insect with 3 and 23%, respectively. Furthermore, complete mortality of the insect is observed after 14 days in all legumes.

Key words: Protein PA1b, legumes, bio-insecticide, control, *granary weevils* L.

INTRODUCTION

Le blé représente la principale source d'alimentation pour plus de la moitié de la population mondiale. La politique mondiale de sécurité alimentaire, devrait prendre en compte la nécessité d'augmenter la production actuelle qui est de 675 millions de tonnes, pour atteindre pratiquement le double, si l'on veut nourrir une population qui, en 2050 approchera 9,1 milliards d'habitants (Anonyme, 2009). Augmenter leur production est devenu un objectif majeur pour les organismes de sécurité alimentaire. Pour atteindre cet objectif dans les années à venir, une approche multifactorielle permettant à la fois d'augmenter la quantité de blé produite sous les conditions favorables et défavorables, mais aussi de limiter les pertes de rendement dues aux maladies et aux attaques d'insectes est indispensable (Khush, 2005). Plusieurs catégories d'insectes attaquent les grains de céréales depuis la récolte jusqu'à la consommation. Dans le cas du blé, ces insectes peuvent occasionner des pertes considérables, allant jusqu'à 50 %. Les pesticides sont les plus communément utilisés pour lutter contre le charançon du blé. Ces traitements sont efficaces, peu onéreux et aisément disponibles dans les pays en voie de développement où 90 % de la production mondiale du blé est réalisée (Kouassi, 2001). La phosphine est ainsi devenue le pesticide volatile le plus utilisé, mais des applications inappropriées ont favorisé le développement d'un fort niveau de résistance dans différentes populations de charançons (Daglish, 2004). Par conséquent, trouver une alternative pour contrôler efficacement ce ravageur majeur du blé est devenu impératif. Plusieurs travaux ont rapporté l'effet insecticide de la farine de pois sur *Sitophilus oryzae* L (Hou et Field, 2003 ; Pretheep-Kumar *et al*, 2004 ; Fields, 2006). Cette toxicité est principalement corrélée avec l'activité biologique d'une albumine majeure isolée à partir de grains de pois, PA1b (pea albumin 1 subunit b) (Gressent *et al*, 2003). La forte activité entomotoxique de PA1b est aussi couplée à une forte stabilité de cette protéine. Elle est capable de conserver son activité biologique pendant plusieurs années dans des graines sèches (Petit *et al*, 2005). La forte toxicité de la protéine PA1b envers les charançons des grains, sa stabilité lors du stockage et de la dessiccation des graines, associées au fait qu'elle soit consommée en quantité par l'homme et les animaux, sans signe de toxicité ni d'allergénicité, font de ce peptide un candidat idéal pour produire des plantes transgéniques, en particulier des céréales, résistantes aux coléoptères ravageurs des stocks (Louis *et al*, 2004; Taylor *et al*, 2004). De plus, ces mêmes auteurs notent que la coexistence de plusieurs isoformes de la protéine PA1b chez le pois comme chez d'autres fabacées permet de définir la protéine PA1b comme une nouvelle classe d'entomotoxine végétale.

MATERIEL ET METHODE

Matériel animal

Les souches de *Sitophilus granarius* L. proviennent des cellules de stockage de la coopérative des céréales et des légumes secs de Sétif. Elles sont élevées sur grains de blé tendre dans une enceinte ventilée où la température est maintenue à $27 \pm 0.2^\circ \text{C}$ et à $70 \pm 5\%$ HR à l'obscurité (Laviolette et Nardon, 1963).

Matériel végétal

Il est constitué de graines de blé tendre (*Triticum aestivum* Desf. Var Siete Ceros) et des espèces de légumineuses : pois cassé (*Pisum sativum* L. var. Languedoc), Pois chiche (*Cicer arietinum* L. var Kabuli), haricot (*Phaseolus vulgaris* L. var Bordj Ménail), lentille (*Lens esculenta* M. var Larissa) et de fève (*Vicia fabae* L. var Sidi Moussa 178/25). Ces variétés proviennent des différentes stations de l'Institut Technique des Grandes Cultures d'Algérie. Des boîtes en plastique grillagées rondes de 11cm de diamètre sur 8 cm de hauteur sont remplies aux $\frac{3}{4}$ avec des graines. Elles sont mises dans des boîtes fermées à -20°C pendant quelques jours afin de détruire d'éventuels insectes pouvant s'y trouver. Ils sont ensuite conservés à $+4^\circ\text{C}$ jusqu'à utilisation.

Préparation de La farine

Les graines de pois sont broyées finement dans un moulin puis tamisées sur un tamis AFNOR NF X 11-201 Prolabo de 0,2 mm d'ouverture de maille. Le broyage est poursuivi de manière à avoir le minimum de farine non tamisable. La farine verte ainsi obtenue est utilisée pour les extractions et la préparation des boulettes de farine de blé enrichies en farine de pois. Le même procédé est utilisé pour la préparation de la farine de blé et des autres légumineuses.

Préparation de l'aliment artificiel

Selon la méthode décrite par Wicker (1984) et améliorée par Gressent *et al*, (2003) pour la préparation de l'aliment artificiel à une teneur en pois désirée : on pèse dans un tube eppendorf x mg de l'extrait de farine de pois (ref. en PA1b), on ajoute 167 µl d'eau ultra pure puis on complète l'échantillon liquide avec de la farine de blé tendre au moyen d'un transvasement col à col des tubes pour avoir une baguette de 250 mg découpée ultérieurement en tranches (boulettes). Pour une concentration de 10 %, il faut 25 mg de farine de pois + 225 mg de farine de blé. L'ensemble (pois + eau + blé) est bien mélangé avec une spatule. Des cylindres de 0,3 à 0,5 cm de diamètre et de 5 à 10 cm de long sont façonnés et séchés pendant environ 1 heure à la température ambiante du laboratoire. Ils sont ensuite découpés en tranches de 0,3 à 0,5 cm. Ensuite, on les laisse sécher toute une nuit à la température ambiante du laboratoire sans levure ni fermentation. Les boulettes sont alors stockées à +4°C dans des boîtes fermées jusqu'à utilisation. Pour la mise en place du test, 30 charançons adultes de moins de 5 jours sont placés dans un tube sur les boulettes de farine de blé tendre (témoin) mélangé à de la farine de pois (toxique de référence) ou d'autres légumineuses, à des concentrations de 10, 20, 40, 60 et 80%. Les boîtes sont placées ensuite dans une enceinte régulée à $27 \pm 0,2^\circ \text{C}$ et à $70 \pm 5\% \text{ HR}$, à l'obscurité. Ces essais comportent 3 répétitions. Les insectes morts sont comptés et retirés à partir du 3^{ème} jour pour l'étude de la cinétique de mortalité jusqu'au dernier survivant. Le même procédé est effectué avec des concentrations de 60% et 80 % de farine pour chaque espèce de légumineuses.

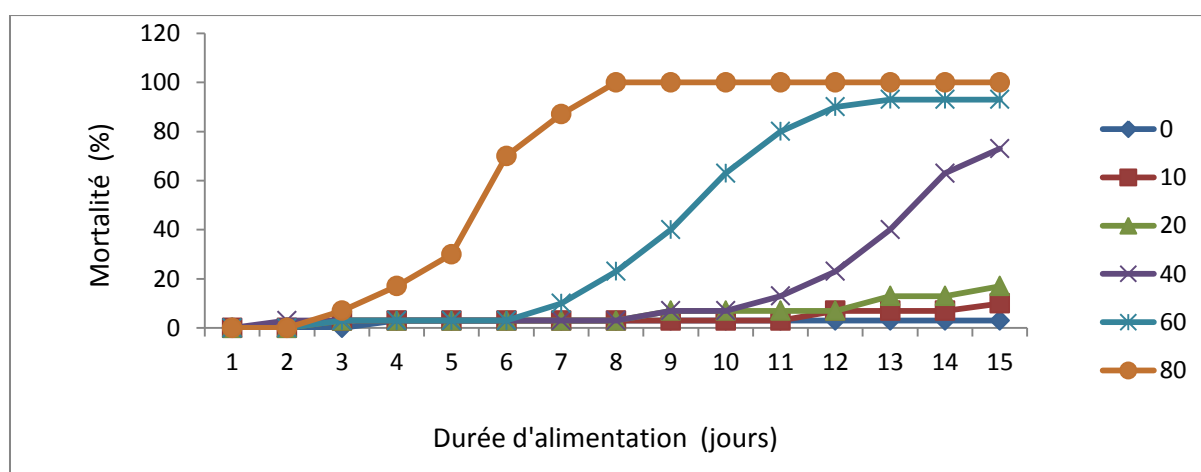
RESULTAT

Toxicité de PA1b du pois

On constate au niveau de la figure 1, qu'après 2 jours d'alimentation de *Sitophilus granarius* L. sur le blé (*Triticum aestivum* Desf.) et sur le pois (*Pisum sativum* L.), il n'y a pratiquement pas de mortalité.

Figure 1 : Mortalité cumulée (%) des adultes de *Sitophilus granarius* L. sur blé (témoin) et sur mélange de blé et de pois (toxique), en fonction des concentrations (10, 20, 40, 60 et 80 %) en pois et de la durée d'alimentation. (moyenne des 3 répétitions).

Figure 1: Accumulative mortality (%) of *granary weevil* adults on wheat (witness) and on mixture of pea (toxic) and wheat in function of pea concentrations (10, 20, 40, 60 and 80%) and food duration.



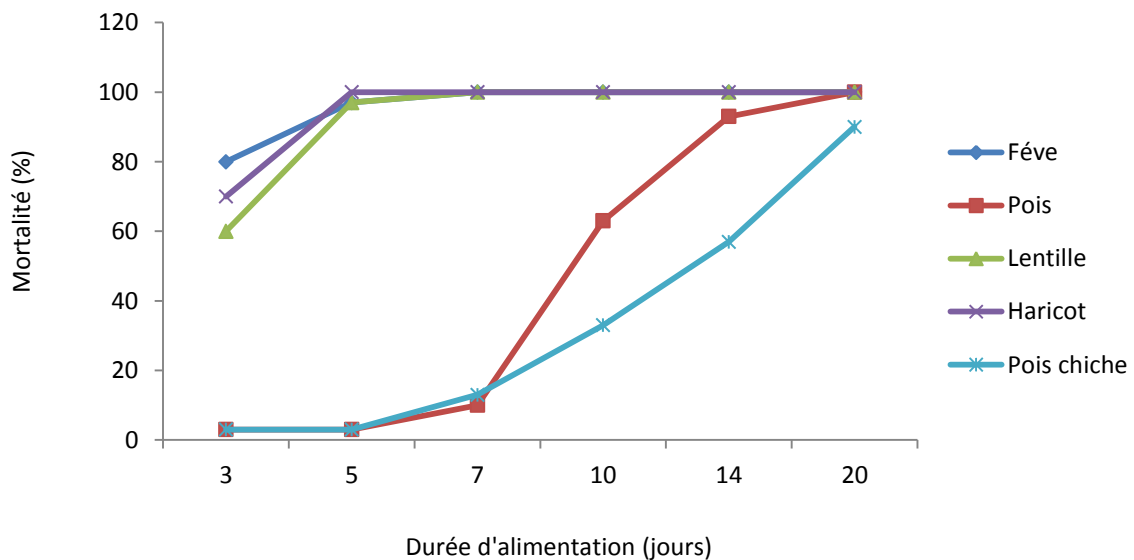
Au troisième jour, on note en général 1 à 2 morts sur le blé comme sur le pois. Au-delà, la mortalité présente des différences en fonction de la concentration en pois. Sur le blé, on n'observe pas d'augmentation de la mortalité pendant les 15 jours de durée de l'expérience. Sur le pois, pour une concentration de 80% (ref. en PA1b), on observe à partir du troisième jour une augmentation rapide de la mortalité dépassant les 10 %. À partir de 7 jours, il n'y a quasiment plus de survivants. Pour les concentrations de 40% et 60%, les taux de mortalités sont de 73,3 % et 93,3 % respectivement ; par contre pour les autres concentrations, les taux sont faibles ne dépassant pas le seuil des 20%.

Toxicité des homologues de PA1b des légumineuses

On remarque que toutes les légumineuses testées sont toxiques pour l'espèce *Sitophilus granarius* L. et une mortalité totale de l'insecte est constatée au bout de 14 jours chez les différentes espèces de légumineuses : lentille (*Lens esculenta* M.), pois chiche (*Cicer arietinum* L.), haricot (*Phaseolus vulgaris* L.), fève (*Vicia fabae* L.) et pois cassé (*Pisum sativum* L.), à des concentrations de 60 % et 80 % en farine de ces légumineuses. On note toutefois, des différences dans la toxicité, si l'on considère les mortalités avant 14 jours. Ainsi, à 7 jours, la figure 2, montre qu'avec une concentration de 60 %, le taux de mortalité est de 100 % sur fève (*Vicia fabae* L.), haricot (*Phaseolus vulgaris* L.) et lentille (*Lens esculenta* M.), alors que des individus sont encore vivants sur pois chiche (*Cicer arietinum* L.) et sur pois cassé (*Pisum sativum* L.). La différence s'observe beaucoup plus nettement quand on considère les mortalités à 5 jours. Après cette durée d'alimentation, certaines espèces sont suffisamment toxiques pour provoquer une mortalité qui dépasse les 96 %. C'est le cas de la lentille (*Lens esculenta* M.), du haricot (*Phaseolus vulgaris* L.), et de la fève (*Vicia fabae* L.). D'autres sont moins toxiques telles que le pois-chiche (*Cicer arietinum* L.) et le pois cassé (*Pisum sativum* L.), dont le taux de mortalité ne dépasse pas le seuil des 3%.

Figure 2 : Mortalité cumulée (%) des adultes de *Sitophilus granarius* L. sur les espèces de légumineuses à une concentration de 60 % en fonction du temps (moyenne des 3 répétitions).

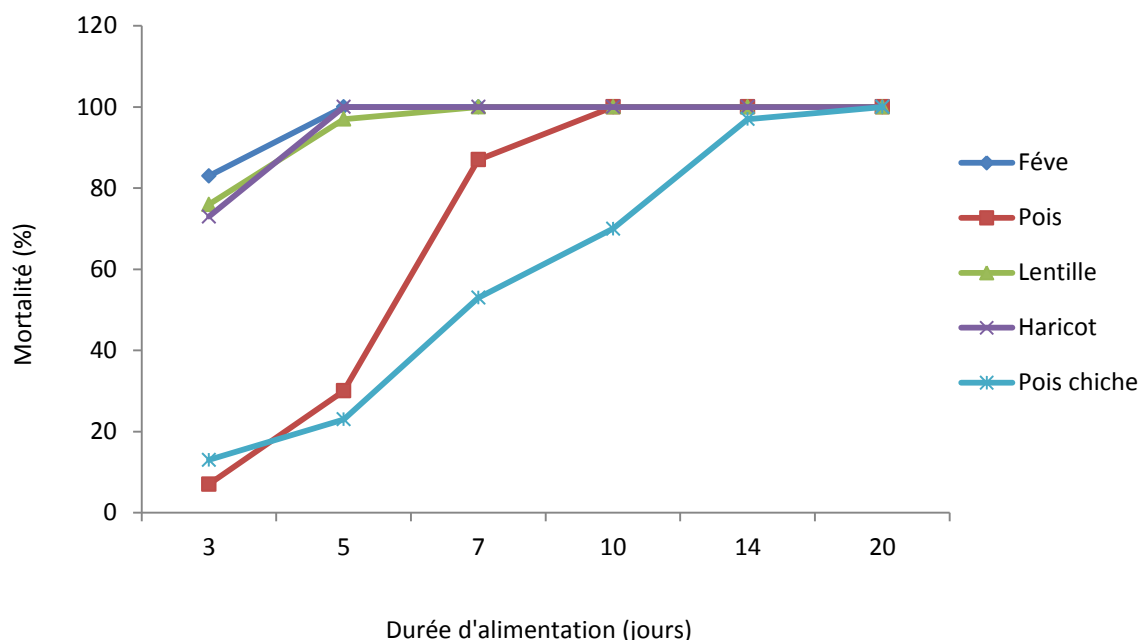
Figure 2: Cumulative mortality (%) of adult *Sitophilus granarius* L. on legume species at a concentration of 60% over time.



De plus, la figure3 montre qu'à la même période (5 jours) et à une concentration de 80%, le taux de mortalité est plus élevé pour atteindre 30 % sur pois (*Pisum sativum* L.) et 23 % sur pois-chiche (*Cicer arietinum* L.). Sur les trois autres espèces, il atteint déjà 100 %. Enfin, il est à noter que seul le pois-chiche (*Cicer arietinum* L.) nécessite un temps assez long de l'ordre de 20 jours pour atteindre une mortalité maximale.

Figure 3 : Mortalité cumulée (%) des adultes de *Sitophilus granarius* L. sur les espèces de légumineuses à une concentration de 80 % en fonction du temps..(moyenne des 3 répétitions).

Figure 3: Cumulative mortality (%) of adult *Sitophilus granarius* L. on legume species at a concentration of 80% over time.



DISCUSSION

Toxicité de PA1b du pois

Une corrélation significative positive ($c = 0,78$) a été observée entre la concentration d'extrait de farine de pois et le taux de mortalité de *Sitophilus granarius* L., conformément aux résultats annoncés par Fields *et al*, (2001). Ainsi, la farine de pois riche en protéine est toxique pour le charançon (Hou *et al*, 2006). Selon Fields (2006), le *Sitophilus spp* est le plus sensible des insectes testés, suivi de *Cryptolestes ferrugineus*, *Tribolium castaneum* et *Rhyzopertha dominica*. Ceci a été confirmé par les travaux de Hou *et al*, (2004), qui notent que le traitement du blé avec la farine de pois enrichie en protéine, à une concentration de 0,04 et 0,1 %, a réduit la population de *Sitophilus oryzae* de 26 % et 79 % respectivement et de *Cryptolestes ferrugineus* de 27 et 43 % respectivement. Pour une concentration de 1 %, le taux de mortalité de *Sitophilus oryzae* atteint 100 % pendant 3 semaines sur le riz (Pretheep-Kumar *et al*, 2004). En plus de l'efficacité de la protéine du pois sur la réduction des populations de *Cryptolestes ferrugineus*, *Sitophilus spp*, *Tribolium castaneum* et *Tribolium confusum*, Fields *et al*, (2001), notent qu'elle est également répulsive à des concentrations de 0,1 % et 1 %, après 1heure d'exposition. Cette répulsion est de l'ordre de 91,2 % après 48 heures d'exposition de *Sitophilus oryzae* sur du riz traité à une concentration de 1 % (Pretheep-Kumar *et al*, 2004). Cependant, les travaux de Hou *et al*, (2006), montrent que les toxines de la farine de pois riche en protéine peuvent franchir la cuticule de l'insecte et par conséquent, les tissus de l'intestin moyen seront endommagés avec la présence de plusieurs bulles de gaz. Cette sensibilité a été déterminée par Gressent et son équipe, par la mise en évidence d'un site de liaison à forte affinité (K_d 2,6 nm) pour la protéine PA1b dans les extraits de protéines membranaires de charançons sensibles et qui semble absent ou muté chez les souches résistantes. La corrélation entre la présence du site de liaison et la sensibilité à l'entomotoxine PA1b chez les charançons suggère que ce site, capable de fixer PA1b sur son récepteur, pourrait jouer un rôle majeur dans le mécanisme de toxicité (Gressent *et al*, 2003). Ces mêmes auteurs, notent que le site de liaison de cette protéine a été mis

en évidence chez les coléoptères, les lépidoptères, les diptères, les hyménoptères et les hémiptères. Cependant, la présence de ce site de liaison n'implique pas forcément que l'insecte va être sensible à la protéine PA1b.

Toxicité des homologues de PA1b des légumineuses

Ces résultats sont en concordance avec ceux mentionnés par Louis (2004), où la toxicité du pois, soja, haricot et luzerne diffère grandement d'une espèce végétale à l'autre et à différentes concentrations (20, 40, 60 et 80 %). En effet, bien que dans tous les cas, tous les charançons du riz *Sitophilus oryzae* L. meurent en 14 jours quelle que soit la concentration en farine. Ce constat a été également observé sur des individus de *Sitophilus granarius* L. où l'on peut dire que l'agent responsable est la protéine toxique purifiée. Mais il n'est pas exclu que des effets soient conjugués avec ceux d'autres substances secondaires contenues dans ces espèces végétales comme des effets anti-appétants et toxiques. Car, à seulement 3 jours d'alimentation, *Vicia fabae* L., *Phaseolus vulgaris* L. et *Lens esculenta* M., tuent pratiquement tous les insectes, alors que c'est seulement à ce moment que *Pisum sativum* L. commence à montrer ses effets toxiques et qu'on observe des morts sur cet aliment.

CONCLUSION

Il est courant pour les insectes des denrées stockées d'avoir de grandes différences dans la sensibilité aux insecticides synthétiques. Il y a eu peu de recherches sur les causes de ces différences de sensibilité, mais ils sont probablement dus à des différences d'absorption de l'insecticide, la dégradation à l'intérieur de l'insecte et le mode d'action. Par conséquent, il n'est pas surprenant qu'il y ait de grandes différences dans la sensibilité à la farine de pois riche en protéines entre les différents ravageurs de grains entreposés (Fields, 2006). La toxicité de la protéine PA1b du pois et les homologues de différentes espèces de légumineuses (Haricot, Pois-chiche, Lentille et Fève) a été testée sur le charançon du grain de blé. On note toutefois des différences dans la toxicité entre ces légumineuses alimentaires, du fait probablement de différences entre les homologues des PA1b et de la présence de substances secondaires. En prévision de probables modifications des législations, les insecticides devraient être remplacés par des méthodes physiques telles que le refroidissement des silos, la conservation sous CO₂ ou sous azote. Ces méthodes sont délicates et onéreuses, elles demandent une haute technicité, et ne sont pas applicables partout. Une autre alternative est de rendre les graines résistantes aux insectes grâce à une modification génétique. Cette protéine, d'origine végétale est partout présente mais à des niveaux variables. Elle est issue d'une plante et d'un tissu consommé régulièrement par l'homme, ce qui minimise les risques d'une toxicité. Même si elle existe, elle doit être très faible. De ce fait, elle devrait être valorisée dans le cadre d'une utilisation avec transgénèse végétale qui pourrait aussi assurer la protection contre plusieurs insectes.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier les responsables des différentes stations de l'institut technique des grandes cultures d'Algérie ; de la coopérative des céréales et des légumes secs de Sétif ainsi que toute l'équipe du laboratoire de biologie fonctionnelle INRA-INSA de Lyon, France.

BIBLIOGRAPHIE

Anonyme 2009 - Perspectives de récoltes et situation alimentaire. *FAO, Rome* 4, 37 p.

Daglish G. J., 2004 - Effect of exposure period on degree of dominance of phosphine in adults of *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrychidae) and *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae). *Pest. Management Science*, 60, 822-826.

Fields P. G., Xie Y.S., Hou X., 2001- Repellent effect of pea (*Pisum sativum*) fractions against stored-product insects. *Journal Stored Product Research*, 37, 359-370.

Gressent F., Rahiouil., RahbeY., 2003 - Characterization of a high-affinity binding site for the pea

albumin 1b entomotoxin in the weevil *Sitophilus*. *European Journal Biochemistry*, 270, 2429-2435.

Hou X., Fields P. G., 2003 - Granary trial of protein-enriched pea flour for the control of three stored product insects in barley *Journal Economic Entomology*, 96, 1005-1015.

Hou X., Fields P., Flinn P., Perez-Mendoza J., Baker J., 2004 - Control of stored product beetles with combinations of protein-rich pea flour and parasitoids. *Environment Entomology*, 33, 671-680.

Hou X., Taylor W., Fields P., 2006 - Effect of pea flour and pea flour extracts on *Sitophilus oryzae*. *Canadian Entomology*, 138, 95-103.

Khush G. S., 2005 - What it will take to feed 5.0 billion rice consumers in 2030. *Plant Molecular Biology*, 59, 1-6.

Kouassi M., 2001 - Les possibilités de la lutte microbiologique emphase sur le champignon entomopathogène *Beauveria bassiana*. *Revue Science Environnement*, 2, 19 p.

Laviolette P., Nardon P., 1963 - Action des rayons gamma du cobalt 60 sur la mortalité et la fertilité des adultes d'un charançon du riz. *Bulletin Biologie France Belgique*, 97, 305-333.

Louis S., Delobel B., Gressent F., Duport G., Diolo O., Rahiouil., Charles H., Rahbé Y., 2007 - Broad screening of the legume family for variability in seed insecticidal activities and for the occurrence of the A1b-
 Louis S., Delobel B., Gressent F., Rahiouil., Quillien L., Vallier A., Rahbé Y., 2004 - Molecular and biological screening for insect-toxic seed albumins from legume species. *Plant Science*, 167, 705-714.

Petit J., Duport G., Rahbé Y., Guiderdoni E., Breitler J. C., 2005 - Pea albumin 1b (PA1b), an entomotoxic cysteine-rich peptide protects transgenic rice seeds against the stored product pest *Sitophilus oryzae*. *Rice Genetics*, 5, 18-26.

Pretheep-Kumar P., Mohan S., Ramaraju K., 2004 - Protein-enriched pea flour extract protects stored milled rice against the rice weevil, *Sitophilus oryzae*. *Journal Insect Science*, 4, 26-32.

Taylor W.G., Fields P. G., Elder J.L., 2004 - Insecticidal components from field pea extracts: Isolation and separation of peptide mixtures related to pea albumin 1b. *Journal Agriculture Food Chemistry*, 52, 7491-7498.

Wicker C., 1984 - Etudes d'interactions nutritionnelles et enzymatiques entre *Sitophilus oryzae* et les bactéries symbiotiques intracellulaires. *Thèse Doctorat INSA Lyon*, 195 p.