

EFFICACITE D'UNE PROTEINE ENTOMOTOXIQUE DU TYPE A1b DES GRAINES DE LEGUMINEUSES

Mebarkia A^{* (1)}, Benkohila H.S⁽¹⁾, Hamza M⁽¹⁾ et Makhlouf M⁽²⁾

(1) Laboratoire de Microbiologie et de Phytopathologie, Département des Sciences Agronomiques, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Ferhat Abbas de Sétif.

(2) Institut Technique des Grandes Cultures, Station de Sétif.

mebarkiabba@yahoo.fr

Résumé : Les graines de légumineuses sont toxiques envers les ravageurs des grains stockés. L'effet de la protéine PA1b du pois (*Pisum sativum*), du pois chiche (*Cicer arietinum*), du haricot (*Phaseolus vulgaris*), de la lentille (*Lens esculenta*) et de la fève (*Vicia fabae*), été évalué à des concentrations de 10, 20, 40, 60 et 80 %. On remarque que toute les légumineuses testées sont toxiques à l'espèce *Sitophilus granarius* L. et une mortalité totale de l'insecte au bout de 14 jours. Au 3^{ème} jour, on note en générale 1 à 2 morts sur le blé jusqu'à 15 jours ou l'expérience a été arrêtée. Sur le pois, on observe une mortalité dépassant les 10% pour une concentration de 10% du PA1b. A partir de 7 jours, il n' ya quasiment plus de survivant. Pour des concentrations de 40% et 60%, les taux de mortalités sont de 73,3% et 93,3% respectivement ; par contre les taux sont faibles ne dépassant pas le seuil des 20% pour des concentrations de 20% et 10%. Certaines espèces de légumineuses provoquent une mortalité totale de l'insecte aussi bien à 60% qu'à 80%. C'est le cas de la lentille, du haricot et de la fève. D'autres sont moins toxiques telle que le pois chiche qui provoque de plus faible mortalité de l'ordre de 3 et 23% respectivement.

Mots clés : PA1b, légumineuses, bio insecticide, contrôle, *sitophilus granarius* L.

Abstract: Legume seeds are toxic to pests in stored grain. The effect of the protein PA1b pea (*Pisum sativum*), chickpea (*Cicer arietinum*), bean (*Phaseolus vulgaris*), lentil (*Lens esculenta*) and bean (*Vicia fabae*), was evaluated at concentrations of 10, 20, 40, 60 and 80%. Legume seeds are toxic to pests in stored grain. The effect of the protein PA1b pea (*Pisum sativum*), chickpea (*Cicer arietinum*), bean (*Phaseolus vulgaris*), lentil (*Lens esculenta*) and bean (*Vicia fabae*), was evaluated at concentrations of 10, 20, 40, 60 and 80%. We note that all legumes tested are toxic to the species *Sitophilus granarius* L. and a total mortality of the insect after 14 days. On 3rd day, there is in general 1-2 dead on wheat up to 15 days or the experiment was stopped. On peas, there is a mortality exceeding 10% at a concentration of 80% of PA1b. From 7 days, there are no survivors. For concentrations of 40% and 60%, mortality rates were 73.3% and 93.3% respectively; but, the rates are low, not exceeding the threshold of 20% for concentrations of 20% and 10%. Some legume species cause total mortality of the insect as well as 60% to 80%. This is the case of the lens, beans and bean. Others are less toxic as chickpea which causes lower mortality of about 3 and 23% respectively.

Key words: PA1b, legumes, bio insecticide, control, *granary weevil*.

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 sa 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 des 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 attaquant 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 de forts niveaux 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* (Hou et Fields, 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, résistant 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 végétales.

Matériel animal. Les souches de *Sitophilus granarius* L. proviennent des cellules de stockage de la région d'étude. Elles sont élevées dans une enceinte ventilée où la température est maintenue à $27 \pm 0.2^\circ\text{C}$ et à 70 ± 5 % hr à l'obscurité (Laviolette et Nardon, 1963).

Matériel végétal.

Les graines de blé tendre (*Triticum aestivum* Desf. var Siete Cerros) et des espèces de légumineuses, du pois cassés (*Pisum sativum* L. var. Languedoc), du Pois chiche (*Cicer arietinum* L. var Kabuli), du haricot (*Phaseolus vulgaris* L. var Bordj Ménail), de la lentille (*Lens esculenta* M. var Larissa) et de la 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°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 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 l'extrait de PA1b, on ajoute 167µl d'eau ultra pure puis on complète à l'échantillon liquide avec de la farine de blé tendre au moyen d'un transvasement col à col des tubes pour avoir une boulette de 250 mg. L'ensemble 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. 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 15 jours sont placés dans chaque tube sur les boulettes de blé tendre (témoin) et de pois (toxique), 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 $70 \pm 5\%$ hr, à l'obscurité. Le nombre de répétition étant de trois. 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 % pour chaque espèce de légumineuses.

Résultats et discussion

Toxicité de PA1b du pois. On constate 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. Au troisième jour, on note en général 1 à 2 morts sur le blé comme sur le pois. Au-delà, la mortalité se présente différemment, selon que les charançons sont sur le blé ou sur le pois (figure 1). Sur le blé, on n'observe pas

d'augmentation de la mortalité jusqu'à 15 jours où l'expérience a été arrêtée. Sur le pois, pour une concentration de 80% du PA1b, on observe à partir du troisième jour une augmentation rapide de la mortalité dépassant les 10%. A partir de 7 jours, il n'ya quasiment plus de survivants. Pour les concentrations 40% et 60%, les taux de mortalités sont de 73,3% et 93,3% respectivement ; par contre pour les autres concentrations, les taux sont

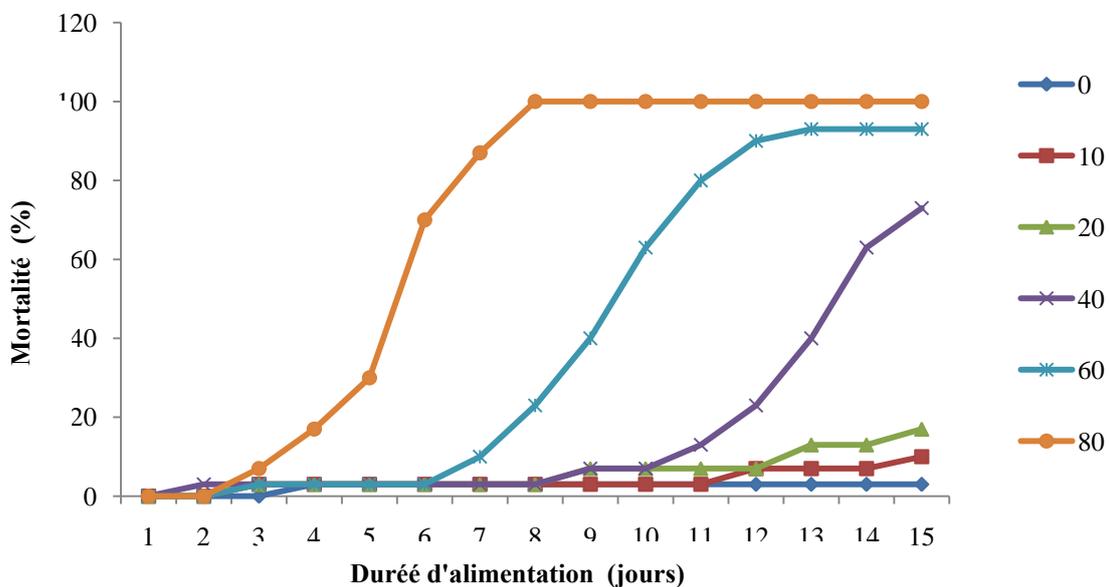


Figure 1. Mortalité cumulée (%) des adultes de *Sitophilus granarius* L. sur blé (témoin) et sur pois en fonction des concentrations (10, 20, 40, 60 et 80 %) et de la durée d'alimentation.

faibles ne dépassant pas le seuil des 20%. Une corrélation significative positive a été observée entre la concentration d'extrait de farine de pois et le taux de mortalité de *Sitophilus granarius*, qui est conformément aux résultats annoncés par Fields *et al.* (2001). Ainsi, la farine de pois riche en protéine est toxique au 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 (Kd 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. Chez les différentes espèces de légumineuses, la lentille (*Lens esculenta* M.), le pois chiche (*Cicer arietinum* L.), le haricot (*Phaseolus vulgaris* L.), la fève (*Vicia fabae* L.) et le pois cassé (*Pisum sativum* L.), avec des concentrations de 60% et 80% pour chaque espèce (figure 2 et 3). On remarque que toutes les légumineuses testées sont toxiques à l'espèce *Sitophilus granarius* L. et une mortalité totale de l'insecte au bout de 14 jours. On note toutefois, des différences dans la toxicité si l'on considère les mortalités avant 14 jours. Ainsi, à 7 jours le délai de mortalité de 100% sur le pois cassé, des individus sont encore vivants sur le pois chiche (*Cicer arietinum* L.). La différence s'observe beaucoup plus nettement quand on considère les mortalités à 5 jours. A ce délai d'alimentation certaines espèces provoquent une mortalité totale de l'insecte aussi bien à 60% qu'à 80%. C'est le cas de *Lens esculenta* M., de *Phaseolus vulgaris* L., et de *Vicia fabae* L. D'autre sont moins toxique telle que *Cicer arietinum* L. et provoque de plus faible mortalité de l'ordre de 3 et 23 % à ces deux concentrations respectivement. Il faut noter enfin qu'une concentration de 80% de de *Cicer arietinum* L, il faut 10 et 20 jours respectivement pour obtenir 100% de mortalité de l'insecte. Ces résultats sont en concordances avec ceux mentionnés par Louis (2004), ou 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

insectes de *Sitophilus oryzae* L. meurent en 15 jours quelque soit la concentration en farine.

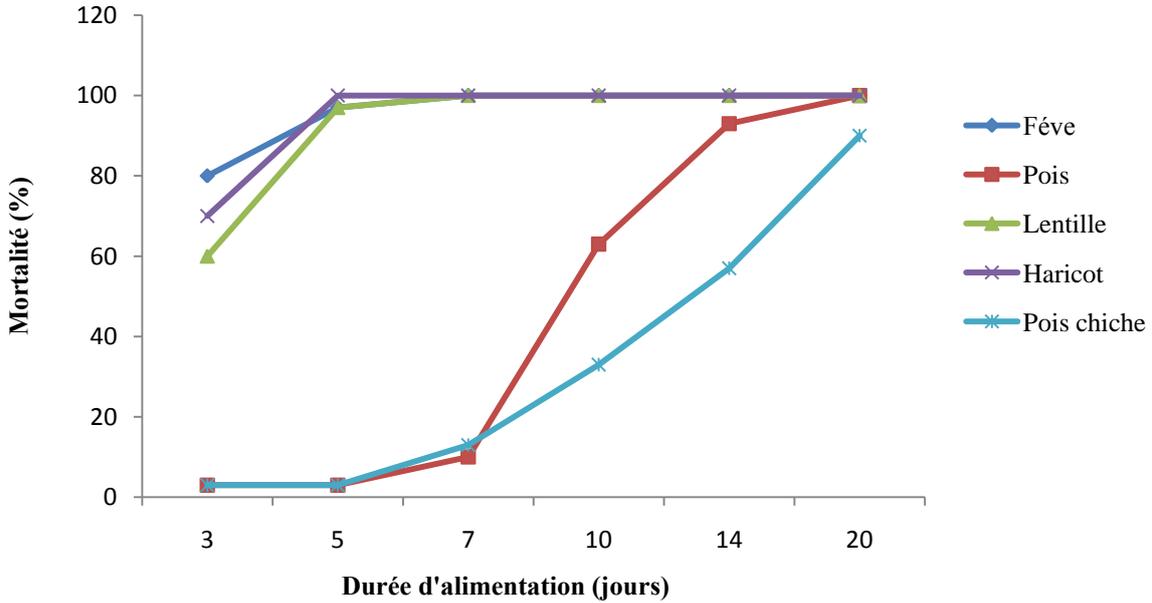


Figure 2. Mortalité cumulée (%) des adultes de *Sitophilus granarius* L. sur les espèces de légumineuses à une concentration de 60% en fonction du temps.

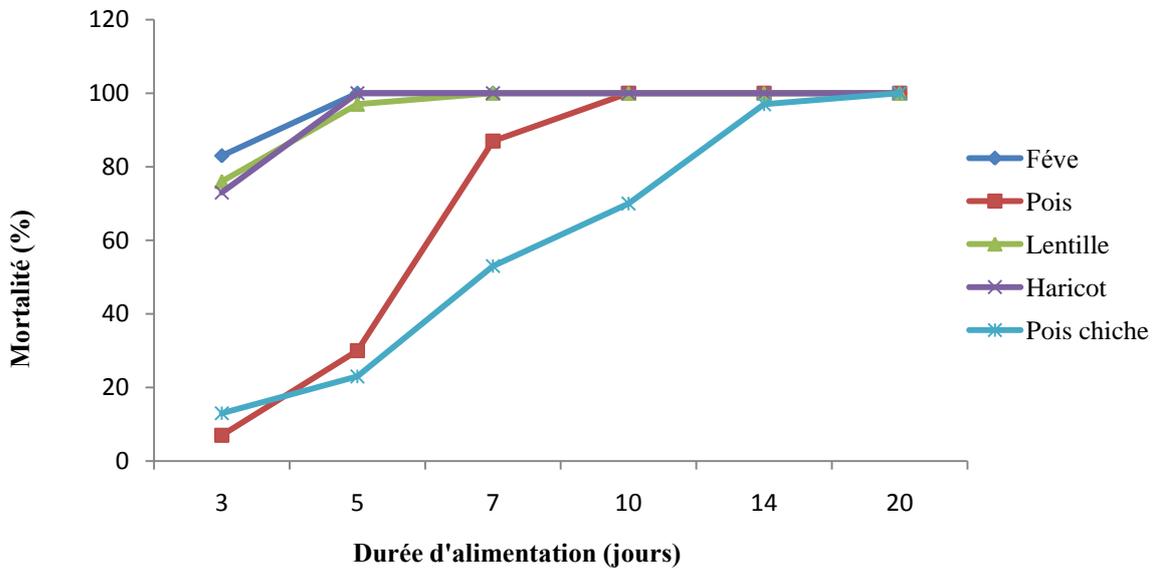


Figure 3. Mortalité cumulée (%) des adultes de *Sitophilus granarius* L. sur les espèces de légumineuses à une concentration de 80 % en fonction du temps.

Ce constat a été également observé sur des individus de *Sitophilus granarius* L. ou, on peut dire que l'agent responsable étant la protéine toxique purifiée, mais il n'est pas

exclu que ses effets soient conjugués avec ceux d'autres substances secondaires avec des effets anti-appétant et toxiques contenues dans ces espèces. Car à 3 jours d'alimentation seulement

Vicia fabae L., *Phaseolus vulgaris* L. et *Lens esculenta* M., tuent pratiquement tous les insectes alors que ces seulement à ce moment

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 du grain entreposé (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. On note toutefois, des différences dans la toxicité entre ces légumineuses alimentaires, du fait probablement de la présence de substances secondaires. En prévision de

Références bibliographiques.

Anonyme.(1987). <http://www.ozone.unep.org/>.

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

Bajaj, S., and Mohanty, A.(2005). Recent advances in rice biotechnologie towards genetically superior transgenic rice. *Plant Biotech.J* **3**, 275-307.

Blum, H., Beier, H., and Gross, H.J., (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels, *Electrophoresis* **8**, 93-98.

que le *Pisum sativum* L., commence à se montrer toxique et qu'on observe des morts sur cet aliment.

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, 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 transgénèse végétale pour la protection contre plusieurs insectes.

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. Manag. Sci* **60**, 822-826.

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

- Gressent, F., Rahioui, I., and Rahbe, Y. (2003).** Characterization of a high-affinity binding site for the pea albumin 1b entomotoxin in the weevil *Sitophilus*. *Eur.J.Biochem* **270**, 2429-2435.
- Hou, X., and Fields, P. G. (2003).** Granary trial of protein-enriched pea flour for the control of three stored product insects in barley *J.Econ.Entomol* **96**, 1005-1015.
- Hou, X., Fields, P., Flinn, P., Perez-Mendoza, J., and Baker, J. (2004).** Control of stored product beetles with combinations of protein-rich pea flour and parasitoids. *Envir.Entomol* **3**, 671-680.
- Hou, X., Taylor, W., and Fields, P. (2006).** Effect of pea flour and pea flour extracts on *Sitophilus oryzae*. *Can.Entomol* **138**, 95-103.
- Khush,G. S. (2005).** What it will take to feed 5.0 billion rice consumers in 2003. *Plant. Mol. Biol* **59**, 1-6.
- Kouassi, M. (2001).** Les possibilités de la lutte microbiologique emphase sur le champignon entomopathogène *Beauveria bassiana*. *Rev.Sci.Env* **2**, 19 p
- Laemmli, U.K.(1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Laviolette, P., and Nardon, P. (1963).** Action des rayons gamma du cobalt 60 sur la mortalité et la fertilité des adultes d'un charançon du riz. *Bull.Biol.Fr.Belg* **97**, 305-333.
- Louis, S., Delobel, B., Gressent, F., Duport, G., Diol, O., Rahioui, I., Charles, H., and Rahbé Y. (2007).** Broad screening of the legume family for variability in seed insecticidal activities and for the occurrence of the A1b-like knottin peptide entomotoxins. *J.Phytochem* **68**, 521-535.
- Louis, S., Delobel, B., Gressent, F., Rahioui, I., Quillien, L., Vallier, A., and Rahbé, Y. (2004).** Molecular and biological screening for insect-toxic seed albumins from legume species *Plant.Sci* **167**, 705-714.
- Petit, J., Duport, G., Rahbé, Y., Guiderdoni, E., and Breitler, J. C. (2005).** Pea albumin 1b (PA1b), an entomotoxic cystein-rich peptide protects transgenic rice seeds against the stored product pest *Sitophilus oryzae*. *Rice Genetics* **5**, 18-26.
- Pretheep-Kumar, P., Mohan, S., and Ramaraju, K. (2004).** Protein-enriched pea flour extract protects stored milled rice against the rice weevil, *Sitophilus oryzae*. *J.Insect. Sci* **4**, 26-32.
- Rahioui, I., Laugier, C., Balmand, S., Da Silva, P., Rahbé, Y., and Gressent, F. (2007).** Toxicity, binding and internalization of the pea-A1b entomotoin in Sf9 cells. *J.Biochem* **89**, 1539-1543.
- Taylor, W. G., Fields, P. G., and Elder, J. L. (2004).** Insecticidal components from field pea extracts: Isolation and separation of peptide mixtures related to pea albumin 1b. *J. Agric Food. Chem* **52**, 7491-7498.
- Wicker, C. (1984).** Etudes d'interactions nutritionnelles et enzymatiques entre *Sitophilus oryzae* et les bactéries symbiotiques intracellulaires. *Th. Doct. INSA. Lyon*, 195 p