

Université du Québec  
INRS – Institut Armand-Frappier  
Avril 2006

**ÉLABORATION D'UNE STRATÉGIE DE LUTTE, À L'AIDE DE *BACILLUS THURINGIENSIS* VAR. *KURSTAKI*, CONTRE LA PYRALE DES CÔNES DU SAPIN, *DIORYCTRIA ABIETIVORELLA*, DANS LES VERGERS À GRAINES**

Par  
Louis Philippe Caron

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de Maître ès sciences  
(M.Sc.) en microbiologie appliquée

Jury d'évaluation

Abderrazak Merzouki, examinateur externe

Domingos de Oliveira, examinateur externe

Claude Guertin, directeur de recherche

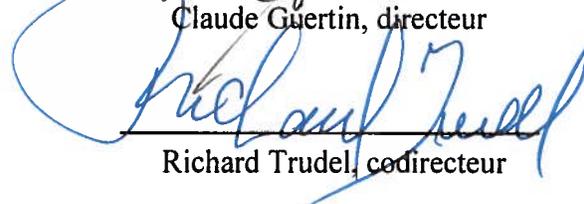
Richard Trudel, codirecteur de recherche

## Résumé

La pyrale des cônes du sapin est un insecte ravageur qui cause des dommages récurrents dans les vergers à graines de conifères. Le but de ce projet consiste à évaluer l'efficacité de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*, un entomopathogène bactérien, pour le contrôle des populations de pyrales des cônes du sapin dans les vergers à graines. Ce projet consistait à vérifier deux hypothèses. Premièrement, que les dommages occasionnés par la pyrale des cônes allaient entraîner une baisse de la production de graines, ainsi qu'une baisse du potentiel de leur germination de celles-ci. Ensuite, que l'application d'une formulation à base de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* allait significativement augmenter le niveau de protection d'un verger à graines. Le but de ce projet était donc d'élaborer une prescription sur la nature des traitements à appliquer dans une stratégie de lutte contre la pyrale des cônes du sapin.

Cette étude a permis de démontrer que les dommages occasionnés par la pyrale des cônes du sapin entraînait une baisse de la production de graines et que le taux de germination de ces graines était inférieur à celui de celles provenant de cônes n'ayant subi aucun dommage. Ensuite, il a été établi que la souche BMP 123 de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* montrait un potentiel insecticide accru par rapport à la souche de référence HD-1, mais qu'elle possédait bien les gènes nécessaires pour lui conférer un pouvoir insecticide pour tuer les larves de lépidoptères. Finalement, les épreuves de terrain ont permis de déterminer la dose d'application ainsi que le nombre d'applications nécessaires d'une formulation à base de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* pour le contrôle efficace d'une population de pyrale des cônes du sapin. Il a été démontré que trois applications d'une concentration égale ou supérieure à 1 L/ha seraient suffisantes pour réduire significativement l'incidence des dommages causés par la pyrale des cônes du sapin. Une réduction accrue des dommages peut être obtenue en augmentant la concentration de la formulation, pour atteindre un plafond à une concentration de 6 L/ha.

  
Louis Philippe Caron

  
Claude Guertin, directeur  
  
Richard Trudel, codirecteur

## Remerciements

Je tiens à remercier mon directeur de recherche, Claude Guertin, ainsi que mon codirecteur Richard Trudel pour le support apporté lors de la réalisation de ce projet de recherche. Leurs précieux conseils et temps ont permis de mener à terme cette étude.

Je remercie Marc Henrichon, Rachid Sabbahi, Rosa-Maria De Moraes et Myriam Jean pour le soutien technique très profitable et essentiel lors des manipulations en laboratoire. De plus, j'aimerais également remercier Robert Lavallée, du Centre de Foresterie des Laurentides, en plus de Simon Boudreault, Conrad Cloutier et Jeremy McNeil, de l'Université Laval, pour m'avoir permis d'utiliser leurs installations pour certains aspects du projet. Je tiens aussi à souligner la participation de Fabienne Colas, Monique Pelletier et Jean-Philippe Mottard (MRNFQ).

Ce projet a pu être réalisé grâce au support financier de Fond FQRNT (CG), de la Direction de la Production des Semences et des Plants (DPSP)(CG, RT) et de la Fondation Armand Frappier (LC).

Je tiens tout spécialement à remercier ma famille pour leur soutien et leurs encouragements, Fred et Éric pour ma présence récurrente sur leur sofa respectif. Finalement, un merci tout spécial à Marie-France, pour son support constant au point de vue académique mais surtout, sur les différents tracés que nous empruntons, ici comme ailleurs.

## Table des matières

Résumé .....	ii
Remerciements .....	iii
Table des matières .....	iv
Liste des figures .....	vii
Liste des tableaux .....	ix
Liste des abréviations .....	x
Introduction .....	1
CHAPITRE 1 : REVUE DE LITTÉRATURE .....	3
1.1 Vergers à graines .....	3
1.2 Pyrale des cônes du sapin .....	5
1.2.1 Généralités .....	5
1.2.2 Dommages et importance économique .....	9
1.3 <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	12
1.3.1 Généralités .....	12
1.3.2 Description des toxines .....	15
1.3.3 Structure et diversité des $\delta$ -endotoxines .....	16
1.3.4 Mode d'action des $\delta$ -endotoxines .....	20
1.4 <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> .....	25
1.4.1 Description .....	25
1.4.2 Innocuité .....	25
1.4.2.1 Toxicologie .....	25
1.4.2.2 Impacts environnementaux .....	26
1.5 <i>B. thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> et pyrale des cônes du sapin .....	27
1.6 Hypothèse et objectifs .....	28
CHAPITRE 2 : MATÉRIEL ET MÉTHODES .....	30
2.1 Évaluation de l'impact des dommages occasionnés par <i>D. abietivorella</i> .....	30
2.1.1 Provenance des graines .....	30
2.1.2 Stratification des graines .....	30
2.1.3 Test de germination .....	35
2.1.4 Mesure de la valeur germinative et analyse statistique .....	35

2.2	<i>Bacillus thuringiensis</i> .....	38
2.2.1	Souches .....	38
2.2.2	Caractérisation des souches de <i>B. thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> .....	38
2.2.2.1	Culture des souches .....	38
2.2.2.2	Extraction et purification des ADN plasmidiques .....	39
2.2.2.3	Amplification des gènes de type <i>CryIA</i> par PCR .....	40
2.2.2.4	Digestion enzymatique des amplicons .....	43
2.3	Titre insecticide de <i>B. thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> contre <i>D. abietivorella</i> .....	43
2.3.1	Provenance des larves .....	44
2.3.2	Préparation de la nourriture artificielle .....	44
2.3.3	Préparation de la nourriture artificielle pour les épreuves biologiques .....	44
2.3.4	Épreuves biologiques .....	46
2.3.5	Détermination de la CL <sub>50</sub> et analyse statistique .....	46
2.4	Évaluation des effets de l'application de <i>B. thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> en verger à graines .....	47
2.4.1	Effets de l'application multiple sur le niveau de protection .....	47
2.4.1.1	Dispositif expérimental .....	47
2.4.1.2	Traitement des parcelles .....	47
2.4.1.3	Évaluation du niveau de protection du verger à graines et analyse statistique .....	47
2.4.2	Évaluation des effets de la concentration .....	48
2.4.2.1	Dispositif expérimental .....	48
2.4.2.2	Traitement des parcelles .....	48
2.4.2.3	Évaluation du niveau de protection du verger à graines et analyse statistique .....	48
CHAPITRE 3 : RÉSULTATS .....		49
3.1	Évaluation de l'effet des dommages de <i>D. abietivorella</i> sur la germination .....	49
3.1.1	Effets des dommages sur la production de graines .....	49
3.1.2	Mesure de la valeur germinative selon le niveau de dommage .....	49
3.2	Caractérisation des souches de <i>B. thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> .....	54
3.2.1	Comparaison des profils de l'ADN plasmidiques des souches BMP 123 et HD-1 .....	54
3.2.2	Détection des gènes de type <i>CryIA</i> par amplification par PCR .....	54
3.3	Titre insecticide de <i>B. thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> contre la pyrale des cônes du sapin .....	61
3.4	Évaluation de la formulation de <i>B. thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> en verger à graines .....	61
3.4.1	Effets des applications multiples .....	61
3.4.2	Effets de la concentration .....	65
3.4.2.1	Verger à graines de Labrosse, Saguenay .....	66
3.4.2.2	Verger à graines de Ste-Luce, Bas-St-Laurent .....	70

CHAPITRE 4 : DISCUSSION.....	73
4.1 Évaluation de l'effet des dommages sur la germination.....	73
4.2 Caractérisation des souches de <i>B. thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> .....	75
4.3 Titre insecticide de <i>B. thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> contre la pyrale des cônes du sapin.....	76
4.4 Évaluation de l'effet des dommages sur la germination.....	76
4.5 Évaluation de la formulation de <i>B. thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> en verger à graines.....	77
4.5.1 Effets des applications multiples.....	77
4.5.2 Effets de la concentration.....	77
CONCLUSION.....	80
BIBLIOGRAPHIE.....	85
ANNEXES.....	82
Annexe 1 : Classification des toxines <i>Cry</i> selon le degré parenté selon leur composition en acides aminés.....	92
Annexe 2 : Composition de la nourriture artificielle de la pyrale des cônes du sapin.....	93
Annexe 3 : Caractéristiques techniques du pulvérisateur dorsal motorisé utilisé pour les épandages de la formulation à base de <i>B. thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> .....	94

## Liste des figures

<b>Figure 1</b> : Cycle vital de la pyrale des cônes du sapin ( <i>Dioryctria abietivorella</i> ).....	7
<b>Figure 2</b> : Description des dommages occasionnés par la pyrale des cônes du sapin sur les cônes d'épinette blanche.....	11
<b>Figure 3</b> : Schéma de la structure de la $\delta$ -endotoxine <i>CryIA</i> .....	19
<b>Figure 4</b> : Mode d'action des toxines <i>Cry</i> .....	23
<b>Figure 5</b> : Localisation géographique des vergers à graines de Sainte-Luce, situé dans le Bas-Saint-Laurent et de Labrosse, situé à Sacré-Cœur, Saguenay-Lac-Saint-Jean.....	32
<b>Figure 6</b> : Pose de manchons dans le verger à graines de Labrosse.....	34
<b>Figure 7</b> : Test de germination.....	37
<b>Figure 8</b> : Pourcentage de germination cumulé de graines d'épinette blanche selon les différents niveaux de dommages occasionnés par <i>D. abietivorella</i> .....	52
<b>Figure 9</b> : Profil plasmidique, par électrophorèse sur gel d'agarose 0.8%, des souches BMP 123 et HD-1 de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> ,.....	56
<b>Figure 10</b> : Électrophorèse sur gel d'agarose 1% des produits de PCR amplifiés à partir de l'ADN total des souches BMP 123 et HD-1 de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> ,.....	58
<b>Figure 11</b> : Électrophorèse sur gel d'agarose 1,5% des produits de PCR, après digestion enzymatique, amplifiés à partir de l'ADN total des souches BMP 123 et HD-1 de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> ,.....	60
<b>Figure 12</b> : Larve de la pyrale des cônes du sapin ayant succombée à une ingestion de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> .....	64
<b>Figure 13</b> : Effets de l'application multiple d'une formulation de <i>B. thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> sur le pourcentage de cônes d'épinette blanche endommagés par <i>D. abietivorella</i> dans le verger à graines Labrosse, Saguenay.....	67
<b>Figure 14</b> : Effets de la dose d'une formulation de <i>B. thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> appliquée sur le pourcentage de cônes d'épinette blanche endommagés par <i>D. abietivorella</i> dans le verger à graines Labrosse, Saguenay.....	69

**Figure 15** : Effets de la dose d'une formulation de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* appliquée sur le pourcentage de cônes d'épinette blanche endommagés par *D. abietivorella* dans le verger à graines de Ste-Luce, Bas-St-Laurent ..... 72

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1</b> : Principales toxines <i>Cry</i> retrouvées chez <i>B. thuringiensis</i> .....	17
<b>Tableau 2</b> : Amorces utilisées pour l'identification des gènes <i>Cry1A</i> chez BMP 123 .....	41
<b>Tableau 3</b> : Série de dilutions effectuées pour les épreuves biologiques visant à comparer la CL <sub>50</sub> des souches de <i>B. thuringiensis</i> var <i>kurstaki</i> BMP 123 et HD-1 .....	45
<b>Tableau 4</b> : Évaluation de la CL <sub>50</sub> de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> souches BMP 123 et HD-1, incorporées à une nourriture artificielle, chez les larves de pyrale des cônes du sapin. ....	50
<b>Tableau 5</b> : Effets du niveau de dommage occasionné par <i>D. abietivorella</i> sur le nombre et le poids des graines des cônes d'épinette blanche .....	53
<b>Tableau 6</b> : Évaluation de la CL <sub>50</sub> des souches BMP 123 et HD-1 de <i>B. thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> , incorporées à une nourriture artificielle, chez les larves de pyrale des cônes du sapin (t =7 jours). ....	62

## Liste des abréviations

ARLA:	Agence de Réglementation de la Lutte Antiparasitaire
EDTA:	Acide éthylènediaminetétracétique
LSPQ:	Laboratoire de Santé Publique du Québec
MEV:	Ministère de l'Environnement du Québec
MFO:	Ministère des Forêts du Québec
MRNFPQ:	Ministère des Ressources Naturelles, de la Faune et des Parcs du Québec
MRNFQ:	Ministère des Ressources Naturelles et des Forêts du Québec
MRNQ:	Ministère des Ressources Naturelles du Québec
SDS:	Sodium dodecyl sulfate
SMC:	Service météorologique du Canada
UI:	Unités internationales
WHO:	World Health Organization

## Introduction

Les vergers à graines sont des plantations d'arbres à rendement accru, dont les arbres ont fait l'objet d'une sélection particulière, et qui ont été développés pour la production de semences destinées à la régénération artificielle des forêts. Dans le contexte de développement durable privilégié par la *Stratégie de protection des forêts du Québec* (MRN 2000), cet apport continu de graines génétiquement supérieures est essentiel à une reforestation suffisante et de bonne qualité. Au Québec, un réseau de verger à graines composé de 95 plantations de 18 essences distinctes a été mis en place dans le but d'accroître le rendement des plantations, de régulariser l'approvisionnement en semences et d'augmenter la qualité des arbres produits (Haavisto et Skeates 1995, MRNQ 1999). Cependant, les vergers à graines constituent un endroit favorable au développement de problématiques entomologiques (Eriksson 1996). En effet, les dommages occasionnés par les insectes ravageurs des cônes peuvent sérieusement compromettre la production de semences d'un verger à graines (Bennet 1994).

Parmi les nombreux insectes ravageurs des cônes, on retrouve la pyrale des cônes du sapin, *Dioryctria abietivorella* (Grote) (Lepidoptera : Pyralidae). Elle occasionne des problèmes périodiques dans les vergers à graines de conifères de l'Amérique du Nord. Suite à l'établissement d'une population de pyrales des cônes du sapin, un verger à graines est susceptible de subir des dommages considérables (Hedlin *et al.* 1980). Au Québec, la production semencière de plusieurs vergers à graines a plusieurs fois été compromise par le passé, puisque cet insecte peut détruire jusqu'à 70% des cônes (MRNQ 2000, MRNQ 1991). Ces baisses considérables de productivité se traduisent évidemment par des pertes financières pouvant se chiffrer à des valeurs aussi élevées que 150 000 dollars pour une seule année pour les gestionnaires et exploitants de vergers à graines.

Afin d'assurer un rendement accru du réseau de vergers à graines québécois, la mise en place d'un programme de surveillance phytosanitaire et l'élaboration de stratégies de lutte contre les différents insectes ravageurs sont nécessaires. Ces stratégies doivent toutefois tenir compte des politiques gouvernementales concernant le bannissement des pesticides de synthèse en forêt naturelle (MRNQ 2000). C'est dans ce contexte qu'il est important de développer des outils de lutte biologique à risques réduits efficaces contre les principaux ravageurs des

vergers à graines. Cependant, le développement de ces stratégies de lutte biologique doit prendre en considération la biologie des différents insectes en présence (Weslien 1999).

La larve de la pyrale des cônes du sapin est de type exoconophytique, elle se développe à l'intérieur des cônes mais en sort en maturité (Turgeon 1993). Elle endommage les cônes en creusant de multiples galeries, caractérisées par la présence d'un amas d'excréments à leur entrée. Au cours de leur développement, les larves peuvent également sortir du cône infesté pour en attaquer un autre. C'est donc au cours de ces déplacements qu'il serait possible pour la larve d'entrer en contact avec le produit insecticide. En ce sens, l'approche par pulvérisations multiples permettrait d'augmenter considérablement les chances de contact entre l'insecte et l'entomopathogène (Moreau et Bauce 2003, Weslien 1999, Haverty *et al.* 1986).

Connaissant l'effet pathogène de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* chez les lépidoptères (Whalon 2003, Gill *et al.* 1992, Aronson *et al.* 1986), cette bactérie a été privilégiée dans cette étude pour l'élaboration d'un outil de lutte biologique contre la pyrale des cônes du sapin. Afin de permettre l'activation de ce pathogène, la bactérie doit être ingérée par l'insecte. L'activation des toxines bactériennes engendrera alors la paralysie du système digestif de la larve, qui cessera rapidement de s'alimenter et qui mourra par la suite d'inanition.

L'objectif de cette étude était de démontrer que la souche BMP 123 de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* constituait un outil de choix pour diminuer l'incidence des dommages causés par l'établissement d'une population de pyrale des cônes du sapin dans un verger à graines. Pour ce faire, cette souche a été comparée à la souche HD-1 (souche référence). Cet exercice avait pour objectif de démontrer que la souche BMP 123 détenait les gènes nécessaires pour lui conférer une toxicité envers les larves de lépidoptères. Cela allait aussi permettre de vérifier si elle possédait un potentiel insecticide supérieur à HD-1 pour les larves de pyrale des cônes du sapin.

# Chapitre 1

## Revue de littérature

### 1.1 Verger à graines

Les vergers à graines occupent une place importante dans les objectifs de développement durable des essences commerciales du ministère des Ressources naturelles et de la Faune du Québec. Le succès d'un aménagement forestier durable repose sur un apport constant de graines de haute qualité. Ainsi, la mise en place d'un réseau de vergers à graines permet d'accroître le rendement des plantations, de régulariser l'approvisionnement en semences et d'augmenter la qualité des arbres produits (Haavisto et Skeates 1995, MRNQ 1999).

Un verger à graines est une plantation d'arbres issue de greffes ou de semis descendant d'individus qui ont fait l'objet d'une sélection particulière. Ces peuplements semenciers à rendement accru sont aménagés intensivement de façon à augmenter la qualité du génotype et à obtenir une production fréquente et abondante de semences génétiquement améliorées. Ils sont le fruit d'une sélection d'individus les plus performants et n'impliquent aucune modification génétique. Il existe deux types de vergers à graines, le verger de semis et le verger de greffes, appelé aussi verger clonal. Le verger de semis est formé d'individus issus de graines. Il est mis en place pour les essences qui atteignent rapidement la maturité sexuelle (5-15 ans), tels l'épinette noire [*Picea mariana* (Mill.) B.S.P.], le pin gris [*Pinus banksiana* Lamb.] et le mélèze laricin [*Larix laricina* (Du Roi) Koch] (Forêts Canada 1992). Pour leur part, les vergers de greffes sont mis en place pour les essences qui atteignent moins rapidement la maturité sexuelle (15 à 25 ans), tels l'épinette blanche [*Picea glauca* (Moench) Voss], l'épinette de Norvège [*Picea abies* (L.) Karst], et le pin blanc [*Pinus strobus* L.]. Ils sont formés d'individus obtenus par multiplication végétative, soit par greffage ou par bouturage (Forêts Canada 1992). Le greffage consiste à placer une partie d'un organisme végétal (greffon) en contact physiologique avec une plante enracinée (porte-greffe) afin d'obtenir une soudure des deux individus. Cette technique permet de ramener le délai de floraison à 5 ou 10 ans (Quirion et Bourbeau 1998).

Afin de garantir la qualité génétique des graines produites dans un verger à graines, la contamination pollinique provenant de sources exogènes doit être minimisée (MRNQ 1999). Cette contamination est grandement diminuée lorsque le verger est situé aux limites ou à l'extérieur de l'aire de distribution de l'espèce (Lamontagne 1992). L'approche des vergers entre brise-vent est également utilisée. Ces derniers engendrent par le fait même la création de microclimats permettant d'accélérer le développement des fleurs (Guyot 1983).

Au Québec, le réseau public de vergers à graines compte 95 plantations de 18 essences distinctes. Les récoltes de semences génétiquement améliorées connaissent une progression constante. À ce jour, 85% des semences requises pour le reboisement des essences commerciales proviennent de sources génétiquement améliorées (MRNQ, 1999). On estime que les vergers atteindront leur pleine capacité de production vers 2010. Ils pourront alors combler environ 90 % des besoins en semences génétiquement améliorées (MRNQ 2003).

La concentration d'arbres à haut rendement peut cependant favoriser l'apparition de problèmes entomologiques. En effet, par leur forte production de cônes, les vergers à graines représentent une importante source de nourriture pour certaines espèces d'insectes. Fenner (1985) a démontré que l'attaque d'un cône par un insecte allait grandement diminuer l'apport de nutriments vers les graines intactes, en plus de détruire plusieurs graines. Ce manque de nutriments empêche la constitution de réserves nutritives par la graine, ce qui engendre une diminution de la taille de celle-ci. Différentes études ont démontré que les graines possédant de plus grandes réserves allaient germer plus fréquemment et engendrer de jeunes plants plus vigoureux (Schmidt 2000, Walsh et Lord 1996, Sorensen et Cambell 1993, Scott *et al.* 1974, Hewston 1963). Le calcul de la valeur germinative est une méthode ayant été développée dans le but de quantifier la qualité d'un lot de graines par l'entremise d'un test de germination (Czabator 1962). La valeur germinative combine la vitesse de germination et la germination totale des graines. En regroupant celles-ci, il est alors possible de comparer la valeur germinative de graines ayant subi différents traitements. Les lots de graines possédant une valeur plus élevée sont considérés comme étant plus vigoureux, ce qui augmenterait le potentiel de germination et la survie des jeunes plants (Czabator 1962, Roques 1988, Mosseler *et al.* 1992)

Afin d'assurer un rendement accru des vergers à graines, la mise en place d'un réseau de surveillance phytosanitaire et l'élaboration de stratégies de lutte contre les différents insectes

ravageurs sont nécessaires. Ces stratégies doivent toutefois tenir compte des politiques concernant le bannissement des pesticides de synthèse en forêt naturelle (MRNQ 2000). Dans ce contexte, qu'il est important de développer des outils de lutte biologique à risques réduits efficaces contre les principaux ravageurs des vergers à graines, tels que la mouche granivore [*Strobilomyia neanthracina* Mich.], la tordeuse des graines de l'épinette [*Cydia strobilella* L.] et la pyrale des cônes du sapin [*D. abietivorella*].

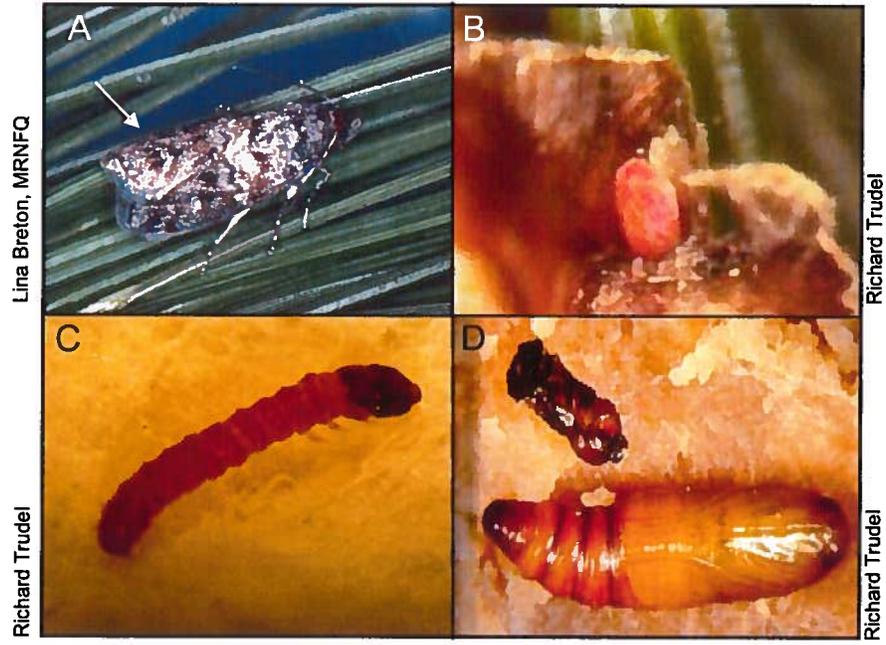
## 1.2 Pyrale des cônes du sapin

### 1.2.1 Généralités

La pyrale des cônes du sapin, *D. abietivorella*, est un lépidoptère de la famille des Pyralidae. Son aire de distribution s'étend des provinces maritimes jusqu'à la Colombie-Britannique, en incluant l'Alaska. On retrouve l'insecte sur les côtes Est et Ouest des États-Unis (Hedlin et al. 1980). L'hôte préférentiel des larves de la pyrale des cônes du sapin est l'épinette blanche (Trudel et al. 1999). L'insecte s'alimente aussi des cônes du sapin baumier [*Abies balsamea* (L.) Mill.], de l'épinette noire, et du pin blanc (Hedlin et al. 1980). Les larves peuvent également s'attaquer aux cônes de l'épinette de Norvège, l'épinette rouge [*Picea rubens* Sarg.], le pin gris, le pin rouge [*Pinus resinosa* Ait.], le pin sylvestre [*Pinus sylvestris* L.] ainsi que quelques autres espèces de mélèzes [*Larix sp.*] (Hedlin et al. 1980, Turgeon 1994). Les larves se nourrissent principalement des cônes. En absence de ceux-ci, elles peuvent aussi s'alimenter d'aiguilles, de pousses terminales et de la partie interne de l'écorce des branches ou du tronc (Hedlin et al. 1980, Bennet 1994). *D. abietivorella* est un insecte de type conophyte puisque les larves se développent à l'intérieur des cônes. Plus précisément, elles sont exoconophytes car elles sortent du cône à la fin de leur développement, où elles se laissent choir au sol (Turgeon 1993). Elles peuvent aussi sortir du cône infesté pour s'attaquer à un autre au cours de leur développement.

Dans l'Est du Canada, la pyrale des cônes du sapin est univoltine, n'ayant qu'une seule génération par année (Turgeon 1993). L'adulte de la pyrale des cônes du sapin (Figure 1A) est un papillon ayant une envergure variant entre 25,0 mm et 28,0 mm (Hedlin et al. 1980). Les ailes antérieures sont de couleur gris-bleu traversées de bandes plus pâles bordées de noir. Cet arrangement de couleurs forme un « W » distinctif près du bout des ailes. Les ailes

**Figure 1** : Cycle vital de la pyrale des cônes du sapin (*Dioryctria abietivorella*) (Selon Hedlin *et al.* 1980). A- Adulte avec flèche pointant le « W » caractéristique de l'espèce, B- Oeuf, C- Larve, D- Chrysalide.



postérieures sont de couleur gris pâle, sans motif (Munroe 1959, Hedlin *et al.* 1980). Les adultes de *D. abietivorella* sont principalement actifs durant les périodes d'obscurité. C'est durant ces périodes, appelées scotophases, que la ponte se produit (Fatzinger et Merkel 1985). Les adultes sont présents de mai à juin (Turgeon 1993). Les œufs (Figure 1B) sont pondus individuellement ou en groupe de deux ou trois sur les cônes, sur les branches ou sur de vieilles aiguilles (Lyons 1957, Ruth 1980, Martineau 1985). Les œufs sont ovales, 0,6 mm sur 1,0 mm, et sont d'un vert blanchâtre lors de la ponte. Ils deviennent orangé à maturité (Turgeon 1993). Les œufs sont pondus au mois de juin et mettent environ dix jours à éclore (Turgeon 1993, Stevens *et al.* 1988). Les jeunes larves (Figure 1C) se développent dans le cône. Elles sont présentes du mois de juin à la fin avril de l'année suivante. Elles ont le corps de couleur ambre et la tête brune. Au cinquième et dernier stade larvaire, la tête et les plaques thoraciques deviennent brun foncé, le corps est plus foncé et il est longitudinalement strié de taches brunes sur la partie dorsale (Ives et Wong 1988). À maturité, les larves mesurent entre 18,0 mm et 20,0 mm de longueur (Hedlin *et al.* 1980). Lorsqu'elles atteignent le cinquième stade larvaire, les larves de pyrale des cônes du sapin sortent des cônes infestés et se laissent tomber au sol pour passer l'hiver sous le couvert de neige et ainsi éviter les basses températures (Martineau 1985). La diapause est induite par la diminution de la photopériode (Trudel *et al.* 1999). Des expériences en laboratoire ont cependant démontré que la diapause était facultative. En effet, sous des conditions abiotiques favorables, le développement de *D. abietivorella* est continu (Trudel *et al.* 1995). Au printemps, les larves se tissent un cocon de soie dans lequel elles se transforment en une chrysalide (Figure 1D) de couleur variant de l'ambre au brun rougeâtre et mesurant environ 11,0 mm de long (Hedlin *et al.* 1980). C'est de cette chrysalide qu'émergera l'adulte.

Durant la période reproductive, les adultes de la pyrale des cônes du sapin réagissent aux monoterpènes des cônes des espèces hôtes (Asher 1970). Ainsi, l'oviposition des femelles semble être positivement influencée par la concentration en monoterpène émise par l'hôte. Selon Fatzinger et Merkel (1985), ces substances volatiles stimulent également la ponte. Fidgen et Sweeney (1996) ont démontré que la pyrale des cônes du sapin s'attaque en plus grande proportion aux cônes qui ont été préalablement infestés, comparativement aux cônes non endommagés. La plus grande densité de larves dans les cônes endommagés peut être reliée au fait que les femelles gravides de *D. abietivorella* réagiraient aux grandes concentrations de monoterpènes se dégageant des cônes présentant des dommages. Cela augmenterait l'effet d'attraction et d'oviposition des femelles (Fidgen et Sweeney 1996, Shu

*et al.* 1997, Brockerhoff et Grant 1999). En plus d'augmenter le dégagement de monoterpènes, les dommages causés par d'autres ravageurs comme la mouche granivore permettraient d'augmenter la qualité de l'hôte en créant des entrées pour les larves de la pyrale des cônes du sapin (Fidgen et Sweeney 1996).

### **1.2.2 Dommages et importance économique**

Durant son développement, la larve de *D. abietivorella* endommage les cônes en creusant de nombreuses galeries à travers les écailles et les graines (Turgeon 1993). Les cônes endommagés sont caractérisés par la présence d'amas d'excréments à l'entrée des galeries, qui sont généralement libres de tout débris. Afin d'assurer leur approvisionnement en nourriture, les larves réunissent quelques cônes ensemble à l'aide de soie mêlée de déjections granuleuses (Turgeon et de Groot 1992) (Figure 2). Par ce comportement alimentaire, la pyrale des cônes du sapin peut donc causer des dommages importants dans les vergers à graines.

Les vergers à graines sont susceptibles de subir des dommages considérables suite à l'établissement des populations de pyrale des cônes du sapin (Hedlin *et al.* 1980, Ruth *et al.* 1992). Ces dommages ont une incidence remarquée lors des années où la production des vergers à graines est faible ou modérée (Turgeon 1994). Kulhavy *et al.* (1976) rapportent que, dans le nord de l'Idaho, *D. abietivorella* a détruit près de 45% des graines en 1972, année où la production avait été très faible. Durant les périodes épidémiques, l'insecte peut totalement détruire la production de cônes d'une région (Bennet 1994). Par exemple, dans une région de Terre-Neuve où la production de graines des peuplements naturels de conifères avait été faible, une grande densité de pyrale des cônes du sapin a été observée dans un verger à graines de pins rouges ayant connu une production semencière importante (Mosseler *et al.* 1992). Alors que l'incidence de la pyrale dans les cônes des peuplements naturels de la région était seulement de 25%, elle avoisinait les 90% dans les vergers à graines.

Au Québec, durant les bonnes années de production florale, plus de la moitié des cônes produits peuvent être endommagés par la pyrale des cônes du sapin (MFO 1991). Au Québec, au cours des dernières années, plusieurs vergers à graines de conifères ont été sérieusement infestés par la pyrale des cônes du sapin. En 1990, dans la région administrative Gaspésie – Îles-de-la-Madeleine, près de 70% des cônes de la plantation d'épinettes blanches

**Figure 2 : Description des dommages occasionnés par la pyrale des cônes du sapin sur les cônes d'épinette blanche. A- Amas d'excréments à l'extrémité d'une galerie. B- Cônes réunis dans le but d'assurer un approvisionnement en nourriture à la larve. C- Larve de la pyrale des cônes du sapin ayant presque totalement détruit un cône.**

A



Richard Trudel

B



Richard Trudel

C



Lina Breton, MRNFQ

de Romieu présentait des dégâts causés par *D. abietivorella*. La même année, dans la plantation d'épinettes blanches d'Escourt, au Témiscouata, près de 25% des cônes ont été affectés par la pyrale (MRNQ 1991). En 1991, toujours dans la région administrative de Gaspésie – Îles-de-la-Madeleine, un verger à graines de mélèzes hybrides [*Larix x eurolepis* Henry] de Hamilton a été infestés par la pyrale des cônes du sapin. Les dommages observés ont engendré la perte totale des graines des cônes et compromis la récolte de graines (MRNQ 1992). En 1999, la totalité des graines des cônes endommagés par la pyrale des cônes du sapin ont été détruites dans le verger à graines d'Escourt (MRNQ 2000).

Les dommages occasionnés par la pyrale des cônes du sapin se traduisent par une diminution de l'approvisionnement en semences génétiquement améliorées et par des pertes financières pour les gestionnaires. En 1996, dans le verger de Labrosse situé à Sacré-Coeur dans la région du Saguenay, les dégâts occasionnés par la pyrale des cônes du sapin ont engendré la perte de près de 280 hectolitres de cônes d'épinette blanche, soit l'équivalent de 140 000\$. Afin que l'industrie forestière puisse profiter des bénéfices offerts par ces semences génétiquement améliorées, il est primordial d'élaborer une stratégie de lutte contre *D. abietivorella*. Selon la loi visant à protéger la santé, la sécurité humaine et l'environnement en réglementant les produits utilisés pour la lutte antiparasitaire, il est maintenant interdit d'utiliser des pesticides de synthèses et autres produits chimiques en forêt. C'est dans cette optique que l'emphase a été mise sur l'emploi de *B. thuringiensis* Berliner. Cette bactérie possède des propriétés insecticides contre les insectes de l'ordre des lépidoptères, des diptères, des coléoptères et contre certains nématodes (Boucias et Pendland 1998).

### **1.3 *Bacillus thuringiensis***

#### **1.3.1 Généralités**

Le genre *Bacillus* regroupe des bactéries aérobies Gram-positives possédant la capacité de former des endospores lorsque les conditions sont défavorables. La bactérie *Bacillus thuringiensis* a été observée pour la première fois au Japon au début du vingtième siècle dans les élevages de vers à soie, *Bombyx mori* L., où elle était considérée nuisible. C'est en 1911, dans la province allemande de Thüringen, que Berliner a isolé et décrit la bactérie. Contrairement à la vision des Japonais, celle-ci était considérée bénéfique puisqu'elle tuait les

larves de lépidoptères nuisibles dans les entrepôts de céréales. *B. thuringiensis* est une bactérie de sol très peu mobile que l'on retrouve à la grandeur de la planète. La bactérie doit donc être réintroduite au niveau des plantes pour exercer son pouvoir entomopathogène et ainsi être utilisée comme outil de lutte biologique (Dulmage et Aizawa 1982). Au cours des années 1950, l'élaboration de méthodes de production de masse en milieu liquide a permis la commercialisation à grande échelle des premiers produits à base de *Bacillus thuringiensis*. Ces produits ont alors été massivement utilisés en Amérique du Nord pour lutter contre les différents ravageurs forestiers, agricoles et horticoles (Burgess et Daoust 1986). Au début des années 1960, la variété *kurstaki* a pour la première fois été associée à l'activité biocide spécifique qu'elle possède envers les lépidoptères. Jusqu'au milieu des années 1970, ces derniers ont pratiquement été les seules cibles des produits à base de *Bacillus thuringiensis* (Joung et Côté 2000). Depuis 1975, on retrouve, d'autres produits homologués à base de différentes variétés : *israelensis*, toxique pour les larves de diptères, *tenebrionis*, toxique pour certaines espèces de coléoptères, et *aizawai*, toxique envers certains lépidoptères et diptères (Goldberg et Margalit 1977, Smith *et al.* 1996).

Actuellement, les deux principales variétés utilisées dans les formulations à base de *B. thuringiensis* sont les variétés *israelensis* et *kurstaki*. La première est utilisée dans les campagnes de prévention de transmission de maladie telles que le paludisme ou le virus du Nil occidental, tandis que la seconde est utilisée contre les insectes ravageurs des cultures, des forêts et des plantations.

*B. thuringiensis* var *israelensis* a officiellement été identifiée en 1976 (Goldberg et Magalit 1977) et plusieurs études ont par la suite démontré l'efficacité de cette bactérie pour lutter contre les insectes piqueurs. De Barjac (1978) a premièrement démontré l'effet larvicide de la variété contre certains diptères aquatiques. Thomas et Ellar (1983) ont ensuite présenté les mécanismes et le mode d'action de la  $\delta$ -endotoxine responsable des propriétés insecticides de la bactérie envers les larves de moustiques. Plusieurs dispositifs expérimentaux ont par la suite démontrés l'efficacité de *B. thuringiensis* sur le terrain contre différentes espèces de moustiques (Mulla *et al.* 1982, Garcia *et al.* 1983, Majori *et al.* 1987). Depuis plus de vingt ans, l'intérêt pour les produits commerciaux à base de *B. thuringiensis* var. *israelensis* ne cesse d'augmenter à travers le monde pour le contrôle des moustiques à petite ou grande échelle (Becker et Margalit 1993). Depuis 2002, des pulvérisations de ce produit sont

effectuées dans certaines régions du Québec pour contrôler les populations de moustiques, vecteurs du virus du Nil occidental (Boisvert et Lacoursière 2004).

Pour sa part, la variété *kurstaki* de *B. thuringiensis* est la plus utilisée, puisqu'elle permet de lutter contre différentes espèces de lépidoptères, ces derniers étant les principaux ravageurs des forêts, plantations et cultures. Cette variété a officiellement été découverte au début des années 1970 (Beegle et Yamamoto 1992, Dulmage 1970). Par la suite, de nombreuses études ont démontré l'efficacité de cette variété, en particulier de la souche HD-1, pour lutter contre divers insectes ravageurs. En agriculture, *B. thuringiensis* var. *kurstaki* est utilisé pour lutter contre les larves de lépidoptères ravageurs, parmi lesquels on retrouve entre autre la fausse-arpenteuse du chou [*Trichoplusia ni* (Hübner)], la fausse-teigne des crucifères [*Plutella xylostella* L.], la pyrale du maïs [*Ostrinia nubilalis* Hübner], la tordeuse à bandes obliques [*Choristoneura rosaceana* (Harris)], ainsi que plusieurs autres espèces qui s'attaquent aux légumes, aux céréales et aux arbres fruitiers. En ce qui concerne le milieu forestier, la variété *kurstaki* a entre autre fréquemment été utilisée contre la spongieuse [*Lymantria dispar* (L.)], la livrée des forêts [*Malacosoma disstria* Hübner] et la tordeuse des bourgeons de l'épinette [*Choristoneura fumiferana* (Clemens)] (Beegle et Yamamoto 1992).

Au Québec, les produits à base de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* sont principalement utilisés pour la lutte contre la tordeuse des bourgeons de l'épinette. Celle-ci est considérée comme le plus grand ravageur des forêts de sapins et d'épinettes en Amérique du Nord (SOPFIM 1992). C'est au début des années 1970 que les premières études démontrant l'efficacité de la variété *kurstaki* contre *C. fumiferana* ont été effectuées (Smirnoff et Valero 1972, Smirnoff 1974). D'autres études en laboratoire et sur le terrain ont par la suite été conduites pour évaluer son activité insecticide accrue contre la tordeuse des bourgeons de l'épinette (van Frankenhuyzen 1995). Aujourd'hui, les techniques utilisées pour la protection des forêts contre la tordeuse des bourgeons de l'épinette ont grandement été raffinées, ce qui permet d'augmenter considérablement l'efficacité des traitements en forêts et la protection de celles-ci contre cet insecte ravageur (Bauce *et al.* 2004).

Un protocole d'épreuve biologique standardisée a été développé pour établir le potentiel insecticides des divers produits à base de *B. thuringiensis* (Dulmage *et al.* 1971). La méthode consiste à placer des larves de la fausse-arpenteuse du chou sur de la nourriture artificielle contenant une série de concentration du produit à évaluer. La relation de mortalité en

fonction de la dose en résultant est ensuite comparée à une courbe référence. Cette courbe est obtenue offrant aux larves de *T. ni* d'une nourriture artificielle contenant une concentration connue une souche de *B. thuringiensis* ayant été déterminée comme référence. Un potentiel insecticide arbitraire de 10 000 Unités Internationales (UI) par milligramme a été assigné à cette souche de référence. Le potentiel du produit à l'étude est ensuite calibré en fonction de ce standard.

### 1.3.2 Description des toxines

On retrouve différentes toxines entomopathogènes produites par *B. thuringiensis*, dont les principales sont les exotoxines  $\alpha$  et  $\beta$ , ainsi que les  $\delta$ -endotoxines. L' $\alpha$ -exotoxine crée des ruptures dans les membranes cellulaires et joue un rôle important dans l'entrée des cellules végétatives du *B. thuringiensis* à l'intérieur de l'hémocoèle de l'hôte (Boucias et Pendland 1998). L'effet insecticide de cette toxine a été observé chez la fausse-teigne des crucifères, un lépidoptère ravageur des cultures de choux (Dubois et Lewis 1981).

La  $\beta$ -exotoxine, associée à certaines sous-espèces de *B. thuringiensis*, est produite durant la phase végétative de la bactérie. Elle est toxique pour les diptères mais affecte aussi les lépidoptères, les hyménoptères, les hémiptères, les isoptères, les orthoptères et les nématodes (Angus 1962, Dubois et Lewis 1981, Boucias et Pendland 1998). L'utilisation de préparations comprenant la  $\beta$ -exotoxine est interdite au Canada car elle peut avoir des effets tératogéniques et est considérée toxique pour presque toutes les formes de vie (WHO 1999, Dubois et Lewis 1981). L'exposition à la  $\beta$ -exotoxine peut créer des lésions au foie, aux reins et aux glandes surrénales. De plus, des tests effectués sur des poulets ont démontré une baisse de vigueur des individus et une diminution du poids des oeufs pondus (Boucias et Pendland 1998).

Finalement, on retrouve la  $\delta$ -endotoxine, qui ne peut être solubilisée qu'en milieu très alcalin (Angus 1962). La  $\delta$ -endotoxine est toxique pour les lépidoptères, les diptères et les coléoptères. Ces toxines sont des protéines cristallines provenant d'un cristal parasporal adjacent à l'endospore produit lors de la sporulation de la bactérie (Candas et Bulla 2002). Ces protéines sont codées par des gènes nommés gènes *Cry*.

### 1.3.3 Structure et diversité des $\delta$ -endotoxines

Plus d'une centaine de gènes *Cry* codant pour les  $\delta$ -endotoxines ont été clonées à partir de *B. thuringiensis*. Une souche particulière peut produire une ou plusieurs toxines *Cry* dans différentes formations cristallines. Par exemple, une nouvelle variété récemment découverte, *B. thuringiensis* var. *aegypti*, possède au moins quinze différents gènes *Cry* (Candas et Bulla 2002). Chacune des toxines *Cry* produites a des propriétés biocides spécifiques généralement restreintes à quelques espèces appartenant à un ordre particulier d'insectes. Malgré cette grande variété, quatre principaux groupes de toxines sont retrouvés (Tableau 1). Tous ces gènes auraient une origine commune en raison de leur grande homologie en ce qui a trait aux acides aminés (Höfte et Whiteley 1989).

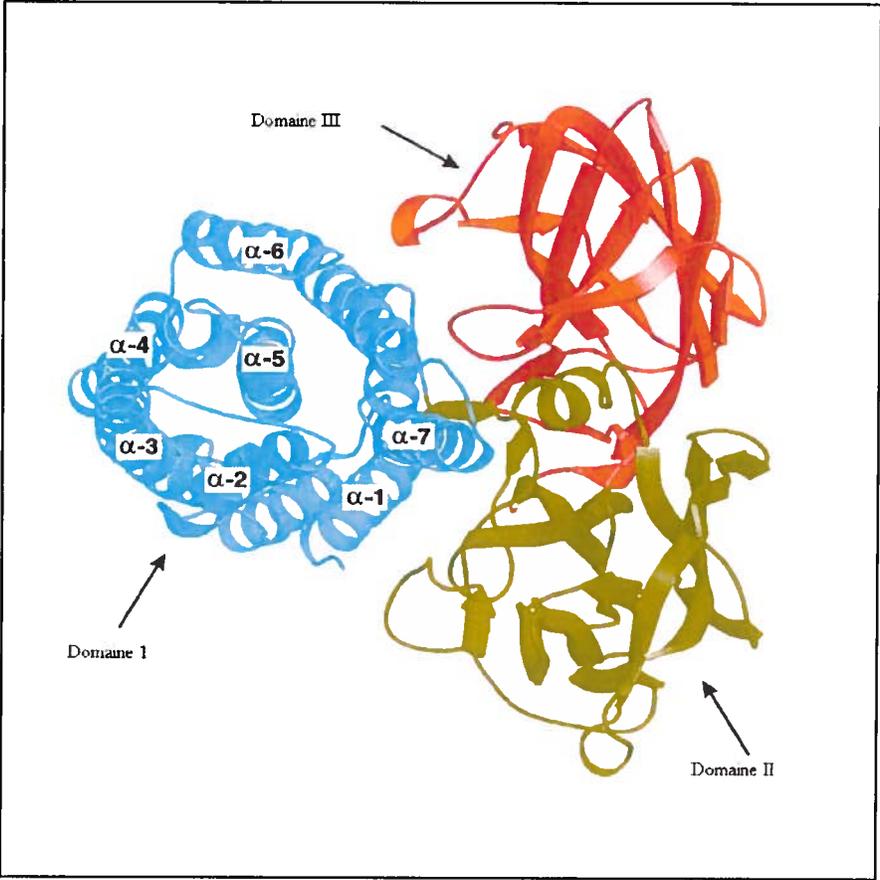
Les  $\delta$ -endotoxines ont d'abord été classifiées par Höfte et Whiteley (1989) selon leur champ d'activité. Avec la découverte d'une multitude de nouvelles toxines au cours des dernières années, la classification a énormément changé. Depuis 1993, une classification basée sur la composition en acides aminés, la masse moléculaire et la spécificité des toxines a été établie et, depuis ce jour, elle est en constante évolution. Cette nouvelle classification permet de regrouper les toxines étroitement apparentées et élimine la nécessité de soumettre chaque nouvelle toxine à des essais biologiques (Annexe 1) (Crickmore *et al.* 2005, Crickmore *et al.* 1998).

Les  $\delta$ -endotoxines sont constituées de trois domaines (Figure 3). Le domaine I est un groupement de 7 hélices  $\alpha$  hydrophobes (6 hélices s'enroulant autour d'une hélice centrale  $\alpha 5$ ) qui s'insère dans les membranes cellulaires du système digestif pour former un pore aqueux à travers lequel les ions peuvent circuler (Hodgman et Ellar 1990). Le domaine II consiste en 3 feuillets  $\beta$  antiparallèles repliés similaires aux régions de liaison des antigènes de l'immunoglobuline. Ce domaine se lie aux récepteurs épithéliaux et est responsable de la spécificité de la toxine (Whalon 2003). Le domaine III est constitué de 2 feuillets  $\beta$  sandwich compressés qui protège la partie C-terminale exposée de la toxine active et qui prévient les clivages éventuels qui pourraient être occasionnés par d'autres protéases (Li *et al.* 1991). Les trois domaines forment un « L » inversé, les domaines II et III étant superposés et le domaine I étant accolé à leur côté (Schnepf *et al.* 1998). Les différentes  $\delta$ -endotoxines *Cry* sont une famille de protéines qui comprennent plusieurs régions identiques ou très similaires entrecoupées de régions variables (Höfte et Whiteley 1989, Hodgman et Ellar 1990). Elles

**Tableau 1 : Principales toxines Cry retrouvées chez *B. thuringiensis* (Aronson et Shay 2001, Gill *et al.* 1992, Wirth *et al.* 1998)**

<b>Gène(s)</b>	<b>Masse de la protéine</b>	<b>Référence</b>	<b>Spécificité</b>
<i>Cry1</i>	130-140 KDa	<i>B.t. var. kurstaki</i>	Lépidoptère
<i>Cry2</i>	70-75 KDa	<i>B.t. var. kurstaki</i>	Lépidoptères et diptères
<i>Cry3</i>	70-75 KDa	<i>B.t. var. tenebrionis</i>	Coléoptères
<i>Cry4A et Cry 11</i>	70-135 KDa	<i>B.t. var. israelensis</i>	Diptères

**Figure 3 : Schéma de la structure de la  $\delta$ -endotoxine CryIA:** Le domaine I s'insère dans les membranes cellulaires du système digestif pour former un pore aqueux (Hodgman et Ellar 1990). Le domaine II se lie aux récepteurs épithéliaux et est responsable de la spécificité de la toxine. Le domaine III protège la partie C-terminale exposée de la toxine active et prévient les clivages par d'autres protéases intestinales (Li *et al.* 1991). (Modifié de Aronson et Shay 2001).



sont synthétisées sous la forme de protoxines inactives et doivent être activées par protéolyse dans l'intestin de l'insecte (Lecadet et Martouret 1965). Les toxines activées interagissent avec l'épithélium intestinal, causant un bris de l'intégrité membranaire et conduisant à la mort de l'insecte (Gill *et al.* 1992).

Afin de comprendre le mode d'action des toxines *Cry*, une connaissance de l'anatomie générale de l'intestin de l'insecte ainsi que la physiologie de l'intestin moyen est requise. L'intestin moyen est le site principal de digestion et d'absorption chez les insectes et, chez les lépidoptères, il constitue près de la moitié du poids de la larve. Une membrane péritrophique protège l'épithélium de l'intestin moyen (Dow 1986). Cette membrane est une matrice de fibrilles de chitine entrelacées qui est recouverte d'un gel de protéoglycane. Elle sépare le lumen de l'intestin moyen en deux compartiments: l'espace ectopéritrophique, qui contient les aliments ingérés par la larve, et l'espace endopéritrophique, qui consiste en l'espace entre la membrane et la paroi cellulaire de l'intestin moyen (Chapman 1998). La membrane péritrophique possède deux fonctions : elle agit comme une barrière mécanique prévenant les dommages physiques à l'unique couche de cellules épithéliales de l'intestin moyen et comme un tamis à travers lequel les nutriments diffusent (Chapman 1998, Lane *et al.* 1989). Elle possède une très faible porosité ne permettant généralement pas le passage des bactéries ainsi que des grosses molécules toxiques d'origines végétales comme les tannins. Par contre, elle n'empêche pas le passage de toxines monomères vers l'épithélium intestinal (Chapman 1998, Bravo *et al.* 1992, Yunovitz *et al.* 1986).

L'intestin moyen des insectes phytophages est caractérisé par une alcalinité très élevée, présentant des valeurs de pH situées entre 10 et 11 (Gringorten 2001, Dow 1986). Ce pH élevé prévient la désactivation des enzymes digestives par l'action des tannins d'origine végétale. En neutralisant ainsi les tannins de la nourriture ingérée, la digestibilité de celle-ci en est grandement augmentée (Gringorten 2001, Berenbaum 1980). Cependant, c'est cette forte alcalinité qui permettra aux  $\delta$ -endotoxines d'être solubilisées et activées.

#### **1.3.4 Mode d'action des $\delta$ -endotoxines**

Certaines caractéristiques permettent au *B. thuringiensis* d'être un entomopathogène efficace. Les cristaux sont de petite taille et peuvent ainsi franchir l'intestin antérieur, contrairement aux spores et à la forme végétative qui sont de taille plus importante. L'action principale des  $\delta$ -endotoxines est de provoquer la lyse des cellules épithéliales de l'intestin moyen de

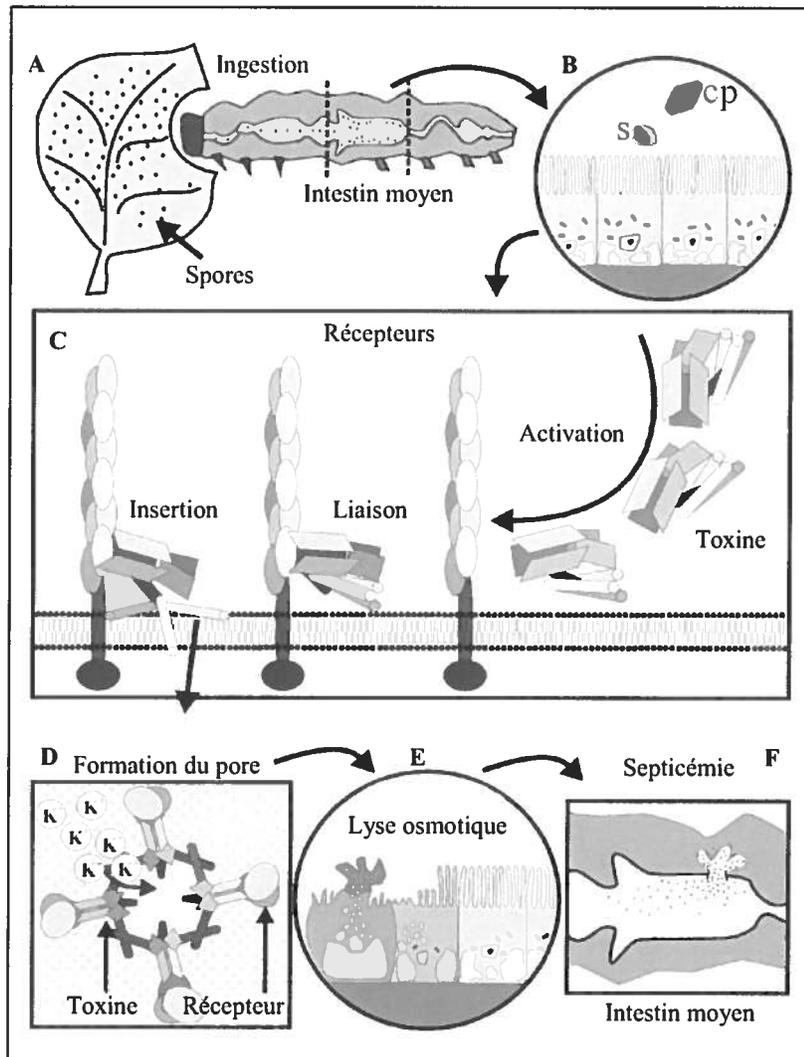
l'insecte sensible (Gill *et al.* 1992). Après l'ingestion des cristaux, les premiers symptômes à apparaître sont une cessation du comportement alimentaire de la larve et une paralysie de l'intestin (Boucias et Pendland 1998). Cependant, avant que *B. thuringiensis* puisse coloniser la larve, il doit franchir avec succès les différents systèmes de défense de l'insecte. Après l'ingestion du cristal parasporal, l'activité biocide dépend d'un procédé complexe qui nécessite plusieurs étapes. Ces dernières consistent en la solubilisation de la protéine cristalline, l'activation protéolytique de la protoxine, la liaison aux récepteurs de l'intestin moyen et l'insertion irréversible de la toxine dans la membrane cellulaire (Jenkins et Dean 2001). Ces étapes sont schématisées à la figure 4.

La majorité des  $\delta$ -endotoxines contenues dans les cristaux parasporaux sont insolubles, sauf en milieu très alcalin. Cette insolubilité est due à la présence de ponts disulfites localisés dans les premiers acides aminés de l'extrémité N-terminale et dans la moitié C-terminale de la protéine (Höfte et Whiteley 1989). Les cystéines composant ces ponts disulfites ne sont pas impliquées dans la toxicité (Choma et Kaplan 1992). Les cristaux parasporaux sont donc solubilisés par le pH élevé et les conditions réductrices qui prévalent dans l'intestin moyen des larves de lépidoptères, ce qui résulte en la libération d'une protoxine (Aronson et Shay 2001, Choma *et al.* 1991).

Une activation protéolytique est nécessaire pour que les protoxines puissent exercer leur action biocide. Cette opération requiert une forte alcalinité ainsi que l'action d'enzymes digestives présentes dans l'intestin moyen de l'insecte (Whalon et Wingerd 2003). Cette activation implique le clivage, par des protéases intestinales, des extrémités C-terminale et N-terminale de la protéine (Gringorten 2001). Une fois activée, la toxine peut alors diffuser à travers la membrane périplasmique et ainsi avoir accès à la surface des membranes à bordure en brosse des cellules prismatiques épithéliales (Hill et Pinnock 1998, Ferre et Van Rie 2002, Escriche *et al.* 1995).

Le domaine II situé sur l'extrémité C-terminale de la toxine activée est responsable de la reconnaissance du récepteur de la liaison à celui-ci (Whalon et Wingerd 2003). Plusieurs récepteurs de toxines différents sont présents chez un même insecte et plus d'un type de toxines peuvent entrer en compétition pour un site de liaison unique, mais avec des degrés différents d'affinité.

**Figure 4 : Mode d'action des toxines Cry.** A: Ingestion de spores ou de cristaux parasporaux par la larve. B: Solubilisation des toxines dans l'intestin moyen, à partir des spores (S) et des protéines cristallisées (CP)). C: Activation des toxines *Cry* par des protéases intestinales, liaison des toxines actives à des récepteurs présents sur les cellules prismatiques et insertion dans la membrane cellulaire. D: Agrégation des toxines *Cry* pour former des pores dans la membrane. E: Formation des pores menant à une lyse osmotique de la cellule. F: Inanition ou septicémie de la larve des suites des dommages occasionnés à la membrane de l'intestin moyen (Modifié de Whalon et Wingerd 2003).



Deux types de molécules servent de récepteurs aux toxines activées (Jenkins et Dean 2001). Des aminopeptidases, qui sont impliquées dans la digestion (Rajagopal 2002, Luo *et al.* 1997), et des molécules, similaires à des cadhérines, qui sont impliquées dans des réactions de liaison cellulaire (Nagamatsu *et al.* 1999, Vladmudi *et al.* 1995).

Après la liaison de la toxine au récepteur, le domaine I se déploie et s'insère de façon irréversible dans la membrane cellulaire. Ce déploiement a pour effet de positionner le domaine III à la surface de la membrane, au-dessus des hélices maintenant insérées (Li *et al.* 2001). La liaison des toxines *Cry* à des récepteurs membranaires spécifiques résultent en l'agrégation de la protéine qui mène à la formation d'un pore sélectif aux ions  $K^+$  dans la double couche lipidique membranaire (Gringorten 2001, Gazit *et al.* 1994).

La formation du pore sélectif aux ions  $K^+$  dans la membrane apicale de la cellule prismatique provoque instantanément des changements physiologiques néfastes pour l'insecte infecté. Ces changements physiologiques entraînent la lyse osmotique de la cellule prismatique, ce qui altère la perméabilité de la barrière intestinale (Whalon et Wingerd 2003, Knowles 1994). Cet éclatement des cellules épithéliales de l'intestin moyen permet aux spores d'accéder à un environnement à pH presque neutre, de poursuivre leur croissance végétative et d'envahir le corps de l'insecte (Whalon et Wingerd 2003).

La majorité des insectes ne meurent pas directement par l'action directe des toxines mais plutôt en raison de la paralysie du système digestif. Cette inhibition du comportement alimentaire favorisera l'infestation de la bactérie dans l'hémocoèle de l'insecte, qui mourra subséquemment d'inanition ou de septicémie et ce, entre 1 et 4 jours après l'ingestion (Gringorten 2001). L'efficacité des formulations utilisées dépend donc de la spécificité des toxines envers la population d'insectes ciblés. Quant à elle, la variété *kurstaki* est caractérisée par la présence des toxines *CryIA*, qui a une toxicité spécifique envers les lépidoptères.

## **1.4 *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki***

### **1.4.1 Description**

La bactérie *B. thuringiensis* var. *kurstaki* se retrouve naturellement dans l'environnement (MEV 2002). Elle est utilisée à travers le monde pour le contrôle des populations de lépidoptères ravageurs. Les produits commerciaux à base de *B. thuringiensis* sont utilisés depuis plus d'une trentaine d'années, partout à travers le monde, pour lutter contre les insectes ravageurs des milieux agricoles, forestiers et urbains. Au Canada, l'Agence de Réglementation de Lutte Antiparasitaire a classé tous les produits à base de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* destinés à être utilisés dans les forêts, les boisés et les secteurs résidentiels dans la catégorie des produits homologués à usage restreint, commercial et domestique (ARLA 2000).

Les préparations de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* sont vendues sous forme de suspension ou de poudre mouillable contenant des spores et des cristaux (MEV 2002). Outre les cristaux de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* utilisées comme ingrédient actif, d'autres ingrédients entrent dans la préparation du produit final. Ces adjuvants incluent normalement de l'eau et des adhésifs qui permettent à la formulation de bien adhérer au feuillage.

### **1.4.2 Innocuité**

#### **1.4.2.1 Toxicologie**

Des études réalisées dans divers pays ont montré qu'aucun des ingrédients entrant dans la fabrication des insecticides à base de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* ne présente des risques significatifs pour la santé humaine, les animaux et l'environnement (ARLA 2000). Selon le Laboratoire de Santé Publique du Québec (LSPQ), l'ensemble des ingrédients entrant dans la composition des produits à base de *Bacillus thuringiensis* ont été évalués et se sont avérés non toxiques aux doses utilisées sur le terrain. Des tests ont montré que même si les différentes toxines sont ingérées par un mammifère, elles sont éliminées sans effets néfastes sur la santé (Lessard et Bolduc 1996). En effet, l'activation des toxines du *B. thuringiensis* requiert des conditions d'alcalinité élevées. L'acidité de l'estomac des humains et des animaux ne permet pas cette activation. En cas d'ingestion ou d'inhalation, les spores du *B. thuringiensis* var.

*kurstaki* sont éliminées sans avoir le moindre effet néfaste pour la santé. Certaines études ont démontré qu'il pouvait y avoir persistance de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* dans les systèmes sanguin et digestif ainsi que dans différents organes (yeux, poumons, foie, rate, reins, cerveaux). Cette persistance durerait de quelques heures à quelques mois mais, rien n'indiquerait que la bactérie pourrait se multiplier dans l'organisme humain ou animal. Les bactéries seraient éliminées de manière semblable à celle des particules inertes (MEV 2002). Depuis que le *B. thuringiensis* var. *kurstaki* est utilisé au Canada, il n'y a eu aucun cas d'intoxication humaine ou animale, non plus de dérèglement des fonctions endocrines répertorié (ARLA 2000).

Des études immunologiques ont indiqué qu'une exposition au *B. thuringiensis* var. *kurstaki* provoque une réaction du système immunitaire et induit l'apparition d'anticorps (Lessard et Bolduc 1996). Cette réaction physiologique du système immunitaire se produit naturellement lorsqu'un corps animal est exposé à un micro-organisme, pathogène ou non. Les risques d'infection peuvent toutefois être possibles chez les organismes immunodéficients. Comme on retrouve la présence d'adjuvants dans les formulations commerciales, ces dernières peuvent être irritantes pour les yeux et la peau. De tels symptômes ont d'ailleurs été observés chez des travailleurs fortement exposés lors des opérations de pulvérisations.

#### **1.4.2.2 Impacts environnementaux**

Les effets possibles de l'application du *B. thuringiensis* var. *kurstaki* sur l'environnement, tels la persistance sur le feuillage, dans le sol et dans l'eau, ont été étudiés par Otvos et Vanderveen (1993). Les principaux facteurs responsables de la dégradation des spores et des cristaux sont l'exposition au soleil, la température et le manque d'humidité (Leong *et al.* 1980). Sous l'action des rayons UV provenant du soleil, les spores et les cristaux produisent du peroxyde et des radicaux peroxyde qui mènent à leur inactivation. Ce phénomène est amplifié lorsque les conditions environnementales sont très sèches (Otvos et Vanderveen 1993). La pluie peut également affecter la persistance du *B. thuringiensis* var. *kurstaki* sur le feuillage en provoquant son lessivage. Selon les conditions, le *B. thuringiensis* perd environ la moitié de son potentiel insecticide en l'espace de 1 à 3 jours mais certains chercheurs ont fait état d'une activité résiduelle pouvant aller jusqu'à 10 jours (Beckwith et Stelzer, 1987). Cette courte demi-vie fait en sorte que le *B. thuringiensis* var. *kurstaki* est moins susceptible que les pesticides chimiques de provoquer un phénomène de résistance chez les insectes ciblés (MEV 2002). Dans le sol, le risque de contamination de l'eau souterraine est inexistant

car le *B. thuringiensis* var. *kurstaki* est considéré comme immobile, il ne s'infiltré que très rarement au-delà des 25 premiers centimètres (MEV 2002, ARLA 2000). De plus, la forme végétative du *B. thuringiensis* n'est généralement pas bien adaptée au sol, dont les conditions ne se prêtent pas au déclenchement du cycle d'activité bactérienne. Sa survie dépend donc de sa capacité à atteindre un habitat spécialisé, soit des insectes vulnérables (MEV 2002, Otvos et Vanderveen 1993). Cependant, les spores de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* possèdent une persistance à long terme, pouvant aller jusqu'à 7 ans après les pulvérisations (MEV 2002). Finalement, le *B. thuringiensis* var. *kurstaki* n'a aucun effet direct sur la qualité de l'eau et il est inoffensif pour la plupart des organismes aquatiques (Otvos et Vanderveen 1993).

L'innocuité du *B. thuringiensis* dans l'environnement est donc établie : quelques souches sauvages sont appliquées à travers le monde depuis plus de quarante ans et ce, sans le moindre incident ou dommage recensé (Otvos et Vanderveen 1993). Étant donné sa spécificité pour les lépidoptères et son innocuité environnementale, le *B. thuringiensis* var. *kurstaki* est un agent de lutte pouvant jouer un rôle primordial dans une stratégie de lutte biologique visant à contrôler les populations d'insectes ravageurs.

### **1.5 *B. thuringiensis* var. *kurstaki* et pyrale des cônes du sapin**

Des études antérieures ont permis de démontrer la susceptibilité de la pyrale des cônes du sapin au *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (Trudel *et al.* 1997). Ces épreuves biologiques réalisées en laboratoire ont démontré la vulnérabilité de la pyrale des cônes du sapin à la souche HD-1 de *B. thuringiensis* var. *kurstaki*. De plus, cette étude a mis en évidence qu'il n'y avait aucune diminution de vulnérabilité entre les différents stades larvaires. En effet, aucune différence significative n'a été observée entre les premier, troisième et cinquième stades larvaires en ce qui a trait à leur concentration létale moyenne (CL<sub>50</sub>) respective.

En milieu naturel, les larves de la pyrale des cônes se développent uniquement à l'intérieur des cônes. Plusieurs d'entre elles peuvent donc être hors de portée de l'insecticide si une seule application est effectuée. Cependant, le comportement exoconophyte caractérisant son développement larvaire fait en sorte que les larves peuvent se retrouver soit à l'intérieur ou à l'extérieur du cône. L'utilisation d'applications multiples à des dates successives pourrait permettre d'atteindre une plus grande proportion d'insectes. Les effets avantageux d'une double application d'une formulation à base de *B. thuringiensis* var. *kurstaki*, ont été

démontrés chez une espèce très apparentée à la pyrale des cônes du sapin, soit la pyrale du sapin, *Dioryctria abietella* (Schiffermuller) (Weslein 1999). En effet, l'auteur a démontré que l'application d'une préparation à base de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* à trois reprises, a significativement réduit le nombre de larves de *D. abietella* retrouvées dans les cônes d'un verger à graines d'épinette de Norvège situé en Suède, en plus d'augmenter significativement le nombre de cônes sains. Une étude antérieure, réalisée par Haverty *et al.* (1986) avait précédemment démontré que l'impact des larves de la pyrale des cônes du sapin sur la production de cônes était grandement diminué avec une double application de Fenvalerate, un insecticide de synthèse maintenant interdit en forêt naturelle.

Les bénéfices d'une application multiple de biocide ont aussi été démontrés chez plusieurs autres espèces d'insectes. Par exemple, Pinkey *et al.* (2000) ont démontré que trois applications successives d'un larvicide biologique à une semaine d'intervalle réduirait significativement l'émergence de moustiques des étangs à l'étude. Shehata *et al.* (1999) ont démontré que trois applications de *B. thuringiensis* optimisent la réduction des dommages occasionnés aux pommiers et aux poiriers par la sésie du pommier [*Synanthedon myopaeformis* (Borkhausen)]. Au Québec, l'avantage d'un tel traitement a été documenté sur la tordeuse des bourgeons de l'épinette. En laboratoire, il a été démontré qu'une double application de *B. thuringiensis* augmentait la mortalité larvaire de 20 à 30% (Moreau et Bauce 2003). Cette seconde application diminue les chances que les larves récupèrent et survivent normalement, ce qui se produit fréquemment lorsqu'une seule exposition est effectuée (Moreau et Bauce 2003, Fast et Régnière 1984). Sur le terrain, des études ont montré que deux applications de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* étaient significativement plus efficaces qu'une seule pour diminuer l'incidence des dommages causés par une population à haute densité de tordeuse des bourgeons de l'épinette (Bauce *et al.* 2004).

## **1.6 Hypothèse et objectifs**

Ce projet consistait à vérifier deux hypothèses. Premièrement, que les dommages occasionnés par la pyrale des cônes entraînait une baisse de la production de graines, ainsi qu'une baisse du potentiel de germination de celles-ci. Cette hypothèse a été testée en évaluant l'impact des dommages occasionnés par la pyrale des cônes du sapin sur la production de graines et sur la germination des graines produites. La seconde hypothèse était que l'application d'une

formulation à base de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* augmentait significativement le niveau de protection d'un verger à graines d'épinette blanche.

Afin de tester cette seconde hypothèse de recherche, trois objectifs ont été fixés :

- 1- Caractériser la souche BMP 123 en la comparant à la souche HD-1, qui fait office de référence pour *B. thuringiensis* var *kurstaki*.
- 2- Évaluer le titre insecticide des souches BMP 123 et HD-1 par des épreuves biologiques effectuées sur des larves de pyrale des cônes du sapin.
- 3- Déterminer le nombre d'applications et la concentration optimale d'une formulation à base de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* à utiliser pour diminuer l'incidence des dommages causés par la pyrale des cônes du sapin présente dans un verger à graines d'épinette blanche.

Le but de ce projet était donc d'élaborer une prescription sur la nature des traitements à appliquer dans une stratégie de lutte contre la pyrale des cônes du sapin.

## Chapitre 2

### Matériel et méthodes

#### 2.1 Évaluation de l'impact des dommages occasionnés par *D. abietivorella*

##### 2.1.1 Provenance des graines

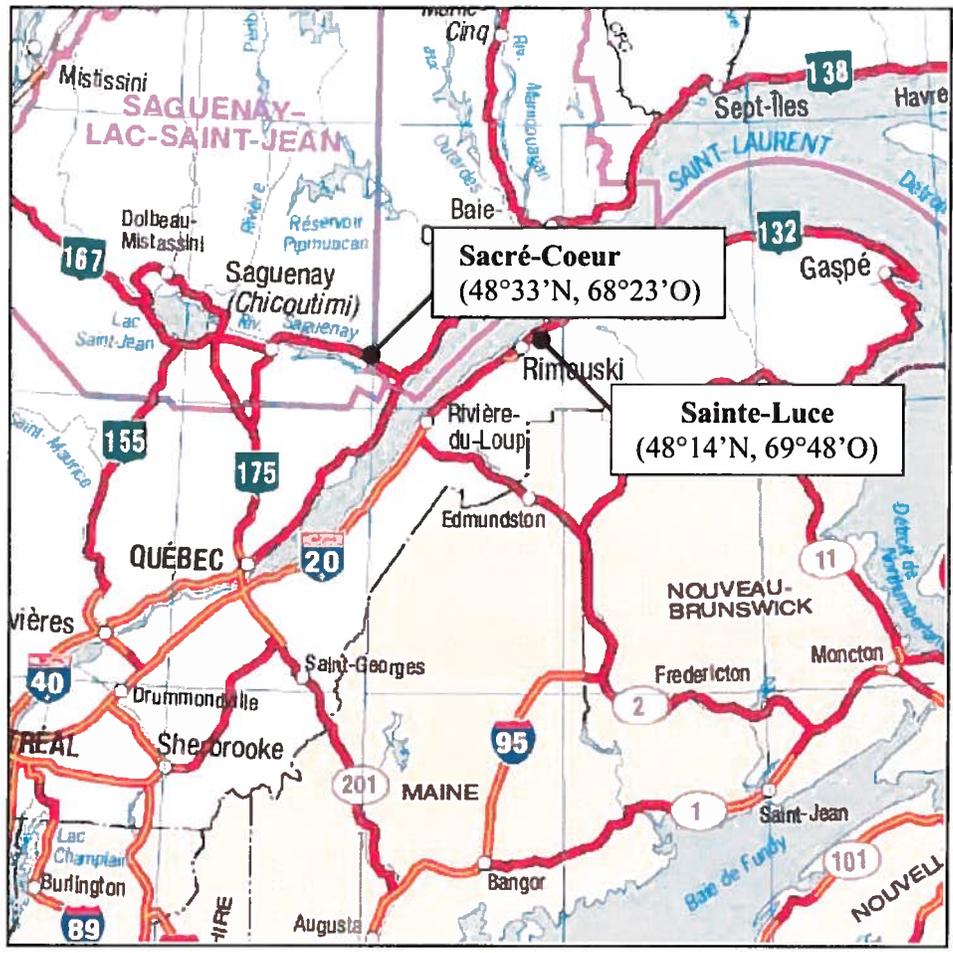
L'étude sur l'impact des dommages occasionnés par la pyrale des cônes du sapin à la production et au potentiel de germination des graines d'épinette blanche a été réalisée au verger à graines Labrosse, situé à Sacré-Cœur, dans la région du Saguenay-Lac Saint-Jean (Figure 5). Afin de soustraire les cônes aux attaques des différents insectes ravageurs, cinquante manchons de nylon ont été disposés sur autant de branches, à raison de 2 manchons par arbre (Figure 6). Cinq larves de pyrale des cônes du sapin ont été introduites à l'intérieur de 25 manchons, les autres manchons étant utilisés comme témoin.

Les cônes ont été récoltés 5 semaines plus tard afin de permettre aux larves de s'alimenter sur ceux-ci. Par la suite, les cônes ont été classifiés selon trois niveaux de dommages, soit peu, moyennement ou fortement endommagés. Cette classification est basée sur la superficie du cône détruite (0%, <50% et >50%). Finalement, les étapes suivantes ont été effectuées pour extraire les graines : séchage par culbutage et ouverture des cônes, extraction des graines, désailage, nettoyage et criblage des graines. Afin de vérifier l'impact de *D. abietivorella* sur la production de graines, les résultats obtenus ont été soumis à une analyse statistique utilisant le test de LSD protégé (SAS Institute 1985). Pour chacun des réplicats, les graines ont été dénombrées et pesées. Les graines ont ensuite été placées en dormance, à une température de  $-5^{\circ}\text{C}$ , pour une durée de 6 semaines.

##### 2.1.2 Stratification des graines

Après cette période de dormance, les graines ont été placées dans de petites bouteilles avec un couvercle perforé, à raison d'un réplicat par bouteille. Les graines ont ensuite été mises en stratification, période qui consiste à interrompre la dormance et à ramollir l'enveloppe de la graine (Forêts Canada 1992). Cette opération a été effectuée en humidifiant les graines

**Figure 5 : Localisation géographique des vergers à graines de Sainte-Luce, situé dans le Bas-Saint-Laurent et de Labrosse, situé à Sacré-Cœur, Saguenay-Lac-Saint-Jean.**



**Figure 6 : Pose de manchons dans le verger à graines de Labrosse afin d'isoler les branches d'épinettes blanches et de limiter l'accès aux cônes aux divers insectes ravageurs. À l'intérieur de chacun des manchons, cinq larves de pyrales des cônes du sapin sont introduites.**



par un trempage à l'eau courante, pendant une durée de 24h.

L'eau a été retirée en secouant les bouteilles, qui ont ensuite été placées au frais ( $T^{\circ} = 4^{\circ}\text{C}$ ), bouchons vers le bas, dans une boîte de plastique pour une durée de 21 jours. Une faible quantité d'eau a été versée au fond de la boîte et le couvercle a été laissé entrouvert.

### **2.1.3 Test de germination**

Les semences ont été placées sur un lit de germination, qui est constitué d'une boîte de plastique (25 cm x 30 cm) dans laquelle du sable de silice humidifié a été déposé (Figure 7). Quinze graines de chaque traitement ont aléatoirement été choisies et placées sur le lit de germination, à raison de dix traitements par boîte. Les boîtes ont ensuite été placées en chambre de croissance pendant une période de 21 jours [ $30^{\circ}\text{C}$ , 16h;  $20^{\circ}\text{C}$ , 8h(L :O)].

Le dénombrement des graines germées a été effectué à tous les 2 jours à partir de la deuxième semaine de germination. Pour être considérée comme ayant germé avec succès, une graine devait atteindre le deuxième stade de germination, soit le stade de gonflement. Ce stade se distingue par un gonflement situé à la jonction de la tige et de la graine. Les plantules ayant atteint le stade de gonflement étaient éliminées du plat de germination afin de faciliter les dénombrements subséquents (Figure 7).

### **2.1.4 Mesure de la valeur germinative et analyse statistique**

Les données recueillies lors des tests de germination des graines d'épinette blanche, en fonction des trois niveaux de dommages, ont permis d'établir le pourcentage de germination relative, la germination moyenne journalière (GMJ), la valeur de pointe où l'indice de germination est maximal ( $IG_{\text{max}}$ ), et la valeur germinative (VG) (Czabator 1962). Cette dernière permet de tenir compte à la fois de la vitesse de germination et du nombre total de graines ayant germées. La germination totale est représentée par la germination moyenne journalière, qui est le pourcentage de graines ayant atteint le stade de gonflement à la fin du test, divisé par la durée du test. La vitesse de germination est exprimée par la valeur de pointe, qui est le quotient maximum provenant de tous les pourcentages cumulatifs divisés par

**Figure 7 : Test de germination A-** Lit de germination composé de sable de silice. Chaque rangée correspond à un traitement. **B** – Gonflement à la jonction de la tige et de la graine correspondant au deuxième stade de germination.

leur nombre de jours écoulés respectif. Les résultats de valeurs germinatives obtenues ont été soumis à une analyse statistique utilisant le test de LSD protégé (SAS Institute 1985).

Le calcul de la valeur germinative s'effectue selon la formule suivante :

$$VG = IG_{\max} * GMJ$$

Où,

$$IG = \frac{\% \text{ cumulatif de graines germées}}{\text{Nbre de jours de germination}}$$

$$GMJ = \frac{\% \text{ cumulatif de graines germées}}{\text{Nbre total de jour de germination}}$$

## **2.2 *Bacillus thuringiensis***

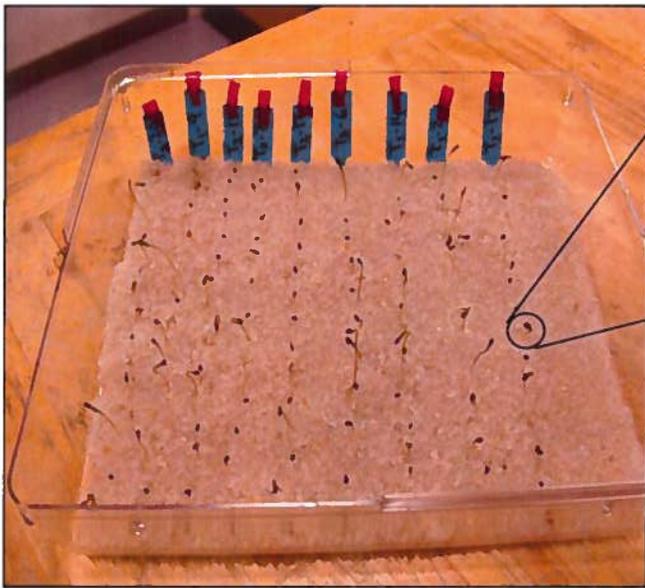
### **2.2.1 Souches**

La souche utilisée au cours de ces travaux appartient à la variété *kurstaki* et est nommée BMP 123, développé par AFA Environnement Inc. de Boischatel, Québec. L'efficacité de celle-ci sera comparée à la souche HD-1 de la bactérie *B. thuringiensis* var. *kurstaki*, souche produite par la compagnie Abbott Laboratories Ltd de Montréal.

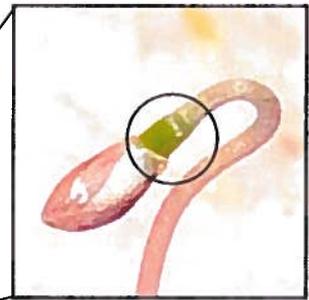
### **2.2.2 Caractérisation des souches de *B. thuringiensis* var. *kurstaki***

#### **2.2.2.1 Culture des souches**

Les deux souches de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* à l'étude ont été mises en culture dans un milieu liquide de type L-Broth et placées à 37°C sous agitation de 225 rpm durant 16 heures (Sambrook *et al.* 1987). Les différentes souches ont ensuite été inoculées sur un milieu LB semi-solide (Sambrook *et al.* 1989) et les boîtes de pétris ont été incubées à 37°C pendant 20 heures. Pour chaque souche, une colonie a été sélectionnée et transférée en milieu liquide selon les mêmes paramètres d'incubation qu'énoncés précédemment.



A



B

### 2.2.2.2 Extraction et purification des ADN plasmidiques

Pour chaque souche de *B. thuringiensis*, l'ADN plasmidique a été extrait. Pour ce faire, un volume de 5 ml des bouillons de culture bactérienne a été prélevé et placé dans un tube Eppendorf pour une centrifugation à 10 000 xg pendant 5 minutes, à la température de la pièce. Le surnageant a ensuite été retiré et le culot obtenu a été resuspendu dans 200 µl de tampon de suspension (Tris-HCl 0,04M; EDTA 2mM; Saccharose 15%; pH 7.9). La lyse des cellules a été effectuée en ajoutant 400 µl de tampon de lyse (SDS 3%; NaOH 0,15M; Saccharose 15%; Tris-HCl 50mM; pH 11,9). Les tubes ont été inversés 20 fois et placés en incubation dans un bain-marie à 60°C pendant 30 minutes. Par la suite, 100 µl de Pronase (2 mg/ml dans Tris-HCl 2M à pH 7) (Biomeda Corporation, USA) ont été ajoutés et le tout a été mélangé par inversion et incubé à 37°C pendant 20 minutes.

L'extraction de l'ADN plasmidique a ensuite été effectuée en ajoutant dans un premier temps 2 volumes de phénol saturé à 350 µl du produit de lyse et en mélangeant par inversion, et ce dans le but d'éliminer les impuretés par l'action déprotéinisante du phénol. La solution a été centrifugée à 10 000 xg pendant 20 minutes, à température de la pièce. La phase phénolique (surnageant) résultant de cette centrifugation a été éliminée et la phase aqueuse contenant l'ADN plasmidique a été transférée dans un tube Eppendorf propre de 1,5 ml. Ensuite, 700 µl de phénol saturé a été ajouté à la phase aqueuse et le tout a été mélangé par inversion. La solution a été par la suite centrifugée à 10 000 xg pendant 20 minutes, à la température de la pièce. Afin d'éliminer toute trace de phénol, la phase aqueuse (surnageant) a ensuite été transférée dans un tube Eppendorf où 750 µl de chloroforme isoanylique 24 : 1 ont été ajoutés. Cette solution a été centrifugée à 10 000 xg pendant 10 minutes, à la température de la pièce, et la phase aqueuse (surnageant) a été transférée dans un tube Eppendorf propre. Un volume égale d'isopropanol a été ajouté et la solution a été incubée 10 minutes à la température de la pièce pour ensuite être soumise à une centrifugation à 10 000 xg pendant 5 minutes, à la température de la pièce. Le surnageant a été éliminé pour effectuer la précipitation de l'ADN plasmidique. Cette précipitation a été effectuée en ajoutant 700 µl d'éthanol maintenu à -20°C et en soumettant cette solution à une centrifugation de 10 000 xg pendant 5 minutes, à la température de la pièce. Le surnageant a été éliminé, le culot d'ADN a été lavé de toute trace d'éthanol puis séché à l'air sous une hotte. Le culot a ensuite été resuspendu dans 50 µl d'eau stérile.

La pureté de l'échantillon d'ADN a été évaluée en utilisant le ratio d'absorbance 260/280 nanomètres. L'absorbance de l'échantillon a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à 260 nanomètres, longueur d'onde où l'on retrouve le pic d'absorbance maximal de l'ADN. L'absorbance a aussi été mesurée à 280 nanomètres, longueur d'onde où est situé le pic d'absorption des protéines. Cette dernière mesure quantifie la présence d'impuretés protéiques. Une solution d'acides nucléiques purs devrait avoir un ratio 260/280 d'environ 1,8 pour l'ADN.

Finalement, la quantité d'ADN plasmidique des deux souches, BMP 123 et HD-1 a été évaluée par analyse par électrophorèse sur gel d'agarose 0,7%. Les échantillons d'ADN bactérien et le marqueur moléculaire 1 Kb (Invitrogen Corporation) ont été dilués dans le tampon de charge (0,25% de bleu de bromophénol, 0,25% de xylène-cyanol et 30% de glycérol). Un volume de 10 µl de chacun des échantillons a été chargé dans les puits du gel d'agarose disposé dans une cellule électrophorétique. Après une migration de 45 minutes à un voltage de 100 V, le gel a été coloré au bromure d'éthidium 0,5%. Les bandes d'ADN ont été visualisées et photographiées en utilisant un transilluminateur ultraviolet (Bio-Rad, Canada).

### **2.2.2.3 Amplification des gènes de type *Cry1A* par PCR**

L'amplification par PCR a été effectuée sur trois gènes codants pour les principales protéines responsables de la pathogénicité de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* pour les lépidoptères. Les amorces spécifiques aux gènes codant pour les  $\delta$ -endotoxines *Cry1Aa*, *Cry1Ab* et *Cry1Ac* utilisées pour l'amplification par PCR ont été élaborées par Kalman *et al.* (1993) (Tableau 2). Pour cette amplification par PCR, trois paires d'amorces ont été sélectionnées, TY1AA/TY1UNI2, TY6/TY14 et TY1AC/TY1UNI2, respectivement spécifiques aux gènes *Cry1Aa*, *Cry1Ab* et *Cry1Ac* (Silva-Werneck *et al.* 1999, Kalman *et al.* 1993).

La réaction de PCR a été effectuée en ajoutant 2 µl d'ADN total à 1 µl de chacune des deux amorces spécifiques, 5 µl de tampon PCR 10X, 1 µl de dNTP et 40 µl d'H<sub>2</sub>O stérile, pour un volume de réaction de 50 µl. Ensuite, 0,2 µl de *Taq* polymérase (Pharmacia) ont été ajoutés. L'amplification par PCR a été effectuée à l'aide d'un thermocycleur GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems, USA) selon les paramètres suivants : dénaturation initiale de

**Tableau 2 : Amorces utilisées pour l'identification des gènes *Cry1A* chez BMP 123  
(Kalman *et al.* 1993)**

<b>Amorce</b>	<b>Séquence (5'-3')</b>	<b>Gène</b>
TYIAA	GAGCCAAGCAGCTGGAGCAGTTTACACC	<i>Cry1Aa</i>
TYIUNI2	ATCACTGAGTCGCTTCGCATGTTTGACTTTCTC	<i>Cry1</i>
TY6	GGTCGTGGCTATATCCTTCGTGTCACAGC	<i>Cry1Ab</i>
TY14	GAATTGCTTTCATAGGCTCCGTC	<i>Cry1Ab</i>
TYIAC	TCACTTCCCATCGACATCTACC	<i>Cry1Ac</i>

l'ADN à 94°C durant 5 minutes, suivie de 35 cycles composés d'une dénaturation de l'ADN matrice à 94°C pendant 15 secondes, d'un appariement des amorces à 45°C pendant 30 secondes et d'une période d'élongation des amorces à 72°C durant 30 secondes. Ces 35 cycles ont été suivis d'une période d'élongation finale de 7 minutes à 72°C dans le but d'obtenir des amplicons de pleine longueur. Un aliquot de 2 µl d'ADN de chaque souche, dilué dans 8 µl de tampon de charge (0,25% de bleu de bromophénol, 0,25% de xylène-cyanol et 30% de glycérol), a finalement été chargé dans les puits d'un gel d'agarose 1%. Après une migration de 45 minutes à un voltage de 100 V, le gel a été coloré au bromure d'éthidium 0,5%. Les bandes d'ADN ont été visualisées et photographiées en utilisant un transilluminateur ultraviolet (Bio-Rad, Canada).

Avant d'effectuer la digestion qui confirmera que les fragments amplifiés correspondent bien aux gènes désirés, les produits de PCR ont été purifiés grâce à la trousse Sephaglas™ BandPrep Kit (Amersham Biosciences). Un volume de 40 µl de chaque produit de PCR a été déposé dans un gel d'agarose 1% pour une migration de 45 minutes à 100 V. Les bandes résultantes de cette migration ont ensuite été visualisées en utilisant un transilluminateur ultraviolet (Bio-Rad, Canada) pour être par la suite découpées à l'aide d'un scalpel. Les bandes, toujours incluses dans une fraction de gel ont été déposées dans des tubes Eppendorf préalablement pesés. Pour chaque microgramme de gel présent dans les tubes, une quantité équivalente, en microlitre, de solution de solubilisation constituée d'iodure de sodium (NaI), a été ajoutée. Les tubes ont ensuite été incubés à 60°C pour une période de 10 minutes. Cinq microlitres de la solution de Sephaglas™ ont été ajoutés dans les tubes pour permettre l'adsorption de l'ADN sur les billes de silice contenues dans cette solution. Les tubes ont par la suite été incubés à la température de la pièce pendant 5 minutes en les agitant périodiquement, pour être subséquemment centrifugés 30 secondes à 10 000 xg. Sans perturber le culot contenant l'ADN amplifié, le surnageant a été éliminé et 80 µl de tampon de lavage (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, 0,1 mM NaCl et éthanol 100%) ont été ajoutés aux tubes pour resuspendre le culot. Les tubes ont ensuite été centrifugés 30 secondes à 10 000 xg et l'étape précédente a été répétée à deux reprises. Après avoir laissé sécher les tubes pendant 10 minutes à l'air libre pour s'assurer de l'évaporation complète de l'éthanol, les culots ont été resuspendus dans 30 µl d'H<sub>2</sub>O et ont été incubés 5 minutes à la température de la pièce. Finalement, une centrifugation de 30 secondes à 10 000 xg a été effectuée pour récupérer le surnageant contenant l'ADN purifié.

#### 2.2.2.4 Digestion enzymatique des amplicons

Les enzymes utilisées pour la digestion des fragments amplifiés ont été sélectionnées à l'aide du logiciel Restriction Mapper (Blaicklok 2005). Le fragment correspondant à *CryIAa* (723 pb) a été digéré par *EcoRI* et *HindIII*. Les produits de digestion de ces enzymes étaient deux fragments de 264 et 459 pb pour *EcoRI* et de 344 et 379 pb pour *HindIII*. Pour le fragment correspondant à *CryIAc* (486 pb), les enzymes utilisées ont été *XhoI* (205 et 281 pb) et *XmnI* (225 et 261 pb) (Blaicklok 2005). Le fragment *CryIAb* de 223 pb n'a pas été digéré en raison des limitations du Sephaglas™ BandPrep Kit, dont la limite inférieure de purification sans perte de l'échantillon se situe aux environs de 200 pb (Amersham Biosciences 2002).

Pour chacun des échantillons, la digestion de l'ADN purifié a été effectuée en mélangeant 1 µl d'enzyme sélectionnée, 1 µl de tampon de digestion 10X, 3 µl d'H<sub>2</sub>O et 5 µl d'ADN purifié. Le tout est ensuite incubé une heure à 37°C pour permettre l'action des enzymes. Les échantillons d'ADN digéré et le marqueur moléculaire 1 Kb (Invitrogen Corporation) ont été dilués dans 10 µl tampon de charge (0,25% de bleu de bromophénol, 0,25% de xylène-cyanol et 30% de glycérol). Un volume total de 20 µl de chacun des échantillons a été chargé dans les puits du gel d'agarose 1,5% disposé dans une cellule électrophorétique. Après une migration de 60 minutes à un voltage de 100 V, le gel a été coloré au bromure d'éthidium 0,5% et les bandes d'ADN ont été visualisées et photographiées en utilisant un transilluminateur ultraviolet (Bio-Rad, Canada).

### 2.3 Titre insecticide de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* contre la pyrale des cônes du sapin

Afin de déterminer le potentiel insecticide des souches BMP 123 et HD-1 et d'évaluer la vulnérabilité de la pyrale des cônes du sapin à ces dernières, le titre insecticide des formulations de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* a été évalué. Pour ce faire, des épreuves biologiques ont été effectuées afin de déterminer la CL<sub>50</sub> de la souche BMP 123 et de la comparer à la souche de référence HD-1. Comme il a été démontré qu'il n'y avait aucune différence significative en ce qui a trait à la vulnérabilité de la pyrale des cônes du sapin au *B. thuringiensis* var. *kurstaki* selon les différents stades larvaires (Trudel *et al.* 1997), des larves de différents stades ont été utilisées aléatoirement pour les divers réplicats.

### **2.3.1 Provenance des larves**

Les larves utilisées pour les épreuves biologiques ont été recueillies grâce à une collecte de cônes d'épinette blanche dans les vergers à graines de Sainte-Luce situé dans le Bas-St-Laurent et de Labrosse situé à Sacré-Coeur, au Saguenay-Lac-Saint-Jean (Figure 5).

### **2.3.2 Préparation de la nourriture artificielle**

La nourriture artificielle utilisée pour l'élevage de la pyrale des cônes du sapin a été préparée selon la recette développée par Trudel *et al.* (1995) (Annexe 2). En bref, l'eau déionisée et l'agar ont été chauffés durant une heure à l'autoclave. Ensuite, après avoir laissé refroidir jusqu'aux environs de 60°C, le reste des ingrédients, soit le germe de blé, les substances protéiques, les sucres, les sels, les vitamines et les solutions anti-fongiques et antibiotiques ont été ajoutés. Le tout a ensuite été homogénéisé en utilisant un mélangeur électrique. Finalement, la nourriture artificielle a été versée dans des contenants de 30 ml (Solo Company, Urbana IL.). Après solidification de la nourriture artificielle, les godets ont été congelés jusqu'à utilisation (Trudel *et al.* 1995).

### **2.3.3 Préparation de la nourriture artificielle pour les épreuves biologiques**

Le titre insecticide a été déterminé en soumettant les larves à six concentrations de chacune des formulations. La souche BMP 123, possédant un potentiel insecticide de 10750 UI/mg a été comparée à la souche HD-1, ayant un potentiel de 16 000 UI/mg. Afin d'uniformiser les épreuves biologiques, les mêmes potentiels insecticides par millilitre de nourriture ont été utilisés. Les séries de six dilutions (Tableau 3) ont ensuite été préparées, chaque dilution étant équivalente à 75% de la dilution précédente (Dulmage *et al.* 1971). Pour chaque dilution, une solution de 20 ml a été créée et ajoutée à 260 ml de nourriture artificielle pour obtenir la concentration escomptée. Par exemple, 2,44 ml (correspondant à 2,5 mg) ont été prélevés à la solution-mère et ajoutée à 17,66 ml d'eau déionisée. Ce volume de 20 ml est ajouté à 260 ml de nourriture artificielle pour obtenir un résultat final de 2,5 mg de *B. thuringiensis* var. *kurstaki*/280 ml de nourriture, ce qui équivaut à 8,92 mg de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* /ml.

**Tableau 3** : Série de dilutions effectuées pour les épreuves biologiques visant à comparer la CL<sub>50</sub> des souches de *B. thuringiensis* var *kurstaki* BMP 123 et HD-1. (Dulmage *et al.* 1971)

<b>Dilution</b>	<b>Potentiel insecticide (UI/mg)</b>	<b>Concentration HD-1 (µg/ml)</b>	<b>Concentration BMP 123 (µg/ml)</b>
1	13440	6,00	8,92
2	10080	4,50	6,69
3	7520	3,38	5,02
4	5640	2,53	3,77
5	4230	1,90	2,83
6	3173	1,42	2,12

Pour les épreuves biologiques, la nourriture artificielle a été préparée selon la méthode décrite précédemment. Cependant, la formaline 10% et l'auroéomycine n'ont pas été incorporés à la nourriture car il a été démontré que certains antibiotiques peuvent inhiber la croissance de *B. thuringiensis* (Ignoffo 1963). Pour incorporer la bactérie dans la nourriture artificielle, celle-ci a été maintenue aux environs de 55°C et a été constamment agitée. Un volume de 260 ml de nourriture artificielle et une solution de 20 ml provenant de la dilution de la solution-mère ont été mélangés pendant une minute. Ensuite, les 280 ml de nourriture artificielle contaminée ont été versés dans trente godets de 30 ml (Solo Company, Urbana, IL), à raison d'environ 10 ml par godet. Pour permettre la solidification de la nourriture, une période d'une heure à la température de la pièce est nécessaire (Trudel *et al.* 1995). L'opération a été répétée pour chacune des concentrations. Pour le témoin, 20 ml d'eau ont été ajoutés à 260 ml de nourriture artificielle. Les groupes de trente godets représentaient chacun un traitement et trois réplicats ont été effectués pour chacune des concentrations. Les godets de chacun des traitements ont finalement été placés sur un plateau distinct.

#### **2.3.4 Épreuves biologiques**

À l'aide d'une pince entomologique, les larves ont été déposées individuellement dans des godets et un couvercle perforé a été apposé. Les godets ont par la suite été placés dans une chambre de croissance à 25°C avec une humidité relative de 60% et une photopériode de 16:8(L:O)h pendant 7 jours. Après cette période d'incubation, le taux de mortalité larvaire a été évalué en fonction des différentes concentrations de *B. thuringiensis* var. *kurstaki*. Une larve était considérée morte lorsqu'elle n'avait aucune réaction au toucher.

#### **2.3.5 Détermination de la CL<sub>50</sub> et analyse statistique**

Le calcul de la CL<sub>50</sub> s'effectue en déterminant le nombre de larves mortes sur les trente de départ et ce, pour chacune des concentrations testées. Les données recueillies sont transformées (logarithme naturel) pour fin d'analyse. La CL<sub>50</sub> a été déterminée par analyse PROBIT (SAS Institute 1985). Celle-ci consiste en une analyse de régression basée sur un modèle logarithmique.

## **2.4 Évaluation des effets de l'application de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* en verger à graines**

### **2.4.1 Effets de l'application multiple sur le niveau de protection**

#### **2.4.1.1 Dispositif expérimental**

Les tests d'efficacité concernant le nombre d'applications ont été effectués dans le verger à graines Labrosse, situé à Sacré-Cœur, dans la région du Saguenay. Un dispositif expérimental en bloc complet aléatoire a été utilisé. Cinq blocs ont été établis, chacun d'eux étant constitué de cinq parcelles auxquelles un traitement était aléatoirement assigné. Chacune des parcelles était composée de cinq arbres choisis aléatoirement, ces derniers devant posséder plus de dix cônes. Chaque bloc était constitué de 25 arbres, pour un total de 125 arbres pour l'ensemble du dispositif expérimental. Dans chacun des blocs, quatre traitements, soit 1, 2, 3 et 4 applications, ont été comparés à une parcelle témoin non-traitée. Chaque unité expérimentale de cinq arbres était séparée par au moins une rangée d'arbres afin d'éviter les effets de dérive des particules aéroportées.

#### **2.4.1.2 Traitement des parcelles**

Les traitements ont été appliqués à l'aide d'un pulvérisateur dorsal motorisé (Annexe 3). Le débit du pulvérisateur a été ajusté pour qu'une application de 10 secondes corresponde à une concentration équivalente à 4 litres/hectares. Le premier arrosage a été effectué lors de l'apparition des premiers stades larvaires et les traitements subséquents ont été appliqués à une semaine d'intervalle. Les traitements ont été appliqués au lever ou à la tombée du jour afin d'éviter la présence de grands vents. Lors de l'application, le produit a été pulvérisé vers la partie centrale de la parcelle de traitement afin d'éviter les effets de dérive.

#### **2.4.1.3 Évaluation du niveau de protection du verger à graines et analyse statistique**

Une récolte aléatoire de 10 cônes de chacun des arbres des différents blocs de traitement a été effectuée sept jours après le dernier traitement dans le but d'évaluer le niveau de protection des cônes du verger à graines d'épinette blanche. Le pourcentage de cônes endommagés, après traitement au *B. thuringiensis* var. *kurstaki*, a été évalué en observant la présence de dommages occasionnés par *D. abietivorella*. Les dommages externes ont été évalués et les cônes ont par la suite été sectionnés en quatre parties pour effectuer la recherche de larve. Un

cône était considéré endommagé lorsque l'on retrouvait la présence d'un amas d'excréments à la surface, la présence de galeries, ou qu'une larve était retrouvée à l'intérieur. L'analyse statistique des résultats obtenus a été effectuée en utilisant la fonction de contrastes polynomiaux de la procédure GLM du logiciel SAS (SAS Institute 1985).

## **2.4.2 Évaluation des effets de la concentration**

### **2.4.2.1 Dispositif expérimental**

Les tests ont été effectués dans les vergers à graines de Labrosse et de Sainte-Luce. Les traitements ont été appliqués selon un plan en bloc complet aléatoire, identique à celui utilisé pour le nombre optimal d'applications (section 2.4.1.1), à la différence que, dans chacun des blocs de traitements, quatre doses de la formulation de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (1, 2, 4, 6 litres/hectares) étaient comparées à un témoin.

### **2.4.2.2 Traitement des parcelles**

Les traitements ont été appliqués selon les mêmes paramètres que le dispositif concernant l'évaluation du nombre d'applications à effectuer, décrits à la section 2.4.1.2. Le débit du pulvérisateur étant ajusté pour qu'une application de 10 secondes corresponde à une concentration équivalente à 1, 2, 4 ou 6 litres/hectares.

### **2.4.2.3 Évaluation du niveau de protection du verger à graines et analyse statistique**

Une récolte aléatoire de 10 cônes de chacun des arbres composant a été effectuée sept jours après le dernier traitement dans le but d'évaluer le niveau de protection des cônes du verger à graines d'épinette blanche. Le pourcentage de cônes endommagés, après traitement avec la préparation à base de *B. thuringiensis* var. *kurstaki*, a été évalué en observant la présence de dommages occasionnés par *D. abietivorella*. Les dommages externes ont été évalués et les cônes sont par la suite sectionnés en quatre parties pour effectuer la recherche de larve. Un cône était considéré endommagé lorsque l'on retrouvait la présence d'un amas d'excréments à la surface, la présence de galeries, ou qu'une larve est retrouvée à l'intérieur. L'analyse statistique des résultats obtenus est effectuée en utilisant la fonction de contrastes polynomiaux de la procédure GLM du logiciel SAS (SAS Institute 1985).

**Tableau 4 : Effets du niveau de dommage occasionné par *D. abietivorella* sur le nombre et le poids des graines des cônes d'épinette blanche.**

<b>Niveau de dommage</b>	<b>Nombre de graines par cône (<math>\pm</math> SD)</b>	<b>Poids des graines (mg <math>\pm</math> SD)</b>
Aucun	40,8 $\pm$ 18,1 <sup>a</sup>	3,15 $\pm$ 0,34 <sup>a</sup>
Faible	37,5 $\pm$ 14,3 <sup>a</sup>	3,06 $\pm$ 0,30 <sup>a</sup>
Élevé	19,1 $\pm$ 3,8 <sup>b</sup>	2,74 $\pm$ 0,18 <sup>b</sup>

Les moyennes présentant des lettres différentes dans une même colonne diffèrent significativement les unes des autres,  $p < 0,05\%$ , ANOVA, test de LSD protégé.

## Chapitre 3

### Résultats

#### 3.1 Évaluation de l'effet des dommages de *D. abietivorella* sur la germination

##### 3.1.1 Effets des dommages sur la production de graines

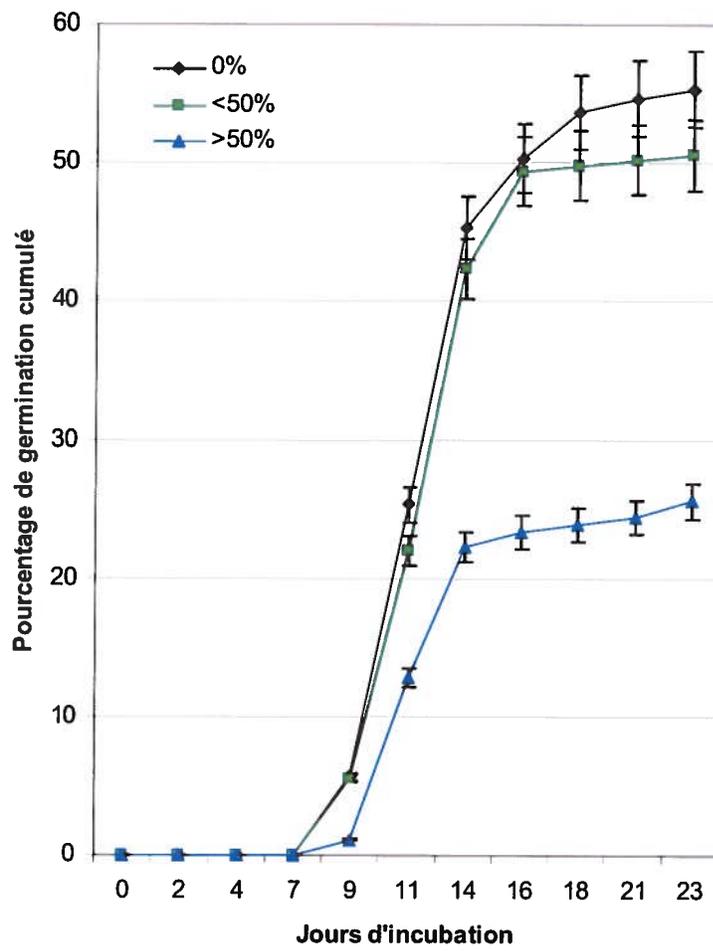
Le nombre de graines produites et leur poids respectif ont été influencés par les différents niveaux de dommages occasionnés par la pyrale des cônes du sapin (Tableau 4). Le nombre total moyen de graines intactes présentes dans les cônes ayant subi peu ou aucun dommage étaient de  $40,8 \pm 18,1$  et de  $37,5 \pm 14,3$  (moyenne  $\pm$  écart-type). Ces résultats sont significativement différents du nombre moyen de graines retrouvées à l'intérieur des cônes ayant été fortement endommagés, avec des valeurs de  $19,1 \pm 3,8$  graines ( $F=9,04$ ;  $dl=2$ ;  $p=0,0005$ ).

Le poids des graines qui proviennent de cônes faiblement endommagés ou n'ayant pas été endommagés, est significativement plus élevé que celui provenant de cônes très endommagés par la pyrale des cônes du sapin ( $F=7,50$ ;  $dl=2$ ;  $p=0,0015$ ). Dans le premier cas, le poids moyen des graines variait entre  $3,06 \pm 0,30$  et  $3,15 \pm 0,34$  mg, comparativement à  $2,74 \pm 0,18$  mg pour les cônes fortement endommagés.

##### 3.1.2 Mesure de la valeur germinative selon le niveau de dommage

La germination des graines provenant de cônes endommagés à divers niveaux par la pyrale des cônes du sapin a été significativement influencée par l'ampleur des dommages (Figure 8). Lorsque les dommages sont faibles ou absents, ils n'affectent pas la germination des graines (Tableau 5). Les cônes présentant peu ou pas de dommages renfermaient des graines qui ont respectivement germé selon des taux de  $50,59 \pm 16,67\%$  et  $55,33 \pm 24,85\%$ . Les graines retrouvées dans les cônes qui étaient endommagés sur plus de deux tiers de leur surface ont quant à elles germé à des pourcentages significativement plus faibles, pour une moyenne de  $25,56 \pm 21,24\%$ . Des différences significatives selon le niveau de dommages ont aussi été observées en ce qui concerne la valeur germinative des graines. Les valeurs germinatives ont varié selon le même patron que les pourcentages cumulatifs de germination.

**Figure 8 : Pourcentage de germination cumulé de graines d'épinette blanche selon les différents niveaux de dommages occasionnés par *D. abietivorella*.**



**Tableau 5** : Effets du niveau de dommage occasionné par *D. abietivorella* sur le taux germination des graines d'épinette blanche germées et sur la valeur germinative.

Niveau de dommage	Pourcentage moyen de germination (% ± SD)	Valeur de pointe (± SD)	Germination moyenne journalière (± SD)	Valeur Germinative (± SD)*
Aucun	55,33 ± 24,85 <sup>a</sup>	3,54 ± 1,46 <sup>a</sup>	2,41 ± 1,08 <sup>a</sup>	9,90 ± 7,08 <sup>a</sup>
Faible	50,59 ± 16,67 <sup>a</sup>	3,13 ± 1,05 <sup>a</sup>	2,20 ± 0,73 <sup>a</sup>	7,54 ± 4,76 <sup>a</sup>
Élevé	25,56 ± 21,24 <sup>b</sup>	1,64 ± 1,26 <sup>b</sup>	1,11 ± 0,92 <sup>b</sup>	2,87 ± 4,61 <sup>b</sup>

\* La valeur germinative moyenne présentée a été calculée pour l'ensemble des réplicats et ne correspond donc pas à la multiplication des valeurs de pointe moyennes et de germination moyenne journalière moyennes présentées dans ce tableau. Les moyennes présentant des lettres différentes dans une même colonne diffèrent significativement,  $p < 0,05\%$ , ANOVA, test de LSD protégé.

Les graines provenant de cônes présentant peu ou pas de dommages montrent une valeur germinative significativement supérieure à celle des cônes ayant été grandement endommagés par la pyrale des cônes du sapin.

On observe une différence significative entre les valeurs de pointe (Tableau 5). Cependant, en décomposant les éléments qui constituent la valeur de pointe, on n'observe aucune différence significative entre les différentes journées correspondant au moment où l'indice de germination a été maximal selon les différents niveaux de dommage ( $F=1,10$ ;  $df=2$ ;  $p=0,3412$ ). La présence d'une différence significative est donc une conséquence directe des pourcentages cumulés de germination.

### **3.2 Caractérisation des souches de *B. thuringiensis* var. *kurstaki***

#### **3.2.1 Comparaison des profils de l'ADN plasmidiques des souches BMP 123 et de HD-1**

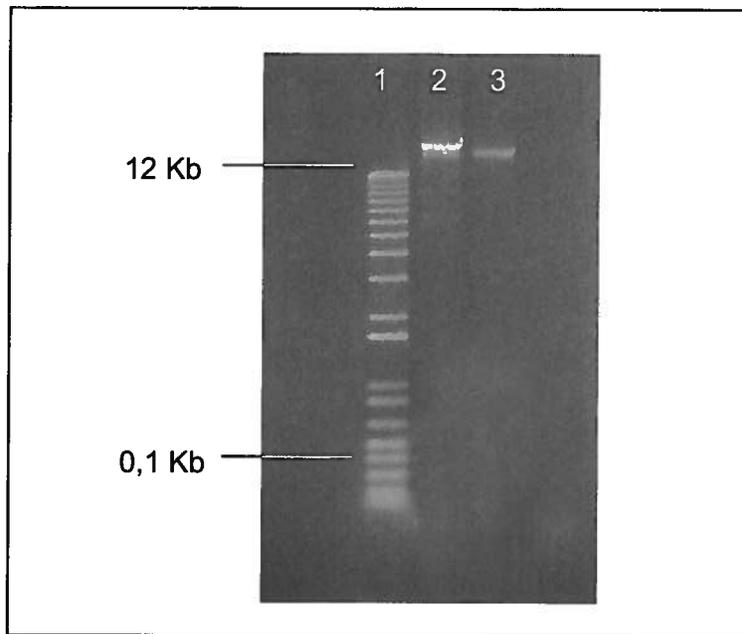
Le profil de l'ADN plasmidique de la souche BMP 123 s'est avéré différent de celui de la souche HD-1 (Figure 9). La visualisation du gel d'agarose a révélé que l'ADN plasmidique de HD-1 comportait un nombre inférieur de paires de bases que celui de BMP 123. L'ADN de BMP 123 a migré sur une plus grande distance dans le gel, les deux souches ayant migrées au-delà de la bande du marqueur de poids moléculaire standard 1Kb correspondant à environ 12 000 paires de bases.

#### **3.2.2 Détection des gènes de type *Cry1A* par amplification par PCR**

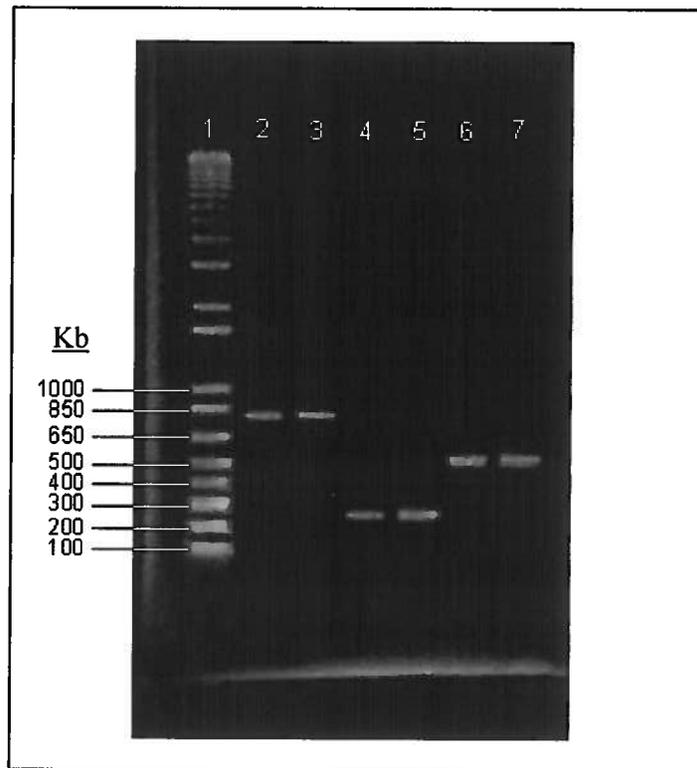
Les produits de PCR de la souche BMP 123 ont été comparés à ceux de la souche HD-1, contenant les gènes *Cry1Aa*, *Cry1Ab* et *Cry1Ac* (Höfte et Whiteley 1989, Ceron *et al.* 1994). La souche HD-1 faisait office de témoin lors de ces manipulations. Les fragments ont été observés après migration sur gel d'agarose. On a donc pu confirmer la présence des fragments correspondant à *Cry1Aa* (723 pb), *Cry1Ab* (223 pb) et *Cry1Ac* (486 pb), qui ont été produits en utilisant les amorces spécifiques à ces gènes, à partir de l'ADN plasmidique des différentes souches (Figure 10).

Finalement, la migration des produits de digestion des fragments obtenus par l'amplification PCR a elle aussi révélée la présence des fragments attendus (Figure 11). En effet, la

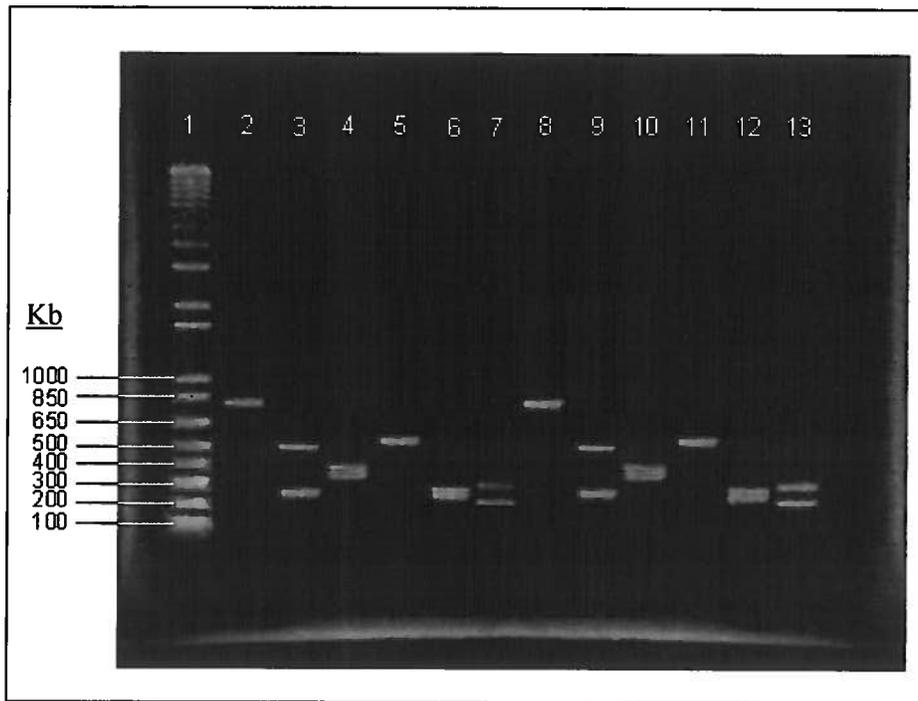
**Figure 9** : Profil plasmidique, par électrophorèse sur gel d'agarose 0.8%, des souches BMP 123 et HD-1 de *B. thuringiensis* var. *kurstaki*. Couloirs de migration : (1) Marqueur de poids moléculaire standard 1Kb, (2) BMP 123, (3) HD-1.



**Figure 10** : Électrophorèse sur gel d'agarose 1% des produits de PCR amplifiés à partir de l'ADN total de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*, souches BMP 123 et HD-1. L'amplification a été effectuée en utilisant les amorces spécifiques pour *CryIAa* (TY1AA/TYIUNI2, puits 2 et 3); *CryIAb* (TY6/TY14, puits 4 et 5); et *CryIAc* (TY1AC/TYIUNI2, puits 6 et 7). Couloir de migration : (1) Marqueur de poids moléculaire standard 1Kb; (2),(4), et (6), souche BMP 123; (3),(5), et (7), souche HD-1.



**Figure 11** : Électrophorèse sur gel d'agarose 1,5% des produits de PCR, après digestion enzymatique, amplifiés à partir de l'ADN total des souches BMP 123 et HD-1 de *B. thuringiensis* var. *kurstaki*. La digestion a été effectuée par les enzymes *EcoRI* et *HindIII* pour *CryIAa* et *XhoI* et *XmnI* pour *CryIAc*. Couloirs de migration : (1) Marqueur de poids moléculaire standard 1Kb; (2) à (7) BMP 123; (8) à (13) HD-1; (2)-(8) *CryIAa* [723 pb]; (3)-(9) *EcoRI* [264, 459 pb]; (4)-(10) *HindIII* [344, 379 pb]; (5)-(11) *CryIAc* [486 pb]; (6)-(12) *XhoI* [205, 281 pb]; (7)-(13) *XmnI* [225, 261 pb].



digestion du fragment *CryIAa*, obtenu grâce aux amorces TYIAA et TYIUNI2, a produit deux fragments possédant respectivement 264 et 459 pb pour *EcoRI* et 344 et 379 pb pour *Hind III*. Le fragment *CryIAc*, obtenus grâce aux amorces TYIAA et TYIUNI2, a mené à la production de fragments possédant 281 et 338 pb pour *XhoI* et 261 et 358 pb pour *XmnI*. Ces résultats confirment donc que les fragments amplifiés par les amorces spécifiques sélectionnées sont véritablement les gènes *CryIAa* et *CryIAc* attendus.

### **3.3 Titre insecticide de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* contre la pyrale des cônes du sapin**

La vulnérabilité de la pyrale des cônes du sapin à *B. thuringiensis* var. *kurstaki* a été documentée et les  $CL_{50}$  des souches BMP 123 et HD-1 ont pu être comparées sur des larves de *D. abietivorella* (Tableau 6). Une  $CL_{50}$  de 2,28 µg de *B. thuringiensis* var. *kurstaki*/ml de nourriture artificielle a été obtenue pour la souche BMP 123, comparativement à 4,33 µg de *B. thuringiensis* var. *kurstaki*/ml pour HD-1.

Les larves ayant succombées à l'entomopathogène étaient légèrement gonflées et présentaient une teinte foncée (Figure 12). Les larves témoins introduites sur de la nourriture artificielle saine ont poursuivi leur développement et des taux de mortalité très faibles ont été observés. Par contre, les taux mortalité des larves ayant été introduites sur de la nourriture artificielle contaminée ont augmenté de façon logarithmique, en fonction de la concentration de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* utilisée. La majorité des larves ayant survécu aux épreuves biologiques étaient amorphes et ont succombé au cours des jours suivants.

### **3.4 Évaluation de la formulation de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* en verger à graines**

#### **3.4.1 Effets des applications multiples**

Parmi les cônes récoltés après l'application des différents traitements, environ 30% étaient complètement desséchés. Ce dessèchement constitue une conséquence directe d'un niveau important de dommages occasionnés par des larves de la mouche granivore de l'épinette. Les dommages occasionnés par ce ravageur des cônes perturbent le système vasculaire du cône, ce qui entraîne le dessèchement hâtif des cônes. Parmi les cônes récoltés, un peu moins de 20% des cônes secs avaient été endommagés par la pyrale des cônes du sapin. Comme cet insecte apparaît tardivement dans la période estivale, les femelles doivent donc orienter leur

**Tableau 6 :** Évaluation de la CL<sub>50</sub> des souches BMP 123 et HD-1 de *B. thuringiensis* var. *kurstaki*, incorporées à une nourriture artificielle, chez les larves de pyrale des cônes du sapin (t =7 jours).

		Concentration (µg/ml)	Intervalles de confiance 95%	
			Limite inférieure	Limite supérieure
BMP 123	CL <sub>10</sub>	0,15	0,01	0,45
	CL <sub>50</sub>	2,29	1,14	3,06
	CL <sub>90</sub>	35,65	17,15	295,17
HD-1	CL <sub>10</sub>	1,25	0,85	1,57
	CL <sub>50</sub>	4,33	3,74	5,30
	CL <sub>90</sub>	20,14	3,16	42,28

**Figure 12 : Larve de la pyrale des cônes du sapin ayant succombée à une ingestion de *B. thuringiensis* var. *kurstaki*.**



Richard Trudel

choix de site de ponte sur des cônes encore verts afin d'assurer un apport de nourriture suffisant à leur progéniture. Pour le traitement des données, seuls les cônes encore verts ont été considérés et ce, dans le but d'éviter un biais causant l'augmentation des pourcentages de dommage.

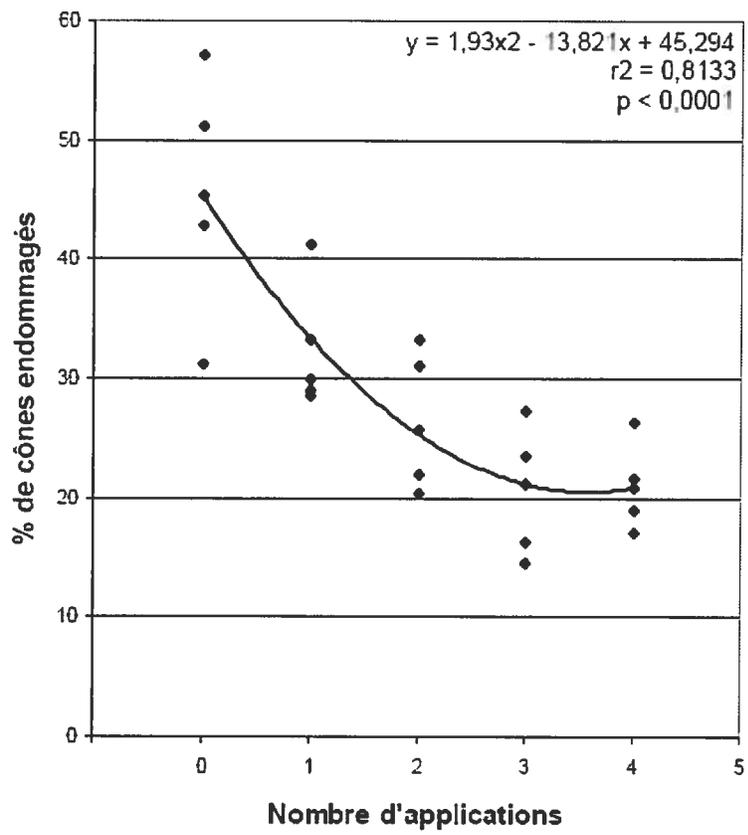
Après analyse statistique, les résultats obtenus lors de l'expérience des applications multiples de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* montrent des résultats significatifs sur le niveau de protection des cônes d'épinette blanche contre les larves de la pyrale des cônes du sapin (Figure 13). Une relation significative est observé entre le nombre de pulvérisations et le pourcentage de cône endommagés ( $F = 15,74$ ;  $dl = 4$ ;  $p < 0,0001$ ). Ainsi, ce pourcentage de cône endommagés diminuera avec le nombre de pulvérisations effectuées (effet linéaire :  $F = 54,88$ ;  $dl = 1$ ;  $p < 0,0001$ ). Dans les parcelles n'ayant pas été traitées, un pourcentage moyen ( $\pm$  SE) de  $45,6 \pm 4,3\%$  de cônes endommagés par la pyrale des cônes du sapin a été observé, par rapport à  $20,6 \pm 2,3$  pour les parcelles arrosées trois fois et  $20,9 \pm 1,6\%$  pour les parcelles pulvérisées quatre fois avec la préparation de *B. thuringiensis* var. *kurstaki*. À partir de la troisième pulvérisation, on peut observer que le pourcentage de cônes endommagés commence à plafonner aux environs de 21% (effet quadratique :  $F = 7,69$ ;  $dl=1$ ;  $p < 0,0136$ ). Ces résultats suggèrent que trois applications successives, à une semaine d'intervalle, assurent une protection efficace du verger à graines d'épinette blanche face à la pyrale des cônes du sapin.

### **3.4.2 Effets de la concentration**

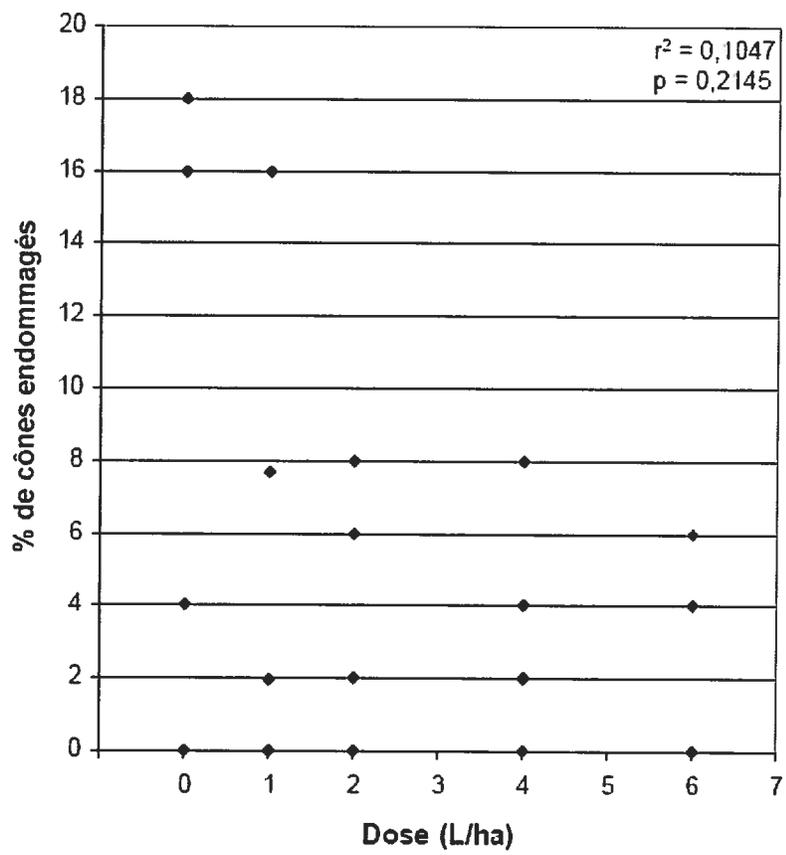
#### **3.4.2.1 Verger à graines de Labrosse, Saguenay**

Les résultats obtenus lors de l'expérience concernant l'utilisation de différentes concentrations d'une préparation à base de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* ne présentent aucune différence significative du niveau de protection des cônes d'épinette blanche contre les larves de la pyrale des cônes du sapin. On peut observer une certaine tendance montrant un effet linéaire entre le pourcentage de cônes endommagés et la concentration utilisée (Figure 14) mais cette relation n'est pas significative ( $F = 1,76$ ;  $dl = 2$ ;  $p = 0,2145$ ). Des explications concernant les causes ayant possiblement influencés ces résultats sont présentées à la section 4.4.2 de la discussion.

**Figure 13** : Effets de l'application multiple d'une formulation à base de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* sur le pourcentage de cônes d'épinette blanche endommagés par *D. abietivorella* dans le verger à graines Labrosse, Saguenay



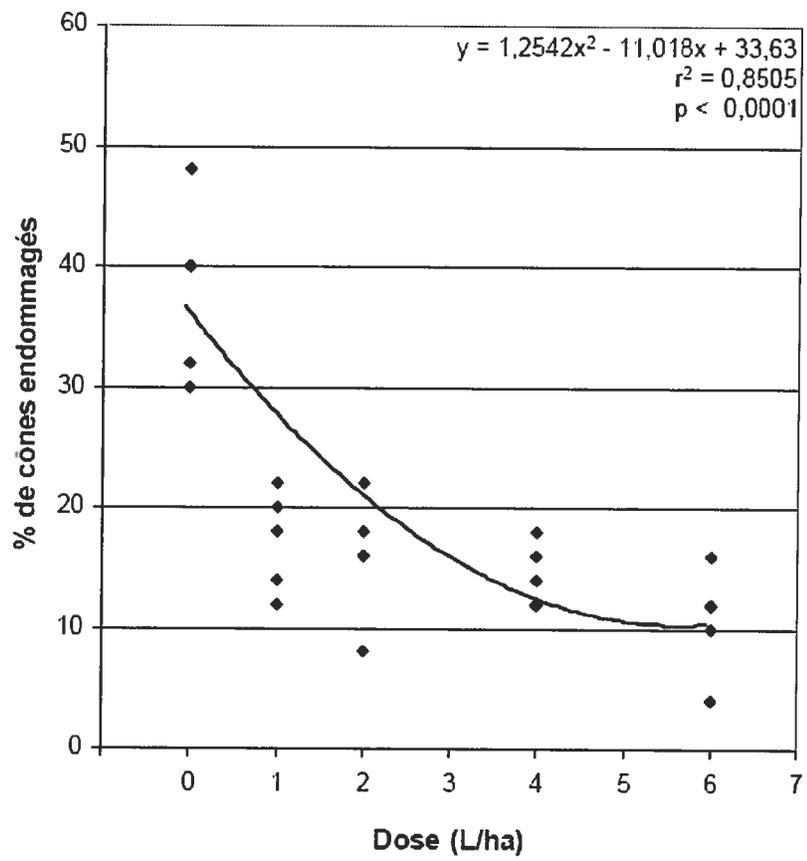
**Figure 14** : Effets de la dose de la formulation à base de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* appliquée sur le pourcentage de cônes d'épinette blanche endommagés par *D. abietivorella* dans le verger à graines Labrosse, Saguenay.



### 3.4.2.2 Verger à graines de Sainte-Luce, Bas-St-Laurent

Des résultats significativement différents du niveau de protection des cônes d'épinette blanche contre les larves de la pyrale des cônes du sapin ont été obtenus lors de l'expérience visant à déterminer la concentration optimale d'une préparation à base de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (Figure 15). On observe ainsi une relation significative entre la concentration appliquée et le pourcentage de cônes endommagés ( $F=21,72$ ;  $dl=4$ ;  $p<0,0001$ ). Ce dernier diminuera donc en fonction de la concentration appliquée sur le terrain (effet linéaire :  $F=48,70$ ;  $dl=1$ ;  $p<0,0001$ ). Dans les parcelles n'ayant pas été traitées, un pourcentage moyen ( $\pm$  SE) de  $38,0 \pm 3,2\%$  de cônes endommagés par la pyrale des cônes du sapin a été observé, par rapport à des pourcentages nettement inférieurs pour les parcelles pulvérisées avec la préparation. Les pourcentages moyens de cônes endommagés des parcelles traitées diminuent donc de façon linéaire, passant de  $17,2 \pm 1,6\%$  pour le traitement d'un litre à l'hectare à  $10,8 \pm 2,0\%$  pour le traitement de six litres à l'hectare. On observe aussi un effet quadratique significatif ( $F=19,27$ ;  $dl=1$ ;  $p=0,0005$ ), ce qui indique que le pourcentage de cônes endommagés commencent à plafonner avec une augmentation de la dose. Ces résultats révèlent que trois applications successives d'une dose supérieure ou égale à un litre à l'hectare, à une semaine d'intervalle, assurent une protection efficace du verger à graines d'épinette blanche contre la pyrale des cônes du sapin. De plus, une augmentation de la dose augmentera le niveau de protection du verger, qui tend à plafonner aux alentours de 11%.

**Figure 15** : Effets de la dose d'une formulation de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* appliquée sur le pourcentage de cônes d'épinette blanche endommagés par *D. abietivorella* dans le verger à graines de Sainte-Luce, Bas-St-Laurent



## Chapitre 4

### Discussion

#### 4.1 Évaluation des effets des dommages de *D. abietivorella* sur la germination

Les résultats obtenus lors de cette étude montrent que les cônes fortement endommagés vont comporter 50% moins de graines et que le poids de ces graines sera de 15% inférieur aux cônes peu ou pas endommagés. Cette réduction de poids peut être due au fait que certains canaux d'alimentation en sève du cône aient été brisés des larves de la pyrale des cônes du sapin, entraînant ainsi une baisse de l'apport de nutriments vers la graine. En raison de ce manque d'éléments nutritifs, la graine n'aurait pu constituer de réserves nutritives maximales, ce qui se refléterait par un poids moyen des graines inférieur (Fenner 1985).

La taille des graines influence directement la croissance des semis. (Scott *et al.* 1974, Hewston 1963). Les graines dont le poids est plus élevé mèneront donc à la production de semis de plus grande taille qui pousseront avec plus de vigueur que ceux provenant de graines plus petites. Les grosses graines offrent donc un avantage physiologique aux jeunes plants car elles leur fournissent une plus grande quantité de nutriments (Schmidt 2000, Sorensen et Cambell 1993). Des résultats similaires ont été observés lors d'une étude sur l'influence de la masse et de la dimension des graines d'épinette noire pour la production de semis en récipients (Walsh et Lord 1996). En effet, les auteurs ont démontré que le pourcentage de survie des semis n'était que de 32% pour les graines ayant une masse inférieure à 0,8 mg, alors qu'il atteignait plus de 80% pour les graines possédant une masse supérieure à 1,3 mg. Ces résultats confirment donc que l'influence des dommages occasionnés par la pyrale des cônes du sapin sur la masse des graines de l'épinette blanche peut directement influencer le taux de survie des jeunes plants.

La présence de dommages importants aux cônes d'épinette blanche a également eu une influence directe sur le potentiel de germination des graines. Cela se traduit par une réduction considérable de près de 50% de leur potentiel de germination par rapport aux semences provenant de cônes n'ayant pas ou peu été endommagés par la pyrale des cônes du sapin. Les valeurs germinatives des trois catégories de dommages ont aussi varié selon ce même patron, tandis que l'analyse des vitesses de germination pour chacun des différents

niveaux de dommage n'a montré aucune différence. Cela suggère que les différences observées au point de vue de la valeur germinative soient dues aux plus grands pourcentages de graines ayant germées, et non à la vitesse à laquelle celles-ci ont germées. Cela est appuyé par l'analyse de la figure 8, correspondant au pourcentage de germination cumulé de graines d'épinette blanche selon les différents niveaux de dommages occasionnés. La différence se situe plutôt au niveau de la germination moyenne journalière, qui varie de la même façon que le pourcentage de germination cumulé, et qui est significativement plus élevé chez les graines provenant de cônes n'ayant subi aucun ou peu de dommages.

Les résultats de ces tests de germination suggèrent que la viabilité des graines provenant de cônes fortement endommagés par la pyrale des cônes du sapin soit grandement diminuée. Comme pour la diminution du poids des graines, cette baisse peut être attribuable à une diminution de l'apport d'éléments nutritifs vers la graine en raison de la destruction des vaisseaux. Il y aurait donc une insuffisance de réserve nutritive, ce qui empêcherait le déclenchement de la germination chez la graine (Fenner 1985). Cela concorde avec les résultats d'études antérieures qui ont démontré que les insectes étaient la cause de mortalité la plus importante durant la phase précédant la dispersion des graines (Turgeon *et al.* 1994). Fenner (1985) a classé l'alimentation des phytophages sur les graines parmi les plus grandes causes de mortalité des ovules et des graines. D'autres études ont démontré que, sous certaines conditions, le potentiel de régénération naturelle des conifères pouvait être significativement réduit par les insectes phytophages s'alimentant de cônes et de graines, dont la pyrale des cônes du sapin (Roques 1988, Mosseler *et al.* 1992). Le comportement alimentaire des larves à l'intérieur des cônes peut ainsi occasionner des dommages considérables, ce qui résulte en des pertes partielles ou complètes du contenu en graines des cônes (Ebel *et al.* 1980). La capacité de germination des graines varie en réponse aux différents niveaux de dommages présents sur les cônes, ce qui se traduit par des différences en ce qui a trait au pourcentage cumulatif de germination, la valeur maximale de l'indice de germination et la valeur germinative.

En combinant les résultats du nombre de graines produites à ceux du pourcentage de germination des graines d'épinette blanche, on peut constater que les graines provenant des cônes fortement endommagés vont produire 50% moins de graines et que, seulement 25% de celles-ci germeront.

La pyrale des cônes du sapin, de par son comportement alimentaire, constitue une menace importante à la productivité et au rendement des vergers à graines d'épinette blanche au Québec. En effet, contrairement aux deux principaux ravageurs des cônes de l'épinette blanche, la pyrale des cônes du sapin peut détruire la totalité des graines d'un cône, en creusant de nombreuses galeries, à travers écailles et graines (Turgeon 1993). La mouche granivore de l'épinette et la tordeuse des graines de l'épinette détruisent quant à elles respectivement 60% et 30%, en moyenne, des graines d'un cône (Alberta Sustainable Resource Development 2003). Il est donc primordial de pouvoir mettre en place une méthode de contrôle des populations de pyrale des cônes du sapin afin d'assurer un approvisionnement en semences viables adéquat pour répondre au besoin de production de plants destinés au reboisement.

#### **4.2 Caractérisation des souches de *B. thuringiensis* var. *kurstaki***

Lors de la comparaison des profils plasmidiques des souches BMP 123 et HD-1, il a été démontré que le poids moléculaire de l'ADN plasmidique de la souche BMP 123 était différent de celui de HD-1. La migration a révélé un plasmide de masse légèrement inférieure chez la souche BMP 123. Ces manipulations ont permis de démontrer que nous étions en présence d'une souche différente de la souche de référence HD-1. Par la suite, l'approche par amplification en chaîne par polymérase, ou PCR, a permis de démontrer que cette nouvelle souche, quoique différente, appartenait bien à la variété *kurstaki*.

L'analyse des produits de PCR amplifiés grâce aux amorces spécifiques aux gènes d'intérêts a démontré que la souche BMP 123 possédait bien les gènes correspondant aux  $\delta$ -endotoxines *CryIAa*, *CryIAb* et *CryIAc*, tout comme la souche HD-1. La spécificité de ces produits a été confirmée en digérant ceux-ci avec diverses enzymes de restriction. Cette digestion a résulté en un patron de migration sur gel d'agarose correspondant aux différents fragments attendus. Cela coïncide donc avec les prévisions établies en début d'expérience et avec différentes études menées sur le sujet (Chang *et al.* 1998, Schnepf 1998).

Plusieurs variétés de *Bacillus thuringiensis* produisent différentes toxines provenant du cristal parasporal. Ces variétés montrent une activité insecticide variable mais particulière aux récepteurs spécifiques de l'intestin moyen des espèces susceptibles (Dorsh *et al.* 2002). Les

souches appartenant à la variété *kurstaki* de *B. thuringiensis* sont reconnues pour synthétiser les  $\delta$ -endotoxines *CryIA*, protéines qui sont spécifiquement toxiques pour les insectes de l'ordre des lépidoptères (Höfte et Whiteley 1989). La souche de référence de la variété *kurstaki*, HD-1, est caractérisée par la présence des gènes *CryIAa*, *CryIAb* et *CryIAc*. Ce sont ces gènes qui sont responsables des propriétés insecticides du corps d'inclusion parasporal cristallin face aux lépidoptères (Li *et al.* 2002). Afin de montrer qu'une souche appartient bien à la variété *kurstaki*, il importe donc de démontrer qu'elle possède bien ces gènes. Cette opération est essentielle si la souche est utilisée dans une formulation destinée à devenir un outil de lutte contre les lépidoptères.

#### **4.3 Titre insecticide de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* contre la pyrale des cônes du sapin**

Les épreuves biologiques effectuées au cours de ce projet ont démontré que la pyrale des cônes du sapin était plus vulnérable à la souche BMP 123 qu'à la souche HD-1. La valeur de  $CL_{50}$  obtenue, soit 2,28  $\mu\text{g/ml}$  de nourriture artificielle, était un peu moins de 50% inférieure à celle obtenue en utilisant la souche HD-1, qui était de 4,23  $\mu\text{g/ml}$ . Des résultats similaires, concernant la souche HD-1, avait été obtenu par Trudel *et al.* (1997). L'état amorphe des larves ayant survécu aux différentes concentrations de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* semble indiquer que celles-ci aurait subi certains dommages au niveau de l'intestin moyen et que leur comportement alimentaire aurait été inhibé par l'action des  $\delta$ -endotoxines (Gringorten 2001). Cette démonstration du pouvoir insecticide supérieur de la souche BMP 123 de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* envers la pyrale des cônes du sapin a permis d'établir que cet entomopathogène serait définitivement un meilleur outil de lutte biologique que la souche HD-1 dans une campagne de pulvérisation dirigée contre les larves de cet insecte dans les vergers à graines.

La paralysie de l'appareil digestif de la larve est due à un bris de l'intégrité de la membrane épithéliale, par l'action des toxines bactériennes, de l'intestin moyen des larves. Ces dernières meurent donc des suites de l'inanition causée par cette paralysie. L'insecte est alors envahi par les spores de *B. thuringiensis* var. *kurstaki*, qui peuvent ainsi se multiplier et germer. C'est la germination des spores du *B. thuringiensis* var. *kurstaki* qui cause le gonflement et la coloration caractéristique des larves mortes (Whalon et Wingerd 2003, Gringorten 2001, Gill *et al.* 1992, Angus 1962).

#### 4.4 Évaluation de la formulation de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* en verger à graines

##### 4.4.1 Effets des applications multiples

En accord avec l'hypothèse de recherche postulée, l'application multiple d'une préparation à base de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* s'est avérée efficace pour augmenter significativement le niveau de protection des cônes d'épinette blanche en verger à graines contre la pyrale des cônes du sapin. En effet, le pourcentage moyen de cônes endommagés par la pyrale des cônes du sapin a diminué de plus de 55%, passant de 45,6% pour les parcelles témoins à 20,6% et 20,9% pour les parcelles ayant été traitées à trois et quatre reprises. Sur la base de ces résultats, l'application de trois traitements avec la formulation à base de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* serait suffisante pour exercer un contrôle efficace des dommages causés par les populations de la pyrale des cônes du sapin dans les vergers à graines. Ces résultats sont en accord avec la littérature. En effet, les effets bénéfiques d'une triple application de *B. thuringiensis* (Turex 50 WP, 25 000 UI/mg) avaient été démontrés chez *D. abietella* (Den. et Schiff.), une espèce très apparentée à la pyrale des cônes du sapin (Weslien 1999). Cette étude, effectuée dans un verger à graines d'épinette de Norvège (*Picea abies* (L.) Karst), avait établi que la présence de dommages occasionnés par *D. abietella* passait de 80%, dans les parcelles non traitées, à un peu moins de 15% dans les parcelles ayant été arrosées 3 fois, à des intervalles de 9 jours. De plus, les avantages d'une application double de fenvalate 0,025%, un pesticide de synthèse à base de pyréthroides maintenant interdit en milieu forestier, avaient été démontrés chez la pyrale des cônes du sapin par Haverty *et al.* (1986) alors qu'ils avaient observé une augmentation de la production de graines par cônes allant de 30 à 127% par rapport aux parcelles non traitées. Finalement, dans le cadre d'opérations de pulvérisations aériennes, il a été observé que deux applications successives de *B. thuringiensis* étaient significativement plus efficaces qu'une seule pour le contrôle de la tordeuse des bourgeons de l'épinette (Auger et Therrien 1993).

##### 4.4.2 Effets de la concentration

Le niveau de protection d'un verger à graines d'épinette blanche contre la pyrale des cônes du sapin a été significativement augmenté par l'accroissement de la concentration d'une préparation à base de *B. thuringiensis* var. *kurstaki*. En effet, le pourcentage moyen de cônes

endommagés occasionnés par la pyrale des cônes des sapins ont été réduits de près du quart dans les parcelles ayant été traitées à trois reprises avec une dose de 6 L/ha.

Cette diminution de cônes endommagés dans les parcelles traitées est un indicateur d'un taux de mortalité accru dans celles-ci. Cette augmentation du niveau de protection des cônes est une conséquence directe de l'application de la formulation de *B. thuringiensis* var. *kurstaki*. Des résultats semblables ont déjà été démontrés chez diverses espèces de lépidoptères. Li *et* Fitzpatrick (1996) ont démontré qu'une augmentation de la dose appliquée de la variété *kurstaki* augmentait significativement la mortalité de la tordeuse à bandes obliques dans les champs de fraises. En forêt naturelle de sapin baumier, Bauce *et al.* (2004) ont démontré que l'augmentation de la dose de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* augmentait la protection du feuillage contre la tordeuse des bourgeons de l'épinette. De plus, ce niveau de protection atteignait lui aussi un plafond lorsque la dose appliquée dépassait les 30 milliards d'UI/ha. Finalement, lors d'essais contre la tordeuse des bourgeons de l'épinette menés en forêt naturelle au Canada et au États-Unis, il s'est avéré qu'une application de 30 milliards de UI de *B. thuringiensis* par hectare était plus efficace que 20 milliards de UI par hectare, particulièrement si les larves sont présentes à haute densité (Morris 1984, van Frankenhuyzen 1995).

En ce qui concerne les résultats obtenus dans le verger à graines de Labrosse, au Saguenay, deux facteurs principaux peuvent expliquer les résultats non significatifs. En effet, en ce qui concerne la production de cônes dans le verger de Labrosse, l'année 2003 a été une année où la quantité de cônes produits a été exceptionnellement élevée. Cette augmentation considérable du nombre de cônes provoque une diminution importante de la probabilité des cônes d'être attaqués par la pyrale des cônes du sapin. Ainsi, dans les parcelles non traitées, on a pu observer un niveau de dommage moyen ( $\pm$  SE) de cônes endommagés de  $45,6 \pm 4,3$  % à l'été 2002, alors qu'il était de  $7,6 \pm 8,7$ % en 2003. Les conditions météorologiques observées durant la période d'arrosage ont aussi pu influencer le rendement des produits appliqués. Les conditions pluvieuses dans la région de Sacré-Coeur pendant la durée de l'expérience, soit lors du mois d'août, ont également pu procéder au lessivage de l'insecticide appliqué sur les cônes. En effet, il est tombé, dans les environs de Sacré-Cœur, un peu plus de 19 mm de précipitations dans les deux jours suivant la première application du 25 juillet 2002, et près de 60 mm dans les cinq jours suivant la dernière application, soit le 11 août 2002 (SMC 2004). Toutefois, considérant les faibles pourcentages d'infestation dans les parcelles

non traitées par rapport à ceux de l'année précédente, la première théorie, concernant la forte production de cônes, semble la plus vraisemblable.

## Conclusion

Le réseau de vergers à graines québécois a été établi dans le but d'améliorer les efforts de reboisement des essences commerciales. Le succès d'une reforestation durable requiert un apport constant de semences de grande qualité. Cet approvisionnement en graines peut être atteint en améliorant le rendement des vergers à graines, ainsi que la qualité des arbres qui les composent. En raison de leur grande productivité, ces sources de semences génétiquement améliorées nécessitent un contrôle efficace des populations d'insectes des cônes pouvant menacer la rentabilité semencière.

La pyrale des cônes du sapin, *D. abietivorella*, occupe une place importante parmi les insectes des cônes pouvant causer des dommages significatifs dans un verger à graines. Bien qu'ayant un impact négligeable dans les peuplements naturels, les populations de pyrales des cônes du sapin peuvent s'établir dans les vergers à graines et compromettre la production semencière. Face à cela, il était donc primordial d'élaborer une stratégie de lutte biologique efficace contre la pyrale des cônes du sapin. Des études antérieures ont démontré le potentiel biocide du *Btk* contre la pyrale des cônes du sapin et qu'aucune différence de vulnérabilité entre les différents stades larvaires n'a été observée.

La présente étude a permis de démontrer que la pyrale des cônes du sapin pouvait avoir un impact négatif sur le rendement en semences des vergers d'épinette blanche. En plus de réduire le nombre de semences disponibles pour la production de plants, son impact se traduit également par une diminution du pouvoir de germination des graines ayant pu être récupérées des cônes fortement endommagés. Grâce au *B. thuringiensis* var. *kurstaki* de souche BMP 123, il est maintenant possible d'élaborer une méthode de contrôle pour réduire les dommages occasionnés par ce ravageur. En effet, les travaux sur la caractérisation moléculaire de cette souche ont révélé qu'elle possédait bien les gènes spécifiques à la variété *kurstaki*, lui conférant son pouvoir insecticide contre les lépidoptères. De plus, la souche BMP 123 s'est avérée présenter un pouvoir insecticide deux fois supérieur à la souche de référence qu'est HD-1.

Finalement, les épreuves de terrain ont permis de vérifier la concentration de produit et le nombre d'applications nécessaires pour le contrôle efficace des populations de pyrale des

cônes du sapin. Il a donc été établi qu'avec la formulation utilisée, trois applications de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* à une concentration égale ou supérieure à 1 L/ha seraient suffisantes pour exercer un contrôle qui diminuerait sous la barre des 20% l'incidence des dommages causés par la pyrale des cônes du sapin, ce qui est en deçà des 30% de pertes raisonnables fixées par les gestionnaires des vergers à graines. Cette incidence pourrait être réduite à près de 10% avec une application de 6 L/ha.

L'atteinte des objectifs de recherche de cette étude rend maintenant possible l'élaboration d'une prescription concernant le contrôle biologique des populations de pyrale des cônes du sapin établies dans les vergers à graines. Selon les ressources disponibles et les besoins en semences, il sera alors possible de faire varier la dose et le nombre de pulvérisation afin d'exercer un contrôle qui saura répondre aux objectifs fixés par les gestionnaires des vergers à graines.

## Bibliographie

ALBERTA SUSTAINABLE RESOURCE DEVELOPMENT. 2003. Annual report: Forest health in Alberta. Department of Sustainable Resource Development, Public Lands and Forests Division, Forest Management Branch, Forest Health Section. Edmonton, Alberta. 44 pp.

ANGUS, T.A., 1962. The biochemistry and mode of action of *Bacillus thuringiensis* (Berliner) and its varieties. Dep. For., Ins. Pathol. Res. Inst., Sault-Ste-Marie, Ont., Canada, No.37, Coll. Int. Pathol. Insectes, Paris, 1962.

ARLA, 2000. Fiche technique sur le *Bacillus thuringiensis* ssp. *kurstaki*. ARLA, Santé Canada, Ottawa. 2 p.

ARONSON, A.I. et Y. Shai, 2001. Why *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins are so effective : unique features of their mode of action. FEMS Microbiology Letters, 195 : 1-8.

ASHER, W.C., 1970. Olfactory response of *Dioryctria abietivorella* (Lepidoptera : Phycitidae) to slash pine cones. Ann. Rev. Entomol. Soc. Am. 63 : 474-476.

AUGER, M. et P. Therrien, 1993. Expertises entomologiques reliées aux pulvérisations aériennes contre la tordeuse des bourgeons de l'épinette au Québec en 1989, Ministère de l'énergie et des Ressources, Direction de la Conservation, Québec, Québec, Canada.

BAUCE, E., N. Carisey, A. Dupont, et K. Van Frankenhuyzen, 2004. *Bacillus thuringiensis* subsp *kurstaki* aerial spray prescriptions for balsam fir stand protection against spruce budworm (Lepidoptera : Tortricidae). J. Econ. Ent. 97 (5): 1624-1634.

BECKER, N. et J. Margalit. 1993. Use of *Bacillus thuringiensis israelensis* against mosquitoes and blackflies. In: *Bacillus thuringiensis*, an environmental biopesticide: theory and practice (Éd. P.F. Entwistle, J.S. Cory, M.J. Bailey et S. Higgs). New York. pp. 147-170.

BECKWITH, R.C. et M.J. Stelzer. 1987. Persistence of *Bacillus thuringiensis* in two formulations applied by helicopter against western spruce budworm (Lepidoptera: Tortricidae) in North Central Oregon. J. Econ. Entomol. 80: 204-207.

BEEGLE C.C., 1985. The bioassay of *Bacillus thuringiensis* based preparation: historical perspectives and current status. USDA-ARS, Ins. Pathol. Res. Unit, Brownsville, Texas.

BEEGLE, C.C., and Yamamoto, T. 1992. History of *Bacillus thuringiensis* Berliner research and development. Can. Entomol. 124: 587-616.

BENNET, R.G., 1994. Cone and Seed Insects of Pines, Spruces and Western Larch. Dans : J.J. Turgeon et P. de Groot [Éd.]. Biology, Damage and Management of Seed Orchards Pests. F.P.M.I. Can. For. Serv., Sault-Sainte-Marie, Ontario, 1-13.

BEEGLE, C.C., 1990. Bioassay methods for quantification of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxine. Dans : L.A. Hickie et W.L. Fitch [éd.]. Analytical chemistry of *Bacillus thuringiensis*. American Chemical Society, Washinton, DC.: 14-21.

BERENBAUM, M.R. 1980. Furanocoumarin chemistry, insect herbivory and coevolution in the Umbelliferae. Cornell Univ., Ithaca, N. Y.

BLAICKLOK, Peter, 2005. RestrictionMapper V.3 : Online restriction mapping. Réss. élec. <http://www.restrictionmapper.org/>

BOISVERT, J., et J. Lacoursière, 2004. Le *Bacillus thuringiensis israelensis* et le contrôle des insectes piqueurs au Québec. Québec, ministère de l'Environnement, Envirodoq no ENV/2004/0278, document préparé par l'Université du Québec à Trois-Rivières pour le ministère de l'Environnement du Québec 101 p.

BOUCIAS, D.G., et J.C. Pendland, 1998. Principles of insect pathology. Kluwer Academic Publisher, Norwell, MA, USA, 537 p.

BRAVO, A., K. Hendrickx, S. Jansen, et M. Peferoen, 1992. Immunocytochemical analysis of specific binding of *Bacillus thuringiensis* insecticidal Crystal proteins to lepidopteran and coleopteran midgut membranes. J. Invertebr. Pathol. 60: 247-253.

BROCKERHOFF, E.G. et G.G. Grant, 1999. Correction for differences in volatility among olfactory stimuli and effect on EAG responses of *Dioryctria abietivorella* to plant volatiles. J. Chem. Eco., 25 : 1353-1367.

BURGES, H.D. et R.A. Daoust, 1986. Current status of the use of bacteria as biocontrol agents. In: Fundamental and applied aspects of invertebrate pathology (Éd: R.A. Samson, J.M. Vlak and D. Peters). Soc. Invertebr. Pathol., Wageningen. pp. 514-517.

CANDAS, M. et L.A. Bulla Jr., 2002. Insecticides, Microbial. Dans : Bitton, G., Encyclopedia of Environmental Microbiology, John Wiley & Sons Inc. New York. 3527 p.

CERON, J., L. Covarrubias, R. Quintero, A. Ortiz, M. Ortiz, E. Aranda, L. Lina et A. Bravo, 1994. PCR analysis of the *cryI* insecticidal crystal family genes from *Bacillus thuringiensis*. Appl. Environ. Microbiol. 60 : 353-356.

CHANG, J.H., J.Y. Roh, Y.H. Je, H.W. Park, B.R. Jin, S.D. Woo, et S.K. Kang, 1998. Isolation of a strain of *Bacillus thuringiensis* ssp. *Kurstaki* HD-1 encoding  $\delta$ -endotoxin CryIE. Lett. Appl. Microbiol. 26:387-390.

CHAPMAN, R.F. 1998. The insects : Structures and functions. Cambridge University Press, London.

CHOMA, C.T. et H. Kaplan, 1992. *Bacillus thuringiensis* crystal protein : effect of chemical modification of the cysteine and lysine residues. J. Invertebr. Pathol. 59 : 75-80

CRICKMORE, N., D.R. Zeigler, E. Schnepf, J. Van Rie, D.Lereclus, J. Baum, A. Bravo, et D.H. Dean, 2005 *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. Réss. élec. [http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil\\_Crickmore/Bt/](http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/)

CRICKMORE, N., D.R. Zeigler, E. Schnepf, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum, A. Bravo, et D.H. Dean, 1998. *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 62: 807-813

CZABATOR, F.J., 1962. Germination value : An index combining speed and completeness of pine seed germination. Forest Sci. 8, 386-396.

DE BARJAC H. 1978. Un nouveau candidat a la lutte biologique contre les moustiques: *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. Entomophaga. 23(4): 309-319.

DEML, R., T. Meise & K. Dettner, 1999. Effects of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxins on food utilization, growth, and survival of selected phytophagous insects. J. of App. Entomol. 123: 55–64.

DORSCH JA, M. Candas, N.B. Griko, W.S.A. Maaty, E.G. Midboe, R.K. Vadlamudi, et L.A. Bulla. 2002. CryIA toxins of *Bacillus thuringiensis* bind specifically to a region adjacent to the membrane-proximal extracellular domain of BT-R-1 in *Manduca sexta*: involvement of a cadherin in the entomopathogenicity of *Bacillus thuringiensis*. Insect Biochem. Mol. and Biol. 32:1025–1036.

DOW, J.A.T., 1986. Insect Midgut Functions. Adv. Insect. Physiol. 19 : 187-238.

DUBOIS, N.R. et F.B. Lewis, 1981. What is *Bacillus thuringiensis*. J. Arboriculture, 7: 233-240.

DULMAGE, H.T., 1970: Insecticidal activity of HD-1, a new isolate of *Bacillus thuringiensis* var. *alesti*. J. Invertebr. Pathol. 15: 232-239.

Dulmage, H. T., O.P Boeing, C.S. Rehnborg, G.D. Hansen, 1971. A proposed standard bioassay for formulations of *B. thuringiensis* based on the international unit. J. Invertebr. Pathol. 18: 240–245.

DULMAGE H.T. et Aizawa K., 1982. Distribution of *Bacillus thuringiensis* in nature. Dans : Microbial and viral pesticides. ed E Kurstak. New-York pp 209-237.

EBEL BH, Flavell TH, Drake LE, Yates III HO, DeBarr GL. 1980. Seed and Cone Insects of Southern Pines. U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Southeastern Forest Experiment Station and Southeastern Area State and Private Forestry. General Technical Report SE-8. 43 p.

ENTWISTLE, F.P., S.J. Cory, J.M. Bailey, S. Higgs, 1993. *Bacillus thuringiensis*, an environmental biopesticide: theory and practice. John Wiley and Sons, Chichester, England. pp. 9-11.

ERIKSSON, U. 1996. Enhancing production of high-quality seed in Swedish conifer breeding. Dissertation. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala. Acta Universitatis Agriculturae Sueciae, Silvestria 12. 45 pp.

- ESCRICHE, B., B. Tabashnik, N. Finson, et J. Ferre, 1995. Immunohistochemical detection of binding of CryIA crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* in highly resistant strains of *Plutella xylostella* (L.) from Hawaii. Biochem. Biophys. Res. Com. 212: 388-395.
- FAST, G.P. et J. Régnière, 1984. Effect of exposure time to *Bacillus thuringiensis* on mortality and recovery of the spruce budworm (Lepidoptera: Tortricidae). Can. Entomol., 116, 123-130.
- FATZINGER, W.H. et E.P. Merkel, 1985. Oviposition and feeding preferences of the southern pine coneworm (Lepidoptera: Pyralidae) for different host plant materials and observations on monoterpenes as an oviposition stimulant. J. Chem. Ecol. 11: 689-699.
- FENNER, M., 1985. Seed ecology. New York, Chapman & Hall. 151 p.
- FERRE, J. et J. Van Rie, 2002. Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. Annu. Rev. Entomol. 47 : 501-533.
- FIDGEN, L.L. et J.D. Sweeney, 1996. Fir coneworm, *Dioryctria abietivorella* (Groté) (Lepidoptera: Pyralidae), prefer cones previously exploited by the spruce cone maggots *Stobilomyia neanthracina* Michelsen and *Stobilomyia appalachensis* Michelsen (Diptera: Anthomyiidae). Can. Ent. 128: 1221-1224.
- FORETS CANADA, 1992. Terminologie de la sylviculture au Canada. Direction générale des sciences et du développement durable. Forêts Canada, Ottawa.
- GARCIA, R., B. DesRochers and W. Tozer. 1981. Studies on *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* against mosquito larvae and other organisms. Proc. and Papers Calif. Mosq. Control Assoc. 49:25-29.
- GAZIT, E., D. Bach, I.D. Kerr, M.S. Sansom, N. Chejanovsky et Y. Shai, 1994. The alpha-5 segment of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin: in vitro activity, ion channel formation and molecular modelling. Biochem J. 304 (3):895-902.
- GILL, S.S., E.A. Cowles et P.V. Pietrantonio, 1992. The Mode of Action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. Ann. Rev. Entomol. 37 : 615-636.
- GOLDBERG, L.J. et J. Margalit. 1977. A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles serengetii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univittatus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*. Mosq. News 37: 355-358.
- GRINGORTEN, J.L., 2001. Ion balance in the Lepidoteran midgut and insecticidal action of *Bacillus thuringiensis* toxins. Dans: Ishaaya, I. [éd.], Biochemical sites of insecticide action and resistance. Springer, Heidelberg, p.167-202.
- GUY, R.H., N.C. Leppla et J.R. Rye, 1985. *Trichoplusia ni*. Dans : P.Singh et R.F Moore [éd.] Handbook of insect rearing, vol.II. USDA, Cotton Production Research Unit, Florence, SC.

- GUYOT, G., 1983. Les effets aérodynamiques et microclimatiques des brise-vent et des aménagements régionaux. INRA de Montfavet, France. Mémoire de la station bioclimatique n°91, 43 p.
- HAAVISTO, V.F. & D.A. Skeates, 1995. Larger black spruce cones produce more and heavier seeds. Natural resources Canada, Canadian Forest Service - Ontario. Technical note 30, 4 p.
- HAVERTY, M.I., P.J. Shea, et L.E. Stipe, 1986. Single and multiple applications of Fenvalerate to protect Western White Pine cones from *Dioryctria abietivorella* (Lepidoptera: Pyralidae). J. Econ. Entomol., 79:158-161.
- HEDLIN, F.A., H.O. Yates III, D.C. Tovar, B.H. Ebel, T.W. Koerber et E.P. Merkel, 1980. Cone and Seed Insects of North American conifers. Canada Forestry Service, Ottawa, Ont. 122 p.
- HEWSTON L.J. 1963. Effects of seed size on germination, emergence and yield of some vegetable crops. MSc Dissertation, University of Birmingham, U.K
- HILL, C.A. et D.E. Pinnock, 1998. Histopathological effects of *Bacillus thuringiensis* on the alimentary canal of the sheep louse, *Bovicola ovis*. J. Invertebr. Pathol. 72: 9-20.
- HODGMAN, T.C. et D.J. Ellar, 1990. Models for the structure and function of the *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxins determined by compilational Analysis. DNA Seq., 1: 97-106.
- HÖFTE, H. et H.R. Whiteley, 1989. Insecticidal Proteins of *Bacillus thuringiensis*. Microbiol. Rev. 53 : 242-255.
- IGNOFFO, C.M., 1963. Sensitivity spectrum of *Bacillus thuringiensis* Berliner to antibiotics, sulfonamides, and other substances. J. Insect Pathol. 5:395-397.
- IVES, W.G.H, et R.H. Wong, 1988. Tree and shrub insects of the prairies provinces. Nor. For. Cent., Can. For. Serv., Inf. Rep. NOR-X-292.
- JENKINS, J.L. et D.H. Dean, 2001. Binding specificity of *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa for purified, native Bombyx mori aminopeptidase N and cadherine-like receptors. BMC Biochemistry 2:1-8.
- JOUNG K.B. and Côté J.C., 2000. Une analyse des incidences environnementales de l'insecticide microbien *Bacillus thuringiensis*. Bull. technique n°29.
- JURAT-FUENTES, J.L., F.L. Gould et M.J. Adang, 2002. Altered glycosylation of 63- and 68-kilodalton microvillar proteins in *Heliotis virescens* correlates with reduced Cry1 toxin binding, decreased pore formation, and increased resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1 toxins, Appl. Environ. Microbiol. 68: 5711-5717.
- KADO, C.I. et S.T. Liu, 1981. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. Journal of Bacteriology 145(3): 1365-1373.

- KALMAN S., K.L. Kiehne, J.L. Libs et T. Yamamoto, 1993. Cloning of a novel cryIC-type gene from a strain of *Bacillus thuringiensis* subsp. *galleriae*. Appl. Environ. Microbiol. 59:1131-1137.
- KNOWLES, B.H., 1994. Mechanism of Action of *Bacillus thuringiensis* Insecticidal  $\delta$ -endotoxins. Advances in Insect Physiology, 24: 275-308.
- KULHAVY, D.L., J.A. Schenk, et T.J. Hudson, 1976. Cone and seed insects of subalpine fir during a year of low cone production in Northern Idaho. J. Entomol. Soc. Brit. Columbia, 73: 25-28.
- LAMONTAGNE, Y., 1992. Vergers à graines de la première génération et tests de descendances implantés au Québec pour les espèces résineuses. Bilan et réalisations. MFO, Direction de la recherche, Sainte-Foy, Québec. Mémoire de recherche forestière 106. 39 p.
- LANE, N.J. , Harrison, J.B. et W.M. Lee, 1989. Changes in microvilli and Golgi-associated membranes of lepidopteran cells induced by an insecticidally active bacterial  $\delta$ -endotoxin. J. Cell. Sci. 93: 337-347.
- LECADET, M.-M. et D. Martouret, 1965. The Enzymatic Hydrolysis of *Bacillus thuringiensis* Berliner Crystals, and the Liberation of Toxic Fractions of Bacterial Origin by the Chyle of *Pieris brassicae* (Linnaeus). J. Invertebr. Pathol., 7 : 105-108.
- LEPPLA, N.C., P.V. Vail, et J.R. Rye, 1984. Mass Rearing of the Cabbage Looper, *Trichoplusia ni*. Dans : E.G. King et N.C. Leppla [éd.] Advances and Challenges in Insect Rearing. USDA – ARS, New Orleans, Louisiana: 223-231.
- LESSARD, S, et D.G. Bolduc, 1996. L'insecticide *Bacillus thuringiensis* et la santé publique, document de support à l'avis de santé publique. Comité de santé environnementale, Institut National de Santé Publique du Québec (INSPQ), Québec, 70 p.
- LI, J., D.J. Derbyshire, B. Promdonkoy et D.J. Ellar, 2001. Structural implications for the transformation of the *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins from water-soluble to membrane-inserted forms. Biochem. Soc. Transact. 29: 571-577.
- LI, J., Carroll, J and D.J. Ellar, 1991. Crystal Structure of Insecticidal  $\delta$ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5Å resolution. Nature, 353: 815-821.
- LI, M.S., Y.H. Je, I.H. Lee, J.H. Chang, J.Y. Roh, H.S. Kim, H.W. Oh, et K.S. Boo, 2002. Isolation and characterization of a strain of *Bacillus thuringiensis* ssp. *kurstaki* containing a new  $\delta$ -endotoxin gene. Current Microbiology. 45:299-302.
- LI, S.Y., et S.M. Fozpatrick, 1996. The effects of application rate and spray volume on efficacy of two formulations of *Bacillus thuringiensis* Berliner var. *kurstaki* against *Choristoneura rosaceana* (Harris) (Lepidoptera: Tortricidae) on raspberries. Can. Ent. 128 (4): 605-612.

- LUO, K. S. Sangadala, I. Masson A. Mazza, R. Brousseau et M.J. Adang, 1997. The *Heliothis virescens* 170 Kda aminopeptidase functions as receptor A by mediating *specific Bacillus thuringiensis* CryIA delta-endotoxin binding and pore formation. Insect. Biochem. Mol. Biol. 27: 735-743.
- LYONS, L.A., 1957. Insects affecting seed production in red pine. II. *Dioryctria dichusa* Heinrich, *D. abietella* (D. & S.), and *D. cambiicola* (Dyard) (Lepidoptera: Phycitidae). Can. Entomol. 89: 70-79.
- MAJORI, G., A. Ali et G. Sabatinelli, 1987. Laboratory and field efficacy of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* and *Bacillus sphaericus* against *Anopheles gambiae* s.l. and *Culex quinquefasciatus* in Ouagadougou, Burkina Faso. J. Am. Mosq. Control Assoc. 3:20-25.
- MARTINEAU, R., 1985. Les insectes nuisibles des forêts de l'Est du Canada. Éd. Broquet Inc. Min. des App. Et Serv. Can. 283 p.
- McMORANM, A., 1965. A systematic diet for the spruce budworm *Choristoneura fumiferana* (Clem.) (Lepidoptera: Pyralidae). J. Econ. Entomol. 88: 606-609.
- MENV, 2002. Répertoire des principaux pesticides utilisés au Québec. Publication du Québec, Montréal, 476 p.
- MFO, 1991. Insectes et maladies des arbres. Québec 1990, Gouvernement du Québec 91-3020. Suppl. For. Conserv. 57, 35 p.
- MOREAU, G. et É. Bauce. 2003. Lethal and sub-lethal effects of single and double application of *Bacillus thuringiensis* variety *kurstaki* on spruce budworm larvae. J. Econ. Entomol. 96(2) 280:286.
- Morris, O. N. 1984. Field response of the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* (Lepidoptera: Tortricidae), to dosage and volume rates of commercial *Bacillus thuringiensis*. Can. Entomol. 116: 983-990.
- MOSSELER, A., B.A. Roberts, et P. Tricco, 1992. The effects of fir coneworm, *Dioryctria abietivorella* (Grote) (Lepidoptera : Pyralidae), on seed production in small isolated populations of red pine, *Pinus resinosa* Ait. Forest Ecology and Management, 53 :15-27.
- MRNQ, 2003. Résultats récents des recherches en reproduction des arbres au Québec. Direction de la recherche, Sainte-Foy, Québec. Note de recherche forestière 119. 8 p.
- MRNQ, 2000. Mise en application de la stratégie de protection des forêts 1995-1999. Direction des programmes forestiers, Sainte-Foy, Québec. 100 p.
- MRNQ, 2000. Insectes, maladies et feux dans les forêts québécoises, en 1999. Portrait statistique – Bilan annuel. Direction de la conservation des forêts, Charlesbourg, Québec.
- MRNQ, 1999. L'amélioration génétique en foresterie : où en sommes-nous ? Actes du colloque tenu à Rivière-du-Loup, 28-30 septembre 1999, Min. Ress. Nat., Dir. Rech. For., 220 p.

MRNQ, 1992. Insectes, maladies et feux dans les forêts québécoises, en 1991. Portrait statistique – Bilan annuel. Direction de la conservation des forêts, Charlesbourg, Québec.

MRNQ, 1991. Insectes, maladies et feux dans les forêts québécoises, en 1990. Portrait statistique – Bilan annuel. Direction de la conservation des forêts, Charlesbourg, Québec.

MULLA, M.S., B.A. Federici et H.A. Darwazeh, 1982. Larvicidal efficacy of *Bacillus thuringiensis* serotype H-14 against stagnant water mosquitoes and its effect on non-target organisms. Environ. Ent. 11:788-795.

MUNROE, E., 1959. Canadian species of *Dioryctria* Zeller (Lepidoptera : Pyralidae). Can. Entomol. 91 : 65-72.

NAGAMATSU, Y, T. Koike, K. Sasaki, A. Yoshimoto, et Y. Furukawa, 1999. The cadherin-like protein is essential to specificity determination and cytotoxic action of the *Bacillus thuringiensis* insecticidal CryIAa toxin. FEBS Letters 460 : 385-390.

OTVOS, I.S. et S. Vanderveen, 1993. Environmental report and current status of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. Use for control of forest and agricultural insect pests. British Columbia Forestry Canada Rep. 80 p.

QUIRION, P. et P. Bourbeau, 1998. Lexique des sciences biologiques. Faculté de sciences et de génie, Presse de l'Université Laval, 764 p.

ROQUES, A., 1988. Impact des insectes ravageurs des cônes et graines sur les potentialités de régénération naturelle des principales essences constituant les forêts d'altitude du Briançonnais. Dans : Régénération naturelle des Forêts d'altitude. Éd. Gensac, P. Chambéry : Université de Chambéry.

RUTH, D.S., 1980. A Guide to Insect Pests in Douglas-fir Seed Orchards. Can. For. Serv., Pac. For. Res. Cent., Victoria, B.C. 63p.

RUTH, D.S., G.E. Miller et J.R. Sutherland, 1982. A Guide to Insect Pests and Diseases in Spruce Seed Orchards in British Columbia. Environ. Can., Can. For. Serv., Pac. For. Res. Cent., Victoria, B.C. 27p.

SAS Institute, 1985. SAS user's guide: statistics, version 5. SAS Institute, Cary, NC.

SAMBROOK, J., E.F. Gritsch et T. Maniatis, 1989. Molecular Cloning : a laboratory manual. 2<sup>ième</sup> édition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA.

SCHMIDT, Lars, 2000. Genetical implications of seed handling. Dans: Guide to Handling of Tropical and Subtropical Forest Seed. Danida Forest Seed Centre, Krogerupvej 21, DK-3050 Humlebaek, Danemark.

SCHNEPF E., N. Crickmore, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum, J. Feitelson, D.R. Ziegler et D.H. Dean, 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62 :775-806.

SCOTT R.K., F. Harper, D.W. Wood et K.W. Jaggard, 1974. Effects of seed size on growth, development and yield of monogerm sugar beet. J. Agric. Sci. 90: 281–288.

SHEHATA, WA, F.N. Nasr, et A.W. Tadros, 1999. Application of some bacterial varieties of *Bacillus thuringiensis* and its bioproduct Delfin on *Synanthedon myopaeformis* Borkh. (Lep. Aegeriidae) in apple orchards. J. Pest Science, 72(5), pp. 129 – 132.

SHU, S., G.G. Grant, D. Langevin, D.A. Lombardo, et L. MacDonald, 1997. Oviposition and electroantennogram responses of *Dioryctria abietivorella* (Lepidoptera: Pyralidae) elicited by monoterpenes and enantiomers of eastern white pine. J. Chem. Ecol. 23: 35-50.

SILVA-WERNECK, J.O., M.T. De-Souza, J.M.C. de S. Dias, et B.M. Ribeiro, 1999. Characterization of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* strain S93 effective against the fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*). Can. J. Microbiol. 45 : 464-471.

SMC, 2004. Archives nationales d'information et de données climatologiques. Ress. élec. <http://www.climate.weatheroffice.ec.gc.ca>

SMIRNOFF, W.A., 1974. The symptoms of infection by *Bacillus thuringiensis* + chitinase formulation in larvae of *Choristoneura fumiferana*. J. Inv. Pathol., 23, 397–399.

SMIRNOFF, W.A. et Valéro, J.R., 1972. Perturbations métaboliques chez *Choristoneura fumiferana* Clemens au cours de l'infection par *Bacillus thuringiensis* seul ou en présence de chitinase. Review of Canadian Biology, 31, 163–169.

SMITH, D. et R.D. Lacewell. 1996. Economic and environmental aspects of crop protection chemicals. Environmental Issue/sustainability Technical Report 96-01 of Agriculture Program, Texas A& M Univ.

SOPFIM, 1992. Programme quinquennal (1993-1997) de pulvérisations aériennes d'insecticides contre certains insectes forestiers. Tome 1 - tordeuse des bourgeons de l'épinette. Étude d'impact sur l'environnement réalisée par Lavalin Environnement (1991) inc. pour la Société de protection des forêts contre les insectes et maladies (SOPFIM), Québec.

STEVENS, R.E., L.D. Merrill et J.W. Koerber, 1988. *Dioryctria albovitella* (Hulst) (Lep., Pyralidae) in shoots and cones of pinyon (*Pinus edulis* Engelm.) in Colorado. J. Appl. Entomol. 105: 387-392.

SORENSEN, F.C. et R.K. Campbell, 1993. Seed weight-seedling size correlation in coastal Douglas-fir: genetic and environmental components. Can. J. For. Res., 23: 2, 275-285.

THOMAS, W.E. et Ellar, D.J., 1983. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* delta-endotoxin. FEBS Lett. 154, 362-368.

TRUDEL, R., É. Bauce, J. Cabana et C. Guertin, 1997. Vulnerability of the Fir Coneworm, *Dioryctria abietivorella* (Grote) (Lepidoptera : Pyralidae), in different larval stages to the HD-1 Strain of *Bacillus thuringiensis*. Can. Entomol. 129 : 187-198.

TRUDEL, R., É. Bauce, J. Cabana et C. Guertin, 1995. Rearing techniques for *Dioryctria abietivorella* (Lepidoptera : Pyralidae). J. Econ. Entomol. 88 : 640-643.

TRUDEL, R., É. Bauce, C. Guertin, et J. Cabana, 1999. Diapause induction and overwintering stage in the Fir Coneworm (Lepidoptera: Pyralidae). Can. Entomol. 131 : 779-786.

TURGEON, J. J., 1994. Insects exploiting seed cones of *Larix* spp., *Picea* spp. and *Pinus* spp.: species richness and patterns of exploitation, pp 15-30. In J. J. Turgeon & P. de Groot [eds.], Biology, damage and management of seed orchard pests. F.P.M.I. Can. For. Serv., Sault Ste-Marie, Ontario.

TURGEON, J.J., 1993. Vergers à graines de conifères : identification des ravageurs et guide de protection. F.P.M.I., Can. For. Serv., Sault-Sainte-Marie, Ontario, 98p. : 59-60.

TURGEON, J.J. et P. De Groot, 1992. Management of insect pests of cones in seed orchards in Eastern Canada. F.P.M.I., Can. For. Serv., Sault-Ste-Marie, Ontario, 98 p.

TURGEON, J.J., A. Roques et P. De Groot, 1994. Insect fauna of coniferous seed cones. Ann. Rev. Entomol. 39 : 179-212.

VAN FRANKENHUYZEN, K., 1995. Development and current status of *Bacillus thuringiensis* for control of defoliating forest insects. Forest Insect Pests in Canada (ed. J. A. Armstrong ET W. G. H. Ives), Canadian Forest Service, Science and Sustainable Development Directorate, Canada. pp. 315–325.

VLADMUDI, R.K., E. Weber, I.H. Ji, T.H. Ji et L.A. Bulla, 1995. Cloning and expression of a receptor for an insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis*. J. Biol. Chem. 270: 5490-5494.

WALSH, D. et D. Lord, 1996. Effets de la masse et de la dimension des graines d'épinette noire (*Picea mariana* [Mill.] B.S.P.) sur le taux de germination et la survie des semis produits en récipients. Rapport présenté au Ministère des Ressources naturelles du Québec (Forêt), bureau de Jonquière, projet no 9 520 263, octobre 1996. 78 p.

WESLEIN, J., 1999. Biological control of the Spruce Coneworm, *Dioryctria abietella*: Spraying with *Bacillus thuringiensis* reduced damage in seed orchard. Scan. J. For. Res. 14 : 127-130.

WHALON, M.E, et B.A. Wingerd, 2003. *Bt*: Mode of action and use. Archives of Insects Biochem. And Phys. 54: 200-211.

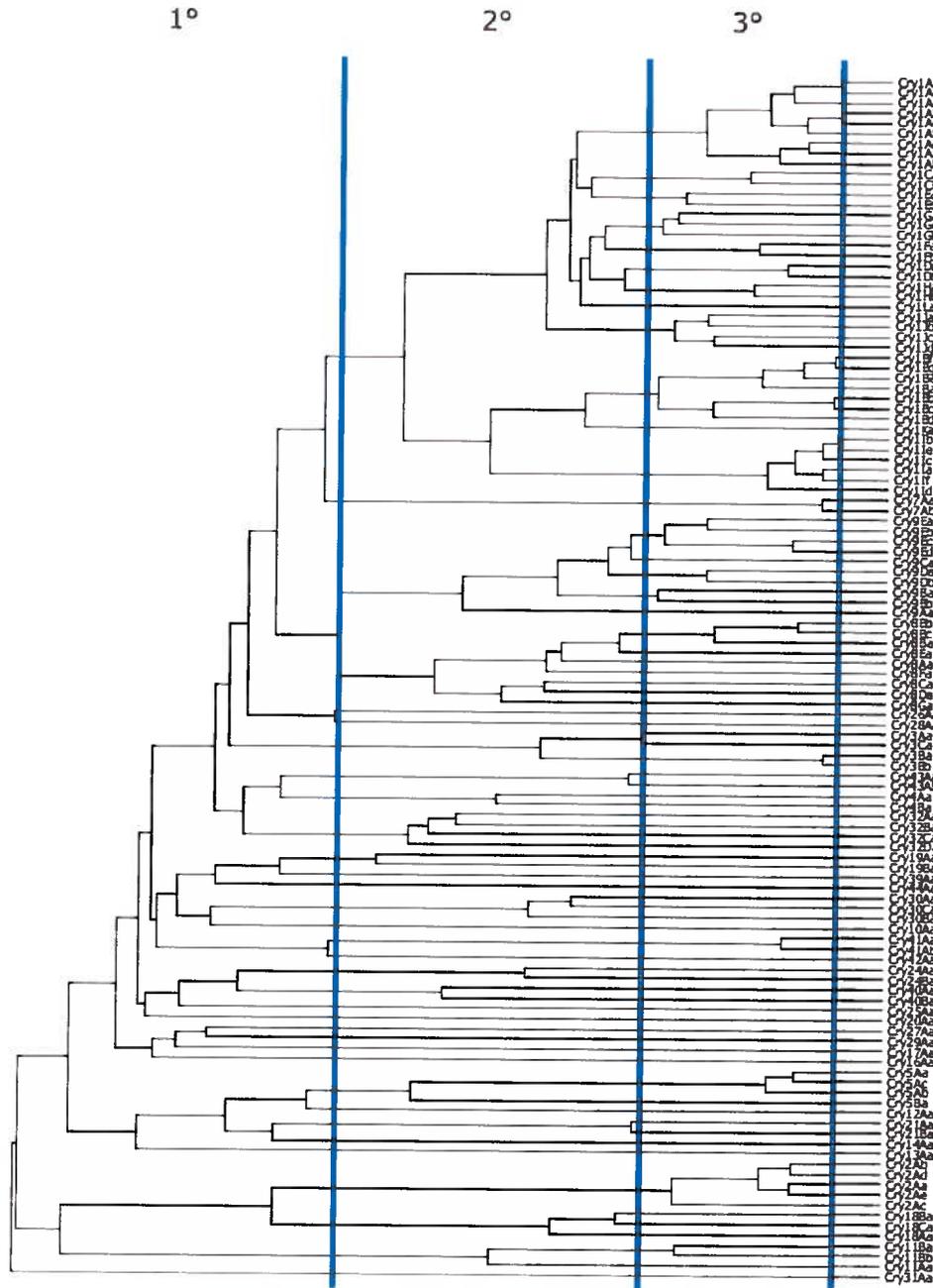
WHITE, B., 2002. Information on *Bacillus thuringiensis kurstaki* (*Btk*). State of Washington Department of Agriculture, Olympia, Washington.

WHO, 1999. Environmental Health Criteria 217 : *Bacillus thuringiensis*. IPCS, WHO, Genève, 105 p.

WIRTH, M.C., A. Delécluse, B.A. Federici, et W.E. Walton, 1998. Variable cross-resistance to Cry11B from *Bacillus thuringiensis* subsp. *jegathesan* in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) resistant to single or multiple toxins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. Appl. Environ. Microbiol. 64: 4174-4179

YUNOVITZ , H., B. Sneh, S. Schuster, U. Oron, M. Broza, et A. Yawetz, 1986. A new sensitive method for determining the toxicity of a highly purified fraction from  $\delta$  endotoxin produced by *Bacillus thuringiensis* var. *entomocidus* on isolated larval midgut of *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera, Noctuidae). J. Invertebr. Pathol. 48: 223-231.

**Annexe 1 : Classification des toxines Cry selon le degré de parenté de leur composition en acides aminés (Crickmore *et al.* 2005, Crickmore *et al.* 1998)**



**Annexe 2 : Composition de la nourriture artificielle de la pyrale des cônes du sapin (Trudel *et al.* 1995)**

Groupe	Ingrédient	Quantité
I	Eau déionisée	1000 ml
	Caséine sans vitamine	35 g
	Alphacel	5 g
	Mélange de sels	10g
	Saccharose	35g
	Germe de blé	44 g
	Chlorure de choline	1 g
	Acide ascorbique	4 g
	Méthyle paraben	1,5 g
	Agar	16,6 g
	Acide sorbique	1,5 g
II	Solution A de vitamine <sup>a</sup>	5 ml
	Solution B de vitamine <sup>b</sup>	5 ml
	KOH 4M	5 ml
III	Formaline 10%	2 ml
	Auréomycine	5,5 ml

<sup>a</sup> 50 mg d'acide folique et 100 mg de riboflavine pour 100 ml d'eau

<sup>b</sup> 20 mg de niacine, 200 mg de pentothénate de calcium, 50 mg de thiamine HCL, 50 mg de pyrodoxine HCL, 4 mg de biotine et 0,4 mg de vitamine B<sub>12</sub> pour 100 ml d'eau

**Annexe 3: Caractéristiques techniques du pulvérisateur dorsal motorisé utilisé pour les applications de la formulation à base de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*.**

---

**STIHL BR400**

---

<b>Capacité du réservoir</b>	14 litres
<b>Volume d'air max.</b>	715 m <sup>3</sup> /h
<b>Débit max.</b>	7500 ml/min.
<b>Portée horizontale</b>	12 m
<b>Portée verticale</b>	11,5 m

---

- **Données de départ**

Arbres:	1 hectare (ha) ≈ 2,500 arbres
Dose:	4 L/ha
Volume/arbre:	1,6 ml/arbre
Dilution de la formulation:	40 ml dans 20 litres H <sub>2</sub> O

- **Applications des traitements**

Débit du pulvérisateur:	94.5 ml/min
Temps de l'application:	8 secondes/arbre

- **Volume final de formulation diluée appliquée : 12,6 ml/arbre**