TECHNIQUES DE LABORATIORE

PATHOLOGIE D'INSECTES

Section III

CONTENU

INTRODUCTION 5

1.TECHNIQUE ASEPTIQUE 7

Sterilisation: 7
Desinfection: 7
Des milieux microbiologiques de croissance: 7
Récipients en verre: 7
Petits ustensiles: 7
Les paillasses de laboratoire: 7

2.STERILISATION DES MILIEUX SOLIDES ET LIQUIDES A L'AIDE DE L'AUTOCLAVE OU DE COCOTTE-MINUTE 8

Stérilisation à l'aide de l'Autoclave 8
Milieux solides 8
Milieux liquides 8
Stérilisation à l'aide de LA Cocotte-minute 8

3.AGAR 9

Agar a l'eau robinet 9
Agar de pomme de terre et dextrose 9
Agar a base de pomme de terre et de carotte 9
Agar a ' extrait de malt 9
Insectes morts depuis longtemps 9

4.CULTURE DE CHAMPIGNONS 9

Utiliser des ballons de Mcartney de 30 ml 9
Inoculation dans les flacons 10
Culture de champignon dans des bouteilles et flacons en verre. 10
Ensemencement du champignon dans des flacons en verre 10
Ensemencement du champignon dans les bouteilles 10

5.LA SECURITE AU LABORATOIRE 11

Responsabilités 11
Vêtements 11
Les produits chimiques 11
Les dangers biologiques 11
Soins médicaux 11

6.MICROSCOPE 12

L'utilisation d'un microscope 12
Making smears 12
Colorant bleu de coton 12
Colorant Giemsa 12

7.DIVERSES TECHNIQUES 13

Determination de la concentration des spores a l'aide de l'hemacitometre 13
Preparation et dilution de solution 13
Montage de la lamelle sur l'hémacitomètre 13
Addition des spores 13
Comptage des spores 13
Calcul de la concentration 13
Calcul de la concentration voulue 13
Test de germination 14
Desechage du petrole 14
Preparation et réutilisation du silica gel 15
Réutilisation du silica gel 15

8.ESSAI BIOLOGIQUE AVEC LES ENTOMOPATHOGENES FONGIQUES CONTRE LES ACRIDIENS 15

Pourquoi faire des essais biologiques? 15
Essais biologiques d'insectes 15
Schistocerca gregaria - en boîtes 15
Les spores 15
L'inoculation 16
Observations 16
Les acridiens - à noter 16

INTRODUCTION

Settee section décrit un certain nombre de techniques qui seront utiles aux entomopathologistes travaillant au laboratoire. La plupart des techniques est déjà connue des pathologistes intervenant dans d'autres domaines.

Les techniques décrites supposent que le pathologiste a accès à un laboratoire raisonnablement bien équipé, y compris autoclave, mocroscope, verrerie et les produits chimiques. Vous trouverez en annexes IV une liste des produits essentiels de base et quelques adresse de fournisseurs.

Veuillez vous référer à la Section II où vous trouveres un guide pour l'identification des principaux champignons qui attaquent les insectes.

1. TECHNIQUE ASEPTIQUE

STERILISATION:

Elimine tout microbe viable d'un élément.

DESINFECTION:

Enlève tout microbe capable d'infecter, mais ne stérilise pas l'objet.

La pureté des cultures de champignons ou de bactéries entomopathogènes destinées à l'utilisation en entomopathologie est de première importance. Cela implique la présence d'un seul microbe - l'entomopathogène en question. La présence de champignons ou de bactéries supplémentaires equivaut a une contamination et les microbes causant la contamination sont connus sous le nom de contaminants.

On utilise la technique aseptique pour manipuler des organismes microscopiques sans introduire de contaminants dans la culture. La technique aseptique protège le technicien de toute infection eventuelle par des organismes pathogènes.

Il est essentiel de toujours employer la technique aseptique pendant une manipulation d'organismes microscopiques et aussi pendant la préparation de milieux destinés à la culture de ces organismes.

TOUT le matériel et les milieux à utiliser au cours de la manipulation de l'organisme microscopique doivent être stériles.

LA STERILITE PARTIELLE N'EXISTE PAS

Il existe plusieurs méthodes de stérilisation. La méthode utilisée dependra du matériel disponible et de l'objet à stériliser. En général, utiliser les méthodes suivantes.

DES MILIEUX MICROBIOLOGIQUES DE CROISSANCE:

Stérilisation par voie humide, normalement à l'aide d'un autoclave (#) mais un cocotte minute ménagère peut servir (#).

1 Chauffer jusqu'à 121ºC et laisser la pression à 15 psi pendant 15-20 minutes.

2 NE PAS remplir à ras les récipients contenant les liquides.

3 Dévisser les bouchons avant de stériliser.

RÉCIPIENTS EN VERRE:

Steriliser comme ci-dessus ou bien dans une etuve (stérilisation par voie sèche) (#) à 160ºC pendant 1-2 heures.

A défaut d'autoclave, de cocotte minute ou de four, il est possible de stériliser en utilisant des produits chimiques tels que des acides ou alcalins forts, des phénols ou de l'oxide d'éthylène.

Toute méthode chimique présente des risques pour le technicien et ne doit être utilisée qu'en cas de nécessité absolue..

On trouve d'autres méthodes de stérilisation à l'aide de produits chimiques dans le Plant Pathologists Pocketbook.

PETITS USTENSILES:

Les baguettes en verre et les outils métalliques se stérilisent très rapidement en les trempant dans de l'éthanol à 70% et en les chauffant a une flamme. Stériliser les fils à ensemencer et les aiguilles en les soumettant à une flamme jusqu'à ce qu'ils deviennent incandescants.

LES PAILLASSES DE LABORATOIRE:

Nettoyer la surface de travail avec de l'alcool ou un desinfectant chimique afin d'eviter toute contamination. NE JAMAIS toucher la paillasse directement avec un objet stérile.

D'autres méthodes de stérilisation existent comme, par exemple, l'irradiation aux rayons UV, ce qui peut être utile pour les paillasses et les salles propres, et l'irradiation aux rayons Gamma, que l'on emploie pour la stérilisation de produits plastiques à échelle industrielle. La filtration, est utilisant des filtres aux pores de 1 nm maximum, est généralement employée pour stériliser de petites quantités de liquides normalement instables à des températures élevées. Toutefois, ces méthodes ne sont employées que rarement dans la manipulaiton d'entomopathogènes.

Utiliser la technique aseptique tout au long de TOUS transferts microbiens.

Assurer que TOUT le matériel est stérilisé en utilisant la méthode appropriée.

QUOI QUE VOUS FASSIEZ

N'UTILISEZ JAMAIS le cabinet pour n'importe quelle manipulation de labo. Il est uniquement destiné aux innoculations et travaux nécessitant un milieu stérile.

NETTOYEZ TOUJOURS le cabinet avant et après chaque utilisation. N'y travaillez surtout pas dans un environnement pollué; les surfaces extérieures des flacons, sachets etc.. sont sources de contamination.

VEILLEZ TOUJOURS à ce qu'il y ait un passage libre pour laisser passer l'air entre le filtre à air et votre travail car tout objet placé devant le filtre pourrait contaminer l'air qui passe.

UTILISEZ TOUJOURS la flamme pour travailler dans le cabinet et pour stériliser les aiguilles bactériologiques et les goulots des flacons avant et après chaque manipulation.

N'OUBLIEZ JAMAIS que si vous employez une procédure stérile, tout ce dont vous vous servez doit être aseptisé. Ne soyez sûr qu'un objet est stérile que si vous l'avez au préalable autoclavé.

VOUS DEVEZ toujours autoclaver les pipettes de 1 ml avant de les utiliser car la boîte restée au labo toute la nuit a inévitablement été contaminée à l'intérieur par les fourmis.

N'OUBLIEZ JAMAIS que vos mains, le cabinet, de même que l'extérieur des flacons et sachets ne sont pas stériles. Vous êtes une source potentielle de contamination.

Prennez surtout votre temps, le processus d'aseptisation est lent et ne peut être hâté; étapes brûlées = CONTAMINATION.

Bon courage

2. STERILISATION DES MILIEUX SOLIDES ET LIQUIDES A L'AIDE DE L'AUTOCLAVE OU DE COCOTTE-MINUTE

- DRY HEAT
- AUTOCLAVE

Les milieux liquide et solide destinés à la production des champignons contiennent le plus souvent des microbes indésirés.Raison pour laquelle il est nécessaire et indispensable de stériliser ces milieux avant leur utilisation

STÉRILISATION À L'AIDE DE L'AUTOCLAVE

Avant toute Opération
Ouvrir l'autoclave puis vérifier si la cuvette est remplie d'eau jusqu'au niveau indiqué; ensuite ouvrir la vane pour faire évacuer l'eau des parois

Après toute Opération
Le bouton "Power" est mis à "Off" dès que l' alarme commence à sonner, puis on attend quelques minutes, le temps que la température et la pression baissent, avant d'ouvrir.

MILIEUX SOLIDES

1 Le milieu est mis soit dans un sachet à stériliser soit dans un objet supportant de grandes tempéraratures et déposé sur le plateau de l'autoclave. Il ne doit pas être fermé hermétiquement.

2 L'autoclave est refermé hermétiquement, le bouton de la température de controle de celle-ci est placé à la position trois (3), puis l'on se rassure que les boutons de "Slow exhaust", et de "Dryer" sont à "Off" .

3 Le bouton du temps est tourné au temps de stérilisation voulue, puis le bouton "Power" est mis à "On" .

MILIEUX LIQUIDES

1 Se rassurer que "slow exhaust", "power" et "dryer" sont à "off".

2 Régler la température contrôle à "low" (LO).

3 Tourner le bouton du temps au temps de stérilisation voulue en tenant compte du temps qu'occupe "Slow exhaust" c'est à dire 20 mn.

4 Ensuite, on met les boutons "power" "slow exhaust", sur "on".

STÉRILISATION À L'AIDE DE LA COCOTTE-MINUTE

1 Une petite quantité d'eau selon la taille de la cocotte est versée dans celle-ci.

2 Le milieu est mis dans la cocotte qui est refermée après sans le bouchon.

3 La casserole est mise sur le feu.

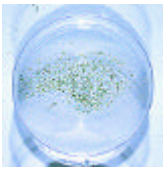
4 Le bouchon est placé dès que la sortie de la vapeur se fait sentir.

5 Et c'est à partir de cet instant que le chronomètre est réglé au temps voulu.

6 A la fin du temps imparti le feu est dimunié, le bouchon enlevé, puis on attend la chutte complète de la température avant d'ouvrir.

3. AGAR

AGAR A L'EAU DU ROBINET



1 Mettre 15 g d'agar et un (1) litre d'eau du robinet dans un ballon de forme conique.

2 Porter à ébullition l'agar dans l'eau jusqu'à sa dissolution.

3 Stériliser à 15 psi pendant 20 minutes.

AGAR DE POMME DE TERRE ET DEXTROSE

Pomme de terre	200 g
Dextrose	20 g
Agar	20 g
Eau du robinet	1 l

1 Prendre 200 g de pommes de terre.

2 Bien nettoyer les pommes de terre - NE PAS LES PELER.

3 Découper les pommes de terre en des cubes de 12 mm.

4 Peser 200g de pommes de terre.

5 Rincer rapidement dans de l'eau courante.

6 Placer dans un (1) litre d'eau.

7 Faire bouillir pendant une (1) heure.

8 Faire une purée et presser le pulpe à travers un tamis fin.

9 Ajouter 20 g d'agar et faire bouillir jusqu'à la dissolution de l'agar.

10 Ajouter 20 g de dextrose et mélanger jusqu'à la dissolution.

11 Ajouter de l'eau pour faire un (1) litre.

12 Steriliser à 15 psi pendant 20 minutes.

AGAR A BASE DE POMME DE TERRE ET DE CAROTTE

C'est un milieu très doux utilisé pour conserver les cultures.

1 Râper 20 g de pomme de terre et 20 g de carotte.

2 Faire bouillir la pomme de terre râpée et la carotte râpé dans un (1) litre d'eau du robinet.

3 Passer dans un tamis fin - NE PAS PRESSER.

4 Ajouter 20 g d'agar au liquide obtenu après tamisage.

5 Chauffer au bain-marie jusqu'à dissolution de l'agar.

6 Stériliser à 15 psi pendant 20 minutes.

AGAR A L'EXTRAIT DE MALTE

1 Faire bouillir 20 g d'extrait de malte dans un (1) litre d'eau jusqu'à dissolution.

2 Ajouter 20 g d'agar.

3 Faire bouillir jusqu'à dissolution de l'agar.

4 Stériliser à 15 psi pendant 20 minutes.

INSECTES MORTS DEPUIS LONGTEMPS

1 Stériliser en surface l'insecte dans de l'hypochlorite de sodium pendant plusieurs minutes.

2 Rincer trois (3) fois dans de l'eau distillée stérile.

3 Disséquer les tissus internes (normalement remplacés par les hyphes du champignon).

4 Appliquer les spores en striures sur plusieurs milieux d'agar contenant des antibiotiques: agar à l'eau du robinet, agar à base de carotte ou de pomme de terre, agar à base d'extrait de malt (#)

5 Incuber à 20-25°C.

6 Examiner toutes les cultures chaque jour au microscope stéréoscopique.

Pour retirer les spores en pleine germination:

1 Découper un cercle dans l'agar.

2 Transférer le bloc de spores sur un milieu frais.

N.B. Si vous trouvez beaucoup d'hyphes, mais peu de dessiccation interne, il y a probablement une infection d'Entomophtorales. Ceux-ci sont difficiles à cultiver sur les milieux d'agar.

4. CULTURE DE CHAMPIGNONS

Culture de champignons dans des flacons et des ballons en verre

TOUJOURS nettoyer et stériliser à l'alcool votre lieu de travail et l'équipement

Pour cultiver le champignon sur des pentes d'agar pour la conservation et le transport:

UTILISER DES BALLONS DE MCARTNEY DE 30 ML

1 Préparez l'agar PCA avec de l'antibiotique (#).

2 Mettez 7 ml d'agar dans les ballons de 30 ml.

3 Passez les ballons à l'autoclave pendant 15 minutes.

4 Inclinez les ballons et laissez-les refroidir.

5 Stérilisez un fil à ensemencer à la flamme (jusqu'à ce qu'il devienne incandescent) et laissez refroidir en appliquant des gouttes d'eau sur le côté du ballon.

6 Prélevez des spores de la culture mère et placez-les sur l'agar à l'intérieur du ballon.

7 Laissez jusqu'à ce que vous puissiez voir le champignon se développer.

8 Fermez le ballon hermétiquement.

9 Couvrez l'agar à l'aide de paraffine liquide stérile pour éviter toute contamination. Si vous désirez conserver le champignon pendant un mois, il suffit de fermer hermétiquement le ballon sans utiliser de paraffine liquide.

10 Placez dans le réfrigérateur.

INOCULATION DANS LES FLACONS

Utilisez des flacons médicaux de 300 ml ou des bouteilles de whisky vides de 700 ml de forme carrée pour une production à moyenne échelle de spores.

1 Préparez l'agar PCA avec de l'antibiotique (#).

2 Mettez 100 ml d'agar dans les bouteilles de 700 ml et 40 ml d'agar dans les flacons de 300 ml.

3 Passez les flacons à l'autoclave pendant 15 minutes.

4 Inclinez les flacons et laissez-les refroidir.

5 Stérilisez un fil à ensemencer à la flamme (jusqu'à ce qu'il devienne incandescent) et refroidissez en appliquant des gouttes d'eau sur le côté du flacon.

6 Prélevez des spores de la culture mère et étalez-les sur l'agar à l'intérieur du flacon.

7 NE PAS fermer hermétiquement les bouteilles tant que la sporulation n'a pas eu lieu.

N.B. Dans ces bouteilles, il n'est pas indispensable d'utiliser de l'agar préparé avec de l'antibiotique.

CULTURE DE CHAMPIGNON DANS DES BOUTEILLES ET FLACONS EN VERRE.

Avant toute opération d' isolation et d' ensemencement

- mettre au propre et stériliser le milieu de travail avec de l' alcool
- stériliser également le matériel à utiliser.

Les champignons sont cultivés dans des flacons en verre (30 ml McCARTNEY bottles) pour la conservation et dans des bouteilles (300 ml medical flats ou 700 ml bouteilles de whisky) pour la production des spores à moyenne échelle .

ENSEMENCEMENT DU CHAMPIGNON DANS DES FLACONS EN VERRE

1 Mettre 7 ml d'agar (PCA de préférence) déja préparé avec de l' antibiotique dans les flacons de 30 ml ensuite les autoclaver pendant 15 mn .

2 Incliner les flacons et les laisser refroidir

3 A l'aide du fil à ensemencer porté au rouge sur une flamme et refroidi avec les gouttes d' eau sur la paroi du flacon, prélever les spores de la culture propre et les faire passer sur l'agar contenu dans le flacon

4 Après ensemencement ne pas fermer hermétiquement le flacon

5 Laisser pousser jusqu' à l'apparution des spores du champignon.

6 Afin de lutter contre les acariens et autres parasites remplir les flacons avec de la paraffine jusqu' au bord supérieur de l' agar. Pour une conservation de courte durée (< 1 mois) il suffira de bien serrer le couvercle du flacon sans un apport de paraffine .

7 Conserver l' ensemble au réfrigirateur.

ENSEMENCEMENT DU CHAMPIGNON DANS LES BOUTEILLES

1 Autoclaver les bouteilles et l' agar déja dissout

2 Mettre 100 ml et 40 ml d' agar (ex: SDA, MA) respectivement dans les bouteilles de 700 ml et 300 ml.

3 les incliner et les laisser refroidir

4 Ensemencer l' agar dans les bouteilles de la même manière que dans les flacons.

5 Ne pas fermer hermétiquement les bouteilles jusqu' à sporulation

N.B. Pour les bouteilles il n' est pas nécessaire d'utiliser de l'agar avec de l'antibiotique .

5. LA SECURITE AU LABORATOIRE

Dans un laboratoire:

DEFENSE DE FUMER

DEFENSE DE MANGER

DEFENSE DE BOIRE

Conseil:

INSTALLATIONS D'ABLUTIONS

INSTALLATIONS D'EVACUATION

RESPONSABILITÉS

Le surveillant du laboratoire doit assurer que:

1 Le laboratoire est un lieu de travail sans danger.

2 Le matériel ne présente aucun danger.

3 Tous les techniciens sont conscients des dangers.

4 Tous les techniciens sont bien formés pour le travail qu'il doivent accomplir.

5 Il doit aussi assumer la responsabilité pour tous les produits chimiques.

Les techniciens sont responsables de:

1 La propreté et rangement des paillasses.

2 La propreté des sols.

3 Le nettoyage et la conservation adéquats de la verrerie.

4 La conservation en lieu sûr des produits chimiques (placards, magasins).

5 L'entretien du matériel.

VÊTEMENTS

Les techniciens doivent toujours porter des vêtements protecteurs appropriés.

Porter une blouse de laboratoire (toutefois, cela ne sera pas pratique si la température ambiante est élevée).

Porter des masques pendant les manipulations de poudres.

Porter des gants pendant l'utilisation de produits chimiques.

LES PRODUITS CHIMIQUES

TOUJOURS lire l'étiquette sur le récipient.

1 Fond orange avec une croix noire: nocif.

2 Fond orange avec tête de mort: toxique.

3 Fond orange avec une flamme noire: inflammable.

4 Fond orange avec un trait ou une main noir attaqué: corrosif.

Parfois il y a des avertissements écrits MAIS souvent ils ne sont que dans une langue e.g.

Harmful solid! Target organ: Nerves!; Possible teratogen*!

NE PAS OUBLIER de garder une liste de produits chimiques et des dangers associés à ces produits.

NE JAMAIS conserver des produits chimiques dans d'autres récipients que le récipient d'origine, avec l'étiquette appropriée .

NE PAS OUBLIER de toujours garder les produits chimiques inflammables ou toxiques dans un placard fermé à clef.

LES DANGERS BIOLOGIQUES

Les champignons entomopathogènes utilisés dans la lutte contre les acridiens ne présentent aucun risque, TOUTEFOIS, le produit peut présenter quelques problèmes par exemple, d'allergie ou s'il est inhalé. Certains organismes contaminants comme *Aspergillus spp*. sont nocifs. Il est impératif que les techniciens reconnaissent et éliminent les contaminants de manière sûre.

Assurer TOUJOURS la propreté des paillases du matériel et des vêtements protecteurs .

SOINS MÉDICAUX

Garder TOUJOURS le matériel des soins médicaux dans un lieu sûr, visible par tous et en vérifier le contenu régulièrement.

Il est ESSENTIEL qu'une personne (au moins) dans le laboratoire soit formée en techniques de soins médicaux primaires.

Garder une anti-dote pour chaque produit chimique dangereux.

6. MICROSCOPE

L'UTILISATION D'UN MICROSCOPE

1 Asseyez vous confortablement.

2 Allumer le microscope et vérifier que la lumière fonctionne.

3 Placer une feuille fine de papier hygiénique sur une lame et couvrez la lame soigneusement.

4 Vérifier que l'objectif le plus faible est en place.

5 Régler les oculaires afin de trouver une position confortable.

6 Régler la mise au point en descendant l'objectif près de la lame, tout en regardant par le côté. Puis regarder par le microscope et régler doucement jusqu'à ce que la mise au point soit parfaite.

7 En suite régler le condensateur pour que l'auréole de luminosité sur le papier soit mise au point.

8 Fermer le condensateur pour que le bord soit visible par le microscope et mettre au point sur le bord.

9 Le bord du condensateur doit être centré dans le champ de vision. Sinon rapportez-vous au manuel du fabriquant du microscope.

10 Passer maintenant à un objectif plus fort et répéter la mise au point de l'objectif et du condensateur.

11 Observer toujours des spécimens avec le condensateur en dehors du champ de vision. Régler les niveaux de luminosité en utilisant l'interrupteur.

Prenez votre temps! Régler le microscope comme vous le désirez. Il est probable qu'il faudra régler le microscope chaque fois qu'une autre personne l'utilise.

MAKING SMEARS

0,02 Tampon de Phosphate

Solution A:

1 Prendre 28,39 grammes de Na_2HPO_4.

2 Ajouter de l'eau distillée jusqu'à faire un (1) litre de solution.(0,2M).

Solution B:

1 Prendre 31,21 grammes de $Na_2H_2PO_4.2H_2O$.

2 Ajouter de l'eau distillée pour faire un (1) litre de solution.(0.2M).

3 Ajouter 55 mls de solution A à 45 mls de solution B.

4 Ajouter de l'eau distillée pour faire un (1) litre de solution.

Le pH de la solution sera entre pH 6,0 et pH 7,0.

COLORANT BLEU DE COTON

Bleu de coton (ou bleu trypan) dans du lactophénol

67 ml	de lactophénol anhydreux
20 ml	d'eau distillée
0,1 g	de bleu de coton ou de bleu trypan

Mélanger pour donner 0,1% de colorant.

COLORANT GIEMSA

1 Laisser sécher un frottis mince.

2 Tremper pendant 1-2 minutes dans l'agent fixateur Giemsa:

94%	alcool absolu
05%	formol
01%	acide acétique (glacial)

Rincer à l'eau du robinet pendant 5-10 secondes.

3 Utiliser 10% de Giemsa Gurrs amélioré R66 dans 0,02M tampon de phosphate pH 6,9 et laisser se colorer pendant 45-60 minutes.

4 Rincer sous l'eau du robinet pendant 5-10 secondes.

5 S'il reste trop de colorant, placer le frottis dans du tampon 0,02M jusqu'à ce que la couleur rouge sur la lamelle disparait.

6 Sécher sur du papier torchon.

7 Laisser sécher.

8 Observer sous le microscope.

7. DIVERSES TECHNIQUES

DETERMINATION DE LA CONCENTRATION DES SPORES A L'AIDE DE L'HEMACITOMETRE

Pour tout essai (en laboratoire ou au champ) il faut connaître la concentration des spores contenues dans la formulation à inoculer ou àappliquer

PREPARATION ET DILUTION DE SOLUTION

Après l'extration des spores. la solution est bien agitée et mise dans le sonicateur pendant deux minutes. Un ml de la solution est dilué dans 9 ml de pétrole ou d'huile (de préférence le pétrole, parce qu'il se décante plus facilement) et mis dans le sonicateur pendant deux minutes. Si le mélange présente l'aspect d'une solution trop concentrée, 1 ml de la dilution est redilué dans 9 ml de pétrole et mis encore dans le sonicateur; ceci jusqu'à l'obtention d'une concentration supposée raisonnable pour le comptage. Une dilution raisonable devrait donner un comptage entre 30 et 300 spores pour chaque coté.

Si la solution a l'aspect blanc a cette étape, c'est que elle contient de l'eau, et doit etre rejetée.

MONTAGE DE LA LAMELLE SUR L'HÉMACITOMÈTRE

A l'aide d'un doigt on met légerement de la salive aux deux bords de la lamelle (après nettoyage). Après quoi on la monte sur l'hémacitomètre de manière à observer l'arc-en-ciel aux deux bords de la lamelle (type sans rebords) ou on tappe le hémacitomètre pour verifier que la lamelle soit bien fixée (type avec rebords).

ADDITION DES SPORES

A l'aide de pipette pasteur une petite quantité de la solution diluée est mise entre l'hémacitomètre et la lamelle et quelques minutes après on passe au comptage (pour les spores dans le petrole).

Il faut verifier que les spores ne soient pas attachées à la lamelle. C'est le cas si on voit les spores qui ne sont pas sur la même ligne de focus que les gravures. Si les spores sont attachées à la lamelle, il faut recommencer, et mieux nettoyer la lamelle, et le laisser sécher un peu.

Il ne faut pas laisser pendant longtemps les lames avant de les compter, sinon le pétrole evapore. Ceci se voit si le liquide ne couvre plus la superficie entière de l'hémacitomètre .

COMPTAGE DES SPORES

Au microscope le schéma ci-dessous est observé de part et d'autre de l'hématocimetre. Le comptage se fait suivant la diagonal. Mais si le comptage est en dessous de 6 par carreau, tous les 25 carreaux sont comptés. Un carreau est composé de 16 petits carreaux et délimité par trois (3) traits (type sans rebords) ou par deux (2) traits (type avec rebords). Les spores contenues dans un carreau constituent un comptage.

Il faut compter les spores dans la partie ombragée, le coté gauche et en haut. Les spores qui sont sur la ligne sont comptées si plus que la moitié est dedans, et non comptées si moins dans le cas contraire.

CALCUL DE LA CONCENTRATION

Après avoir fait les comptages des 5 carreaux de chaque côté de la lame, on effectue leur somme puis on mulitplie par cinq pour avoir le total sur 25 carreaux. Ensuite on calcul la moyenne des sommes pour les deux différents cotés. Soient a et b, les différentes sommes:

$$X = \frac{a+b}{2}$$

X=Compte moyen de 25 carreaux (comptage pour 5 carreaux mulitplié par 5).

$1/10^{e}$ de µl étant répandu sur les 25 carreaux, alors pour trouver la concentration par ml de la dilution utilisée, il faudra faire:

$$X \text{ x } 10^{4} = c \text{ spores / ml}$$

Si n est le nombre de fois dilué, alors la concentration de spores dans la solution originale sera égale à:

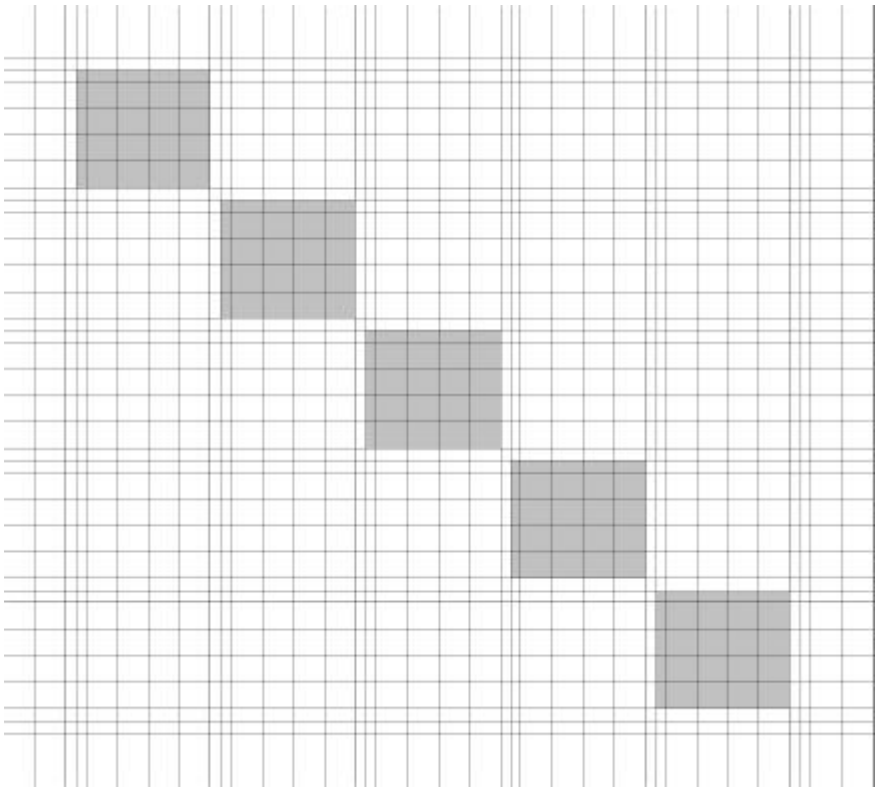
$$c \text{ x } 10^{n} = C \text{ spores / ml}$$

CALCUL DE LA CONCENTRATION VOULUE

Soient C la concentration connue, V le volume de la solution et C' la concentration voulue, il existe un volume V' à retrancher ou à ajouter tel que

$$C' = (C \text{ x } V)/(V + V')$$

Figure 3.1.



TEST DE GERMINATION

Les spores de champignons sont des organismes vivants dont la viabilité (proportion de vivants) peut diminuer au fil du temps selon les conditions de stockage. Par conséquant il est important de connaître la viabilité de ces spores avant leur utilisation. Si le taux de germination a baissé, on peut augmenter la concentration des spores utilisées.

1 L'essai se fait sur de l'agar (SDA ou Molisch) contenant de l'antibiotique dans de petites boîtes de pétri (voir préparation).

2 Les spores sont preparées dans du pétrole à une concentration très faible (10^4 à 10^6 par ml)

3 $1/10^e$ de ml est réparti sur l'agar, bien remué, et la boîte est refermée. A ce moment on peut verifier sous le microscope que les spores sont bien repartis.

4 Vingt (20) heures plus tard les spores germées et non germées sont comptées à l'aide d'un microscope. Toute spore qui émet un bourgeonnement est considérée comme germée.

5 Un total d'au moins 100 spores germées

a) et non germées

b) est compté en déplaçant le champ du microscope de manière à parcourir une grande surface de la boîte de pétri.

6 Le pourcentage de germination s'obtient en faisant le calcul suivant:

[a/(a+b)]x100=% de germination

DESECHAGE DU PETROLE

Le petrole acheté au bord de la route ou autrepart contient souvent une quantité important d'eau. Cette eau peut vite gâter les spores du champignon. Il est donc necessaire de s'assurer de la sécheresse du petrole.

1 Ajoutez 100 g (=100 ml par volume) de silica gel sec (QV) par bouteille de 1,5 l (grande bouteille polycarbonat Fanta, Coca-Cola ou eau gassifiée).

2 Remplissez la bouteille completement - appuyez un peu si necessaire pour faire fuire toutes les bulles d'air.

3 Remuez les bouteilles chaque jour. Après 4-5 jours, la couleur du petrole devrait changer de jaûnatre en clair.

4 Rappelez-vous que le petrole prend l'humidité de l'atmosphère. Donc une bouteille non bouchée n'est plus seche.

PREPARATION ET RÉUTIILISATION DU SILICA GEL

Le silica gel est utilisé pour déssecher les espaces ou les media, tel que le pétrole. Il existe en deux varietés; le silica gel indicateur (bleu ou rose) et le silica gel non-indicateur (brun). Le silica gel indicateur a sa couleur bleue quand il est sec, et tourne en rose quand il a absorbé de l'eau. Donc c'est utile parce qu'on peut savoir tout de suite si c'est déjà mouillé ou non. Mais sa couleur est due a la sulphat de cuivre, qui tue les champignons. Donc pour déssecher le pétrole qui sera utilisé pour les manipulations des spores du champignon, le silica gel non- indicateur est conseillé.

1 Le silica gel doit être seché dans un four. Le four éléctrique est conseillé pour le silica gel qui a été utilisé pour déssécher le pétrole, par risque de feu, même s'il n'y a plus d'odeur de pétrole.

2 Le déssechage du silica gel prend 2 hrs à 120°C. Le temps peut être prolongé jusqu'à 4 ou 6 heures sans dommage.

3 Le silica gel doit être versé directement dans les flacons marqués 'SEC' et fermé hermétiquement.

4 Rappelez-vous que le silica gel prenne l'humidité de l'atmosphère. Donc une bouteille contenant le silica gel mais non bouchée n'est plus seche.

REUTILISATION DU SILICA GEL

Le silica gel qui est saturé de petrole doit être laissé au soleil sur un plateau métallique avec du papier torchon jusqu'à ce que le silica gel devienne inodore

8. ESSAI BIOLOGIQUE AVEC LES ENTOMOPATHOGENES FONGIQUES CONTRE LES ACRIDIENS

POURQUOI FAIRE DES ESSAIS BIOLOGIQUES?

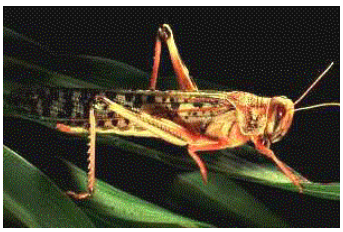
1 Pour trouver de nouvelles souches de pathogènes fongiques susceptibles d'être utiles dans la lutte contre des insectes ravageurs.

2 Pour comparer de nouvelles souches avec celles déjà connues.

3 Pour évaluer la virulence de nouvelles souches contre d'autres insectes ravageurs.

ESSAIS BIOLOGIQUES D'INSECTES

Avant de commencer, il faut s'assurer que la colonie d'insectes ne contient aucune infection protozoaire tels le *Malamoeba* et le *Nosema*. Certains insectes, notamment *Schistocerca gregaria* peuvent survivre dans des boîtes en plastique individuelles sans alimentation, tandis qu'il serait nécessaire de garder d'autres espèces en cages et les nourrir.



SCHISTOCERCA GREGARIA - EN BOÎTES

1 Prendre des nombres égaux de mâles et de femelles adultes 9-12 jours après la mue (avant leur maturité sexuelle).

2 Prendre des boîtes en plastique (pas hermétiques)

3 Mettre un morceau de papier hygiénique sec au fond de chaque boîte - mais rien d'autre!

4 Placer un insecte dans chaque boîte.

5 Terminer les manipulaitons d'insectes avant de toucher aux champignons.

6 Si l'expérience comporte un traitement témoin sans inoculation, il est essentiel de préparer le témoin avant de toucher au champignon.

Après avoir manipulé les champignons NE JAMAIS entrer le même jour dans l'insectarium.

LES SPORES

Metarhizium, Beauveria spp.

1 Utiliser de l'agar de Molisch (#) sur de longues pentes dans des bouteilles Universal de 25 ml.

2 Pour inoculer, strier l'agar librement et uniformément l'agar de conidies.

3 Incuber à 22-25°C en l'exposant à la lumière artificielle pendant 12 heures sur 24 heures.

4 Récolter les conidies 10-30 jours après l'inoculation.

***N.B. Choisir une norme pour les délais de récolte, par exemple**: 15 jours.*

5 Pour récolter les conidies: ajouter 10 ml d'huile de bonne qualité à chaque bouteille.

6 Utiliser un pinceau pour transférer les conidies dans l'huile.

7 Passer la suspension dans un tamis à 75 microns pour enlever les fragments de hyphes.

8 Agiter la suspension dans un sonicateur pendant trois (3) minutes. Si les conidies sont encore regroupées, agiter encore pendant deux (2) minutes.

N.B. A défaut d'un sonicateur, utiliser un Whirlimixer. Une couche d'eau se formera au fond de la suspension.

9 Enlever autant d'eau possible en la transvasant.

10 Utiliser la formulation le même jour.

11 S'il n'est pas practicable d'utiliser la formulation le même jour il est essentiel d'y ajouter du gel de silice non-indicateur afin d'absorber l'eau de la formulation.

N.B. Il est indispensable d'enlever tout excédant d'eau afin d'empêcher la germination des conidies.

12 Vérifier la concentration de conidie à l'aide d'un hémocytomètre (#).

13 Utiliser 105 spores pour chaque criquet adulte (poids approximatif 2 g). Réduire le taux de spores pour des insectes plus petits.

14 Utiliser deux (2) microlitres d'une suspension de 5x107 spores/ml = 105 spores/insecte.

15 Utiliser la fiche de calculation (#) pour calculer la dilution nécessaire pour obtenir 5x107 spores/ml.

L'INOCULATION

1 Pour chaque souche employer 25 insectes. Si vous criblez de nouvelles souches il n'est pas nécessaire de répéter les essais.

2 Les grands acridiens: pour l'inoculation utiliser une micropipette pour placer 2 µ de suspension à l'arrière du pronotum*.

3 Tenir la plaque pronotale en avant à l'aide d'une aiguille émoussée mais veillez à ne pas abîmer la cuticule.

N.B. Une inoculation faite avec 2ul de 5x107 conidies/ml donne un dosage de 100,000 conidies par insecte (105 spores/insecte).

4 Remettre l'insecte dans la boîte.

5 Exposer à 30°C à la lumière artificielle pendant 12 heures sur 24.

6 Vérifier la viabilité des spores en étalant une très mince couche sur de l'agar à l'aide d'un fil à ensemencer.

7 Laisser pendant 24-30 heures et vérifier le pourcentage de germination.

OBSERVATIONS

1 Evaluer le taux de mortalité chaque jour.

2 Si l'insecte est mort, imbiber d'eau le papier hygiénique dans la boîte.

3 Incuber l'insecte mort pendant quelques jours dans la boîte afin de voir si un champignon pousse sur la partie extérieure de l'insecte.

4 Un champignon peut avoir causé la mort de l'insecte même s'il ne se développe pas après la période d'incubation, par exemple, les toxines produites par le champignon peuvent être à l'origine de la mort.

5 Comparer avec une formulation blanche comme témoin afin de vérifier si le pathogène en a réellement été la cause de mort. Si les témoins sont sains, considerer que toute mortalité a été causée par le champignon.

6 Noter les résultats des essais pendant 12 jours.

7 Pour obtenir le résultat final, calculer chaque jour comme étant le pourcentage de mortalité cumulatif sur toute la période des essais (voir figure)

8 Envoyer les résultats à IIBC (voir annexe pour l'adresse) pour qu'ils puissent être ajoutés à la base de données centrale.

LES ACRIDIENS - À NOTER

1 Séparer les mâles des femelles au début car il est possible qu'ils réagissent différemment à une infection.

2 Noter les poids moyens pour les deux sexes avant de commencer l'essai.

3 Pour chaque espèce nouvelle, vérifier qu'elle est susceptible à la souche standard.

4 Pour chaque nouvelle espèce vérifier qu'elle n'est pas affectée par une inoculation témoin à l'huile non inoculée