

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
Université Saad Dahleb Blida 1



Faculté des Sciences de la Nature et de La Vie  
Département des Biotechnologies et Agroécologie



Mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention du diplôme de Master  
En Sciences de la Nature et de la Vie  
Option : Phytopharmacie et Protection des végétaux

## *Thème*

Etude de la pathogénicité de quelques isolats bactériens telluriques  
sur des insectes ravageurs

Présenté par :

MATALLAH Zineb

MOHAMEDI Zohra

Devant les membres de Jury :

M <sup>me</sup> BABA AISSA K.	Maître Assistante A	UB 1	Présidente.
M <sup>me</sup> SABRI K.	Maître Assistante A	UB 1	Examinatrice.
M <sup>me</sup> ALLAL L.	Professeur	UB 1	Promotrice.
M <sup>r</sup> HAFSA M.	Doctorant	UB 1	Co-Promoteur.

2020-2021

# Etude de la pathogénicité de quelques isolats bactériens telluriques sur des insectes ravageurs

## Résumé

La présente étude a pour objectif la valorisation des bactéries rhizosphériques comme une alternative aux insecticides conventionnels dans la protection des cultures contre les attaques des insectes ravageurs. L'application des méthodes de lutte biologique à travers l'exploration de la microflore du sol s'avère intéressante.

Un nombre de 60 isolats bactériennes au total appartenant à différents genres a été isolé à partir de la rhizosphère de deux parcelles cultivées de prunier et de colza situées dans la région de Bouainan et Oued Aleug (Blida). Des tests de pathogénécité ont été effectués au laboratoire à l'égard du puceron noir de la feve *Aphis fabae* et de la teigne de pomme de terre *Phthorimaea operculella*.

17 souches de *Bacillus* et 26 souches de *Pseudomonas* ont été isolées dans les deux régions, Les résultats montrent que le taux de mortalité est très important après 72 heures, après application du traitement bactérien par trempage du matériel végétal. Les mortalités les plus importantes ont été enregistrées avec les isolats de *Bacillus* (S1-5) à concentration  $10^{-6}$  sur les pucerons et (B2-1) sur la teigne de pomme de terre et avec l'isolat (Kb A4\_5) de *Pseudomonas* à la fois sur les pucerons et sur la teigne de pomme de terre, les résultats obtenus ont été comparés avec une bactérie témoin *B. thuringiensis*.

Mots clés: Isolement ; entomopathogénicité ; *Pseudomonas*; *Bacillus* ; lutte microbiologique; *Phthorimaea operculella* ; *Aphis fabae*.

## **Study of the pathogenicity of some soil-borne bacterial isolates on insect pests**

### **Abstract**

The objective of this study is to promote rhizospheric bacteria as an alternative to conventional insecticides in the protection of crops against the attacks of insect pests. The application of biological control methods through the exploration of soil microflora is interesting.

A total of 60 bacterial isolates belonging to multiple genera were isolated from the rhizosphere of two cultivated plots of plum and rapeseed located in the region of Bouainan and Oued Aleug (Blida). Pathogenicity tests were performed in the laboratory for black aphid *Aphis fabae* and potato moth *Phthorimaea operculella*.

17 strains of *Bacillus* and 26 strains of *Pseudomonas* were isolated in both regions, The results show that the mortality rate is very high after 72 hours, after application of bacterial treatment by soaking plant material. The highest mortalities were recorded with *Bacillus* isolates (S1-5) at a concentration 10<sup>-6</sup> on aphids and (B2-1) on potato moth and with *Pseudomonas* isolate (Kb A4\_5) on both aphids and potato moth, the results obtained were compared with a control bacterium *B. thuringiensis*.

**Keywords:** Isolation; entomopathogenicity; *Pseudomonas Bacillus* microbiological control; *Phthorimaea operculella*; *Aphis fabae*.

## دراسة بعض العزلات البكتيرية الممرضة للحشرات الضارة

### المخلص

الهدف من هذه الدراسة هو تعزيز البكتيريا من نطاق الجذور كبديل للمبيدات الحشرية التقليدية في حماية المحاصيل من هجمات الآفات الحشرية. تطبيق أساليب مكافحة البيولوجية من خلال استكشاف البكتيريا التربة تبدو مثيرة للاهتمام.

تم عزل 60 سلالة بكتيرية تنتمي إلى أجناس مختلفة من نطاق جذور قطعتين مزروعتين من البرقوق وسلع اللفت تقعان في منطقة بوعينان وواد العلايق (البلدية). أجريت اختبارات الأمراض في المختبر للثنائي المن الأسود *Aphis fabae* وعتة البطاطا *Phthorimaea operculella*

17 سلالة من *Bacillus* و 26 سلالة من *Pseudomonas* تم عزلها في كلتا المنطقتين، وتظهر النتائج أن معدل الوفيات مرتفع جدا بعد 72 ساعة، بعد تطبيق العلاج البكتيري عن طريق نفع المواد النباتية وسجلت أعلى معدلات الوفيات مع عزل عصيات (S1-5) بتركيز  $10^{-6}$  على المن و (B2-1) على عتة البطاطا ومع عزل السلالة (kb A4\_5) التي تنتمي إلى *Pseudomonas* على كل من المن وعتة البطاطا، تمت مقارنة النتائج التي تم الحصول عليها مع بكتيريا الشاهد *B. thuringiensis*.

الكلمات الرئيسية: العزلة؛ الأمراض؛ *Bacillus*؛ *Pseudomonas*؛ الرقابة الميكروبيولوجية؛ *Phthorimaea* *Aphis fabae*؛ *operculella*

## Remerciements :

Tout d'abord nous remercions Dieu, le tout puissant de nous avoir donné la force, le courage et la patience de réaliser ce modeste travail qui est le fruit de tant d'années d'études, de sacrifices et de dévouement.

Nous tenons à remercier tout particulièrement :

-*M<sup>me</sup> Allal Benfekih L.*, notre chère promotrice qui nous a guidé, aidé, et encadré durant la réalisation de ce travail et cela avec sa patience, ses conseils, sa gentillesse, sa disponibilité, sa délicatesse et sa vigueur quand il le fallait.

Notre co-promoteur *M<sup>r</sup> Hafsa M.* pour son aide, ses précieux conseils, sa disponibilité et sa générosité en ne nous privant d'aucune information simple que soit elle.

Nous remercions également les honorables membres composant notre jury :

-*M<sup>me</sup> Baba Aissa K.*, qui nous a privilégié en acceptant de le présider.

-*M<sup>me</sup> Sabri K.*, qui a bien voulu nous accorder de son précieux temps en évaluant et examinant notre travail.

Nous tenons à remercier toute l'équipe du laboratoire de Recherches des Plantes Médicinales et Aromatiques (LRPMA) pour leur gentillesse, leur bienveillance et surtout leur sympathie et en particulier *M<sup>me</sup> Moumene S.*, et les doctorantes *Amel* et *Rym* pour leur précieux conseils en leur souhaitant beaucoup de réussite et de succès.

Nous adressons nos remerciements particulièrement à *Mr Bellatreche M.* pour son aide précieuse.

Nos sincères remerciements et notre gratitude vont pour tous nos braves enseignants de tous les cycles confondus.

## Dédicaces

### Ce travail est dédié :

*A mes très chers parents,*

*J'ai le privilège d'avoir un papa et une maman aussi aimants, bienveillants, doux, attentionnés, et présents. Quoi que je fasse et quoi que je dise ne saurait exprimer ma gratitude et ma reconnaissance pour leur amour, sacrifices, éducation et pour tout ce qu'ils m'ont offert, ce que je suis devenue aujourd'hui est en grande partie grâce à leur dévouement à m'éduquer, à m'apprendre et à toujours m'orienter vers le bon chemin, ce travail leur est dédié en espérant les avoir rendus fiers. Rien ne pourra représenter l'amour inconditionnel que je leur porte eux qui sont ma force, mon bonheur et autour de qui est basé toute mon existence, que dieu les garde pour moi. ♥*

*A ma grande sœur **Mimi** et mon beau-frère **Khalil**, A mon frère **Mahrez** et ma belle-sœur **Imane**, A ma sœur **Nabila** et mon beau-frère **Djallel** :*

*Je les remercie d'avoir toujours été là pour moi à m'encourager, m'aider et me conseiller, à me reconforter et surtout à supporter mes caprices. Je voudrai les remercier de m'avoir offert le plus beau cadeau au monde qui est d'être une tatie super cool !!*

*A mon seul et unique neveu **Djallilou** mon chéri, qui est toute ma vie.*

*A mes nièces : **Sissi**, **Nima**, **Mellina**, et les toutes petites **Maissa** et **Lina** mes princesses chéries que j'adore.*

*A Tata Baya, Mehdi batata, ma grande soeur Rabiche et ma chérie Malek,*

*J'aimerai dédier tout particulièrement ce travail à l'âme de ma très chère **Titi**, et mon très cher **Khalo**, eux qui m'ont toujours poussé à aller vers le haut et qui ne sont malheureusement plus parmi nous pour voir ce que j'ai accompli.*

*A toutes mes chères tantes **Dalila**, **Bachra**, **Wassila**, **Rafika** et **Lila**, mes oncles, cousins et cousines que j'adore.*

*J'aimerai porter une délicate attention en dédiant ce travail à mes amies : **Amira** ma sœur de cœur, **Sarah**, **Meriem** et **Imene** mes amies et sœurs de toujours.*

*A **Manar** ainsi que ma binôme **Zahra** en les remerciant d'avoir été là pour moi, d'avoir supporté mes folies, mes rires et mes pleurs et surtout d'avoir égayer mes cinq années de fac en les partageant avec moi.*

*A mon très cher Hamza, qui a su être là pour moi, en m'encourageant, m'aidant me conseillant et en me donnant de la force à chaque fois que je faiblissais, il m'a toujours aidé à me relever de chaque moment difficile passé, toujours rendu le sourire quand il s'effaçait, aucun mot ne suffit pour m'exprimer alors ce travail lui ai dédié.*

*Matallah Zineb.*

## *Dédicaces*

*I dedicate this modest work to:*

*God Almighty my creator, my strong pillar, my source of wisdom and knowledge.*

*My lovely parents who have raised me and worked hard without complaining for the purpose of seeing me shine and bright: to my dear father who has always been the source of my strength and only on His wings have I soared; to my dear mother for her unconditional love, her patience, her tremendous sacrifices and her constant encouragements.*

*My second mother, aunt Dalila for being beside me whenever I asked. As a matter of fact, she is my role model, I have always appreciated how she tackles issues and words won't be enough to express my gratitude for her.*

*My siblings wissem, Rahim and Hibat el Rahman and to my cousin Aya for standing by me in tough times and for their eagerness to see me successful*

*My aunts Samia, Samira, Saida and fouzia and to my uncle Abdelkrim for everything they have done to me so far, they have given me strength and guided all my steps nowhere else but to success.*

*My Darling Manar for inspiring and boosting me for the past five years and to my partner Zineb, for her positive vibes and her cooperation. Besides i want to thank both of them for such a sincere and wonderful friendship!*

*My Dear Mohamed for his unlimited support, his advice and his confidence in me.*

*I dedicate this work to everyone who have helped me pursue the path to knowledge.*

*Mohamedi Zohra.*

## Liste des abréviations :

- % : Pourcent.
- °C : Degré Celsius.
- µl : Microlitre.
- µm: Micromètre.
- **A2** : Echantillon du sol de Bouinan correspondant au genre Bacillus.
- **A3** : Echantillon du sol d'Oued Aleug correspondant au genre Bacillus.
- **A4** : Echantillon du sol d'Oued Aleug correspondant au genre Bacillus.
- **Adj MS** : La Somme Ajustée des Carrés pour le Mode (Adjusted sums of squares for the mode).
- **Adj SS** : Sommes Ajustées des carrés (Adjusted Sums of Squares).
- **ADN** : Acide désoxyribonucléique.
- **ARN** : Acide Ribonucléique.
- **ATP** : Adénosine Triphosphate.
- **B3** : Echantillon du sol de Bouinan correspondant au genre Bacillus.
- **BT** : *Bacillus thuringiensis*.
- **CO2** : Dioxyde de Carbone.
- **Cry**: Endotoxin Crystalline.
- **DF** : Degrés de Liberté (Total Degrees of Freedom).
- **FAO** : l'Organisation des Nations Unies pour l'agriculture (Food and Agricultural Organisation)
- **FitD** : Toxine Insecticide Fluorescens.
- **GN**: Gélose nutritive.
- **GV** : Granulovirus.
- **H**: heure.
- **H2S**: Sulfure d'Hydrogène.
- **IPM** : Lutte intégrée contre les ravageurs (Integrated Pest Management)
- **KB** : Milieu King B.
- **KB\_A3** : Echantillon du sol d'Oued Aleug correspondant au genre Pseudomonas
- **KB\_A4** : Echantillon du sol d'Oued Aleug correspondant au genre Pseudomonas
- **Min** : Minute.
- **ml** : Millilitre.
- **mm** : Millimètre.
- **Nm**: Nanometre.
- **NPV** : Nucleopolyhedrovirus.
- **OB**: Occlusion body (corps d'occlusion).
- **OMS** : Organisation Mondiale de la Santé
- **pH** : Potentiel hydrogène.
- **S1** : Echantillons du sol d'Oued Aleug correspondant au genre Bacillus.
- **SIP**: Protéines Insecticides sécrétées.
- **Tc** : Complexe toxine.
- **TSI** : Tri Sugar Iron.
- **UFC** : Unité Formant une Colonie.
- **VIP**: Vasoactive Intestinal Peptide.

## Liste des figures :

### Partie bibliographique

#### ❖ Chapitre I :

Numéro de la figure	Titre	Page
Figure 01	Punaise atteinte de « muscardine blanche	03
Figure 02	Schéma de la cellule bactérienne typique. Cependant, certains des éléments présentés ici, comme le flagelle qui sert à la locomotion, n'équipent pas toutes les bactéries	06
Figure 03	Classification-taxonomie des bactéries	07
Figure 04	Adulte et larves d'une colonie de pucerons sur une feuille de bette à cardé	12
Figure 05	Cycle de vie d' <i>Aphis fabae</i>	13
Figure 06	Effet du puceron noir sur quelques feuilles de plante hôte	13
Figure 07	Different stades biologique de <i>Phthorimaea operculella</i>	15
Figure 08	Effet de la teigne de pomme de terre sur les tubercules	17

#### ❖ Chapitre II :

Numéro de la figure	Titre	Page
Figure 09	Coupe transversale d'une spore de <i>Bacillus</i>	20
Figure 10	Mode d'infection du <i>Bacillus thuringiensis</i> dans l'intestin d'un lépidoptère	22
Figure 11	Illustration d'une bactérie du genre <i>Pseudomonas</i> .	24
Figure 12	Le contexte génomique des îlots codant pour fitD chez <i>Pseudomonas fluorescens</i> .	26
Figure 13	Le groupe du gène Tc chez <i>P. fluorescens</i> .	26

## Partie pratique

### ❖ Chapitre I :

<b>Numéro de la figure</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
<b>Figure 14</b>	Plantation de fève infestée de puceron noir.	<b>27</b>
<b>Figure 15</b>	Puceron noir de la fève (a) et larve de teigne de pomme de terre (b)	<b>28</b>
<b>Figure 16</b>	Echantillonnage du sol.	<b>29</b>
<b>Figure 17</b>	Les deux parcelles des échantillonnages	<b>29</b>
<b>Figure 18</b>	Préparation du sol.	<b>29</b>
<b>Figure 19</b>	Préparation de la solution de mère.	<b>30</b>
<b>Figure 20</b>	Préparation des dilutions décimales.	<b>31</b>
<b>Figure 21</b>	Etalement des dilutions.	<b>31</b>
<b>Figure 22</b>	Ensemencement de la colonie suspecte.	<b>32</b>
<b>Figure 23</b>	Préparation du frottis.	<b>33</b>
<b>Figure 24</b>	Coloration au violet de gentiane.	<b>33</b>
<b>Figure 25</b>	Lame recouverte de Lugol.	<b>33</b>
<b>Figure 26</b>	Lame recouverte de Lugol.	<b>34</b>
<b>Figure 27</b>	Test de catalase.	<b>34</b>
<b>Figure 28</b>	Test d'oxydase.	<b>35</b>
<b>Figure 29</b>	Milieu TSI.	<b>36</b>
<b>Figure 30</b>	Milieu Citrate de Simmons.	<b>37</b>
<b>Figure 31</b>	Préparation de la solution bactérienne.	<b>38</b>
<b>Figure 32</b>	Traitement sur puceron.	<b>39</b>
<b>Figure 33</b>	Répétitions et témoin du traitement.	<b>39</b>

Numéro de la figure	Titre	Page
<b>Figure 34</b>	préparation des doses calculées.	<b>40</b>
<b>Figure 35</b>	Préparation du traitement.	<b>40</b>
<b>Figure 36</b>	Traitement sur les larves de la teigne de pomme de terre.	<b>41</b>

## ❖ Chapitre II :

Numéro de la figure	Titre	Page
<b>Figure 37</b>	Répartitions des isolats obtenus.	<b>44</b>
<b>Figure 38</b>	Colonies suspectes du genre <i>Pseudomonas</i> . (b) : Colonies suspectes du genre <i>Bacillus</i> .	<b>45</b>
<b>Figure 39</b>	Aspect au microscope optique x100 de <i>Pseudomonas</i> (a) et <i>Bacillus</i> (b), avec la coloration au Bleu de méthylène	<b>46</b>
<b>Figure 40</b>	Aspect d'un individu d' <i>Aphis fabae</i> mort.	<b>49</b>
<b>Figure 41</b>	Taux de mortalité du puceron noir de la fève 72h après traitement avec solutions bactériennes à concentrations brutes.	<b>50</b>
<b>Figure 42</b>	Taux de mortalité observée du puceron noir de la fève 72h après traitement sous l'effet des solutions bactériennes à différentes concentrations.	<b>53</b>
<b>Figure 43</b>	Moyennes estimées des mortalités du puceron noir de la fève et groupes homogènes des concentrations en comparaison avec le témoin.	<b>54</b>
<b>Figure 44</b>	Comparaison des mortalités sous l'effet des trois concentrations : C1, C2, C3.	<b>55</b>
<b>Figure 45</b>	Larve de <i>Phthorimaea operculella</i> morte (aspect de mortalité).	<b>56</b>
<b>Figure 46</b>	Moyennes des taux de mortalité comparés de la teigne de la pomme de terre 72h après traitement avec les solutions brutes des isolats bactériens testés.	<b>56</b>

## Liste des tableaux :

<b>Tableaux</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
<b>Tableau 1</b>	Quelques exemples de bactéries et leurs insectes hôtes.	<b>08</b>
<b>Tableau 2</b>	Le mode d'action de quelques bactéries entomopathogènes.	<b>10</b>
<b>Tableau 3</b>	Caractères biochimiques du <i>Bacillus thuringiensis</i> .	<b>19</b>
<b>Tableau 4</b>	Les caractères morphologiques des colonies de <i>P.fluorescens</i> .	<b>24</b>
<b>Tableau 5</b>	Les caractères biochimiques des colonies de <i>P.fluorescens</i> .	<b>25</b>
<b>Tableau 6</b>	Résultats des tests d'orientation des isolats bactériens obtenus.	<b>47</b>
<b>Tableau 7</b>	Analyse de la variance des taux de mortalités du puceron noir de la fève en relation avec les traitements à base de solutions bactériennes à différentes concentrations (C1, C2, C3).	<b>50</b>
<b>Tableau 8</b>	Valeurs des concentrations létales 50% et 90 % des trois isolats bactériens (A2-9, S1-5, A2-26).	<b>52</b>

# Sommaire

<b>Introduction.....</b>	<b>01</b>
--------------------------	-----------

## **Partie bibliographique :**

<b>Chapitre I : Généralité sur les entomopathogènes microbiens .....</b>	<b>03</b>
<b>I.1 Généralité sur les champignons entomopathogènes.....</b>	<b>03</b>
<b>I.2 Généralité sur les virus entomopathogènes. ....</b>	<b>04</b>
<b>I.3 Généralité sur les bactéries entomopathogènes. ....</b>	<b>06</b>
<b>Chapitre II : Utilisation des genres “ <i>Bacillus</i> ” et “ <i>Pseudomonas</i> ” en lutte biologique. ....</b>	<b>18</b>
<b>II.1 Genre <i>Bacillus</i> :.....</b>	<b>18</b>
<b>II.1.a Caractéristiques du genre <i>bacillus</i> .....</b>	<b>18</b>
<b>II.1.b Effet entomopathogène des <i>Bacillus</i>.....</b>	<b>20</b>
<b>II.2 Genre <i>Pseudomonas</i> :.....</b>	<b>23</b>
<b>II.2.a Caractéristiques du genre <i>Pseudomonas</i> .....</b>	<b>24</b>
<b>II.2.b Effet entomopathogène des <i>Pseudomonas</i>.....</b>	<b>25</b>

## **Partie pratique :**

<b>Chapitre I : Matériel et méthode. ....</b>	<b>28</b>
<b>I.1 Matériel.....</b>	<b>28</b>
<b>I.2 Méthode .....</b>	<b>29</b>
<b>I.2.1. Isolement des bactéries telluriques. ....</b>	<b>29</b>
<b>I.2.2. Identification des isolats bactériens. ....</b>	<b>33</b>
<b>I.2.3. Les tests d’orientation. ....</b>	<b>34</b>
<b>I.2.4. Test de pathogénicité des souches isolées sur les pucerons de la fève et la teigne de la pomme de terre.....</b>	<b>38</b>
<b>I.2.4.1. Traitement sur les pucerons.....</b>	<b>39</b>
<b>I.2.4.2. Traitement sur la teigne de la pomme de terre <i>Phthorimaea operculella</i> :.</b>	<b>41</b>

<b>Chapitre II : Résultats et Discussion.</b> .....	<b>45</b>
<b>II.1</b> Identification des isolats bactériens. ....	<b>45</b>
<b>II.1.1.</b> Identification macroscopique. ....	<b>46</b>
<b>II.1.2</b> Identification microscopique. ....	<b>49</b>
<b>II.2.</b> Résultats des tests d'entomopathogénéité. ....	<b>49</b>
<b>II.2.1</b> Effet des isolats bactériens étudiés sur le puceron noir de la fève.....	<b>50</b>
<b>II.2.2</b> Effet des <i>isolats bactériens étudiés sur la teigne de pomme de terre</i> .....	<b>52</b>
<b>II.3</b> Discussion. ....	<b>57</b>
<b>Conclusion</b> .....	<b>60</b>
<b>Références bibliographiques</b> .....	<b>63</b>

---

---

## *Introduction*

---

---

Un pesticide se définit selon l'Organisation des Nations Unies pour l'agriculture (FAO) comme toute substance ou mélange de substances destinées à prévenir, détruire ou combattre tout organisme nuisible, notamment les vecteurs de maladies humaines ou animales, les espèces de ravageurs des végétaux ou les animaux causant des dommages au niveau de la production, du stockage et de l'entreposage des denrées alimentaires.

Ces substances sont utilisées comme régulateur de croissance des plantes, défoliants, déshydratants, agent d'amincissement des fruits ou agent de prévention de chute prématurée de ces derniers. Néanmoins leur application semble être mal gérée en raison de leur non-utilisation rationalisée et systématique qui selon **Launois-Luong et Coll, (1988)** représente un danger grave pour :

- ❖ L'environnement : ils sont mis en cause dans la dégradation de l'état écologique des eaux douces, de surface et des eaux côtières ainsi que dans la réduction de la biodiversité terrestre constatée dans les zones agricoles et dans les milieux "naturels" contaminés. (**Aubertot et al., 2005**)

Ainsi que pour :

- ❖ L'utilisateur et le consommateur : des effets cancérigènes, neurotoxiques ou de types perturbateurs endocriniens de ces pesticides ont été mis en évidence chez l'animal ce qui a conduit à la remise en question de leurs risques sur la santé humaine. (**Aubertot et al., 2005**)

Face à l'inquiétude croissante de ces consommateurs et agriculteurs au sujet de ces pesticides synthétiques et suite aux recommandations de l'OMS (2007) qui vont à la faveur de la recherche de solutions inoffensives et non polluantes, un regain d'intérêt pour l'utilisation des biopesticides a été observé et qui autrefois était relativement marginal en terme d'importance commerciale (**Philogène et al., 2008**). Dans ce contexte leur élaboration doit être considérée comme priorité nécessitant une bonne maîtrise de leur pathogénicité et de leurs techniques d'application dans la mesure d'une lutte biologique intégrée.

La lutte biologique intégrée efficace repose sur le principe du déploiement de plusieurs méthodes complémentaires pour le contrôle des ravageurs, des mauvaises herbes et des maladies. Elle a été définie comme un « processus décisionnel pour la coordination de plusieurs tactiques de contrôle de toutes les classes de parasites d'une manière écologiquement et économiquement rationnelle ».

---

---

## *Introduction*

---

---

Le contrôle biologique est l'outil le plus valorisable de la lutte antiparasitaire intégrée (IPM) qui implique l'utilisation d'une alternative efficace aux pesticides synthétiques à travers des agents de bio contrôle tels que les parasitoïdes, les prédateurs et les entomopathogènes microbiens à base de champignons, des bactéries, des virus, et des nématodes. (**Chandler et al., 2011**).

L'intérêt porté à la pomme de terre, elle joue un rôle clé dans le système alimentaire mondial. C'est la principale denrée alimentaire non céréalière. En Algérie, sa production a occupé la deuxième place, après l'Égypte au niveau du continent Africain d'où notre intérêt à cette culture (**FAO stat, 2015**). La teigne *Phthorimaea operculella* est un ravageur extrêmement nuisible de la pomme de terre en raison des préjudices qu'il peut engendrer aussi bien en plein champ que dans les aires de stockage. Quant à l'intérêt que nous avons porté pour la fève et son principal ravageur, le puceron noir, est essentiellement dû au fait que cette culture soit la légumineuse alimentaire la plus cultivée en Algérie et qu'elle présente des intérêts agronomiques, économiques et nutritionnels. Elle est d'ailleurs considérée comme hautement mycotrophique valorisant ainsi la fertilisation du sol (**Wahbi et al., 2012**).

Les biopesticides bactériens font l'objet d'une attention particulière contre les ravageurs en bio contrôle (**Sarwar, 2015**). C'est pourquoi, nous nous sommes intéressés dans le présent travail à une contribution à la valorisation de la lutte microbiologique sur des modèles de ravageurs d'intérêt économique dans les cultures légumières en Algérie : le puceron noir de la fève et la teigne de la pomme de terre. Les principaux objectifs ciblés sont :

- I) D'isoler et identifier des rhizobactéries appartenant au genre *Bacillus* et *Pseudomonas*, afin de tester leur entomopathogénicité contre les deux ravageurs cibles.
- II) De sélectionner des isolats susceptibles de présenter une meilleure efficacité sous l'effet de concentrations optimales.

Trois chapitres principaux précédés structurent ce document de mémoire :

- Une synthèse de données est présentée dans la partie bibliographique sur les entomopathogènes microbiens et les ravageurs cibles.
- Le second chapitre explique la méthodologie utilisée dans la présente étude.
- Le troisième chapitre traite des résultats obtenus sur l'isolement et les identifications macroscopiques et biochimiques des isolats bactériens et des différents traitements microbiens utilisés.

La fin du document présente une conclusion et des perspectives.

### **I.1. Généralités sur les champignons entomopathogènes :**

Les champignons ou mycètes sont des organismes eucaryotes. Tout comme les végétaux ils possèdent une paroi cellulaire périphérique et sont immobiles. Ils sont hétérotrophes et dépendent pour leur nutrition de la présence de matières organiques préformées.

Le règne des Fungi a été créé en **1969** par le botaniste **Robert H. Whittaker**. On distingue 4 grandes divisions du sous règne des vrais champignons ‘ *Eumycètes* ’ : Les Ascomycètes, les Basidiomycètes, les Zygomycètes et les Chytridiomycètes.

Les recherches sur les champignons entomopathogènes se sont principalement développées entre les années 1880 et 1910 (**Yendol et Roberts, 1970**). Environ 700 espèces rattachées à différents ordres sont reconnues d’après **Starnes et al., (1993)**, dont les plus importants appartiennent à l’ordre des Zygomycètes et des Ascomycètes. Les espèces des genres *Beauveria*, *Metharizium*, *Verticillium*, *Erynia*, *Hirsutella*, *Entomophthora* et *Entomophaga* sont les plus utilisées en lutte biologique (**Wraight et Roberts, 1987; Goettel, 1992**).

Les microchampignons entomopathogènes sont aptes à infecter l’hôte par ingestion ou par simple contact rendant tous les stades, œuf, larve et adulte sensibles (**Carruthers et Soper, 1987**), en (1835) **Agostino Bassi** a décrit l’entomopathogénicité de *B. bassiana* qui était responsable de la muscardine du ver à soie, aussi appelée « mal de segno », (**Fig.1**).



**Figure 01** : Punaise atteinte de « muscardine blanche. Source : <http://organicsoiltechnology.com/us-beauveria-bassiana>

### **I.1.1. Mode d'action :**

Le mode d'action est différé selon l'hôte. Le champignon se fixe à la surface externe du corps des insectes sous la forme de spores microscopiques. La pénétration des spores varie selon le degré de contamination et l'épaisseur de la cuticule de l'hôte (**Brooks et al. 2004**). Les spores se développent en blastospores qui vont coloniser la cavité du corps de l'insecte. La mort de l'insecte survient généralement après 72 h où le champignon va alors poursuivre son développement en saprophyte.

Après envahissement complet du cadavre transformé en momie, le développement du champignon va dépendre de l'humidité ambiante. Seulement si l'humidité est assez importante, le mycélium va traverser une seconde fois le tégument du cadavre de l'intérieur vers l'extérieur où il pourra former des conidiophores (reproduction asexuée). Dans le cas contraire, le cadavre conservera sa momie. L'agent entomopathogène pourrait alors se conserver sous la forme de chlamydospores (**Prasertphon et Tanada, 1968**).

### **I.2 Généralités sur les virus entomopathogènes :**

Les virus sont des parasites intracellulaires obligatoires ayant de l'ADN ou de l'ARN encapsulé dans une couche protéique connue sous le nom de capsid formant les virions ou les nucléocapsides.

Les nucléocapsides ont pour but de protéger l'acide nucléique viral de la digestion par certaines enzymes (nucléases), pour fournir à sa surface des sites de reconnaissance et de fixation à la surface de la cellule hôte ou dans des cas particuliers, pour injecter l'acide nucléique infectieux à l'intérieur de la cellule hôte.

Sur un total de 73 familles de virus connues, les virus entomopathogènes ont été répertoriés dans 7 familles, comme l'ont décrit **Faulkner et Boucias (1985)** dont les Baculoviridae, les Reoviridae, les Poxviridae et les Iridoviridae sont les plus virulents sur différents ordres d'insectes nuisibles, y compris les Lépidoptères, Diptères, Hyménoptères, Orthoptères, Isoptères et Neuroptères.

Les maladies causées par les virus entomopathogènes sont connues depuis le 16<sup>ème</sup> siècle. En **1856**, **Maestri et Cornalia**, ont décrit pour la première fois les corps d'occlusion (OBs) des vers à soie.

Ces virus se sont révélés très efficaces dans la gestion des populations de certains ravageurs tels que les lépidoptères et les ravageurs forestiers hyménoptères. Ils sont également très spécifiques aux insectes cibles.

Les populations naturelles des virus d'insectes appartiennent à de nombreuses familles, dont certaines se trouvent exclusivement chez les arthropodes et/ou les plantes, les virus appartenant à ces familles peuvent varier dans les tissus qu'ils infectent, leur capacité à causer des infections aiguës ou chroniques et dans l'apparition de larves moribondes ou mortes. En général, les virus sont divisés en deux grandes catégories non taxonomiques.

La première catégorie est celle des virus occlus dans lesquels les virions matures sont intégrées dans une matrice protéique, formant des corps para-cristallins, tandis que la deuxième catégorie est celle des virus non occlus dans lesquels les virions se produisent librement ou forment occasionnellement des corps para-cristallins, caractérisés par l'absence de protéines corporelles d'occlusion entrecoupées de virions (**Federici, 1999**).

La famille des Baculoviridae est celle qui est responsable de la majorité des infections, elle est d'après **Francki et al., (1991)** et **Murphy et al., (1995)** divisée en trois genres : *Nucleopolyhedrovirus* (NPV) et *Granulovirus* (GV) et les virus non nucléés ou en forme de tige.

Les virions de la NPV et de la GV sont obstrués dans les OBs protéiques polyédriques et capsulaires, respectivement, les OBs des GV sont plus petits (0,3 à 0,5 µm de longueur) que ceux des NPV (0,15 à 15 µm de diamètre) et ne contiennent généralement qu'un seul nucléoside enveloppé. Les NPV ont des gammes d'hôtes limitées, étant habituellement limitées à une espèce ou à un genre hôte, les infections de GV n'ont été signalées que sur les lépidoptères, de sorte qu'ils sont plus spécifiques que les VNP (**Battu et Arora, 1996 ; Moscardi, 1999**).

### **I.2.1 Mode d'action des virus entomopathogènes :**

Lorsqu'ils sont ingérés par l'insecte, la matrice protéique se dissout dans l'environnement alcalin du tube digestif de l'hôte (pH 8,0), libérant les particules infectieuses. Les virions entrent dans la membrane péri-trophique soit par diffusion directe avec des microvillosités sur les cellules épithéliales colonnaires de la brosse, soit par endocytose adsorbant.

Cette entrée peut également être médiée par les récepteurs permettant au virus de se répliquer dans les noyaux des cellules tissulaires sensibles. (Cunningham, 1995 ; Flexner et Belnavis, 2000).

Les insectes infectés arrêtent de s'alimenter et prennent une couleur blanchâtre à jaunâtre. L'intérieur du corps se liquéfie alors en l'espace de 5 à 10 jours, seul le tégument reste intact mais se déchire au moindre contact libérant avec son contenu nauséabond des millions de virus. Un des exemples les mieux connus est la granulose du carpocapse de la pomme désormais commercialisé sous le nom de carpovirusine (Cunningham, 1995 ; Flexner et Belnavis, 2000).

### I.3. Généralités sur les bactéries entomopathogènes :

Les bactéries sont des micro-organismes ubiquistes, unicellulaires et dépourvues d'organites et de noyaux (procaryotes) dont le génome est constitué d'ADN. Celui-ci consiste en un seul chromosome, et on note éventuellement la présence de plasmides (petit morceau d'ADN circulaire). L'ensemble des bactéries forme le règne des eubactéries (*Eubacteria*) (Cohn, 1870). (Fig.2)

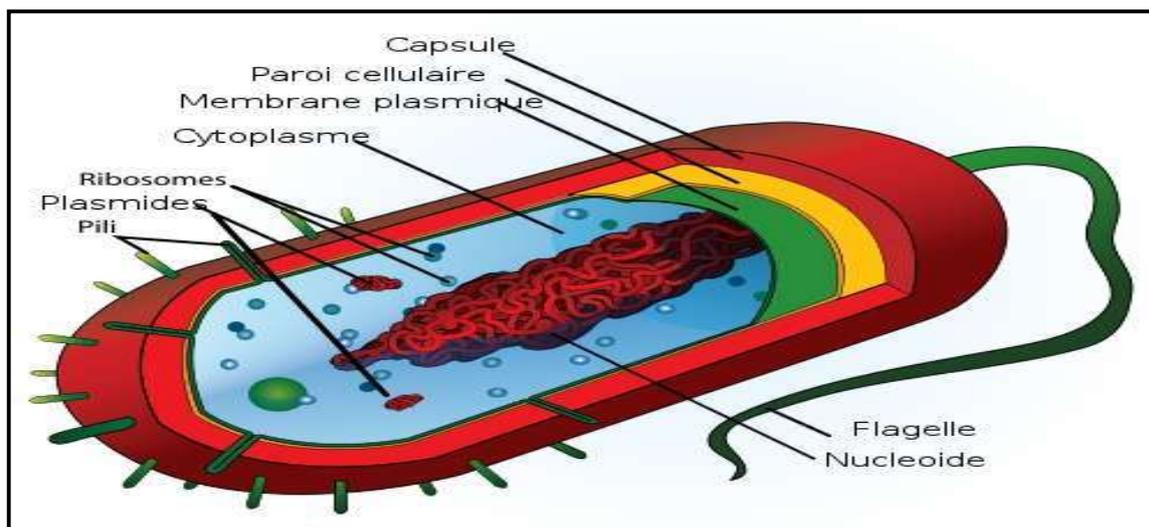


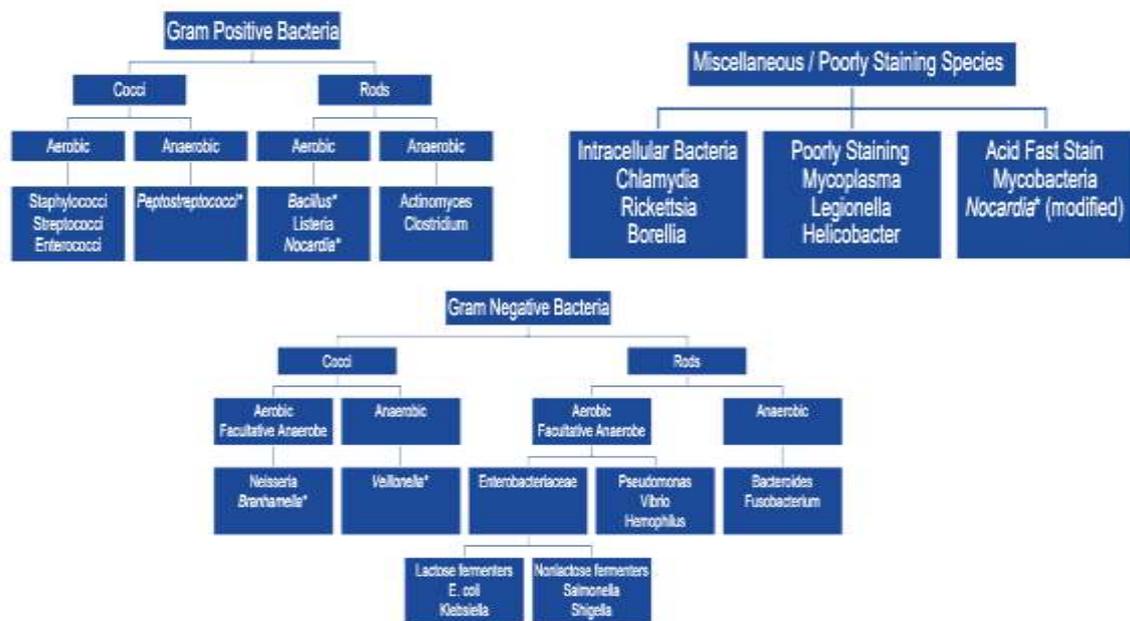
Figure 02 : Schéma de la cellule bactérienne typique. (LadyofHats, DP)

**I.3.1. Classification :**

D’après **Woese (1977)**, les bactéries peuvent être classées selon leurs caractères (**Fig.3**) : biochimiques (biovars), antigéniques (sérovares), pathogéniques (pathovars), enzymatiques (zymotypes ou zymovars), de sensibilité aux antibiotiques (classification en antibiotypes), de sensibilité aux bactériophages (classification en lysotypes ou lysovares) et moléculaires.

Les bactéries peuvent aussi être classées selon la coloration de Gram, leur morphologie et mobilité (présence des flagelles), la capacité à sporuler, la température de croissance, les besoins nutritionnels, le mode respiratoire (aérobie ou anaérobie), la capacité de photosynthèse et l’utilisation des différentes sources de carbone ou d’azote.

Les bactéries peuvent être divisées en 12 groupes qui ont été définis à partir de l’analyse de l’ARN ribosomal 16S et 23S (**Cohn, 1970**).



**Figure 03 : Classification taxonomique des bactéries (Upendra Thapa Sherestha, 2016)**

Les bactéries entomopathogènes appartiennent aux grandes familles des *Bacillaceae*, *Enterobacteriaceae* et *Pseudomonaceae*. Les plus étudiées sont les quatre genres différents : *Bacillus*, *Pseudomonas* et les bactéries associées aux nématodes, *Photorhabdus* et *Xenorhabdus*. (Greathead *et al.*, 1994)

Les genres *Bacillus* et *Pseudomonas* sont respectivement des bactéries à Gram positif et Gram négatif qui sont utilisées depuis plus de 50 ans comme bio-insecticides contre les insectes nuisibles dans les cultures et la foresterie (M Soberon, 2011). Tandis que les espèces de *Photorhabdus* et *Xenorhabdus* comprennent des bactéries symbiotiques à Gram négatif associées aux nématodes entomopathogènes, la plupart des études se sont concentrées sur les toxines insecticides spécifiques produites par ces bactéries (Vallet-Gely, 2004).

### I.3.2. Lutte microbiologique à travers les bactéries entomopathogènes :

Plus d'une centaine de bactéries ont été identifiées comme ayant un potentiel d'utilisation en lutte microbiologique (Starnes *et al.*, 1993), quelques exemples sont présentés dans le tableau 1. De ce fait, les formulations de biocides à base de micro-organismes deviennent de plus en plus performantes avec des prix compétitifs (Ahmed *et al.*, 1994 ; Starnes *et al.*, 1993).

Leur utilisation est très répandue en raison de leur effet sélectif, pour leur respect des auxiliaires présents dans l'agroécosystème et leur non-agressivité vis-à-vis de l'environnement et du consommateur. Enfin, elles agissent sans laisser aucune trace de résidus dans les fruits de l'application jusqu'à la récolte, (Lepoivre, 2007).

**Tableau 1** : Quelques exemples de bactéries et leurs insectes hôtes :

Espèce	Hôte
<i>Bacillus thuringiensis</i>	Coléoptères / Diptères / Lépidoptères (Morris, 1983; Ahmed <i>et al.</i> , 1994)
<i>Xenorhabdus</i>	Acridiens (Greathead <i>et al.</i> , 1994)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Lépidoptères / Hémiptères / Acridiens (Saik <i>et al.</i> , 1990)
<i>Bacillus popillae</i>	Scarabéidés ( <i>Popillia japonica</i> ) (Hutton et Burbutis, 1974; Miller <i>et al.</i> , 1983; Krieg, 1987)
<i>Bacillus sphaericus</i>	Diptères (Boisvert <i>et al.</i> , 2006)

Les biopesticides, à base de ces bactéries représentent la majorité des biopesticides microbiens (**Shoresh et al., 2010**) et les plus commercialisés sont ceux qui sont à base de *Bacillus thuringiensis* vu leur action insecticide (**Rosas-Garcia, 2009**). On en note les produits commerciaux : **Rona Eco**® et **Biobit Df**® qui visent les larves de lépidoptères.

D'après **Filotas (2010)**, une application efficace ces biopesticides nécessitent des facteurs qui doivent être respectés tels que le pH, la température de la solution microbienne, les conditions de stockage, le temps d'application, le nombre de répétitions, la durée de conservation et enfin la compatibilité avec d'autres produits.

### **I.3.3 Mode d'action des bactéries entomopathogènes :**

Un agent pathogène bactérien doit être capable de coloniser son hôte en faisant face à différentes barrières mécaniques et physiques ainsi qu'à des mécanismes de défense cellulaires et humoraux (**Lemaitre et Boccard, 2008**). Dans la nature, les *Pseudomonas* et les spores ou les cellules végétatives des *Bacillus*, sont ingérés par l'insecte ou plus accidentellement par blessure à travers la cuticule (**Lemaitre et Boccard, 2008**).

L'infection naturelle impliquant des *Photorhabdus/Xenorhabdus* commence principalement à partir de la cavité corporelle, puisqu'ils sont libérés à ce niveau par les nématodes hôtes. Ensuite, l'infection se propage aux compartiments et tissus larvaires à différents moments après l'infection (**Lemaitre et Boccard, 2008**).

Le mode d'action de certaines bactéries entomopathogènes comme les *Bacillus thuringiensis*, les *Bacillus sphaericus*, *Bacillus popillae* et les *Xenorhabdus* est synthétisé dans **le tableau 02**.

Tableau 2 : Mode d'action de quelques bactéries entomopathogènes :

Bactérie entomopathogène	Mode d'action
<i>Bacillus thuringiensis</i>	<p>Cette bactérie produit des delta-toxines. Dans le mésentéron de l'insecte, en présence d'un pH stomacal basique (8,9), le cristal va se désintégrer pour libérer une endotoxine.</p> <p>Celle-ci va provoquer une rapide baisse de l'ATP au niveau des cellules stomacales, un gonflement de cellules épithéliales, une paralysie du tube digestif et un déséquilibre ionique dans l'hémolymphe. L'insecte meurt par inanition.</p> <p>(Fast, 1981 ; Cloutier et Cloutier, 1992 ; Greathead <i>et al.</i>, 1992 ; Miller <i>et al.</i>, 1983).</p>
<i>Bacillus sphaericus</i>	<p>La toxine localisée dans la paroi sporale va être libérée par une digestion partielle de la bactérie dans le tube digestif de la larve de l'insecte.</p> <p>La toxine pénètre dans la membrane péritrophique du tube digestif et empoisonne la larve.</p> <p>(Burgess, 1981 ; Singer, 1981).</p>
<i>Xenorhabdus</i>	<p>Les bactéries du genre <i>Xenorhabdus</i> forment des symbiotes avec les nématodes qui agissent comme vecteur. Libérées dans l'hémocoel, elles tuent rapidement leur hôte</p> <p>(Greathead <i>et al.</i>, 1994).</p>
<i>Bacillus popilliae</i>	<p>Les spores ingérées germent dans le tube digestif et traversent la membrane épithéliale. Elles germent par la suite dans le tube digestif et traversent la membrane épithéliale. L'insecte meurt par septicémie (Burgers, 1982).</p>

### **I.3.4. Généralités sur le puceron noir de la fève et la teigne de la pomme de terre :**

Parmi les ravageurs qui causent le plus de dégâts en agriculture on retrouve le puceron noir de la fève *Aphis fabae* (Scopoli, 1763), et la teigne de la pomme de terre *Phthorimaea operculella* (Zeller, 1873).

#### **I.3.4.1. Puceron noir de la fève *Aphis fabae* (Scopoli, 1763) :**

Le puceron noir de la fève *Aphis fabae* (Scopoli, 1763), est une espèce très polyphage, dont la gamme de plantes-hôtes est très large. Les plantes cultivées qui sont les plus à risques de subir des dommages sont : la betterave, la fève et la gourgane. (Blackman et Eastop, 2006). Cette espèce de puceron s'attaque aux tiges, rameaux, feuilles, fleurs, bourgeons et fruits de toutes les cultures et plantes spontanées hôtes de ce ravageur et ceci, qu'elles soient en plein champs ou sous abris. (Aroun, 1985).

##### **I.3.4.1.1 Classification taxonomique :**

Le puceron de la fève est classé comme suit :

**Règne :** Animalia.

**Embranchement :** Arthropoda.

**Classe :** Insecta.

**Ordre :** Hemiptera.

**Famille :** Aphididae.

**Genre :** *Aphis*.

**Espèce :** *Aphis fabae*.

##### **I.3.4.1.2 Description :**

**Larve :** 0,5 à 1,0 mm ; le corps est brun verdâtre ; les antennes et les pattes sont pâles avec les extrémités noires ; des sécrétions cireuses, blanchâtres, sont fréquemment observables sur l'abdomen. (Fig.4).

**Adulte :** 1,5 à 2,0 mm ; le corps est noir verdâtre ; les antennes et les pattes sont jaunes avec les extrémités noires ; des sécrétions cireuses, blanchâtres, sont fréquemment observables sur l'abdomen ; les cornicules de ce puceron sont courtes. (Blackman et Eastop, 2006). (fig.4).



**Figure 04** : Adulte et larves d'une colonie de pucerons sur une feuille de bette à carde  
(Laboratoire d'expertise et de diagnostic en phytoprotection – MAPAQ)

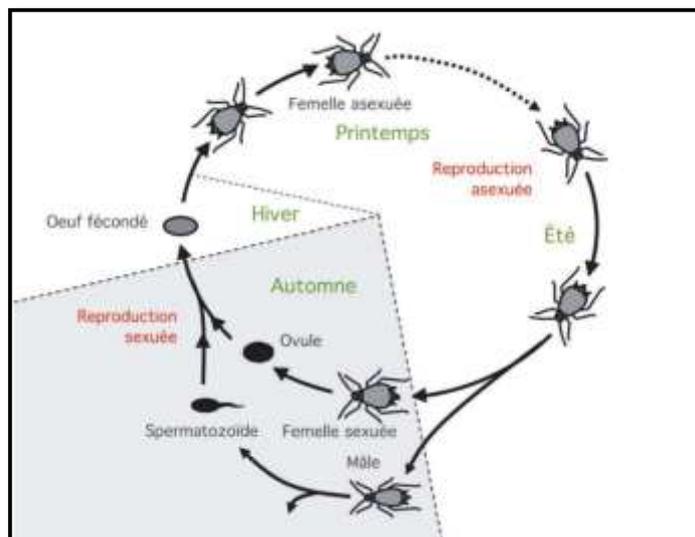
#### **I.3.4.1.3. Cycle biologique :**

Il existe des pucerons holocycliques, qui alternent la reproduction parthénogénétique et celle sexuée et d'autres anholocycliques c'est-à-dire qui se multiplient par parthénogénèse durant toute l'année. Leur cycle de vie est résumé dans la figure 5.

Cette espèce produit plusieurs générations par année et se développe sur plus d'un hôte au courant de la saison chaude. L'hibernation se fait au stade d'œuf sur les tiges de leurs hôtes primaires. (Hôtes hivernaux).

Au printemps, les œufs éclosent et les jeunes pucerons se déplacent jusqu'au feuillage pour commencer à s'en nourrir. Après que quelques générations se soient développées de façon asexuée, des adultes ailés sont produits et ceux-ci quittent leur hôte primaire pour aller rejoindre l'un de leurs multiples hôtes secondaires (hôtes estivaux). Une fois arrivés sur l'hôte secondaire, les pucerons ailés vont donner naissance à des pucerons aptères qui se reproduiront eux aussi par parthénogénèse.

Vers la fin de l'été, les colonies recommencent à produire des individus ailés qui partiront rejoindre l'hôte hivernal. Ces individus vont copuler (reproduction sexuée) et les femelles déposent ensuite leurs œufs sur l'écorce de l'hôte hivernal. (Capinera, 2001)



**Figure 05 :** Cycle de vie d'*Aphis fabae*. Deluzarche (in Jaquiéry et al, 2015)

#### I.3.4.1.4. Dégâts :

Les dommages occasionnés par *A. fabae* peuvent être dévastateurs pour la production végétale, ils peuvent être directs ou indirects (**Fig.6**):

→ **Dégâts directs** : L'alimentation du ravageur provoque un enroulement des feuilles qui va conduire à une diminution de la surface foliaire et même de la masse racinaire et ainsi conduire au dépérissement en cas de fortes infestations.

→ **Dégâts indirects** par la transmission de plus d'une trentaine de virus à la plante hôte. (**Blackman, 2000**).



**Figure 06 :** Dégâts dus au puceron noir de la fève (**Source : INRA**)

### **I.3.4.2. La teigne de la pomme de terre *Phthorimaea operculella* (Zeller, 1873) :**

La teigne de pomme de terre *Phthorimaea operculella* (Zeller, 1873) est un ravageur cosmopolite, en particulier dans les régions tempérées chaudes et tropicales où les plantes hôtes sont cultivées (Foot, 1975).

La pomme de terre est le principal hôte de *P. operculella*, mais d'autres solanacées sont attaquées, en particulier la tomate, le tabac, le piment, l'aubergine et la groseille. Il existe de nombreux hôtes sauvages apparentés; 60 espèces végétales (Das et Raman, 1994).

*P. operculella* attaque toutes les parties végétatives de la plante causant des mines dues à l'alimentation des larves. Lorsque la valeur alimentaire des feuilles diminue, la larve se déplace de la partie aérienne de la plante à la recherche de tubercules (Kroschel et Schaub, 2013).

#### **I.3.4.2.1. Classification taxonomique:**

La teigne de la pomme de terre est classée comme suit :

**Règne :** Animalia.

**Embranchement :** Arthropoda.

**Classe :** Insecta.

**Ordre :** Lepidoptera.

**Famille :** Gelechiidae.

**Genre :** *Phthorimaea*.

**Espèce :** *Phthorimaea operculella*.

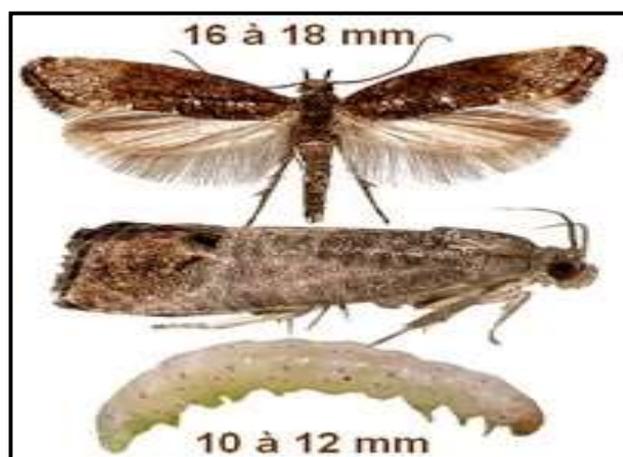
#### **I.3.4.2.2. Description :**

**Œuf :** Largement ovale, blanc nacré lisse juste après la ponte puis devient jaune et brunit à l'approche de l'éclosion (Sefta, 1998) (Fig.7).

**Larves :** Lorsqu'elles sont adultes, les larves de *P. operculella* mesurent environ 12 mm de long. La tête est de couleur brun foncé avec une plaque prothoracique parfois rosâtre. Le corps est d'une couleur blanche grisâtre ou grise verdâtre pâle, le Pinnacle est petit brun foncé ou noir et la plaque anale est brune irisée.

**Adulte :** C'est un petit papillon de nuit géliché allongé, mesurant environ 1 cm de long au repos, de couleur brune pâle avec des persillages plus foncés. Envergure 16-18 mm. La tête et le thorax sont bruns pâles, les palpes incurvés, ascendants, le segment terminal à peu près aussi long que le second. Les antennes sont brunes, 0,7 x la longueur des ailes. Les ailes antérieures sont tachetées de noir et terminées par de longues écailles filiformes, les ailes postérieures gris pâles. Le bout de l'abdomen du mâle est épineux et distinct au microscope.

**Nymphe:** Brun jaunâtre ou rougeâtre, le huitième segment abdominal avec des spiracles légèrement surélevés et pointant vers l'arrière, crémaster avec une épine médiane, dorsale, épineuse et huit crochets



**Figure 07 :** Quelques stades biologiques de *Phthorimaea operculella* (Global register of Introduced and Invasive species (GRIIS), 2019)

#### I.3.4.2.3 Cycle biologique :

Le cycle de vie complet varie de 17 à 125 jours et le développement de tous les stades est fortement influencé par la température : la fécondité maximale a été enregistrée à 28°C et les températures tolérées sont de l'ordre de 15 à 35°C (**Rondon, 2010**).

Les œufs (40 à 290 œufs) sont pondus par lots sur les feuilles de la plante hôte ou sur des tubercules exposés près des bourgeons oculaires. Ils prennent de 3 à 15 jours pour éclore. En hiver, cette étape peut durer jusqu'à 58 jours, mais les œufs ne peuvent pas tolérer les basses températures. les œufs conservés à une 1-4 °C pendant 4 mois n'ont pas éclos (**Langford et Cory, 1932**).

La larve perce d'abord dans le pétiole, jeune pousse ou une veine principale de la feuille, et mine la feuille faisant une tache. Plus tard, elle perce dans un tubercule, faisant une longue galerie irrégulière. L'alimentation au niveau des tubercules stockés commence immédiatement.

L'étape larvaire dure 13-33 jours (**Broodryk, 1970**). L'hivernation se fait à l'état d'œuf et la nymphose a lieu normalement dans le sol et dure de 6 à 29 jours (**Broodryk 1970, 1971**).

Les adultes volent principalement la nuit et sont attirés par la lumière. Ils vivent jusqu'à 10 jours. Le papillon se reproduit continuellement lorsque les conditions le permettent; jusqu'à 13 générations par an (**Mukherjee, 1948**).

#### **I.3.4.2.4. Dégâts :**

Les symptômes typiques des dommages aux feuilles sont les mines causées par les larves qui se nourrissent dans le mésophyle, sans endommager l'épiderme supérieur et inférieur. L'exploitation minière dans la veine principale peut entraîner la perte d'une feuille pennée. Les autres points d'entrée sont les aisselles des feuilles et les points de croissance des jeunes plantes. Le feuillage peut être complètement détruit, ce qui peut entraîner une perte de rendement importante (**Broodryk, 1979**).

Selon **Alvarez et al. (2005)**, les chenilles de *P. operculella* accèdent aux tubercules lorsque les œufs sont déposés sur le sol. Elles forent des galeries sinueuses et des tunnels irréguliers en profondeur ou sous la peau du tubercule. Par ailleurs, des champignons ou des acariens se développent dans les galeries, provoquant la décomposition du tubercule.

En se nourrissant, les chenilles rejettent leurs excréments noirâtres vers l'extérieur qui les rendent facilement repérables. Ces attaques provoquent une perte de la qualité des tubercules si bien qu'ils deviennent inconsommables et inutilisables. (**Fig.8**)



**Figure 08 :** Dégâts de la teigne de pomme de terre sur les tubercules de pomme de terre (Moreda, 2015)

## **II.1 Genre *Bacillus* :**

### **II.1.1. Généralités sur les *Bacillus* :**

Le mot Bacilles en latin signifie bâton. *Bacillus* est un genre de bactéries appartenant à l'embranchement des *Firmicutidae* avec 266 espèces nommées. Celles-ci présentent un large éventail de capacités physiologiques qui leur permettent de vivre dans tous les environnements naturels. Une seule endospore est formée par cellule, ce sont des aérobies obligatoires ainsi que des anaérobies facultatifs (**Lane, 1991**).

*Bacillus anthracis*, l'agent de l'anthrax, est le seul agent pathogène obligatoire de *Bacillus* chez les vertébrés, un certain nombre d'autres espèces en particulier *B.cereus*, sont des agents pathogènes occasionnels des humains et du bétail.

Les espèces de *Bacillus*, *B.lentimorbus*, *B.popilliae*, *B.sphaericus* et *B.thuringiensis* sont des agents pathogènes de groupes spécifiques d'insectes, mais la grande majorité des espèces de *Bacillus* sont des saprophytes inoffensifs (**Cohn, 1872**).

### **II.1.2. Classification taxonomique : (Cohn, 1872).**

**Règne :** Bacteria.

**Embranchement :** Firmicutidae.

**Classe :** Bacilli.

**Ordre :** Bacillales.

**Famille :** Bacillaceae.

**Genre :** *Bacillus*.

**Espèce :**

*Bacillus anthracis.*

*Bacillus cereus.*

*Bacillus coagulans.*

*Bacillus megaterium.*

*Bacillus licheniformis.*

*Bacillus subtilis.*

*Bacillus thuringiensis.*

### **II.1.3. Caractères morphologiques :**

Les *Bacillus* sont des bactéries en forme de bâtonnet à gram positif, leurs spores sont omniprésentes, se trouvant dans le sol, la poussière, l'eau et l'air et constituent les contaminants les plus courants dans les milieux de culture bactériologique (**Smith et Couche, 1991**)

Ils peuvent passer de ( $0,5 \times 1,2 \mu\text{m}$ ) à ( $2,5 \times 10 \mu\text{m}$ ) et peuvent se réduire à des endospores ovales restant dans cet état dormant pendant des années. Les bacilles sont généralement mobiles avec des flagelles peritrichous (**Cohn, 1872**). Les colonies sont grisâtres, larges, arrondies, aplaties, mottes ou brillantes à contours irréguliers avec une large hémolyse sur la gélose (**Alexander et Priest, 1989; Logan et al., 2004**).

#### II.1.4. Caractères cultureux :

Le genre *Bacillus* comporte des bactéries non exigeantes elles se cultivent dans des milieux non enrichis, leur temps d'incubation varie de 20 à 40min. Notant que Chez certaines espèces, les cultures peuvent devenir gram négatif avec l'âge.

La température optimale de culture varie selon l'espèce allant d'environ 25 °C à plus de 75 °C et le minimum d'environ 5 °C à 45 °C, le genre *Bacillus* comprend des espèces psychrophiles, mésophiles et thermophiles et Leur tolérance au sel varie de moins de 2 % à 25 % de NaCl (**Vilas-Bo, 2004**).

#### II.1.5. Caractères biochimiques :

Les caractères d'identification biochimiques sont des critères essentiels dans la classification ou la taxonomie bactérienne. Ces caractères sont présentés dans le **tableau 3** (**Bndjama, 2013**).

**Tableau 3** : caractères biochimiques du *Bacillus thuringiensis* :

Espèce	Caractères biochimiques
<i>Bacillus thuringiensis</i>	Catalase positif Oxydase variable Fermentation du glucose Fermentation du mannitol et une production abondante de gaz (réduction des nitrates en nitrites) Catabolisme du citrate (utilisation du citrate comme une seule source de Carbone) Bactéries aérobies Résistance à des températures élevées

### II.1.6. Effet entomopathogène des *Bacillus* :

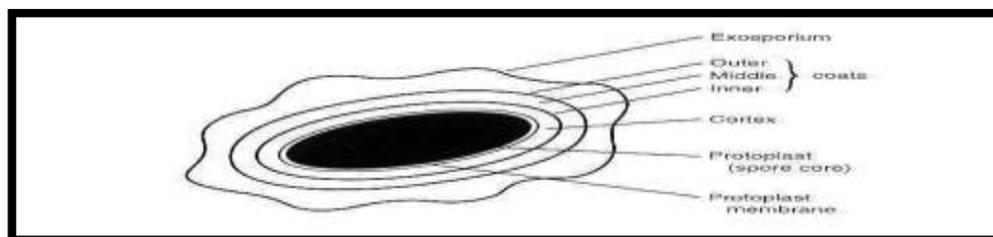
*Bacillus thuringiensis* (BT) est l'espèce la plus utilisée en lutte contre les insectes nuisibles, comme les lépidoptères, les ravageurs les plus nuisibles des céréales, et les palmiers, qui sont les cultures les plus importantes en Afrique du Nord (Bruce 2015 et Kfir, 2002). Elle est efficace contre certaines espèces de coléoptères, lépidoptères et diptères (Morris, 1983 ; Ahmed et al., 1994), principalement en raison de la spécificité des récepteurs membranaires (Mendelsohn et Kough, 2003).

Cette efficacité est réalisée par le biais de l'ensemble des protéines et des enzymes qui seront synthétisés au cours de la sporulation bactériennes (Vilas-Bo, 2004) ; ces mécanismes sont les facteurs de virulence des BT dans la lutte contre les insectes ravageurs (Arora, 2010).

### II.1.7. Les facteurs de virulences des *Bacillus* :

#### II.1.7.1. La sporulation :

Le protoplaste central ou cellule germinale, porte les constituants de la future cellule végétative, accompagnés d'acide dipicolinique. Entourant le protoplaste est un cortex constitué en grande partie de peptidoglycane, qui sont importants dans la résistance à la chaleur et aux radiations de la spore (Brossard et Terry, 1984). La couche interne, la membrane corticale ou paroi protoplastique, devient la paroi cellulaire de la nouvelle cellule végétative lorsque la spore germe. Les couches de spores, qui constituent jusqu'à 50 pour cent du volume de la spore, la protègent des produits chimiques, des enzymes, etc. (Larpen et Gourgaud, 1997).



**Figure 9 : Coupe transversale d'une spore de *Bacillus***  
(Anthrax vads corner 2001)

**❖ Les facteurs stimulants de la sporulation :**

Les événements liés à la sporulation des cellules végétatives et à la germination des spores sont complexes et sont influencés par des facteurs tels que la température, le pH et la disponibilité de certains cations divalents et composés contenant du carbone et de l'azote. Les spores formées dans différentes conditions ont différentes stabilités et degrés de résistance à la chaleur, au rayonnement, aux produits chimiques, à la dessiccation et à d'autres conditions hostiles. (Vilas-Bo, 2004).

**II.1.7.2 Les biomolécules (protéines et enzymes) :****II.1.7.2.1 les protéines :**

*BT* synthétise une grande diversité de protéines cristallines (**Cry et Vip**) lors de la sporulation qui présentent une activité insecticide contre les insectes et les protozoaires (Arora, 2010), De plus, d'autres molécules synthétisées par cette bactérie, les chitinases (Ahmad, 2003), les lactones lactonase acylhomosérine (Lee, 2002), les lipopeptides, et certains antibiotiques tels que la zwittermycine (Zhou, 2008), ces molécules peuvent soit agir en synergie avec cry toxines et protéines Vip, soit agir comme un agent anti-microbien contre plusieurs bactéries et champignons pathogènes et/ou phytopathogènes.

**II.1.7.2.1.1 Protéines cristallines (Cry) :**

Les protéines Cry (ou  $\delta$ -endotoxines) s'accumulent au cours de la sporulation produisant des inclusions cristallines avec plusieurs morphologies Crickmore *et al* (1998), l'identification d'isolats de (BT) porteurs d'une grande variété de gènes cry suggère un large spectre entomotoxique contre différents insectes hôtes ( Monnerat et Pereira, 2014),

**II.1.7.2.1.2 Protéines VIP :**

Les protéines Vip sont connues pour compléter ou apporter une synergie aux activités insecticides des protéines Cry (Chakroun, 2016). Ils sont produits par certaines souches de (BT) et se lient à des récepteurs différents de ceux des protéines Cry (Sena, 2009 ; Chakroun, 2014). Par conséquent, une combinaison de protéines Cry et Vip pourrait élargir le spectre de l'activité insecticide et prévenir l'évolution de la résistance des insectes aux protéines Cry (Ferre, 2002), qui constitue une menace pour les bio insecticides à base de *B.thuringiensis* (Soberón, 2008).

### II.1.7.2.2 Les enzymes :

Les chitinases sont des enzymes qui hydrolysent la chitine (polymère de  $\beta$ -1,4-N-acétyl-aligné-glucosamine), le composant principal de l'exosquelette et de la paroi externe des champignons des invertébrés. Ils sont utilisés depuis longtemps pour lutter contre plusieurs ravageurs fongiques (Hamza, 2016), comme agents synergiques pour augmenter l'entomotoxicité des biopesticides et dans la production de souches recombinantes de (BT) ou de plantes transgéniques (Belaouis et Tamagnini, 2009).

Chez l'insecte, la chitinase potentialise la toxicité des protéines Cry de *B. thuringiensis* en perforant la barrière périthrophique de l'aile moyenne des larves et par conséquent, en augmentant l'accès des endotoxines  $\delta$  aux récepteurs situés dans la membrane externe des cellules épithéliales (Sampson, 1998). Les pores qui se forment par la suite facilitent la pénétration des spores dans l'hémolymphe (Wiwat, 2000).

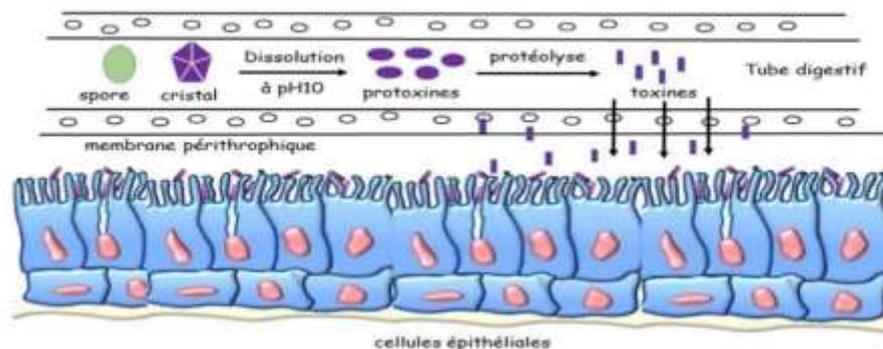


Figure 10 : Mode d'infection du *Bacillus thuringiensis* dans l'intestin d'un lépidoptère (Sanchis, 2016)

## II.2 Genre *Pseudomonas* :

### II.2.1. Généralités sur les *Pseudomonas* :

La famille des Pseudomonadaceae appartient à un vaste groupe de bactéries dont le genre type est celui de *Pseudomonas* qui a été créé en 1894 par Migula. Les espèces regroupées sont principalement des microorganismes saprophytes d'origine essentiellement telluriques (endorrhizosphériques) (Pandey *et al.*, 2013) et aquatiques. (Meghdas *et al.*, 2004).

Ces bactéries peuvent produire des pigments, tels que la **pyocyanine** (vert-bleu) et la **pyorubrine** (jaune-vert) fluorescentes. (Willcox, 2007)

Parmi ces espèces on en retrouve celles qui sont utiles, qui ont une capacité à induire les mécanismes de défense chez la plante et qui pourraient être utilisées comme fertilisants des sols puisqu'elles décomposent la matière organique (Nielsen *et al.*, 1998).

Toutefois il y'a celles qui possèdent un pouvoir entomopathogène comme *Pseudomonas fluorescens* dont certaines souches ont même été commercialisées pour le contrôle biologique des maladies des plantes, (Höfte et Altier, 2010, Stockwell et Stack, 2007).

### **II.2.2. Classification taxonomique de *Pseudomonas fluorescens* (Migula, 1894) :**

**Règne :** Bacteria.

**Embranchement :** Proteobacteria.

**Classe :** Gammaproteobacteria.

**Ordre :** Pseudomonadales.

**Famille :** Pseudomonadaceae.

**Genre :** *Pseudomonas*.

**Espèce :** *Pseudomonas fluorescens*.

Selon **Parte (2014)** le nombre d'espèces reconnues et valablement publié était de 144 espèces appartenant au genre *Pseudomonas*.



**Figure 11 :** Illustration d'une bactérie du genre *Pseudomonas*.  
(Burgstedt, 2019)

### II.2.3 Caractères morphologiques des *Pseudomonas* :

Selon **Bossis et al. (2000)** le genre *Pseudomonas* comprend des bactéries en forme de bâtonnets, mesurant de 2 à 4 µm de longueur et dont la mobilité est assurée par un ou plusieurs flagelles polaires.

Les caractères morphologiques des colonies de *P.fluorescens* sont présentés dans le **tableau 4** (**Ravishankar et al, 2015**).

**Tableau 4** : Les caractères morphologiques des colonies de *P.fluorescens* :

Le caractère	<i>P. fluorescens</i>
La taille	2 mm
La forme	Ronde
L'élévation	Plate
L'opacité	Opaque
La mobilité	Mobile
Le contour	Régulier
Coloration de Gram	Gram négatif

### II.2.3 Caractères cultureux des *Pseudomonas* :

L'immense majorité des espèces de *Pseudomonas* n'exigent aucun facteur de croissance, elles évoluent à un pH neutre et leur température optimale de croissance est de 25 à 30°C tout comme elles peuvent se développer à une température de 4°C (**Palleroni, 1984**).

### II.2.4. Caractéristiques biochimiques des *Pseudomonas* :

Les bactéries du genre *Pseudomonas* sont non-sporulantes, et sont des aérobies obligatoires. Selon **Deshwal et al. (2013)**, les colonies de *Pseudomonas fluorescens* présentent les caractères biochimiques et biologiques présentés dans le **tableau 5** :

**Tableau 5** : Les caractères biochimiques des colonies de *P. fluorescens* :

Test	<i>P. fluorescens</i>
Test d'Oxydase	+
Test de Catalase	+
Test de Citrate	+
Test de l'Indole	-
Arginine dihydrolase	+
Dénitrification	+
Production de pigment	+

### II.2.5. Effet entomopathogène des *Pseudomonas* :

Les bactéries bénéfiques du genre *Pseudomonas* sont des composants importants du sol et du microbiome végétal, elles contribuent à la santé des plantes (Mendes *et al*, 2011), et certaines souches du groupe *P.fluorescens* présentent une activité insecticide, ouvrant ainsi la possibilité d'utiliser ces bactéries pour la gestion des maladies et des insectes ravageurs des plantes. (Commare *et al*, 2002; Otsu *et al*, 2004; Olcott *et al*, 2010; Chen *et al*, 2014).

#### II.2.5.1 : Les facteurs de virulence de *P.fluorescens* :

Les bactérie du groupe *P.fluorescens* sécrètent une exotoxine liée à la  $\beta$ -exotoxine de *Bacillus thuringiensis* (Picot *et al.*, 2001) des exo-enzymes (y compris des protéases (Koka and Weimer,2000; Liao and McCallus, 1998; Sacherer *et al.*, 1994), et aussi des lipases (Dieckelmann *et al.*, 1998) et une enzyme de type cholinestérase (Rochu *et al.*, 1998)

Deux types de gènes de toxines d'insectes ont été identifiés dans des souches du groupe *P. fluorescens* et les deux types sont similaires aux gènes décrits pour la première fois dans des bactéries entomopathogènes des genres *Xenorhabdus* et *Photorhabdus*. (Péchy-Tarr *et al*, 2008).

#### II.2.5.2 : Toxines au pouvoir insecticides produites par *P.fluorescens* :

##### ❖ **Fluorescens insecticidal toxin (FitD) :**

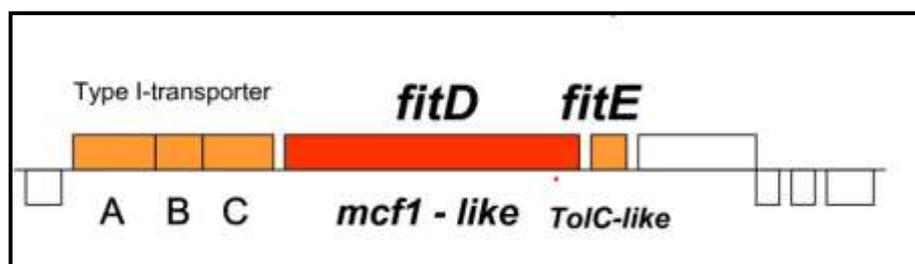
Les souches contenant le gène codant pour **FitD** (toxine insecticide fluorescens) sont mortelles une fois l'insecte attaqué avec (Péchy-Tarr *et al*, 2008), en effet il s'agit d'un

déterminant majeur de la toxicité de la souche sur trois insectes ravageurs lépidoptères importants en agriculture, le ver du cotonnier africain *Spodoptera littoralis*, la tordeuse des bourgeons du tabac *Heliothis virescens* et la teigne des crucifères *Plutella xylostella*. (Ruffner *et al*, 2013).

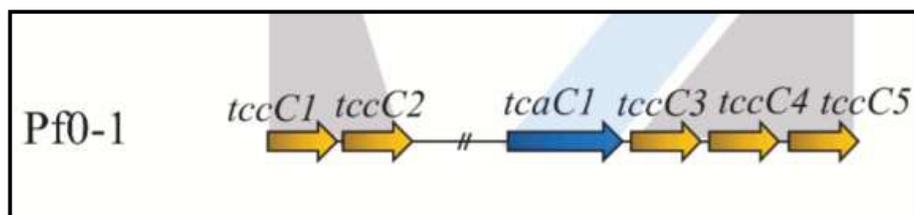
#### ❖ Toxin complex proteins (Tc) :

D'après Loper *et al*, (2012) et Ffrench-Constant *et al*, 2007, certaines souches du groupe *P. fluorescens* ont des gènes similaires à ceux codant pour les protéines du complexe Toxine (Tc) qui sont observés chez *Photobacterium luminescens*.

Les toxines Tc ont trois composants : A, B, et C. (Ffrench-Constant *et al*, 2007) nécessaires pour une toxicité totale. (Ffrench-Constant *et al*, 2000), le composant A servant de toxine primaire, et les composants B et C considérés comme des potentialisateurs qui vont augmenter la toxicité du complexe protéique. (Ffrench-Constant *et al*, 2006; Waterfield *et al*, 2005). Des groupes de gènes Tc ont été décrits chez la souche *P. fluorescens* Pf0-1 (Ffrench-Constant *et al*, 2007)



**Figure 12** : le contexte génomique des îlots codant pour fitD chez *Pseudomonas fluorescens*. (Source : Lorena *et al.*, 2016)



**Figure 13** : Le groupe du gène Tc chez *P. fluorescens*  
(Source : Lorena *et al.*, 2016)

**Objectif de travail :**

La présente étude a été réalisée dans le cadre d'une contribution à la connaissance des effets entomopathogènes d'isolats de la rhizosphère de milieux cultivés sur des modèles d'insectes nuisibles aux cultures légumières. Le principal objectif dans ce travail est d'isoler et d'identifier dans un premier lieu des isolats des genres *Bacillus* et *Pseudomonas* des sols agricoles choisis puis d'évaluer leur efficacité dans le temps. Notre travail expérimental a duré 3 mois et a été réalisé au sein du Laboratoire de Recherches des Plantes Médicinales et Aromatiques (LRPMA) de la faculté des sciences de la nature et de la vie de l'université Saad Dahleb de Blida 1.

**I.1. Matériel :**

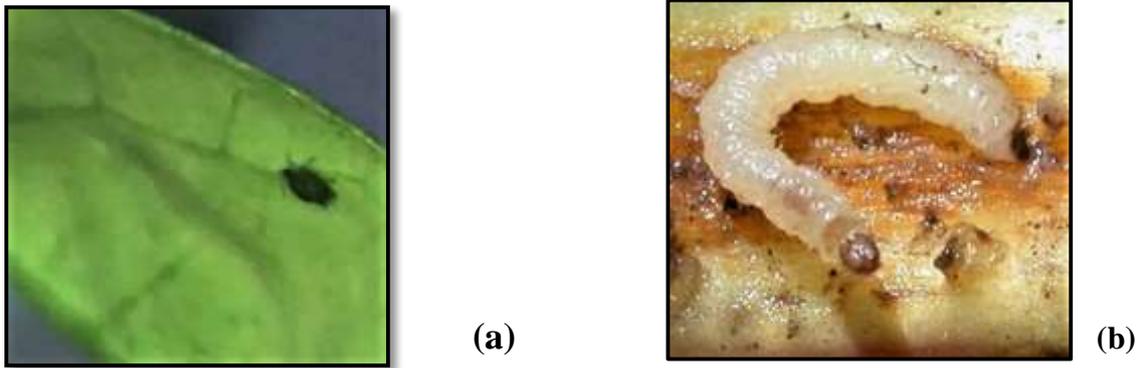
Le matériel et les produits utilisés sont indiqués dans l'annexe 1.

Le matériel biologique utilisé lors de notre expérimentation est représenté par :

- Des bactéries isolées à partir du sol.
- Des plants de fève infestés en pots. (**Fig.14**)
- Des pucerons noirs *Aphis fabae* récoltés à la suite de l'infestation des plants de fève. (**Fig.15.a**)
- Des chenilles de la teigne de la pomme de terre *Phthorimaea operculella*, âgées entre le 3<sup>e</sup> et le 4<sup>e</sup> stade larvaire. (**Fig.15.b**)



**Figure 14 :** Plantation de fève infestée de puceron noir. (**Original, 2021**)



**Figure 15** : Puceron noir de la fève (a) (Original, 2021) et larve de teigne de pomme de terre (b) ( <https://fr.pestctrl.biz/> )

## I.2. Méthodes :

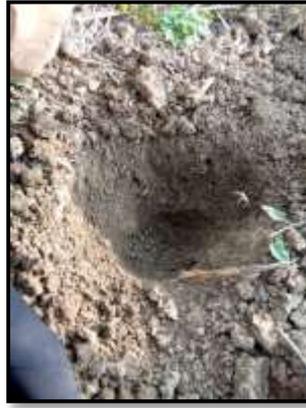
Avant l'obtention des résultats d'entomopathogénicité de nos isolats bactériens, nous avons procédé aux étapes suivantes :

### I.2.1. Isolement des bactéries telluriques :

#### I.2.1.1. Echantillonnage :

Nous avons prélevé deux échantillons de sol à 15 cm de profondeur (**Fig.16**), qui ont été conservés dans des sacs en papiers. Les prélèvements, à raison de trois répétitions aléatoires, ont concerné deux parcelles agricoles (prunier et colza) situées chacune respectivement à Oued Aleug et Bouinan, Wilaya de Blida, (**Fig.17**). Chaque prélèvement est réalisé à deux niveaux :

- Au niveau de la rhizosphère, afin d'isoler des bactéries bénéfiques du genre *Pseudomonas*. (**Pandey et al., 2013**)
- Au niveau des bordures dans la couche superficielle du sol, à environ 5 à 10 cm pour isoler les bactéries du genre *Bacillus*. En effet, ces microorganismes bactériens telluriques sont omniprésents dans la nature. (**Smith et Couche, 1991**)



**Figure 16 : Echantillonnage du sol. (Original, 2021)**



**Parcelle de Prunier**



**Parcelle de Colza**

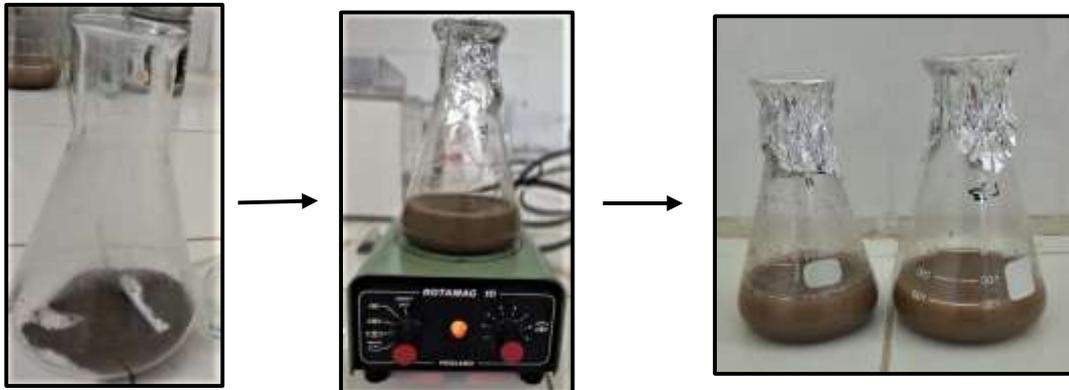
**Figure 17 : Les deux parcelles des échantillonnages (Original, 2021)**

- Au laboratoire, nous avons commencé par tamiser une quantité de sol afin d'éliminer les débris de végétaux et les granules, ensuite nous avons pesé 10 grammes de ce sol. (Fig.18)



**Figure 18 : Préparation du sol. (Original, 2021)**

➤ A cette quantité de sol nous avons rajouté dans un erlenmeyer, 90ml d'eau physiologique stérile. Puis, nous avons agité à l'aide d'un agitateur magnétique cette solution mère pendant 30mn pour l'homogénéiser, (**Fig.19**).



**Figure 19** : Préparation de la solution de mère. (**Original, 2021**)

### **I.2.1.2. Préparation des dilutions :**

Nous avons préparé à partir de la solution mère des dilutions décimales jusqu'à la concentration de  $10^{-7}$  selon les étapes suivantes : (**Fig.20**)

On remplit 9 ml d'eau physiologique stérile dans des tubes à essai stériles qui sont numérotés de (-1) jusqu'à (-7).

A l'aide d'une micropipette graduée à 1000  $\mu\text{l}$ , on prélève 1 ml de solution mère qu'on verse dans le 1<sup>er</sup> tube à essai, puis on procède à une agitation de cette dernière. On a alors notre dilution à  $10^{-1}$ .

On prélève par la suite 1 ml du 1<sup>er</sup> tube à essai qu'on verse dans le 2<sup>eme</sup> tube numéroté (-2). On poursuit avec cette même méthodologie jusqu'à l'obtention de la dilution avec la concentration de  $10^{-7}$  ufc/ml.



Figure 20 : Préparation des dilutions décimales. (Original, 2021)

### I.2.1.3. Etalement des solutions préparées :

Pour isoler les bactéries des genres *Pseudomonas* et *Bacillus*, nous avons dans un premier temps préparé les milieux de culture respectivement KING B et de Gélose Nutritive qui ont été coulés dans des boîtes de Petri stériles numérotées de (-1) jusqu'à (-7), (Fig.21)

A l'aide d'une micropipette graduée à 100  $\mu$ l, nous avons prélevé 0.1 ml de solution de chaque tube de dilutions que nous avons étalé à l'aide d'une pipette Pasteur stérile sur les boîtes de Pétri contenant les milieux de culture King B. Cela permettra de mettre en évidence la fluorescence des bactéries ciblées du groupe des *P. fluorescens*. (Reetha *et al.*, 2014).

Après l'étalement des sept dilutions des solutions bactériennes respectives, les cinq premiers tubes ont été chauffés dans un bain marie à 80°C pendant 10 minutes, dans le but de sélectionner les bactéries du genre *Bacillus*. (Zelege *et al.*, 2009). Une fois le chauffage effectué, ces cinq solutions ont été étalées sur les boîtes de Pétri contenant le milieu GN selon la même procédure utilisée plus haut.

Les boîtes de GN ont été incubées dans une étuve pendant 24h à 30°C et celles de KB à 28°C pendant 48h pour pouvoir observer et identifier par la suite, les colonies suspectes appartenant aux genres ciblés.

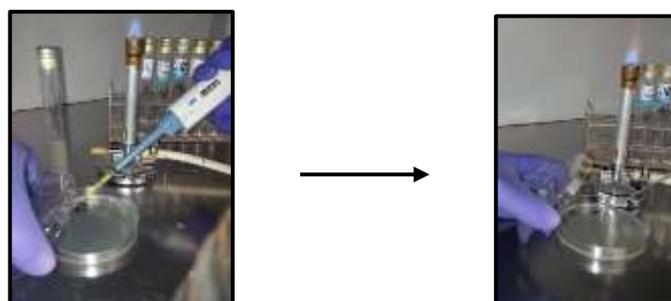
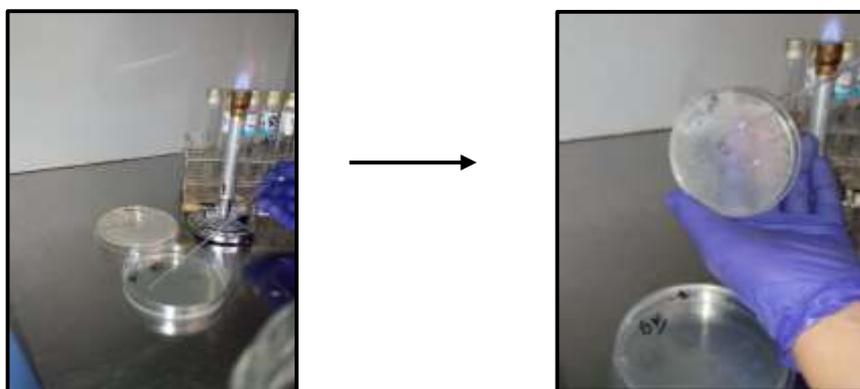


Figure 21 : Etalement des dilutions. (Original, 2021)

**I.2.2. Identification des isolats bactériens :****I.2.2.1. Identification macroscopique et microscopique :****-Identification macroscopique :**

Après 24h et 48h d'incubation pour les isolats respectifs, nous avons observé les colonies qui se sont développées sur les deux milieux (KB, GN), puis nous avons sélectionné selon des caractères morphologiques, les colonies susceptibles d'appartenir aux genres ciblés.

L'étape suivante a consisté à purifier les isolats en prélevant des colonies suspectes à l'aide d'une pipette Pasteur afin de les ensemer en stries séparément dans des boîtes de Pétri avec le milieu GN. (**Fig.22**)



**Figure 22 : Ensemencement de la colonie suspecte. (Original, 2021)**

**-Identification microscopique :****• Coloration au Bleu de méthylène :****a) Technique :**

Cette technique est utilisée dans le but de mettre en évidence le regroupement et la morphologie des bactéries isolées.

**b) Principe :**

Le prélèvement a été déposé sur une lame puis fixé à la chaleur. On a versé quelques gouttes de bleu de méthylène. Puis, nous avons attendu 1 à 2 minutes avant de rincer la lame et la sécher. L'observation a été faite au microscope optique, à l'objectif X100, après ajout d'une goutte d'huile à immersion.

**I.2.2. Tests d'orientation :****1) Coloration de Gram :****a) Technique :**

La technique consiste à séparer les bactéries en deux groupes (gram positif, gram négatif), en fonction des proportions de peptidoglycane présent dans la membrane plasmique de ces dernières.

**b) Principe :**

Tout d'abord on a préparé un frottis comme suit :

Une goutte de solution bactérienne a été étalée sur une lame par des mouvements circulaires en partant du centre à la périphérie. On laisse sécher à température ambiante puis on fixe à la chaleur à 3 reprises. **(Fig.23)**

On procède en premier lieu à la coloration au violet de gentiane pendant 30 à 60 secondes, puis on rince à l'eau distillée. **(Fig.24)**. On recouvre la lame de Lugol, on laisse agir 60 secondes puis on rince à l'eau distillée. **(Fig.25)**



**Figure 23 :**  
Préparation du frottis.  
**(Originale, 2021)**



**Figure 24 :** Coloration  
au violet de gentiane.  
**(Originale, 2021)**



**Figure 25 :** Lame  
recouverte de Lugol.  
**(Originale, 2021)**

On effectue par la suite une décoloration rapide à l'alcool en le versant goutte par goutte sur la lame pendant 10 secondes, puis on rince à l'eau distillée.

En deuxième lieu, nous avons effectué une coloration à la fuchsine, en laissant agir 1 minute, puis on rince et on laisse sécher. (Fig.26)



**Figure 26 :** Coloration à la Fuchsine. (Originale, 2021)

On observe enfin au microscope optique, à l'objectif X100, après ajout d'une goutte d'huile à immersion sur le frottis. Les bactéries Gram Positif se colorent en violet et celles qui se colorent en rose sont Gram négatif.

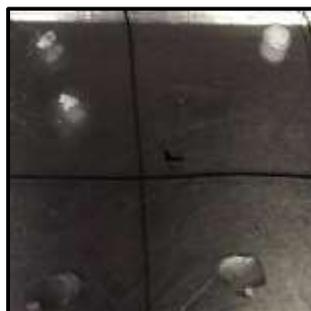
## 2) Test de Catalase :

### a) Technique :

La catalase est une enzyme qui a pour propriété de décomposer l'eau oxygénée en eau et en oxygène gazeux. Selon l'équation suivante :



L'apparition de bulles gazeuses est un signe de l'action de la catalase, et vice-versa. (Fig.27)



**Figure 27 :** Test de catalase. (Originale, 2021)

**b) Principe :**

On dépose sur une lame une goutte d'eau oxygénée à 10 volumes, puis on prélève un petit fragment de la colonie à l'aide d'une pipette Pasteur scellée et on le dissocie dans l'eau oxygénée (**fig.27**).

**3) Test d'Oxydase :****a) Technique :**

L'oxydase est une enzyme qui intervient dans les divers couples d'oxydoréduction et qui assure la fixation de l'oxygène moléculaire.

L'apparition d'une coloration violacée en présence d'oxygène et en quelques secondes montre que la souche est oxydase (+). (**Fig.28**)

Absence de coloration : oxydase (-).

**b) Principe :**

A l'aide de la pipette Pasteur, on prélève un fragment de la colonie et on le dépose sur une plaque imprégnée d'oxalate de diméthyle-paraphénylène diamine.



**Figure 28 : Test d'oxydase. (Originale, 2021)**

#### 4) Aspect sur milieu TSI :

##### a) La technique :

Le test sur milieu TSI permet l'identification des bactéries selon leur métabolisme : (Fig. 29)

-La fermentation du glucose : lorsqu'en anaérobiose la souche fermente le glucose, il y a formation d'acides organiques qui acidifient le milieu et entraînent le virage du culot du rouge au jaune.

-La fermentation du lactose (sur la pente) : Cette fermentation témoigne de la production d'une bêta-galactosidase qui hydrolyse le lactose en galactose et en glucose. Les souches qui ne produisent pas de bêta-galactosidase (lactose -) ne peuvent pas acidifier le milieu, donc la couleur de la pente reste rouge.

-La production de gaz (CO<sub>2</sub>) : Dans le processus fermentaire du glucose, la décarboxylation du pyruvate est à l'origine d'un dégagement du CO<sub>2</sub> dont la pression dans le tube décolle la gélose ; la souche est ainsi dite gaz (+).

-La production d'Hydrogène sulfuré H<sub>2</sub>S : Elle est marquée par un dépôt noirâtre sur la gélose issue de sa combinaison avec les ions ferriques. L'absence de production de H<sub>2</sub>S ne provoque pas de coloration noire du milieu.



**Figure 29 : Milieu TSI.  
(Originale, 2021)**

##### b) Le principe :

On prélève une colonie à l'aide d'une pipette Pasteur à partir de la boîte de Petri. On ensemence ensuite la pente par des stries. Puis, on effectue une piqure centrale dans le culot. Et enfin, on laisse incuber à 37°C pendant 24h.

#### 5) L'utilisation de Citrate :

##### a) La technique :

Le test sur le milieu Citrate de Simmons permet l'étude de l'utilisation du Citrate (Acide organique) comme seule source de carbone, par les bactéries possédant une citrate perméase.

(Fig.30) Ce milieu se caractérise par la présence d'un indicateur de pH, le bleu de bromothymol et d'un seul composé carboné, le citrate de sodium.

La dégradation du citrate se traduit par une alcalinisation du milieu révélée par le virage du bleu de bromothymol à sa teinte basique.

Les bactéries qui utilisent le citrate comme seule source de carbone, avec alcalinisation du milieu sont dites : citrate positif, la couleur vire au bleu sans alcalinisation du milieu la couleur reste inchangée.

Les bactéries qui n'utilisent pas le citrate comme seule source de carbone sont dites : Citrate négatif, la couleur reste inchangée.



**Figure 30 :** Milieu Citrate de Simmons. (Originale, 2021)

#### **b) Le principe :**

On prélève une colonie à l'aide d'une pipette Pasteur à partir de la boîte de Petri. Ensuite, on ensemence la pente par des stries, et enfin on laisse incuber à 37°C pendant 24h, avec le bouchon du tube dévissé pour les échanges gazeux. (Pierre-Yves, 2005).

### **I.2.2. Les tests d'entomopathogénicité :**

Au cours de notre expérimentation au laboratoire, nous avons testé nos isolats bactériens appartenant aux genres *Bacillus* et *Pseudomonas* sur deux ravageurs de culture : Le puceron noir de la fève : *Aphis fabae* et la teigne de la pomme de terre *Phthorimaea operculella*, précédemment présentés.

#### **I.2.2.3.1. Traitement sur les pucerons :**

Les traitements ont été effectués d'une part avec les solutions brutes de vingt isolats bactériens et d'autre part avec trois concentrations de dix isolats dans le but de spécifier une concentration d'entomopathogénicité précise.

**a) Test avec les solutions brutes :**

La solution bactérienne (**Fig.31**), a été préparée comme suit :

- Une quantité suffisante de culture bactérienne présente dans la boîte de Petri correspondante à un isolat donné est raclée à l'aide d'une pipette Pasteur. Elle est ensuite dissoute dans 5ml d'eau physiologique stérile contenue dans un tube à essai qu'on a agité par la suite.



**Figure 31** : Préparation de la solution bactérienne. (Original, 2021)

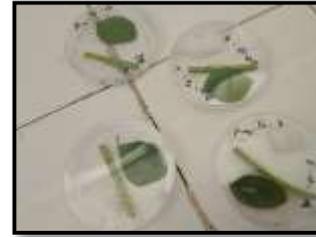
Des feuilles et tiges de plants de fève non infestées de pucerons sont récoltées puis désinfectées avec de l'eau de javel à 2° chlorométrique, puis rincées à trois reprises à l'eau distillée. Elles sont ensuite trempées dans la solution bactérienne de façon à ce qu'elles soient bien imprégnées sur chaque face. D'autres feuilles et tiges de fève trempées dans de l'eau physiologique stérile ont été considérées pour le témoin non traité.

Le matériel végétal traité par les solutions brutes de chaque isolat bactérien est déposé dans des boîtes de Pétri vides avec un coton humidifié avec de l'eau distillée stérile afin de maintenir leur turgescence. Des pucerons noirs aptères de la fève sont récoltés de plants infestés à l'aide d'un pinceau fin puis mis dans les différentes boîtes, (**Fig.32**).

Les tests de pathogénicité avec les solutions bactériennes brutes ont concerné vingt isolats à raison de 3 répétitions par isolat et un total de 15 pucerons pour chaque répétition, (**Fig.33**)



**Figure 33** : Répétitions et témoin du traitement. (Original, 2021)



**Figure 32** : Traitement sur puceron. (Original, 2021)

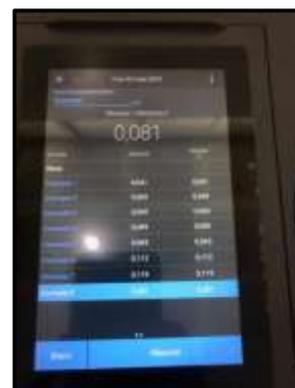
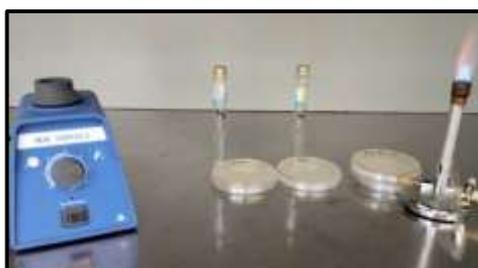
### Tests avec concentrations calculées :

Tout d'abord on a préparé une solution bactérienne, dont on a calculé la concentration en utilisant un spectrophotomètre ; où on a ajusté la turbidité de la solution pour qu'elle soit équivalente à celle d'un standard Mc Farland 0,5 et qui représente une densité de 0.08 à 0.1 c'est-à-dire qui correspond à la concentration de  $1 \times 10^6$  UFC/ml (Abdellah *et al.*, 2018) et cela pour une longueur d'onde de 625 nm, (Fig.34).

Après obtention de la concentration  $1 \times 10^6$  UFC/ml on a effectué des dilutions décimales ( $10^{-1}$ ) jusqu'à la concentration  $1 \times 10^4$  UFC/ml.

L'application du traitement sur les pucerons s'est faite de la même sorte que le traitement avec les concentrations brutes.

Le choix des isolats que nous avons testé avec ces doses calculées a été basé sur l'efficacité de ces derniers vis-à-vis des résultats des tests bruts.

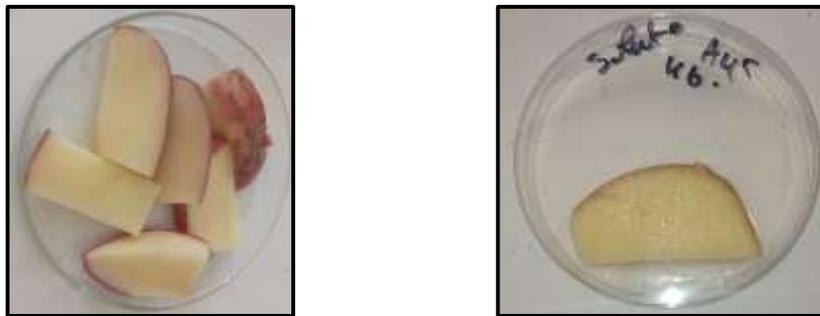


**Figure 34** : préparation des doses calculées. (Original, 2021)

### I.2.2.3.2. Traitement sur la teigne de la pomme de terre *Phthorimaea operculella* :

L'étude des traitements bactériens à base des isolats de *Bacillus* et de *Pseudomonas* identifiés a été appréhendée dans la perspective de mettre en évidence leur efficacité contre la teigne de la pomme de terre.

En premier lieu, des solutions bactériennes brutes ont été préparées, comme expliqué précédemment. Des lamelles d'une épaisseur de 1cm de pommes de terre saines achetées à Blida et à Douera, elles ont été découpées puis rincées à l'eau distillée stérile. Un volume de 09 ml de solution bactérienne a été versé dans une boîte de Petri vide, pour le trempage des lamelles de pomme de terre saines, (**Fig.35**).



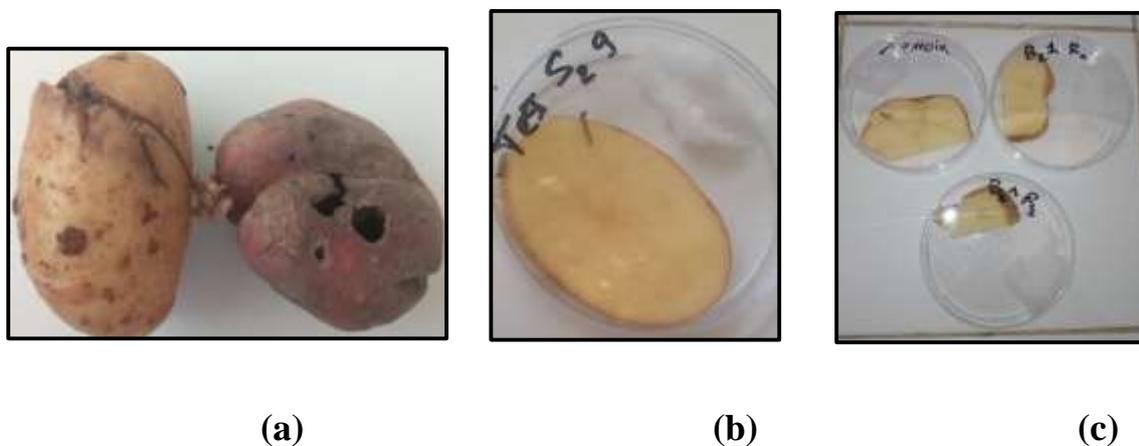
**Figure 35** : Préparation des lamelles de pomme de terre pour les traitements bactériens. (**Original, 2021**)

L'étape suivante a consisté à mettre les lamelles de pomme de terre préalablement trempées dans les solutions bactériennes dans une boîte de Petri contenant un coton humidifié par de l'eau distillée stérile pour garder leur vitalité et réduire leur dessèchement.

Et en dernier lieu, les larves de la teigne ont été recherchées dans les galeries occasionnées par ces dernières dans les tubercules de pomme de terre infestées (**Fig.36.a**). Les larves sont prélevées des galeries à l'aide d'une pince fine puis disposées sur les lamelles de pomme de terre traitées. (**Fig.36.b, 36.c**).

Les témoins négatif et positif ont été considérés respectivement pour des lamelles trempées dans de l'eau physiologique stérile et des lamelles de pomme de terre trempées dans une solution bactérienne à base de *Bt*, souche fournie par le Dr Mohand Kaci H. du laboratoire VALCORE, Université M'hamed Bougara Boumerdes.

Cinq isolats bactériens avec deux répétitions chacun et un total de 4 larves pour chaque répétition ont été utilisés.



**Figure 36 :** Etapes du traitement bactérien sur les larves de la teigne de pomme de terre.  
(Original, 2021)

### **I.3. Analyse des mortalités sous l'effet des traitements bactériens**

Le nombre d'individus morts pour les deux ravageurs a été comptabilisé quotidiennement à 24h, 48h et 72h pour les différents traitements considérés, aussi bien pour les effets bactériens à base des solutions brutes que pour les effets des concentrations des isolats bactériens.

La mortalité observée a été calculée pour les lots traités ainsi que pour les témoins négatif (eau physiologique) et positif (*Bt*). Les moyennes plus ou moins l'écart type de la mortalité observée pour chaque concentration et le témoin, sont calculées à partir des 3 ou 2 répétitions pour chaque isolat bactérien.

Le pourcentage de la mortalité observée (MO) des individus témoins et traités a été déterminé selon la formule  $MO = \frac{NM}{NT} * 100$

NM : nombre des individus morts après traitement, NT : Nombre total des individus traités.

Le pourcentage de la mortalité observée chez les individus traités est transformé en mortalité corrigée (MC) selon la formule **d'Abott (1925)**, qui permet d'éliminer la mortalité naturelle qui doit être comprise entre 4 et 16 %, enregistrée chez la série des témoins

$MC = \frac{MOT - MOT_0}{100 - MOT_0} * 100$ . MC : Mortalité corrigé exprimée en %

Les pourcentages de la mortalité corrigée (ou observée) subissent une transformation angulaire selon la méthode de **Fisher et Yates (1971)**.

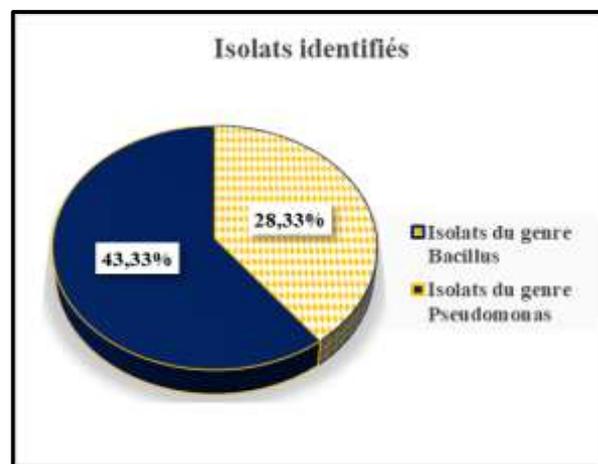
La droite de régression de logarithme décimal des concentrations (X) en fonction des probits (Y), issus de la transformation angulaire des moyennes de la mortalité corrigée (Fisher et Yates, 1971), permet d'estimer les deux concentrations létales CL50 et CL90 selon **Finney (1971)** :

$Y = a X + b$  donc  $X = \frac{probit Y - b}{a}$ , ou  $Y = probit 50 (90)$  et  $X = \log DL 50 (CL90)$ ,  $Anti \log X = CL50. (CL90)$ .

## II.1. Identification des isolats bactériens :

Au total 60 isolats ont été relevés à travers les tests d'orientation. Nous avons pu identifier 43 isolats dont 17 appartiennent au genre *Bacillus* (28.33%) et les 26 autres appartiennent au genre *Pseudomonas*, (43.3%), (**Fig.37**).

Les bactéries appartenant au groupe des *Pseudomonas fluorescens* figurent parmi les plus abondantes de la rhizosphère. En effet, elles représentent dans certains cas plus de 60% de la microflore bactérienne totale du sol (**Allaire, 2005**). S'ajoutent aussi aux *Pseudomonas* fluorescents, les bactéries du genre *Bacillus* qui sont aussi très abondantes dans le sol, (**Kaelin et al., 1974**).



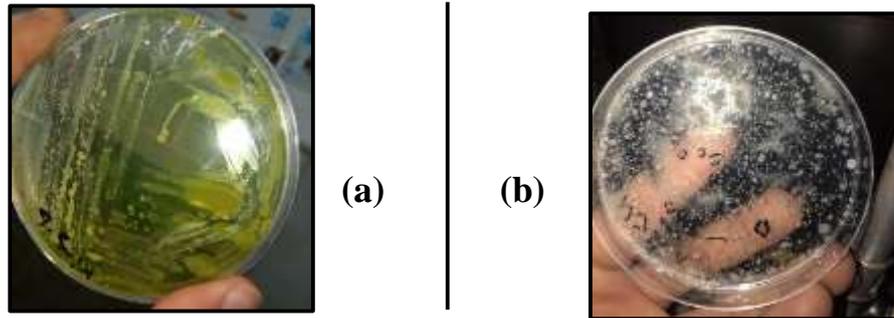
**Figure 37** : Répartitions des isolats obtenus.

### II.1.1. Identification macroscopique :

Les résultats de l'identification macroscopique nous ont permis d'observer les colonies des isolats qui se sont présentées comme suit : (**Fig.38**)

-Des colonies de couleur beige crème, au contour irrégulier tout en étant opaques caractéristiques du genre *Bacillus* décrites par **Zelege et al., (2009)**.

-Des colonies au contour régulier, opaques et rondes, avec production de pigment fluorescent typique des colonies du genre *Pseudomonas* comme l'ont décrit **Ravishankar et al., (2015)**.



**Figure 38 :** (a) : Colonies suspectes du genre *Pseudomonas*. (b) : Colonies suspectes du genre *Bacillus*. (Originale, 2021)

## II.1.2. Identification microscopique :

### II.1.2.1. Coloration au Bleu de méthylène :

Pour une première orientation, nous avons observé au microscope optique des bactéries en forme de bâtonnets, qui se sont différenciées au niveau de la taille, celles du genre *Bacillus* sont considérablement plus grandes que celles du genre *Pseudomonas*. (Fig.39)

D'après **Hernandez et al., (2004)**, les bactéries appartenant aux genres *Bacillus* ont une forme en bâtonnet de 5 $\mu$ m de long alors que les bactéries du genre *Pseudomonas* ont une forme de bacilles droits et fins avec une taille de 0.5 à 1.3 $\mu$ m de long (**Singleton et Sainsbury, 2006**).

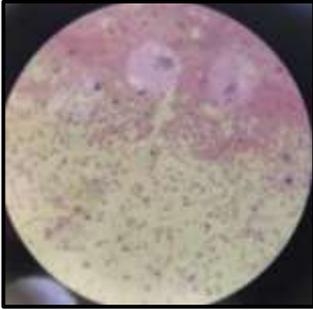
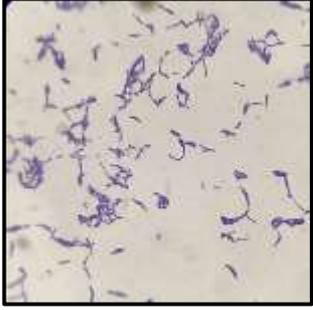


**Figure 39 :** Aspect au microscope optique x100 de *Pseudomonas* (a) et *Bacillus* (b), avec la coloration au Bleu de méthylène (Originale, 2021)

### II.1.2.2. Résultats des tests d'orientation :

Pour différencier les isolats du genre *Bacillus* de ceux appartenant au genre *Pseudomonas*, nous avons effectué des tests d'orientation dont les résultats sont consignés dans le tableau 6.

**Tableau 6 :** Résultats des tests d'orientation des isolats bactériens obtenus.

Tests	Résultats
<p><b>Coloration de Gram</b></p>	<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;">  <p><b>(a)</b></p> </div> <div style="text-align: center;">  <p><b>(b)</b></p> </div> </div> <p><b>a)</b> Les bactéries isolées sont colorées de rose, signe que ce sont des bactéries à gram (-).  <b>b)</b> Sous observation, les bactéries de cet isolat sont colorées de violet, ce qui montre qu'elles sont Gram (+).</p>
<p><b>Test de la catalase</b></p>	<div style="display: flex; align-items: center;">  <div style="margin-left: 20px;"> <p>L'apparition de bulles gazeuses est signe de l'action de la catalase qui a décomposé l'eau oxygénée, donc du test positif pour les isolats obtenus.</p> </div> </div>
<p><b>Test de l'oxydase</b></p>	<div style="display: flex; align-items: center;">  <div style="margin-left: 20px;"> <p>La présence de couleur violacée dans le disque démontre une fixation d'oxygène donc du test positif pour nos isolats à gram (-), et un résultat variable pour nos isolats à gram (+).</p> </div> </div>

Tests	Résultats
Aspect sur milieu TIS	 <p data-bbox="1011 360 1385 577">Le virage du culot de la couleur rouge à la couleur jaune est signe de fermentation du glucose, ce résultat a été observé chez la plupart des isolats.</p>
Utilisation du Citrate	 <p data-bbox="1011 685 1385 902">On a observé un virement de couleur du vert au bleu qui est dû à l'utilisation de nos isolats du citrate comme source de carbone, ils sont alors citrate +.</p>

Les isolats sélectionnés pour le genre *Bacillus* ont présenté des caractères biochimiques similaires et typiques du genre ciblé (Gram +, Oxydase variable, Catalase +, Citrate +, et fermentation du glucose sur TSI) tel démontré par (Adwitiya et al., 2009) ce qui prouve que les isolats étudiés appartiennent au genre *Bacillus*.

Les isolats sélectionnés pour le genre *Pseudomonas* sont également Gram -, Oxydase positive, Catalase positive, Citrate +, avec fermentation du glucose sur milieu TSI. D'après Meera et Balabaskar, (2012) et Katsuhiko et al., (1996), ces critères sont représentatifs des bactéries du genre *Pseudomonas*.

## II.2. Résultats des tests d'entomopathogénicité :

### II.2.1. Effet des isolats bactériens étudiés sur le puceron noir de la fève :

Nous avons effectué des traitements à base de solutions bactériennes à des concentrations à deux niveaux : brutes et calculées. Les observations des mortalités ont été faites au bout de 72h.

L'effet du traitement, a été remarqué par une déshydratation du puceron qui a mené à un ralentissement de mouvements précédant ainsi sa mort. L'aspect de mortalité le plus récurrent

qui a été observé est celui d'un noircissement accentué du corps ainsi qu'un retournement dorsal, (Fig.40). Des aspects similaires ont été également observés par **Miguel Rodríguez et al., (2018)** lors du traitement d'une population de pucerons par *Bacillus sp.*



**Figure 40** : Aspect d'un individu d'*Aphis fabae* mort.  
(Originale, 2021)

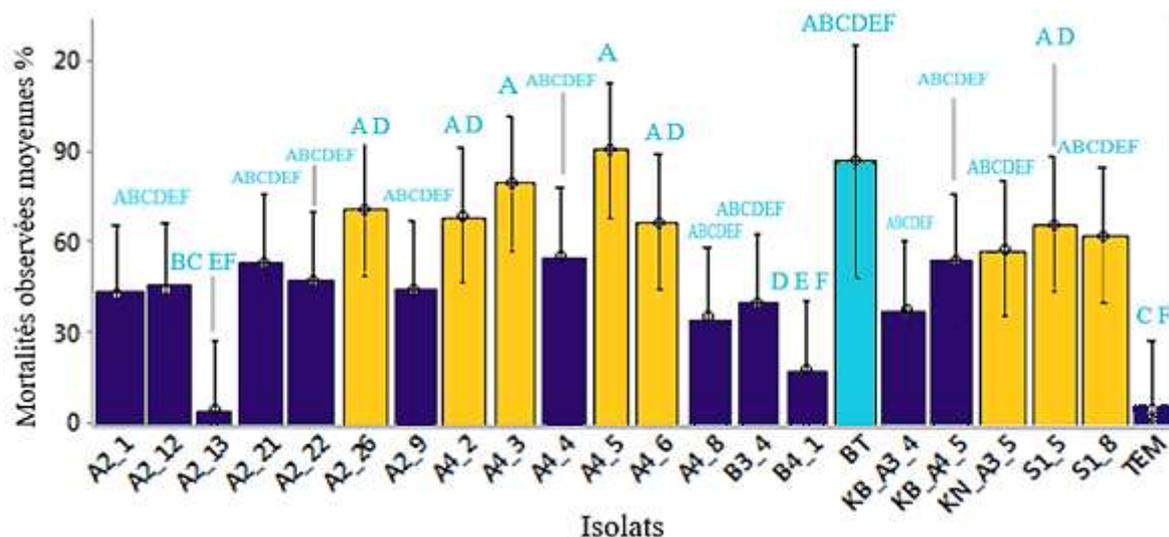
#### **II.2.1.1. Effet des traitements à base des solutions brutes des isolats bactériens :**

Nous avons appliqué les traitements de suspensions bactériennes de 20 isolats (17 du genre *Bacillus* et 3 du genre *Pseudomonas*) aux concentrations brutes. Nous avons comparé leurs effets à celui des deux témoins (positif : *Bt* et négatif) sur des individus adultes aptères d'*Aphis fabae*. Les taux de mortalités ont été calculés après 72h. La variable à expliquer dans cette étude est la mortalité observée alors que les variables explicatives concernent les effets isolat bactérien et concentration de l'isolat.

Pour expliquer les différences des moyennes des mortalités où l'hypothèse alternative stipule l'idée de cette différence, nous avons effectué une analyse de variance (ANOVA) à 2 facteurs. Le test de l'ANOVA (systat vers. 7) renvoie à une probabilité associée (p value) qui comparée à un seuil de risque alpha permet d'accepter l'hypothèse alternative. Un effet significatif se traduira par une différence significative entre les moyennes MO%. Nous avons également testé si l'effet du facteur isolat dépend de la modalité du facteur concentration.

Les comparaisons multiples par paires ont permis d'identifier quelles modalités spécifiques ont des moyennes différentes les unes des autres, à travers le test post hoc de Tukey (Minitab vers. 11).

Les résultats des effets des traitements bactériens à base des isolats de *Bacillus* et *Pseudomonas* étudiés sur les mortalités observées du puceron de la fève sont représentés dans la figure 41. Les moyennes des taux de mortalité observées à 72h sont significativement différentes entre les traitements à base des isolats bactériens étudiés et comparés aux témoins ( $F_{21, 1472,9} = 3,95, p < 0.001$ ).



**Figure 41** : Moyennes des taux de mortalité du puceron noir de la fève 72h après traitement avec solutions bactériennes brutes des isolats du sol de Bouinan (A2, B3) et d'Oued Aleug (A4, S1, A3).

Le taux de mortalité le plus élevé a été observé avec l'isolat A4-5 à un pourcentage de 90% dépassant ainsi celui du Bt estimé à 86%. Les isolats de *Bacillus* : A2-26, A4-2, A4-3, A4-5, A4-6, S1-5 et S1-8 et ceux de *Pseudomonas* KB-A3-5 suivent avec des effets sur la mortalité avoisinant les 60 et 70%. Le reste des isolats occasionnent une mortalité moyenne de l'ordre de 40 à 50% notamment les deux autres isolats de *Pseudomonas* KB\_A3\_4 et KB\_A4\_5. Vraisemblablement, ces résultats mettent en évidence un effet entomopathogène remarquable. Cette entomopathogénicité a été démontrée dans les études effectuées entre autres par **Boemare et Tailliez, (2010)** et **Oulebsir-MohandKaci, (2015)**, qui ont affirmé que les bactéries du genre *Bacillus* étaient les plus étudiées pour la lutte contre les insectes.

L'analyse de comparaison des moyennes (test de Tukey) a révélé la présence de six groupes homogènes qui ont été répartis et classés comme suit :

- Le groupe **(A)** : Avec un intervalle de [79.5; 90.48] donc le groupe dont les mortalités sont les plus élevées, (supérieure à 80%) il regroupe les deux souches (A4\_5) et (A4\_3) ce qui montre que ces isolats ont un effet toxique plus élevé que notre produit de référence *Bt*.

D'autant plus que nous l'avons remarqué avec les valeurs de P qui ont été non significatives ( $P > 0.005$ ) donc qu'il n'y a pas de différence significative entre les isolats et *Bt*.

Le groupe **(ABCDEF)** : Avec un intervalle de [35.56; 62.22] U [86.67] le groupe comprends des moyennes de mortalités différentes et regroupe les isolats : *Bt*, (S1\_8) (KB\_A3\_5) (A4\_4), (KB\_A4\_5), (A2\_21), (A2\_22), (A2\_9), (A2\_12), (A2\_1), (B3\_4), (KB\_A3\_4), (A4\_8).

Le groupe **(DEF)** : avec une moyenne de mortalité de 17.78 il regroupe l'isolat B4\_1.

Le groupe **(CF)** : avec une moyenne de 4.44 % il comporte notre témoin négatif, qui a alors été très significativement différent des autres isolats qui ont présenté une mortalité supérieure.

Le groupe **(BCEF)** : avec une très faible moyenne de mortalité de 4.44%, ce groupe comporte l'isolat (A2\_13).

### **II.2.1.2. Effet des traitements à base des concentrations des isolats bactériens :**

Le taux de mortalité des pucerons après traitement avec les suspensions bactériennes aux concentrations : C6 :  $10^6$ ufc/ml, C5 :  $10^5$ ufc/ml, C4 :  $10^4$ ufc/ml a été calculé après 72h de l'application du traitement, (fig.42, tab.7).

Nous avons testé 10 isolats sélectionnés des tests avec les solutions brutes, dont 8 isolats appartiennent au genre *Bacillus* et 2 isolats appartiennent au genre *Pseudomonas*, et cela dans le but de confirmer leur efficacité.

Les résultats ont été soumis à un test de l'analyse de la variance à 2 facteurs (**tableau 7**).

La variance sur la moyenne des mortalités observées est très hautement significative.

La comparaison des moyennes de mortalités observées des populations du puceron noir de la fève traités par les 10 isolats bactériens étudiés a fait ressortir une différence très hautement

significative pour l'effet de l'isolat bactérien ( $F_{10, 9875,6} = 8,284$ ;  $p < 0,0001$ ) et une différence significative concernant l'effet des concentrations ( $F_{3, 8950,1} = 25,025$ ;  $p < 0,0001$ ).

**Tableau 7** : Analyse de la variance des taux de mortalités du puceron noir de la fève en relation avec les traitements à base de solutions bactériennes à différentes concentrations (C1, C2, C3).

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Variance intergroupes	13	19726,223	1517,402	12,728	<b>&lt;0,0001</b>
Variance intragroupes	29	3457,239	119,215		
Total corrigé	42	23183,463			

Analyse Type III Somme des carrés

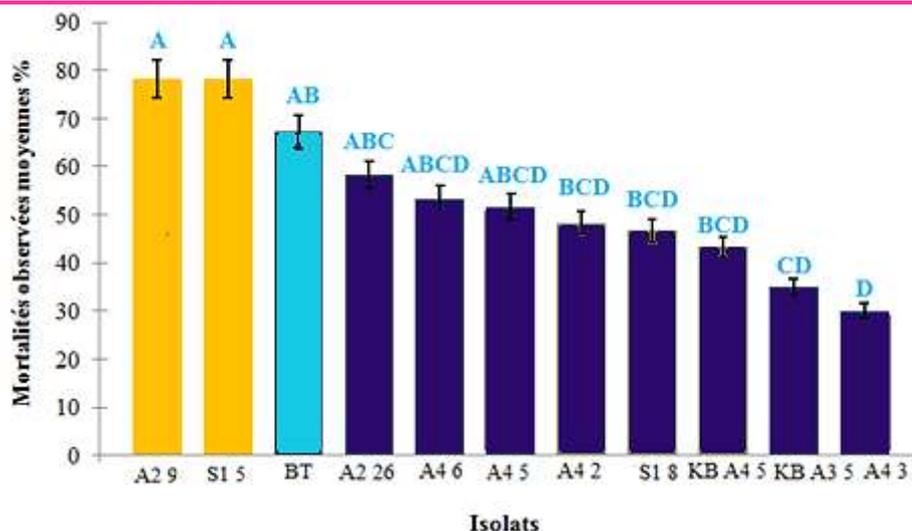
Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Isolat	10	9875,690	987,569	8,284	<b>0,000</b>
Concentration	3	8950,168	2983,389	25,025	<b>0,000</b>

Sur la base des sommes de carrés de type III, les variables suivantes apportent de l'information significative pour expliquer la variabilité de la variable dépendante MC : isolat, concentration. Parmi les variables explicatives, sur la base des erreurs de type III, la variable concentration est la plus influente.

Les résultats pour toutes les concentrations confondues, ont montré un pourcentage de mortalité supérieur à 70% pour 2 isolats dont la souche S1-5 avec plus de 80% de mortalité, suivi par l'isolat A2-9 avec un effet similaire. Les isolats A2-26 et A4-6 ont induit un taux supérieur à 60%. Le reste des isolats dont les deux souches de *Pseudomonas* ont provoqué une mortalité moyenne de 50%, (**Fig. 42**).

Les mortalités du puceron *Aphis fabae* ont varié entre 40 et 90%. Des taux de mortalités ont été obtenus au bout de 72h et avec la plus forte concentration  $10^6$ ufc/ml où plus de 5 isolats A2-9, BT, S1-5, A4-5, A4-6 ont causé plus de 60% de mortalité (**Fig.42 et 44**).

Cette concentration étant plus dense en bactéries, elle va alors amener à des toxicités plus importantes envers les individus ciblés.



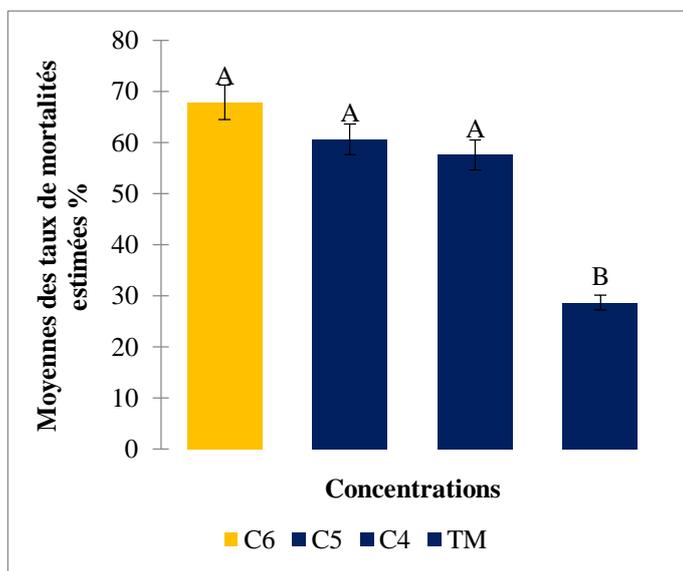
**Figure 42 :** Taux de mortalité observée du puceron noir de la fève 72h après traitement sous l'effet des solutions bactériennes à différentes concentrations en comparaison avec le témoin positif *Bt*.

On peut classer les moyennes estimées des mortalités dues aux 10 isolats en 6 groupes (fig. 42) comme suit :

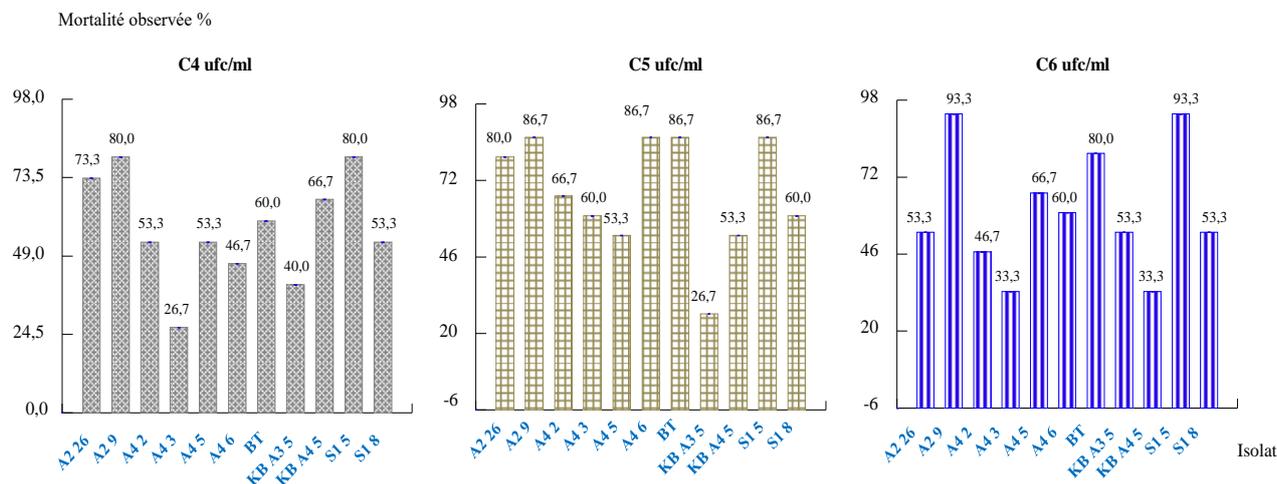
- Le groupe (A) définit les isolats induisant des taux élevés de mortalité et concernant les isolats A2 9 et S1 5 avec un pourcentage de 78,33%.
- Le groupe (AB) est spécifique de la souche de référence *Bt* (67,22%).
- Le groupe (ABC) concerne la souche A2-26 (58,33%).
- Le groupe (ABCD) rassemble les mortalités dues aux isolats A4-6 et A4-5 respectivement 53,333% et 51,667%.
- Le groupe bcd relatif aux pourcentages de mortalité provoquée sur le puceron noir de la fève par les isolats A4-2 (48,333%), S1 8 (46,667%) et KB A4-5 (43,333%).
- Enfin, le groupe (CD) et le groupe (D) correspondent aux plus faibles mortalités qui sont dues d'après nos observations aux isolats bactériens respectivement de *Pseudomonas* (KB A3-5, 35%) et de *Bacillus* (A4-3, 30%).

La synthèse des comparaisons multiples par paires pour l'effet de la concentration selon le test de Tukey (HSD) fait apparaître 2 groupes homogènes. Le groupe A rassemble les taux

de mortalité sous l'effet des 3 concentrations C6 ( $10^6$  ufc/ml), C5 ( $10^5$  ufc/ml) et C4 ( $10^4$  ufc/ml) avec des taux respectifs de 67,879%, 60,606% et 57,576% tandis que le groupe B caractérise les mortalités observées chez le témoin avec 28,687% (**fig. 43**).



**Figure 43 :** Moyennes estimées des mortalités du puceron noir de la fève et groupes homogènes des concentrations en comparaison avec le témoin.



**Figure 44 :** Comparaison des mortalités sous l'effet des trois concentrations : C6= $10^6$  ufc/ml, C5= $10^5$  ufc/ml, C4= $10^4$  ufc/ml.

### II.2.1.3. Calcul des CL<sub>50</sub> et CL<sub>90</sub> :

Nous avons procédé au calcul des concentrations bactériennes létales de 50% et 90% des populations d'*A. fabae*, pour les isolats ayant manifesté une plus grande pathogénéicité (A2-9, S1-5 et A2-26) (**tableau 8**). Les mortalités corrigées considérées après 72h ont été transformées en probits et les 3 concentrations en logarithmes. Les calculs des CL<sub>50</sub> et des CL<sub>90</sub> découlent des équations des droites de régression linéaire en prenant en considération les probits de 50% (y=5) et les probits de 90% (y=6,28).

**Tableau 8** : Valeurs des concentrations létales 50% et 90 % des trois isolats bactériens (A2-9, S1-5, A2-26)

Isolat bactérien	CL <sub>50</sub> (ufc/ml)	CL <sub>90</sub> (ufc/ml)
A2 9	53,7	45 E+7
S1 5	21552,61	1,750 E+11
A2 26	16375,7	2,28E+13

Les concentrations létales de 50% et 90% des populations du puceron noir de la fève paraissent élevées pour tous les isolats d'après nos observations. D'après ces estimations qui ont été réalisées sur seulement 3 concentrations, on peut émettre l'hypothèse d'après cette étude, que l'isolat A2-9 pourrait être testé à la CL<sub>50</sub> de 53,7 ufc/ml pour confirmer l'effet élevé de pathogénéicité de cet isolat bactérien sur le puceron noir de la fève et sur d'autres espèces d'Hemiptera.

### II.2.2. Effet des isolats bactériens étudiés sur la teigne de la pomme de terre :

Les essais de traitements bactériens ont été effectués avec les suspensions bactériennes brutes seulement. Ces traitements ont été comparé aux témoins (négatif et positif : Bt) et ont ciblé les isolats ayant induit des taux de mortalité élevées sur le puceron noir de la fève. Il s'agit des isolats codés A4-2, B2-1, B3-5, S1-8 du genre *Bacillus* et l'isolat Kb-A4-5 du genre *Pseudomonas*.

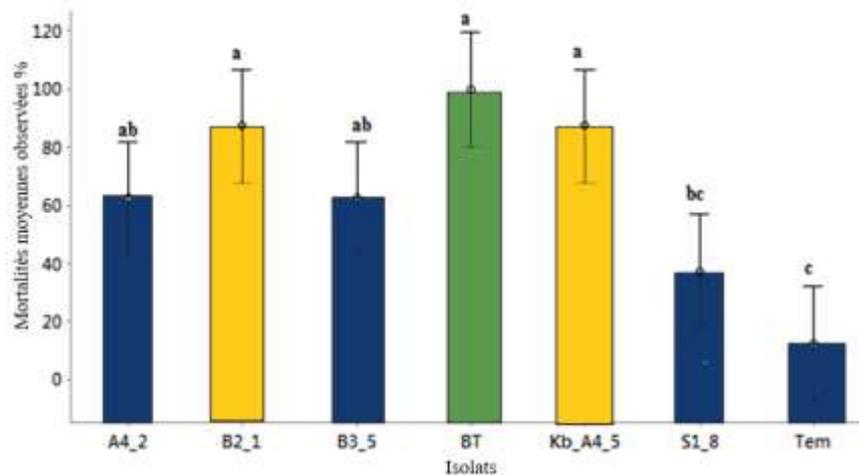
Nous avons observé les chenilles sous l'effet des différents traitements bactériens sur une durée de 3 jours. Le premier impact que nous avons remarqué a été le mouvement lent des

larves puis leur immobilité totale et le changement de couleur du blanc au transparent avec un tube digestif brun et distinct (**Fig.45**), qui serait vraisemblablement dû à l'effet bactérien au niveau de l'épithélium intestinal comme l'ont montré **Lemaitre et Boccard (2008)**.



**Figure 45** : Larve de *Phthorimaea operculella* morte (aspect de mortalité après application des traitements bactériens). (**Original, 2021**)

Les résultats des mortalités observées sur les chenilles de la teigne à 72h ont fait l'objet d'une ANOVA à un facteur, la variable explicative étant l'isolat bactérien. Le test de l'ANOVA a montré un effet très hautement significatif des isolats étudiés en comparaison avec les deux témoins ( $F_{6, 3839,3} = 10,75$  ;  $p < 0,0001$ ). Le test post hoc de Tukey HSD, a permis de classer 4 groupes homogènes (fig. 47).



**Figure 46** : Moyennes des taux de mortalité comparés de la teigne de la pomme de terre 72h après traitement avec les solutions brutes des isolats bactériens testés.

Les résultats qualitatifs des essais biologiques à base des isolats testés mettent en évidence un taux de mortalité supérieur à 80% induit par l'isolat testé du genre *Pseudomonas* (Kb-A4-5). Les isolats de *Bacillus* ont montré une mortalité de 40% à 90%. On peut remarquer que la souche (B2-1) a montré un degré élevé de mortalité égal à 90%, puis les isolats (A4-2) et (B2-1) avec des mortalités de 60% et enfin la souche (S1-8) qui a engendré une mortalité de 40% sur les larves. L'effet du Bt en tant que témoin positif a entraîné une mortalité totale de 100%. Ces résultats semblent indiquer que les isolats testés pourraient être apparentés au groupe du Bt puisque nous avons obtenu une pathogénéicité efficace sur la teigne de la pomme de terre. Ces résultats corroborent avec ceux de **Iriarte et coll. (1998)** contre les larves de lépidoptères.

L'analyse des comparaisons des moyennes des taux de mortalités (test de Tukey) a permis de classer que les 6 isolats des rhizobactéries étudiées 03 groupes :

- Le groupe **(a)**, à l'intervalle de [87.5%, 100%] et dont les pourcentages de mortalité ont été significativement les plus élevées, est constitué des souches (Kb-A4-5), (B2\_1) ainsi que la souche référencée (*Bt*), Il semble qu'elles ont le même taux d'efficacité.
- Le groupe **(ab)** qui comprend les isolats (A4-2) et (B3-5) avec un taux de [62.5%]
- Le groupe **(bc)** est constitué de l'isolat (S1-8) qui a présenté le pourcentage de mortalité le plus faible [37.5%].

## **II.2. Discussion générale :**

Plusieurs études ont déjà mis en évidence le potentiel de différentes souches de *Bacillus* et de *Pseudomonas* afin d'agir comme agents de lutte biologique contre les insectes parasites. L'effet de ces bactéries a été testé par rapport à un large éventail de ravageurs importants sur le plan agronomique, notamment sur le puceron noir de la fève *Aphis fabae* (**Dutton et al., 2003 ; Palma et al., 2014 ; Rashid et al., 2017**) ainsi que sur la teigne de la pomme de terre *Phthorimaea operculella* qui est considérée comme ravageur primaire de la pomme de terre (**Jansens et al., 1995**).

D'après la bibliographie, les programmes de sélection des souches bactériennes ont identifié des milliers d'espèces chacune limitée à un ordre d'insectes spécifique : lépidoptères, coléoptères, diptères, hémiptères et orthoptères (**Sanchis et al., 1995**) et (**Feitelson, 1993**).

Les pourcentages de mortalité obtenus dans la présente étude confirment l'effet entomopathogène des souches isolées, ce qui concorde avec des résultats similaires signalés par d'autres auteurs notamment **Ganga et Charu (2018)**.

Concernant notre expérimentation sur le Puceron noir de la fève, elle a consisté à réaliser un bio essai, basé sur le trempage des feuilles et des tiges dans les suspensions bactériennes du genre *Bacillus* et *Pseudomonas* afin de tester leur toxicité sur des individus d'*Aphis fabae*.

Ces derniers vont alors absorber les nutriments nécessaires à leur survie en suçant la sève des feuilles et tiges trempées, et sont susceptibles d'être infectés par la suite.

En effet, selon **Butko, (2003) ; Gill et al, (1992) ; Yu et al, (1997) ;** les *Bacillus* agissent comme des poisons causant une paralysie intestinale suivie de la mort de l'individu. De même, d'après **Lemanceau (1992)**, les *Pseudomonas* affectent surtout le mésentéron qui est la partie d'assimilation et d'absorption, et présente de ce fait une sensibilité élevée à ces traitements biologiques administrés par ingestion par rapport aux deux autres parties de l'appareil digestif, le stomodeum et le proctodeum. Au vu de ce qui précède, la méthode de trempage dans les solutions bactériennes du matériel végétal ayant servi de substrat nutritif a été judicieuse pour tester et confirmer les mortalités obtenues.

L'efficacité de ces bactéries est due à leur capacité de produire des substances et molécules notamment : les protéines cristallines (Cry,) les protéines insecticides végétatives (Vip) et les protéines insecticides sécrétées (Sip). D'après **Schnepf et al ., (1998)**, ces protéines sécrétées dans le milieu ont des propriétés de bio insecticides.

**Elatti et al., (2010)** mentionnent que ces toxines devraient circuler dans tout le phloème pour contrôler les insectes piqueurs-suceurs comme le principal ravageur étudié : le puceron noir de la fève. Les pucerons sont considérés par ailleurs parmi les agents les plus destructeurs affectant plusieurs cultures et ayant des répercussions sur l'économie agricole, (**Leroy et al., 2011**).

Concernant les bio essais effectués sur la teigne de la pomme de terre, les tubercules ont directement été trempés dans la solution bactérienne. Les résultats obtenus ont mis en évidence une très forte pathogénéicité des Rhizobactéries des deux genres. Dans ce contexte, **Chilcott et**

**Wigley (1993)** ont confirmé que les bactéries isolées à partir du sol peuvent posséder un pouvoir entomopathogène. Notamment, ils signalent une toxicité contre les larves de lépidoptères de 37 % à 88 %. Par ailleurs, **Iriarte et coll (1998)** ont indiqué que les isolats de *Bacillus* présentaient une activité insecticide par rapport à certaines espèces de lépidoptères.

D'autre part, le traitement des tubercules de pomme de terre avec *Pseudomonas* a également causé un effet sur le sex-ratio en faveur des males (**Adam et al., 2016**).

L'effet des bactéries entomopathogènes pourrait s'expliquer par une augmentation du taux de protéines hémolymphatiques chez *Locusta migratoria* traitée par *Bacillus* sp et *Pseudomonas* spp. (**Oulebsir-MohandKaci (2012)** , **Oulebsir-MohandKaci et Doumandji-Mitiche (2012)** ) ; et une diminution de celui des glucides observés chez larves de *Galleria mellonella* traitée par *B. cereus*, Irnatene et Lamri (2016). L'augmentation du taux des protéines hémolymphatiques constatée chez les larves traitées notamment de la teigne, peut être expliqué par l'accumulation de protéines issues de la prolifération de la bactérie injectée directement dans l'hémolymphe ou encore par le fait que les larves elles même secrètent des substances de nature protéique comme forme de défense contre l'effet de stress.

---

---

## *Conclusion*

---

---

Le présent travail est une contribution à l'étude de l'effet entomopathogène des rhizobactéries isolées localement dans des milieux cultivés sur deux modèles de ravageurs importants en Algérie.

Plusieurs études ont déjà mis en évidence le potentiel de différentes souches de *Bacillus* et de *Pseudomonas* afin d'agir comme agents de lutte biologique contre les insectes parasites.

Nous avons isolé de sols des parcelles de prunier et de colza puis identifié des bactéries appartenant aux deux genres *Bacillus* et *Pseudomonas*. Nous avons pu identifier 43 isolats parmi lesquels 17 isolats appartiennent au genre *Bacillus* (28.33%) et 26 isolats font partie du groupe du genre *Pseudomonas* (43.3%).

Nous avons testé un ensemble de 20 isolats sur les organismes cibles avec les solutions bactériennes brutes et à 3 concentrations selon la méthode de trempage du substrat végétal nutritif.

Les résultats des mortalités observées obtenues ont été analysés après 72h de l'application des différentes solutions bactériennes pour les 20 isolats identifiés sur la base des identifications macroscopique, microscopique et des tests d'orientation. Les moyennes des taux de mortalité observées à 72h sont significativement différentes entre les traitements à base des isolats bactériens étudiés et comparés aux témoins. Comparativement, les mortalités les plus élevées observées sur les pucerons de la fève, sont dues aux isolats du genre *Bacillus*, (A4-5) et (A4-3) et la souche de référence *Bt*, à des taux compris entre 80% et 90%. Les pourcentages les plus faibles de mortalités à 72h ont concerné les isolats de *Bacillus* B4-1 et A2-13, entre 4 et 18%. Les résultats des effets des trois concentrations ( $10^6$ ,  $10^5$ , et  $10^4$ ) sur le puceron de la fève, ont montré un pourcentage de mortalité supérieur à 70% pour les isolats S1-5 et A2-9. Les isolats A2-26 et A4-6 ont induit un taux supérieur à 60 %, alors que le reste des isolats dont les deux souches de *Pseudomonas* ont provoqué une mortalité moyenne de 50%. Plus particulièrement, les isolats de *Bacillus* A2-9 et S1-5 ont manifesté une pathogénicité très élevée, supérieure à 90% qui dépasse celle du *Bt* notamment à la concentration  $10^6$  ufc/ml.

D'après cette étude, l'isolat A2-9 pourrait être testé à la CL50 de 53,7 ufc/ml pour confirmer l'effet élevé de pathogénicité de cet isolat bactérien sur le puceron noir de la fève.

Des résultats différents de l'effet des cinq isolats étudiés (A4-2, B2-1, B3-5, KB-A4-5 et S1-8) ont été obtenus sur les larves âgées de la teigne de la pomme de terre avec les solutions

---

---

## *Conclusion*

---

---

bactériennes brutes. Les souches (*Bacillus* B2-1 et *Pseudomonas* KB-A4-5) ont engendré un degré élevé de mortalité égal à 90% et similaire au Bt. Par contre, les autres isolats n'ont induit que des taux moyens à faibles sur les larves.

Dans le court terme, comme perspectives à cette étude, des points pertinents mériteraient d'être éclaircis et complétés notamment :

- D Etudier l'efficacité des souches étudiées et d'autres concentrations sur différents stades de développement des deux ravageurs.
- D Cerner les effets des plus importants isolats bactériens testés des genres *Pseudomonas* et *Bacillus* à différentes températures et dans des conditions semi naturelles.
- D Identifier les espèces de ces isolats testées moyennant les outils de biologie moléculaire.

---

---

## *Références bibliographiques*

---

---

### A

1. Abdellah F, Boukraa L, Si Mohamed H and Benaraba R In vitro Evaluation of the Antimicrobial and Antioxidant activities of juniperus oxycedrus essential oil (Cade oil). International Journal of Innovation Engineering and Science Research. (2018). 2(6): 67.
2. Abdel-Megeed MI, Abbas MG, El Sayes SM, Moharam EA;In sefta, 1998. Efficacy of certain biocides against potato tuber moth, *Phthorimaea operculella* under field and storage conditions. Proceedings, Seventh conference of agricultural development research, Cairo, Egypt, 15-17 December 1998. Volume 1. Annals of Agricultural Science Cairo, Special Issue, Volume 1:309-317.
3. Abbot WS., (1925). A method of computing the effectiveness of an insecticide. J. Econ. Ent. 18 : 265-267
4. Adam et al. - Potato plant resistant to potato tuber moth by a non-pathogenic *Pseudomonas putida* Adv. Hort. Sci., 2016 30(1): 47-52
5. Afifi FML, Haydar MF, Omar HIH, 1990. Effect of different intercropping systems on tomato infestation with major insect pests; *Bemisia tabaci* (Genn.) (Hemiptera: Aleyrodidae), 1969 *Myzus persicae* Sulzer (Homoptera: Aphididae) and *Phthorimpa operculella* Zeller (Lepidoptera: Gelechiidae). Bulletin of Faculty of Agriculture, University of Cairo, 41(3, Suppl. 1):885-900
6. Afrikjan, E. G., V. A. Tchilingirln et L. A. Tchil-Akopln. 1969. Bakterialnii incekticidnii preparat BIP-805. Biol. j. Armenii, t. 22, 3-7
7. Ahmed, S. I. et S. R. Leather. 1994. Suitability and potential of entomopathogenic microorganisms for forest pest management - some points for consideration. Intern. J. Pest Management 40: 287-292.
8. Al-Ali AS, Al-Neamy IK, Abbas SA, Abdul-Masih AME, 1975. Observations on the biology of the potato tuber moth *Phthorimaea operculella* Zell. (Lepidoptera, Gelechiidae) in Iraq. Zeitschrift fur Angewandte Entomologie, 79(4):345-351.
9. Ali MA, 1993. Effects of cultural practices on reducing field infestation of potato tuber moth (*Phthorimaea operculella*) and greening of tubers in Sudan. Journal of Agricultural Science, 121(2):187-192

---

---

## *Références bibliographiques*

---

---

10. Aroun M.E.F. (1985). Les aphides et leurs ennemis naturels en verger d'agrumes de la Mitidja. Thèse magister. Inst, Nat, Agro., El Harrach,Alger, 125p
11. Arthurs SP, Lacey LA, Rosa Fde la, 2008. Evaluation of a granulovirus (PoGV) and *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kurstaki* for control of the potato tuberworm (Lepidoptera: Gelechiidae) in stored tubers. *Journal of Economic Entomology*, 10(5):1540-1056.
12. Augustyniuk-Kram & Kram 2012] (en) Anna Augustyniuk-Kram et Karol J. Kram, « Entomopathogenic Fungi as an Important Natural Regulator of Insect Outbreaks in Forests », *Forest Ecosystem*, Université Cardinal Stefan Wyszyński de Varsovie, 2012 [PDF] sur [cdn.intechopen.com](http://cdn.intechopen.com).

### **B**

13. Betz F. S., Hammond B. G., & Fuchs R. L. : Safety and advantages of *Bacillus thuringiensis* protected plants to control insect pests. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*; 1988; 32(2) : 156–173.
14. Blackman R. L. & Eastop V. F. (2006). *Aphids on the world's herbaceous plants and shrubs: Volume 2 The Aphids*. John Wiley & Sons, New York, United States of America, 1439 pp.
15. Blackman. R.L. & Eastop.V.F. (2000). *Aphids on the world's crops: an identification and information guide*, 2nd Ed. Chichester. London, United Kingdom, John Wiley & Sons. 476 pp
16. Boisvert, M. et J. Boisvert. 2000. Effects of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* on Target and Nontarget Organisms: A Review of Laboratory and Field Experiments. *Biocontrol Science and Technology*. 10:517-561.
17. Bossis, E., Lemanceau, P., Latour, X. and Gardan, L. (2000) The taxonomy of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*: current status and need for revision. *Agronomie* 20, 51–63.
18. Bravo A, Gill SS, Soberon M: Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon* 2007, 49:423-435.
19. Bravo A, Likitvivatanavong S, Gill SS, Soberon M: *Bacillus thuringiensis*: a story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochem Mol Biol* 2011, 41:423-431.

---

---

## *Références bibliographiques*

---

---

20. Broodryk SW, 1971. Ecological investigations on the potato tuber moth, *Phthorimaea operculella* (Zeller)(Lepidoptera: Gelechiidae). *Phytophylactica*, 3(2):73-84.
21. Butko P, [2003] Cytolytic Toxin Cyt1A and Its Mechanism of Membrane Damage: Data and Hypotheses, *Appl. Environ. Microbiol.* 69,(5),2415-2422

### C

22. Capinera J. L. (2001). *Handbook of vegetable pests*. Academic press, New York, New York, 729 pp.
23. Carolina State University, North Carolina, 93 pp. Rondon, S. I.; 2010. The Tuberworm: A Literature Review of Its Biology, Ecology, and Control. *American Journal of Potato Research*, No. 2, vol 87, 149-166.
24. Chandler, D., Bailey, A. S., Tatchell, G. M., Davidson, G., Greaves, J., & Grant, W. P. (2011). The development, regulation and use of biopesticides for integrated pest management. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 366(1573), 1987-1998.
25. Charu Arjyal, Ganga GC, Field Evaluation of Native *B. thuringiensis* Isolates Against Aphids (*Aphis fabae*). *Tribhuvan University Journal of Microbiology*. (2020). 7(1).
26. Cherif A, Rezgui W, Raddadi N, Daffonchio D, Boudabous A: Characterization and partial purification of entomocin 110, a newly identified bacteriocin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *Entomocidus* HD110. *Microbiol Res* 2008, 163:684-692.
27. Chilcot CN, Wigley PJ (1993) Isolation and toxicity of *Bacillus thuringiensis* from soil and insect habitats in New Zealand. *J Invertebr Pathol* 61: 244-247.
28. Coll M., Gavish S., Dori I., 2000 - Population biology of the potato tuber moth, *Phthorimaea operculella* (Lepidoptera: Gelechiidae) in two potato cropping systems in Israel. - *Bul. Entomol. Res.*, 90: 309-315

### D

29. De Lima Pimenta, A., Di Martino, P., Blight, M.A. 2006. Positive correlation between in vivo and in vitro assays for the evaluation of *Pseudomonas* virulence. *Res. Microbiol.* 157:885-890.

---

---

## *Références bibliographiques*

---

---

30. Derzelle S, Turlin E, Duchaud E, Pages S, Kunst F, Givaudan A, Danchin A: The PhoP-PhoQ two-component regulatory system of *Photobacterium luminescens* is essential for virulence in insects. *J Bacteriol* 2004, 186:1270-1279 occupy.
31. Deshwal V. K, Singh S.B, Chubey A and Kumar P. Isolation and Characterization of *Pseudomonas* strains from Potatoes Rhizosphere at Dehradun Valley, India. *International Journal of Basic and Applied Sciences*. (2013) .2(2): 53-55.
32. Dutton, A., Romeis, J., and Bigler, F. (2003). Assessing the risks of insect resistant transgenic plants on entomophagous arthropods *Bt*-maize expressing Cry1Ab as a case study. *BioControl* 48, 611–636. doi: 10.1023/A:1026313719424

### **E**

33. Ehler, L.E. Integrated pest management (IPM): Definition, historical development and implementation, and the other IPM. *Pest Manag. Sci.* 2006, 62, 787–789.
34. Elatti IMM et al. (2010) Selection of *Bacillus thuringiensis* Strains Toxic Against Cotton Aphid, *Aphis gossypii* Glover ( Hemiptera: Aphididae ): 1–4.

### **F**

35. Fadli HA, Al-Salih GAW, Abdul-Masih AE, 1974. A survey of the potato tuber moth in Iraq. *J. Iraqi Agric*, 29:35-37
36. Fang S, Wang L, Guo W, Zhang X, Peng D, Luo C, Yu Z, Sun M: *Bacillus thuringiensis* Bel protein enhances the toxicity of Cry1Ac protein to *Helicoverpa armigera* larvae by degrading insect intestinal mucin. *Appl Environ Microbiol* 2009, 75:5237-5243.
37. Fast, P. G. 1981. The crystal toxin of *Bacillus thuringiensis*. In: Burgess, H. D. (ed.), *Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970-1980*. Academic Press, London, pp. 223-48.
38. Faulkner, P. et Boucias, D. G. 1985. Genetic improvement of insect pathogens: emphasis on the use of baculoviruses. In: Hoy, M. A. and Herzog, D. C. (eds), *Biological Control in Agricultural*.
39. Fedhila S, Gohar M, Slamti L, Nel P, Lereclus D: The *Bacillus thuringiensis* PlcR-regulated gene *inhA2* is necessary, but not sufficient, for virulence. *J Bacteriol* 2003, 185:2820-2825.
40. Feitelson J.S, [1993]. The *Bacillus thuringiensis* family tree. *Advanced engineered pesticides*. Marcel Dekker, New York, PP: 63-72

---

---

## *Références bibliographiques*

---

---

41. Ferron, P., J. Fargues et G. Riba. 1993. Les champignons agents de lutte microbiologique contre les ravageurs. In: La lutte biologique. A. Fraval (ed.). Dossier de la Cellule environnement de l'INRA 5: 65-93
42. French-Constant RH, Bowen DJ (2000) Novel insecticidal toxins from nematode-symbiotic bacteria. *Cell Mol Life Sci* 57: 828–833
43. French-Constant RH, Dowling A, Waterfield NR (2007) Insecticidal toxins from *Photorhabdus* bacteria and their potential use in agriculture. *Toxicon* 49: 436–451
44. French-Constant RH, Waterfield NR (2006) An ABC guide to the bacterial toxin complexes. *Adv Appl Microbiol* 58: 169–183.
45. Food and agriculture Organization of the united nations. International code of conduct on the distribution and use of pesticides. Rome, FAO, 1986.
46. Finney, D. J., (1971). The application of probit analysis to the results of mental tests. *Psychometrika* 9: 31-39.
47. Fisher R.A. et Yates F., (1938). *Statistical Tables for Biological, Agricultural and Medical Research*. Oliver and Boyd. London : 8p.

### **G**

48. Gill S.S, Cowles E.A et Pietrantonio P.V, [1992] The Mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. *Ann. Rev. Entomol.* 37, 615-636
49. Gohar M, Faegri K, Perchat S, Ravnum S, Økstad OA, Gominet M, Kolstø AB, Lereclus D: The PlcR virulence regulon of *Bacillus cereus*. *PLoS ONE* 2008, 3:e2793.
50. Greathead, D. J., Kooyman, C., Launois-Luong, M. H., et Popov, G. B. 1994. Les ennemis naturels des 8 criquets du Sahel. Collection acridologie opérationnelle N CILSS/DFPV, Niamey, Bp 12625. Niger.
51. Gunn JS, Belden WJ, Miller SI: Identification of PhoP-PhoQ activated genes within a duplicated region of the *Salmonella typhimurium* chromosome. *Microb Pathog* 1998, 25:77-90.

### **H**

---

---

## *Références bibliographiques*

---

---

52. Hilje L, 1994. Characterization of the damage by the potato moths *Tecia solanivora* and *Phthorimaea operculella* (Lepidoptera: Gelechiidae) in Cartago, Costa Rica. (Caracterización del daño de las polillas de la papa, *Tecia solanivora* y *Phthorimaea operculella* (Lepidoptera: Gelechiidae), en Cartago, Costa Rica.). Manejo Integrado de Plagas. 43-46.
53. Höfte M, Altier N (2010) Fluorescent pseudomonads as biocontrol agents for sustainable agricultural systems. Res Microbiol 161: 464–471
54. Hutton, P. O. et Burbutis, P. P. 1974. Milky disease and Japanese beetle in Delaware. Journal of Economic Entomology. 67: 247-9. DOI : 10.1093/jee/67.2.247

### I

55. INRA, UMR1319, Micalis, Génétique microbienne et Environnement, La Ministère, F-78280 Guyancourt, France
56. Iriarte J, Bel Y, Ferrandis MD, Andrew R, Murillo JF, Caballero P (1998) Environmental distribution and diversity of *Bacillus thuringiensis* in Spain. Syst Appl Microbiol 21: 97-106.
57. Irnatene H. et Lamri S., 2016- Isolement et étude de l'activité biologique de quelques souches (*Bacillus* sp.) sur la fausse teigne des ruches *Galleria mellonella*. Mem. de master : Université M'hamed Bouguera Boumersdes, Algérie, 68p.

### J

58. J.N. Aubertot, J.M. Barbier, A. Carpentier, J.J. Gril, Laurence Guichard, et al.. Pesticides, agriculture et environnement : réduire l'utilisation des pesticides et en limiter les impacts environnementaux. Synthèse du rapport de l'expertise. irstea; INRA. 2005, 64 p. fihal-02587721.
59. Jubelin G, Pages S, Lanois A, Boyer M-H, Gaudriault S, Ferdy J-B, Givaudan A: Studies of the dynamic expression of the *Xenorhabdus* FliAZ regulon reveal atypical iron-dependent regulation of the flagellin and haemolysin genes during insect infection. Environ Microbiol 2011, 13:1271-1284.
60. Jules,P and Pervez Bharucha,Z Integrated Pest Management for Sustainable Intensification of Agriculture in Asia and Africa. Insects. 2015, 6, 152-182

---

---

## *Références bibliographiques*

---

---

### K

61. Kaelin P, Morel P, Gadani F. [1974]: Isolation of *Bacillus thuringiensis* stored tobacco and *Lasioderma serriocorne* (F.). Appl. Environ. Microbiol. 60, 19-25
62. Kamel AS, Aziz MFA, El-Barky NM (2010). Biochemical effects of three commercial formulations of *Bacillus thuringiensis* (Agerin, Dipel 2X and Dipel DF) on *Spodoptera littoralis* larvae. Egypt Acad J Biolog Sci 3: 21–29
63. Katsuhiko N. Shin O. Hiroshi Z Hideki M. Masahiro M. Biochemical Characterization Of a *Pseudomonas fluorescens* Strain Isolated from a Benzalkonium Chloride Solution Biological and Pharmaceutical Bulletin. 19(6) : 873-875 1996
64. Keller S, 2003. Integrated Pest Management of the Potato Tuber Moth in Cropping Systems of Different Agro-ecological Zones [Abstract]. In: In J. Kroschel (Ed.), Advances in Crop Research. 1 Germany: Margraf. <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201300089705>
65. Klimowicz AK, Benson TA, Handelsman J: A quadruple enterotoxin-deficient mutant of *Bacillus thuringiensis* remains insecticidal. Microbiology 2010, 156:3575-3583.
66. Kroschel J, Koch W, 1994. Studies on the population dynamics of the potato tuber moth (*Phthorimaea operculella* Zell. (Lep., Gelechiidae)) in the Republic of Yemen. Journal of Applied Entomology. 118 (4/5), 327-341. DOI:10.1111/j.1439-0418.1994.tb00808.x
67. Kroschel, J.; Schaub, B. Biology and ecology of potato. In Insect Pests of Potato: Global Perspectives on Biology and Management; Giordanengo, P., Vincent, C., Alyokhin, A., Eds.; Elsevier: Waltham, MA, USA, 2013; pp. 165–192.
68. Kyei-Poku G, Gauthier D, Pang A, van Frankenhuyzen K: Detection of *Bacillus cereus* virulence factors in commercial products of *Bacillus thuringiensis* and expression of diarrheal enterotoxins in a target insect. Can J Microbiol 2007, 53:1283-1290.

### L

69. Laird, M., L. A. Lacey & E. D. Davidson edd. CRC Press Inc., Florida: 116-130
70. Lambert N. : Lutte biologique aux ravageurs : applicabilité au Québec : Essai présenté au Centre Universitaire de Formation en Environnement en vue de l'obtention du grade de maître en environnement (M. Env.) ; 2010 ; Sherbrooke, Québec, Canada., 87p
71. Langford GS, Cory EN, 1932. Winter survival of the potato tuber moth, *Phthorimaea operculella* (Zell.). Journal of Economic Entomology, 27:210-213.

---

---

## Références bibliographiques

---

---

72. Lemaitre, B. & Boccard, F. *Erwinia carotovora* Evf antagonizes the elimination of bacteria in the gut of *Drosophila* larvae. *Cell. Microbiol.* 9, 106–119 (2008).
73. Lemanceau, P. 1992. Effets bénéfiques de rhizobactéries sur les plantes : exemple des *Pseudomonas spp. fluorescents*. *Agronomie*, 12(6) : 413-443.
74. Lepoivre.2007. *Phytopathologie: Bases moléculaires et biologiques des pathosystèmes et fondements des stratégies de lutte*, De Boeck Université. 432 p.
75. Leroy, P. D., Sabri, A., Heuskin, S., Thonart, P., Lognay, G., Verheggen, F. J., et al. (2011). Microorganisms from aphid honeydew attract and enhance the efficacy of natural enemies. *Nat. Commun.* 2:348. doi: 10.1038/ncomms 1347
76. Li XJ, Jin XP, Li ZY, 2005. The present status and developing tendency in *Phthorimaea operculella* research. *J. Qinghai Norm. Univ*, 21:67-70.
77. Loper JE, Hassan KA, Mavrodi DV, Davis EW II, Lim CK, et al. (2012) Comparative genomics of plant-associated *Pseudomonas* spp.: insights into diversity and inheritance of traits involved in multitrophic interactions. *PLoS Genet* 8: e1002784.

### M

78. Markosyan A F, 1992. Effect of temperature on the development of the potato moth *Phthorimaea operculella* Zell. (Lepidoptera, Gelechiidae). *Éntomologicheskoe Obozrenie*. 71 (2), 334-338.
79. Mascarin, G.M.; 2009. Microbial potato moth control, (Zeller, 1873) (Lepidoptera: Gelechiidae), with granulovirus. Master's thesis in Sciences, Area of Entomology, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", University of São Paulo, Piracicaba, 119 pp.
80. Meera and P. Balabaskar. Isolation and characterization of *Pseudomonas fluorescens* from rice fields. *International Journal of Food, Agriculture and Veterinary Sciences*. (2012). 2(1): 113-120.
81. Meghdas I, Hamze M, Dabboussi F, Baida N, Izard D. Taxonomie du genre *Pseudomonas* : Rétrospective et actualité. *Leban Sci J*. 2004 ; 5(1) :116.
82. Mendes R, Kruijt M, de Bruijn I, Dekkers E, van der Voort M, et al. (2011) Deciphering the rhizosphere microbiome for disease-suppressive bacteria. *Science* 332: 1097–1100.
83. Monteiro, R. F.; Macedo, V.M.; Birth, M. S.; Cury, R.S.F.; 2007. Composition, abundance and notes on the ecology of species of lepidopteran larvae associated with

---

---

## *Références bibliographiques*

---

---

- five species of host plants in the Restinga de Jurubatiba National Park, RJ. *Revista Brasileira de Entomologia*, n°.4, vol. 51, 476-483.
84. Morris, O>. N. 1983. Microorganisms isolated from forest insects in British Columbia. *J. Entomol. Sci. BC*. 80: 29-36.
85. Mukherjee AK, 1948. Life-history and bionomics of the potato tuber moth, *Gnorimoschema operculella* Zell. at Allahabad (United Provinces), together with some notes on the external morphology of the immature stages. *Journal of the Zoological Society of India*, 1:57-67.
86. Murphy, A.M., Lee, T., Andrews, C.M., Shilo, B.Z., Montell, D.J. (1995). The breathless FGF receptor homolog, a downstream target of *Drosophila* C/EBP in the developmental control of cell migration.

### N

87. Nappi AJ, Ottaviani E: Cytotoxicity and cytotoxic molecules in invertebrates. *Bioessays* 2000, 22:469-480.
88. Nielsen-LeRoux C, et *al.*: How the insect pathogen bacteria *Bacillus thuringiensis* and *Xenorhabdus/Photorhabdus* occupy their hosts, *Curr Opin Microbiol* (2012).

### O

89. Oulebsir-Mohand Kaci et *al.* 32 - 46 *Revue des BioRessources* Vol 10 N° 2 Décembre 2020
90. Oulebsir-Mohand Kaci H. Doumandji-Mitiche B. et Behidj N. *Revue « Nature & Technologie »*. B- Sciences Agronomiques et Biologiques, n° 12/ Janvier 2015, 100-109
91. Oulebsir-Mohandkaci H., Tiharenzina F. & Mohammedi A.: Study of Some Biocontrol Bacterial Isolates and Evaluation of Their Antifungal and Insecticidal Effects. *International Journal of Innovative Approaches in Agricultural Research*; 2019; 3(2), 332-342. doi: 10.29329/ijjaar. 194.18.

### P

92. Pal ADWITIYA, Prabhu ASHWINI, Arun Kumar AVINASH, Rajagopal BADRI, Dadhe KAJAL, Ponnamma VOMSI, Shivakumar SRIVIDYA, Mutagenesis of *Bacillus*

---

---

## *Références bibliographiques*

---

---

- thuringiensis* IAM 12077 for increasing poly (-β-)hydroxybutyrate (PHB) production. Turkish Journal of Biology. (2009). 33 : 225-230.
93. Palma, L., Munoz, D., Berry, C., Murillo, J., de Escudero, I. R., and Caballero, P. (2014). Molecular and insecticidal characterization of a novel cry-related protein from *Bacillus thuringiensis* toxic against *Myzus persicae*. Toxins 6, 3144–3156. doi: 10.3390/toxins6113144
94. Pandey R, Chavan PN, Walokar NM, Sharma N, Tripathi V, Khetmalas MB. Pseudomonas stutzeri RP1: A versatile plant growth promoting endorhizospheric bacteria inhabiting sunflower (*Helianthus annuus*). Res. J.Biotechnol. 2013; 8(7):48-55
95. Parker B L, Hunt G L T, 1989. *Phthorimaea operculella* (Zell.), the potato tuber moth: new locality records for East Africa. American Potato Journal. 66 (9), 583-586. DOI:10.1007/BF02852122
96. Patent n° US 7122176 B2, *Mycoattractants and mycopesticides*
97. Philogène, B. Regnault-Roger, C. and Vincent, C. 2008. Biopesticides D'origine Végétale. Lavoisier, Paris.
98. Pierre-Yves Guillaume Professeur de biotechnologie génie biologique 2005

### Q

99. QUEZADA-GARCIA R., PURESWARAN D., BAUCE E., 2014 - Nutritional stress causes male-biased sex ratios in eastern spruce budworm (Lepidoptera: Tortricidae). - Can. Entomol., 146: 219-223

### R

100. Rashid, M. H., Khan, A., Hossain, M. T., and Chung, Y. R. (2017). Induction of systemic resistance against aphids by endophytic *Bacillus velezensis* YC7010 via expressing phytoalexin deficient4 in arabidopsis. Front. Plant Sci. 8:211. doi: 10.3389/fpls.2017.00211
101. Ravishankar N, Vaishali P, Deepika S. In vitro Biofilm Formation of *Pseudomonas fluorescens*, A Promising Technique for Waste Water Treatment. International Journal of Science and Research (IJSR).2015;4(2):1604.

---

---

## *Références bibliographiques*

---

---

102. Rodríguez M, Marín A, Torres M, Béjar V, Campos M and Sampedro I (2018) Aphicidal Activity of Surfactants Produced by *Bacillus atrophaeus* L193. *Front. Microbiol.* 9:3114. doi: 10.3389/fmicb.2018.03114
103. Rondon SI, DeBano SJ, Clough GH, Hamm PB, Jensen A, Schreiber A, Alvarez JM, Thornton M, Barbour J, Dogramaci M, 2007. Biology and management of the potato tuberworm in the Pacific Northwest. Oregon State University Extension Service, No. PNW 594, PNW 594. Corvallis, USA: Oregon State University Extension Service. <http://ir.library.oregonstate.edu/xmlui/bitstream/handle/1957/20785/pnw594.pdf?sequence=1>
104. Rondon SI, Hane D, Brown CR, Vales MI, Dogramaci M, 2009. Screening potato generation crosses for resistance to potato tuberworm, *Phthorimaea operculella* Zeller (Lepidoptera: Gelechiidae). *Journal of Economic Entomology*, 102(2):1649-1653.
105. Rosas-Garcia N.M., 2009. Biopesticide production from *Bacillus thuringiensis*: an environmentally friendly alternative. *Recent Pat. Biotechnol.*, 3(1), 28-36.
106. Ruffner B, Péchy-Tarr M, Ryffel F, Hoegger P, Obrist C, et al. (2013) Oral insecticidal activity of plant-associated pseudomonads. *Environ Microbiol* 15: 751–763.
- S**
107. Saik, J. E., L. A. Lacey et C. M. Lacey. 1990. Safety of microbial insecticides to
108. Salamitou S, Ramisse F, Brehe´ lin M, Bourguet D, Gilois N, Gominet M, Hernandez E, Lereclus D: The plcR regulon is involved in the opportunistic properties of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* in mice and insects. *Microbiology ggra*, 146:2825-2832.
109. Sanchis V, Chaufaux J, Lereclus D.[1995] : Utilisation de *Bacillus thuringiensis* en protection des cultures et résistance des insectes. *Cahier de l’Agriculture*. 4,405-406
110. Sara, H. C., Andrew R., Bel, Y., Ferré, J. (2004). Isolation and toxicity of *Bacillus thuringiensis* from potato-growing areas in Bolivia. *J. Invertebr. Pathol.* 88 : 8-16.
111. SARH, 1990. Integrated management of la palomilla de la papa *Phthorimaea operculella* (Zeller) (lepidóptera: Gelechiidae) en el Bajío, Mexico. Special publication Number 23, 2nd Edition, 55 pp.
112. Sarwar, M. (2015). Biopesticides: an effective and environmental friendly insect-pests inhibitor line of action. *International Journal of Engineering and Advanced Research Technology*, 1(2), 10-15.

---

---

## *Références bibliographiques*

---

---

113. Schnepf E et al. (1998) *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins  
*Microbiol Mol Biol Rev*, 62(3): 775–806.
114. Shores, M., Mastouri, F., & Harman, G. E. (2010). Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. *Annual Review of Phytopathology*, 48, 21–43.
115. Silva CP, Waterfield NR, Daborn PJ, Dean P, Chilver T, Au CPY, Sharma S, Potter U, Reynolds SE, French-Constant RH: Bacterial infection of a model insect: *Photorhabdus luminescens* and *Manduca sexta*. *Cell Microbiol* 2002, 4:329-339.
116. Singleton P., Sainsbury D., 2006. Dictionary of microbiology and molecular biology, Third Edition Paul Singleton and Diana Sainsbury. John Wiley and Sons Ltd. ISBN. Pp : 637-638.
117. Starnes, R. L., C. L. Liu et P. G. Marone. 1993. History, use and future of microbial insecticides. *Amer. Entomol.* 39:83-91.
118. Stockwell VO, Stack JP (2007) Using *Pseudomonas* spp. for integrated biological control. *Phytopathology* 97: 244–249
119. Stefan Jansens, Marc Cornelissen, Roger De Clercq, Arlette Reynaerts, Marnix Peferoen, *Phthorimaea operculella* (Lepidoptera: Gelechiidae) Resistance in Potato by Expression of the *Bacillus thuringiensis* CryIA(b) Insecticidal Crystal Protein, *Journal of Economic Entomology*, Volume 88, Issue 5, 1 October 1995, Pages 1469–1476

### T

120. Thal J, 1979. Investigations on the presence of the potato-tuber moth, *Phthorimpa operculella* Zeller (Lep., Gelechiidae) in storehouses by the use of the pheromone trap. *Anzeiger für Schadlingskunde Pflanzenschutz Umweltschutz*, 52(3):44-47
121. Trivedi TP, Rajagopal D, 1992. Distribution, biology, ecology and management of potato tuber moth, *Phthorimaea operculella* (Zeller) (Lepidoptera: Gelechiidae): a review. *Tropical Pest Management*, 38(3):279-285

### V

---

---

## *Références bibliographiques*

---

---

122. Vallet-Gely I, Lemaitre B, Boccard F: Bacterial strategies to overcome insect defences. *Nat Rev Microbiol* 2008, 6:302-313. A nice overview of bacterial insect pathogens with issues to future studies and that highlights especially results from studies involving *Drosophila* immune responses to a few infective bacteria of this insect. vertebrates - domestic animals and wildlife. In: Safety of microbial insecticides.

### **W**

123. Wahbi Sanâa, Sanguin Hervé, Oufdou Khalid, Hafidi Mohamed, Galiana Antoine, Domergue Odile, Baudoin Ezékiel, Prin Yves, Duponnois Robin. 2012. Influence des cultures mixtes fève/blé sur le potentiel mycorhizien des sols et la structure de la microflore mycorhizosphérique au Maroc. In : 3ème Journées francophones des mycorhizes (JFM), Nancy, France, 05-07 septembre 2012. s.l. : s.n., Résumé, 84. Journées francophones des mycorhizes. 3, Nancy, France, 5 Septembre 2012/7 Septembre 2012.

124. Waterfield NR, Hares M, Yang G, Dowling AJ, French-Constant RH (2005) Potentiation and cellular phenotypes of the insecticidal toxin complexes of *Photorhabdus* bacteria. *Cell Microbiol* 7: 373–382

### **Z**

125. Zeleke W. Tenssay 1, Mogessie Ashenafi 2, Alexander Eiler 3 and Stefan Bertilsson. ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF BACILLUS THURINGIENSIS FROM SOILS IN CONTRASTING AGROECOLOGICAL ZONES OF ETHIOPIA. *SINET: Ethiopian Journal of Science*, (2009). 32(2) : 117–128.

I- Matériel non biologique :



Eprouvette graduée



Erlenmeyer



Entonnoir en verre



Boites de petri



Tube à essai vide



Pipettes pasteur



Lames et lamelles



Coton



Eau oxygénée



Disques d'oxydase



Agitateur vortex



Balance



Micropipette graduée



Embouts jaunes



Embouts bleus



Pince



Portoir



Bec bunsen



Gélose nutritive



Milieu King b



Eau distillée



Milieu Citrate  
Simmons



Gélose TSI



Bleu de méthylène



Fuchsine



Violet de Gentiane



Lugol



Eau physiologique



Eau de javel



Alcool



Loupe binoculaire



Microscope optique



Hotte de laboratoire



Etuve



Réfrigérateur



Autoclave

**II- Composition des milieux de culture :****Gélose nutritive**

Peptone .....	10g
Extrait de viande .....	03g
Extrait de levure .....	03g
Chlorure de sodium .....	05g
Agar .....	18g

**Milieu King B**

Peptone dite « B ».....	20g
Glycérol.....	10g
Hydrogénophosphate de potassium.....	1,5g
Sulfate de magnésium heptahydraté .....	1,5g
Agar purifié.....	12g
pH.....	7,2

---

**Gélose TSI**



Peptone .....	20g
Extrait de viande bœuf.....	03g
Extrait de levure .....	03g
Chlorure de sodium .....	05g
Glucose. ....	01g
Lactose .....	10g
Saccharose .....	10g
Agar .....	12g
Rouge de phénol .....	0,05g
Citrate ferrique .....	0,03g
Eau distillée .....	1L
pH .....	7,3

**Gélose TSI**



Citrate de sodium .....	01g
Bleu de Bromothymol .....	0.08g
Hydrogénophosphate de potassium .....	1g
D'hydrogénophosphate d'ammonium .....	1g
Sulfate de magnésium .....	0,2g
Chlorure de sodium .....	05g
Agar-agar.....	15g
pH.....	6,9