

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



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie des populations et des organismes

Mémoire de fin d'étude
En vue de l'obtention du diplôme de
Mastère cycle LMD
En Sciences biologique
Option : parasitologie
(Laboratoire biotechnologie végétale et environnement)

Thème

Evaluation de *Metarhizium anisopliae* et d'*Aspergillus flavus*
à titre d'agent de lutte biologique contre les larves de
Culex pipiens (linné 1758).

M^{lle} LASSAR Asma

Présentée par :

et

M^{lle} BOUAICHAOUI Imane

Soutenue : Le 03 /07/2018

Devant le jury :

Président : M^{me} BOULKOUR S. MCB/USDB1 Université Blida 1.

Examineurs : M^{me} SAIGHI H. MAA/USDB1 Université Blida 1.

Promotrice : M^{me} EDDAIKRA N. Maître de recherche Institut Pasteur d'Alger.

Co-promotrice : M^{me} BENCHRIFA S. Chargée d'études Institut Pasteur d'Alger.

Année Universitaire : 2017-2018

Remercîment

Nous remercions tout d'abord, Dieu tout puissant de nous avoir donné du courage, de la patience et surtout de la volonté pour réaliser ce modeste travail.

*En second lieu, nous remercions très sincèrement, les membres de jury, la présidente madame **BOULKOUR S** et l'examinatrice madame **SAIGHI H.**, d'avoir bien voulu accepter de faire partie de la commission d'examination.*

*Nous tenons à remercier notre promotrice madame **EDDAIKRA N.**, et notre co-promotrice madame **BENCHERIFA S.**, pour ses précieux conseils et ses aides durant toute la période du travail.*

Nous tenons aussi à exprimer nos sincères remerciements à tous les enseignants qui nous ont enseigné et qui par leurs compétences nous ont soutenu dans la poursuite de nos études.

*Nous n'oublions pas de remercier le chef d'option et le chef de département de la biologie des populations des organismes madame **TAIL G***

Merci

Dédicace

Je dédie ce travail

A mon cher père et ma grande mère paternelle et mon grand-père maternel

Que le bon Dieu le tout puissant t'accorde sa sainte miséricorde et t'accueille en son vaste paradis et vous accord janate al firdaws

A ma chère, ma mère

Pour tout leur sacrifice, leur amour, leur tendresse, leur soutien et leur prière tout au long de mes études.

A mon cher grand-père paternel et grande mère maternelle

A ma chère sœur Samira pour leur encouragement permanent, et leur soutien moral, et à sa marie Tiare Mehdi et son fils Mourad

A mes chers frères Hichem ET Issam el-dinne.

A tout ma famille pour leur soutien tout au long de mes études

A La famille BOUAICHAOUI

A La famille HENNICHE

A La famille BOUNADRI

A La famille MEBARKI

A mes cousines Selma, Abla , Khadidja

A ma binôme et très chère amie Asma pour sa entent et sa sympathie.

A tous mes amies

Roufaïda, Khadidja ,Imene ,Akila , Amina ,Narimen pour leurs aide et support dans les moment difficiles et tous les étudiants de l'option parasitologie 2017.2018.

Imane

Dédicace

A l'homme de ma vie, mon exemple éternel, mon soutien moral et source de joie et de bonheur, celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir, a vous papa, mais dommage vous n'avez pas l'occasion pour lire ça, je pris de dieu le tout puissant de vous mettre au paradis.

A la lumière de mes jours, la source de mes efforts, la flamme de mon cœur, ma vie et mon bonheur ; maman que j'adore.

A mes frères Mouhamed, Salem, Ali, Mourad, et Ahmed et mes sœurs Nesrine, Hanane et Meriem.

A mes adorables neveux et nièces.

A mes cousins Mourad, Salim et Mounir. A mes cousines Zahra, Jouri, Imene, Hanane, et Khira.

A ma binôme et très chère amie Imane, à qui je souhaite une vie plein de bonheur et de succès.

A ma meilleurs amie : Fatiha.

*Ainsi que tous les étudiants de l'option Parasitologie promotion
2017.2018*

A Tous ce qui m'aiment et que j'aime

Asma

Résumé

Les moustiques *Culex pipiens* sont des vecteurs de zoonoses d'incidence médicale et vétérinaire considérables. L'utilisation intensive d'insecticides chimiques contre ces moustiques a conduit au développement du phénomène de résistance; ceci rend de plus en plus difficile la lutte contre ces insectes. Dans la nature, un ensemble d'ennemis naturels contribue à la régulation des populations de moustiques, dont les champignons entomopathogènes. Ce travail a permis d'étudier l'utilisation de *Metarhiziumanisopliae* et *Aspergillus flavus* contre les différents stades larvaires de moustiques *Culex pipiens* (L₂, L₃) et (L₃, L₄) en utilisant des concentrations croissantes de spores (10⁴, 10⁵, 10⁶, 10⁷, 10⁸ et 10⁹ spores/ml). Nos résultats ont montré que la mortalité des larves de moustiques traitées aux différentes concentrations fongiques, était de 7 à 100% pour les larves traitées avec *Metarhiziumanisopliae*, et de 3.33% à 60.74% pour les larves traitées avec *Aspergillus flavus*. L'analyse statistique d'ANOVA à un facteur a confirmé nos résultats, nous avons constaté qu'il y a un effet fortement significatif pour les deux champignons *Metarhiziumanisopliae* et *Aspergillus flavus* sur les larves de *Culex pipiens* (L₂₋₃; L₃₋₄) avec $P < 0.05$.

De plus, nous avons montré que *Metarhiziumanisopliae* et *Aspergillus flavus* avaient un effet insecticide sur les larves de *Culex pipiens* (L₂₋₃; L₃₋₄). *Metarhiziumanisopliae* apparaît comme étant plus pathogène que *Aspergillus flavus*. Par ailleurs, les larves du stade L₂ et L₃ étaient plus sensibles aux deux champignons entomopathogènes que les larves du stade L₃ et L₄.

Mots clé : moustiques, *Culex pipiens*, lutte biologique, champignons entomopathogènes, *Metarhiziumanisopliae*, *Aspergillus flavus*, stades larvaires.

Abstract

Culex pipiens mosquitoes are vectors of zoonoses of considerable medical and veterinary incidence. The intensive use of chemical insecticides against these mosquitoes led to the development of the phenomenon of resistance; this makes the fight against these insects more and more difficult. In nature, a set of natural enemies contributes to the regulation of mosquito populations. Among those, we mention the entomopathogenic fungi. This work study the use of *Metarhiziumanisopliae* and *Aspergillus flavus* against the different larval stages of *Culex pipiens* (L₂, L₃) and (L₃, L₄) mosquitoes, by using increasing spore concentrations (10⁴, 10⁵, 10⁶, 10⁷, 10⁸ and 10⁹ spore/ml). The results showed that the mortality of mosquito larvae treated at different fungal concentrations of *Metarhiziumanisopliae* give a mortality from 7 to 100%, and from 3.33% to 60.74% for larvae treated with *Aspergillus flavus*. The one-factor ANOVA statistical analysis confirms our results, we found that there is a highly significant effect for both *Metarhiziumanisopliae* and *Aspergillus flavus* fungi on *Culex pipiens* larvae (L₂₋₃, L₃₋₄) with $P < 0.05$.

Our results show that *Metarhiziumanisopliae* and *Aspergillus flavus* have a larvicidal effect on *Culex pipiens* larvae (L₂₋₃; L₃₋₄). *Metarhiziumanisopliae* is more pathogenic than

Aspergillus flavus. Moreover L2 and L3 larvae stage are more susceptible to both entomopathogenic fungi than L3 and L4.

Key words: mosquitoes, *Culex pipiens*, biological control, entomopathogenic caps, *Metarhiziumanisopliae*, *Aspergillus flavus*, larval stage.

الملخص

يعدّ البعوض من النوع *Culex pipiens* من بين أنواع البعوض الناقل للأمراض عند كل من الإنسان و الحيوان. و له دور كبير في الطبّ و البيطرة.

أدنا لاستخدام المكثف و العشوائيللمبيداتالحشريةالكيميائيةضدهذا النوع منالبعوضالظهور ظاهرةالمقاومة. و هذه الأخيرة في تعسّر و صعوبة القضاء على هذا النوع من البعوض.

لكن في الطبيعة يوجد ما نسميهم بأعداء الطبيعة. و التي تساهم بدورها في تنظيم مختلف مجموعات البعوض من بين هذه الأعداء نذكر الفطريات الممرضة.

في عملنا هذا قمنا باستعمال نوعين من الفطريات الممرضة ضد يرقات البعوض في مختلف مراحل تطورها (المرحلة الثانية و الثالثة من التطور. المرحلة الثالثة و الرابعة من التطور)

الإسم العلمي لهذين الفطريين هو:

Metarhiziumanisopliae,

Aspergillus flavus

نسبة اليرقات التي ماتت بعد معالجتها بالنوع الأول من الفطر تتراوح بين 7% إلى 100% أما بالنسبة لليرقات المعالجة بالنوع الثاني من الفطر فنسبة الوفيات تتراوح بين 3.3% و 60.74% كأقصى قيمة

ان التحليل الاحصائي ANOVA ذو عامل واحد يؤكد نتائجنا , وجدنا ان هناك تأثير مهم لكل من *Aspergillus flavus* و *Metarhiziumanisopliae* على اليرقات *Culex pipiens* (L2,3 ; L3,4) ب $P < 0.05$.

بعد النتائج التي تحصلنا عليها توصلنا إلى أنّ النوع الأول من الفطر أكثر تأثيرا من النوع الثاني في قتل اليرقات مختلف مراحل تطورها لكن الشيء المشترك بينهما هو أنّ كلّ منهما يؤثران على المراحل الأولى من تطوّر اليرقات بنسبة أكبر من تأثيرهما على اليرقات في مراحلها الأخيرة من التطور.

وعليه و حسب وجهة نظرنا فإنه يمكن استخدام النوع الثاني من الفطر الممرض كبديل للنوع الأوّل و نترك وجهة نظرنا كفضية للباحثين القادمين في هذا الموضوع.

الكلمات المفتاحية

Aspergillus flavus, البعوض, الفطريات الممرضة مراحل اليرقات . التحكم البيولوجي.
Metarhiziumanisopliae. *Culex pipiens*.

Liste des abréviations

A. flavus : *Aspergillus flavus*.

A. oryzae : *Aspergillus oryzae*.

A.fumigatus : *Aspergillus fumigatus*.

AF : Aflatoxines.

Aw : Activité de l'eau..

Culex p : *Culex pipiens*.

D : dose.

DDT : Dichlorodiphényltrichloroéthane.

DL : Dose létale.

G : Grossissement.

IPA: Institut Pasteur d'Alger.

j : Jours.

l/j : litre par jours.

L₂ : Larve de deuxième stade.

L₃ : Larve de troisième stade.

L₄ : Larve de quatrième stade.

LAV : Lutte antivectorielle.

M.anisopliae : *Métarhizium anisopliae*.

Max : Maximum.

Min : Minimum.

Opt : Optimale.

Ph : Potentiel d'hydrogène.

PVA : Alcool polyvinylique.

s/ml: Spore par millilitre.

TL: Temps létale.

V: Volume.

Glossaire

Agents pathogènes : est un organisme biologique susceptible de causer une maladie.

Arthropode : est un animal issu de la lignée des invertébrés à squelette chitineux externe, caractérisé par un corps segmenté.

Autodestruction : destruction de soi-même par soi-même.

Cancérigènes : Qui est susceptible de provoquer un cancer.

Chitinisées : constitué de chitine, comme pour la carapace des arthropodes.

Compétiteurs : qui font l'objet d'une compétition.

Conidies aéroportées : sont des conidies transporté par voie aérienne et parachuté.

Diapause : Arrêt temporaire de l'activité ou du développement chez les insectes, en hiver, ou à la saison sèche, ou en cas de carence alimentaire.

Encéphalite japonaise : (EJ) est due à un flavivirus apparenté aux virus de la dengue, de la fièvre jaune et au virus West Nile, transmis par les moustiques.

Épidémies : Une épidémie (du grec epi = au dessus et demos = peuple) est la propagation rapide d'une maladie infectieuse à un grand nombre de personnes.

Fièvre jaune : est une virose qui sévit dans les zones intertropicales d'Afrique et en Amérique intertropicale y compris en Guyane Française. Une seule piqûre de moustique suffit pour contracter la fièvre jaune. La vaccination anti-amaril représente la protection la plus efficace.

Fièvre de la Vallée du Rift (FVR) : est une zoonose virale qui touche principalement les animaux mais peut aussi contaminer l'homme. Dans la majorité des cas, l'infection chez l'homme résulte d'un contact avec du sang ou des organes d'animaux contaminés. Des infections humaines ont également été observées à la suite de piqûres de moustiques.

Hépatotoxiques : est la capacité d'une substance à détruire les cellules du foie.

Hôte : une organisation, un animal, une cellule, un ordinateur ou quelque chose de similaire qui reçoit des invités ou des intrus.

Nacelle : Petit bateau à rames, sans mât ni voiles.

Nocturne : Se dit d'un animal qui sort, agit, vole ou court pendant la nuit, par opposition à diurne.

Opportuniste : Attitude consistant à régler sa conduite selon les circonstances du moment, que l'on cherche à utiliser toujours au mieux de ses intérêts.

Organismes nuisibles : est un organisme dont tout ou partie des activités a des effets considérés comme nuisant à la santé publique et/ou au bon déroulement de certaines activités humaines.

Ornithophile : Le jeune ornithophile est passionné des oiseaux et surtout des oiseaux de proie.

Parasite : Organisme animal ou végétal qui se nourrit strictement aux dépens d'un organisme hôte d'une espèce différente, de façon permanente ou pendant une phase de son cycle vital.

Prédateur : Animal qui pratique la prédation.

Préférences trophiques : est la préférence qui a rapport avec la nutrition des tissus et des organes.

Produits phytopharmaceutiques : Ce terme désigne spécifiquement les utilisations végétales des pesticides.

Reproduction asexuée : est une multiplication sans fécondation: bourgeonnement, fragmentation, scissiparité, gemmation.

Reproduction sexuée : indique que la propagation d'une espèce fait intervenir des gamètes mâles et femelles.

Risques d'endémisation : risque d'une persistance d'une maladie dans une région.

Saccade : Mouvement brusque et irrégulier.

Saprophyte : est dit d'un micro-organisme qui vit aux dépens de matières organiques inertes, par opposition au parasite.

Sclérotés : Peloton mycélien formé par certains champignons pour résister à des conditions défavorables.

Seuil : Limite, point, moment au-delà desquels commence un état, se manifeste un phénomène.

Tératogènes : dit d'un agent mécanique, chimique, physique ou microbien qui, appliqué à l'œuf ou à l'embryon en cours de développement, détermine des formes monstrueuses.

Ubiquiste : Se dit des espèces animales et végétales que l'on rencontre dans des milieux écologiques très différents.

Vecteurs : Tout être vivant capable de transmettre de façon active (en étant lui-même infecté) ou passive un agent infectieux (bactérie, virus, parasite).

West Nile : aussi appelée fièvre de Camargue ou encore maladie à virus du Nil occidental, est une **zoonose à symptomatologie grippale**, très proche de la dengue, **due à l'arbovirus West Nile** (groupe B). Elle est transmissible par des arthropodes vecteurs : des **moustiques du genre *Culex***.

La liste des tableaux

Tableau 1 : Caractéristiques de croissance et de toxinogénèse d'*Aspergillus flavus* 15p.

Tableau 2 : Les principaux caractères microscopiques de l'*Aspergillus flavus* 30p.

Tableau 3 : Le pourcentage de mortalité moyenne et l'écartype des larves L2 et L3 de *Culex pipiens* traités avec *M. anisopliae* de 1^{er}, 2^{ème} et 3^{ème} tests.(annexe I)

Tableau 4 : Le pourcentage de mortalité moyenne et l'éctype des larves L3 et L4 de *Culex pipiens* traités avec *M.anisopliae* de 1^{er}, 2^{ème} et 3^{ème} tests .(annexe II)

Tableau 5 : Evaluation des droites de régression et valeurs de DL50% chez les larves L2 et L3 de *Culex pipiens* traitées avec *M. anisopliae* de 1^{er}, 2^{ème}, et 3^{ème} tests. .(annexe II et III)

Tableau 6 : Evaluation des droites de régression et valeurs de DL50% chez les larves L3et L4 de *Culex pipiens* traitées avec *M. anisopliae* de 1^{er}, 2^{ème}, et 3^{ème} tests. .(annexe III)

Tableau 7 : Evaluation des droites de régression et valeurs de TL50% chez les larves L2 et L3 de *Culex pipiens* traitées avec *M. anisopliae* de 1^{er}, 2^{ème}, et 3^{ème} tests. .(annexe III)

Tableau 8 : Evaluation des droites de régression et valeurs de TL50% chez les larves L3 et L4 de *Culex pipiens* traitées avec *M. anisopliae* de 1^{er}, 2^{ème}, et 3^{ème} tests. .(annexe IV)

Tableau 9 : Le pourcentage de mortalité moyenne et l'éctype des larves L2 et L3 de *Culex pipiens* traités avec *Aspergillus flavus* de pour le 1^{er}, 2^{ème}et 3^{ème} tests. .(annexe IV et V).

Tableau 10 : Le pourcentage de mortalité moyenne et l'éctype des larves L3 et L4 de *Culex pipiens* traités avec *Aspergillus flavus* pour les 1^{er}, 2^{ème} et 3^{ème} tests .(annexe V)

Tableau 11 : Evaluation des droites de régression et valeurs de DL50% chez les larvesL2 et L3 de *Culex pipiens* traitées avec *Aspergillus flavus* de 1^{er}, 2^{ème}, et 3^{ème} tests. .(annexe VI)

Tableau 12 : Evaluation des droites de régression et valeurs de DL50% chez les larves L3et L4 de *Culex pipiens* traitées avec *Aspergillus flavus* de 1^{er}, 2^{ème}, et 3^{ème} tests .(annexe VI)

Tableau 13 : Evaluation des droites de régression et valeurs de TL50% chez les larves L2 et L3 de *Culex pipiens* traitées avec *Aspergillus flavus* de 1^{er}, 2^{ème}, et 3^{ème} tests.(annexe VI et VII).

Tableau 14 : Evaluation des droites de régression et valeurs de TL50% chez les larves L3 et L4 de *Culex pipiens* traitées avec *Aspergillus flavus* de 1^{er}, 2^{ème}, et 3^{ème} tests. (annexe VII).

Liste des figures

Figure 1 : les œufs des culex pipiens, après la ponte de couleurs blanchâtres et noir après l'oxydation des œufs sous loupe binoculaire G : X 2.5.04p

Figure 2 : **a)**- larve de Culicinae en vue dorsale, sauf les 8^{ème} et 9^{ème} segments **qui** sont en vue latérale 05p

Figure 4: a)- morphologie générale d'un moustique adulte ; **b)**-Dimorphisme sexuel des moustiques Culicinae 05p

Figure 5: Cycle de vie de *Culex pipiens*.07p.

Figure 6: *M. anisopliae*. 6a. Phialides . 6b. conidies.11p

Figure 7 : *Culex quinquefasciatus* (b) mosquito adults infected by *Metarhizium anisopliae* and none infected (control)(a).13p

Figure 8: Cycle de vie des champignons phytopathogènes de type *Aspergillus*.15p

Figure 9: Tête aspergillaire (*Aspergillus flavus*) sous microscope optique G :X 10.(originale).16p

Figure 10 : Les étapes de montages les larves du *culex pipiens*.18p

Figure 11 : Larve de *culex pipiens* identifié (original).22p.

Figure12 : Méthode d'élevages des moustiques à l'insectarium.18p

Figure 13: Isolement et repiquage des champignons entomopathogènes (original).23p

Figure 14 : Purification des champignons entomopathogène (*M. anisopliae* et *A. flavus*).23p

Figure 15: Méthode de préparation de la solution mère; filtration après grattage(A) ; après centrifugation des solution mères(B) , la cellule de Thoma)(C). 25p.

Figure 16 : Les six concentrations définitives des spores de deux champignons. 26p.

Figure17 : Protocole expérimental mettant en évidence l'effet de *Metarhizium anisopliae* et d'*Aspergillus flavus* sur la mortalité des larves de *Culex pipiens*.27p

Figure 18: Aspect macroscopique de la souche *metarhizium anisopliae* cultivé sur le milieu de gélose Sabouraud chloramphenicol.29p.

Figure 18 : Aspect microscopique des spores et des conidiophores sous microscope photonique G : X10.29p

Figure 19 : Aspect macroscopique (**recto et verso**) d'*A.flavus*.30p.

Figure 20: Tête aspergillaire (uni et bisériée) sous microscope G : X 40. 31p.

Figure 21 : Larves de *Culex pipiens* (mortes) après traitement avec des champignons entomopathogènes sous microscope photonique G : X40 (original). 52p.

Figure 22 : Pourcentages de mortalité des larves de stades L2 et L3 de *Culex pipiens* après 5 jours de traitement par *M. anisopliae* cultivée. 31p

Figure 23 : Pourcentages de mortalité des larves de stades L2 et L3 de *Culex pipiens* après 5 jours de traitement par *M. anisopliae* cultivée. 32p

Figure 24 : Pourcentages de mortalité des larves de stades L2 et L3 de *Culex pipiens* après 5 jours de traitement par *M. anisopliae* cultivée. 33p.

Figure 25 : Pourcentages de mortalité des larves de stades L3 et L4 de *Culex pipiens* après 5 jours de traitement avec *M. anisopliae* cultivée. 34p.

Figure 26 : Pourcentages de mortalité des larves de stades L3 et L4 de *Culex pipiens* après 5 jours de traitement avec *M. anisopliae* cultivée. 34p.

Figure 27: Pourcentages de mortalité des larves de stades L3 et L4 de *Culex pipiens* après 5 jours de traitement avec *M. anisopliae* cultivée. 35p.

Figure 28: : les DL50 de larves L2 et L3 de 1^{er}, 2^{ème} et de 3^{ème} test. 36p.

Figure 29: les DL50 de larves L3 et L4 de 1^{er}, 2^{ème} et de 3^{ème} test. 36p.

les TL50 de larves L3 et L4 de 1^{er}, 2^{ème} et de 3^{ème} test.

Figure 30: les TL50 de larves L2 et L3 de 1^{er}, 2^{ème} et de 3^{ème} test. 37p.

Figure 31 : les TL50 de larves L3 et L4 de 1^{er}, 2^{ème} et de 3^{ème} test. 37p.

Figure 32: la mortalité moyenne des larves (L2 et L3) du *Culex p* traités par *M. anisopliae* et la significativité entre les doses et le témoin. 38p.

Figure 33 : la mortalité moyenne des larves (L2 et L3) du *Culex p* traités par *M. anisopliae* et la significativité entre les doses et le témoin. 38p.

Figure n°34 : la mortalité moyenne des larves (L2 et L3) du *Culex p* traités par *M. anisopliae* et la significativité entre les doses et le témoin. 39p.

Figure n°35 : la mortalité moyenne des larves (L3 et L4) du *Culex p* traités par *M. anisopliae* et la significativité entre les doses et le témoin. 40p.

Figure 36 : la mortalité moyenne des larves (L3 et L4) du *Culex p* traités par *M. anisopliae* et la significativité entre les doses et le témoin. 40p.

Figure n°37 : Pourcentages de mortalité des larves (L2+L3) de *Culex pipiens* après 5 jours de traitement par *A. flavus* (test 01). 41p.

Figure n°38: Pourcentages de mortalité des larves (L2+L3) de *Culex pipiens* après 5 jours de traitement par *A. flavus* (test 02). 42p.

Figure n°39 : Pourcentages de mortalité des larves (L2+L3) de *Culex pipiens* après 5 jours de traitement par *A.flavus* (test 03). 42p.

Figure n°40 : Pourcentages de mortalité des larves (L3+L4) de *Culex pipiens* après 5 jours de traitement par *A.flavus*.(test 01).43p.

Figure n°41 : Pourcentages de mortalité des larves (L3+L4) de *Culex pipiens* après 5 jours de traitement par *A.flavus*.(test 02).44p.

Figure n°42 : Pourcentages de mortalité des larves (L3+L4) de *Culex pipiens* après 5 jours de traitement par *A.flavus*.(test 02).44p.

Figure 43: les DL50 de larves L2 et L3 de 1^{er}, 2^{ème} et de 3^{ème} test. 45p.

Figure 44 : les DL50 de larves L3 et L4 de 1^{er}, 2^{ème} et de 3^{ème} test. 46p.

Figure 45: les TL50 de larves L2 et L3 de 1^{er}, 2^{ème} et de 3^{ème} test. 46p.

Figure 46 : les TL50 de larves L3 et L4 de 1^{er}, 2^{ème} et de 3^{ème} test. 47p.

Figure 47 : la mortalité moyenne des larves (L2+L3) du *Culex p* traités par *A.flavus* et la significativité entre les doses et le témoin. 47p.

Figure n°48 : la mortalité moyenne des larves (L2+L3) du *Culex p* traités par *A.flavus* et la significativité entre les doses et le témoin. 48p.

Figure 49 : la mortalité moyenne des larves (L2+L3) du *Culex p* traités par *A.flavus* et la significativité entre les doses et le témoin. 49p.

Figure 50 : la mortalité moyenne des larves (L3+L4) du *Culex p* traités par *A.flavus* et la significativité entre les doses et le témoin. 49p.

Figure 51 : la mortalité moyenne des larves (L3+L4) du *Culex p* traités par *A.flavus* et la significativité entre les doses et le témoin. 50p.

Figure 52 : la mortalité moyenne des larves (L3+L4) du *Culex p* traités par *A.flavus* et la significativité entre les doses et le témoin. 51p.

Figure 53 : la mortalité moyenne des larves (L3+L4) du *Culex p* traités par *A.flavus* et la significativité entre les doses et le témoin. 52p.

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
I.1/- <i>Culex pipiens</i>	3
I.1.1/-Systématique	3
I.1.2/-Caractères morphologique.....	4
I.1.3./-Cycle de vie	6
I.1.4. /- Biologie des <i>Culex pipiens</i>	7
I.1.5./-Principales nuisances causées par <i>Culex</i>	8
I.1.6/-Transmission de maladies.....	8
I.1.7/-La lutte antivectorielle (LAV)	9
I.1.8/-La résistance	10
I.2 /-Les Champignons	11
I.2.1/- <i>Metarhizium anisopliae</i>	11
I.2.1.1/- La morphologie des spores	11
I.2.1.2/-Position systématique	12
I.2.1.3/Mode d'infection de <i>Metarhizium spp</i> avec leurs hôtes.....	12
I.2.1.4/-Mode d'infection de <i>Metarhizium</i> spp dans les larves d'insectes aquatiques.....	13
I.2.1.5/-Formulation de Conidia pour <i>Metarhizium anisopliae</i> et <i>Metarhizium acridum</i> ...13	
I.2.2/- <i>Aspergillus flavus</i>	14
I.2.2.1/-Taxonomie	14
I.2.2.2/-Caractéristiques de croissance et de toxinogénèse d' <i>Aspergillus flavus</i>	15
I.2.2.3/-Cycle de vie	15
I.2.2.4/-Ecologie	16
I.2.2.5/-Toxines	16
II /-Materiels et methodes	17
II.A/-Materiel.....	17
II.A.1/- Matériel biologiques	17
II.A.2/-Matériels de travail	17
II.B/-Méthodes.....	18
II.B.1/-Identification des larves	18

II.B. 1.1/- Montage et détermination des larves	18
II.B.1.2./- Identification par le logiciel	19
II.B.3.2.3- L' élevage de <i>Culex pipiens</i>	18
II.B.3/-Isolement purification et identification des champignons entomopathogènes	22
II.B.4/-Etude de l'activité larvicide de <i>Metarhizium anisopliae</i> et d' <i>Aspergillus flavus</i> sur les larves de <i>Culex pipiens</i>	24
II.C/- Test de confirmation	26
II.D/- Traitement des données	27
III/-Résultats et discussion	29
1/-Identification des isolats	29
2/-Test de confirmation	31
2/-Effet de <i>Metarhizium anisopliae</i> et <i>Aspergillus flavus</i> sur les larves de <i>Culex pipiens</i>	32
2.1/-Effet du <i>M. anisopliae</i> sur les larves de <i>Culex pipiens</i>	32
2.1.1/- Variation du taux de mortalité de larves de 2 ^{ème} et 3 ^{ème} stade de <i>Culex pipiens</i> de 1 ^{er} , 2 ^{ème} et 3 ^{ème} tests.	32
2.1.2/- Variation du taux de mortalité de larves de 3 ^{ème} et 4 ^{ème} stade de <i>Culex pipiens</i> de 1 ^{er} , 2 ^{ème} et 3 ^{ème} tests.	34
2.1.3/-Estimation des DL50%	36
2.1.4/-Estimation des TL50%	38
2.1.5/-La comparaison entre les doses de <i>Metarhizium anisopliae</i>	39
2.2. Effet d' <i>Aspergillus flavus</i> sur les larves de <i>Culex pipiens</i>	43
2.2.1. Variation du taux de mortalité de larves de 2 ^{ème} et 3 ^{ème} stade de <i>Culex pipiens</i> de 1 ^{er} , 2 ^{ème} et 3 ^{ème} tests	43
2.2.2. Variation du taux de mortalité de larves de 3 ^{ème} et 4 ^{ème} stade de <i>Culex pipiens</i> de 1 ^{er} , 2 ^{ème} et 3 ^{ème} tests	45
2.2.3. Estimation des DL50%	47
2.2.4. Estimation des TL50%	48
2.2.5/-Analyse des doses en fonction des temps de traitement	59
Discussion	53
Conclusion	56

Introduction

Plusieurs espèces de moustiques (Diptera: Culicidae) sont des vecteurs de zoonoses d'incidence médicale et vétérinaire considérables (Bawin et *al.*, 2016). Leurs places importantes qu'occupent dans la faune terrestre comme dans la faune aquatique d'une part, et la lutte contre les maladies transmises par leurs piqûres d'autre part, font de ces Arthropodes un matériel d'étude important pour les biologistes.

Afin de lutter contre ces insectes piqueurs, il devient de plus en plus nécessaire de chercher des moyens pour réduire les populations de ceux-ci. C'est ainsi qu'a commencé l'essor des insecticides chimiques, après la deuxième guerre mondiale, avec la découverte des propriétés du DDT (dichlorodiphényltrichloroéthane) par Paul Hermann Müller en 1939 de la famille des organochlorés suivi par le développement d'une deuxième génération d'insecticides, représentée par trois grandes familles : les organophosphorés (téméphos, malathion), les carbamates (carbaryl, propoxur) et les pyréthrinoïdes de synthèse (perméthrine, deltaméthrine).

Selon le comité d'experts des insecticides OMS.(1970), chez les *Culicidae* : 19 espèces sont devenues résistantes (Benserradj., 2014).

Par ailleurs, en plus des phénomènes de résistance auxquels se heurtait l'utilisation des produits chimiques (Hamon *et al.*, 1972), s'ajoutait le manque de spécificité de ces derniers.

Les moyens de lutte anti-vectorielle se répartissent aujourd'hui selon quatre axes principaux: (1) la gestion environnementale et le contrôle physique, (2) le contrôle chimique, (3) le contrôle génétique, et (4) le contrôle biologique par le biais d'entomophages et de micro-organismes entomopathogènes (Bawin et *al.*, 2016).

les recherches les plus prometteuses en matière de lutte contre les diptères piqueurs portent sur la production et l'emploi de parasites (protozoaires, nématodes) et d'agents pathogènes d'insectes piqueurs. Parmi ces organismes, les champignons entomopathogènes qui méritent une attention particulière et pourraient être utilisés dans cette lutte biologique (Lacey et Undeen., 1986). Ils jouent un rôle considérable dans la régulation des populations d'insectes (Roberts., 1973; Ferron., 1975).

Le *Métarhizium anisopliae* a fait l'objet de plusieurs études dans le monde, notamment en Algérie. Citons ceux entrepris par Benserradj et *al* (2014)

Cependant, à notre connaissance aucun travail en Algérie concernant l'évaluation de l'activité larvicide du champignon entomopathogène *Aspergillus flavus* sur les larves de *Culex pipiens* n'a été publié à ce jour.

Notre étude est orientée vers un objectif visant à évaluer l'effet larvicide de deux champignons *Metarhizium anisopliae* et *Aspergillus flavus* sur les larves de l'espèce *Culex pipiens* (L2,3 et L3,4), espèce de moustique présentant le plus d'intérêt, en Algérie, en raison de sa large répartition géographique, de son abondance et de sa nuisance réelle, surtout dans les zones urbaines.

I-RAPPEL
BIBLIOGRAPHIQUE

I/-Rappel bibliographie

I.1/-Culex pipiens

I.1.1/-La systématique :

La systématique des moustiques est en perpétuelle évolution en fonction de nouvelles descriptions d'espèces ; la famille des Culicidae comprend 3 539 espèces valides ; La sous-famille des Culicinae comprend 3 061 espèce dans 109 genres (plus 2 genres incertains) regroupées au sein de 11 tribus .Les nouveaux genres de *Culex* sont constitués de 26 sous-genres (Duvallet *et al.*, 2017).

La classification de *Culex pipiens* d'après (Messai *et al.*, 2010 ; Bouabida *et al.*, 2012) est la suivante :

Règne	:Animalia	
Embranchement	:Arthropoda	
Sous-embranchement	:Hexapoda	
Classe	: Insecta	
Sous –classe	:Pterygota	
Ordre	:Diptera	
Sous –ordre	: Nematocera	
Famille	: Culicidae	
Sous famille	: Culicinae	
Genre	: <i>Culex</i>	Linné 1758
Espèce	: <i>Culex pipiens</i>	Linné 1758

I.1.2/- Caractères morphologiques :

I.1.2.1 /-Les œufs

Ils sont fusiformes (Delaunay et *al.*, 2001). Ils mesurent environ 1mm de long (Figure 1) ; Les œufs des espèces du genre *Culex* sont faciles à reconnaître car ils sont regroupés en nacelles (de 200 à 400 œufs) qui flottent à la surface de l'eau (Séguy. 1931) ; ils éclosent au bout de 2 à 5 jrs. Ces œufs peuvent rester viables plusieurs mois voire une année (Duvallet et *al.*,2017)



Figure 1 :à droite : les œufs des culex pipiens juste après la ponte (de couleur blanche) à gauche :des œufs noirs après oxydation , sous loupe binoculaire G : X 2.5.

I.1.2.2/-Larve :

Les larves sont aquatiques. Elles subissent, au cours de leur développement, 4 mues successives. Elles se nourrissent de plancton, de débris organiques (Balenghien.2007) et par filtration de 0.5 à 2 l/j. Elles sont mobiles et se déplacent par saccades (Delaunay et al, 2001) (Duvallet et *al.*, 2017). Le corps est divisé distinctement en 3 parties : tête, thorax et abdomen (Figure 2) (<https://books.openedition.org/irdeditions/10374>).

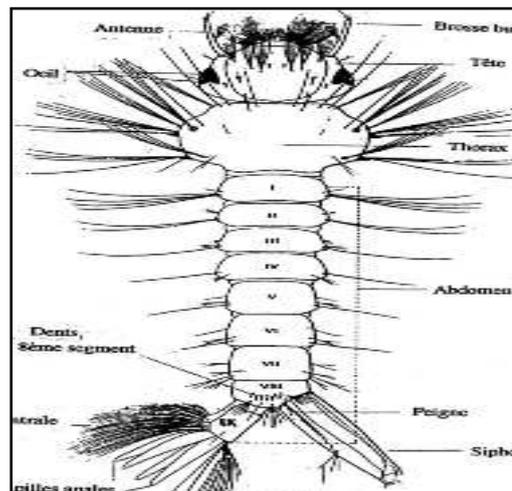


Figure 2 :Larve de Culicinae en vue dorsale, sauf les 8^{ème} et 9^{ème} segments qui sont en vue latérale .

I.1.2.3/-Nymphe :

La nymphe représente le dernier stade de la vie pré-imaginale, elle est aquatique et très mobile, en forme de virgule (figure 3) (Rickenbach.1949).Elle respire par une paire de trompettes respiratoires , la tête et le thorax sont soudés et forment le céphalothorax, l'abdomen de 10 segments terminé par 2 palettes natatoires .Elle ne se nourrit pas, mais puise dans les réserves stockées au stade larvaire (Frédéric et *al.*,2004). Leur taille avoisine 10 mm. Elles sont insensibles à tout traitement chimique ou biologique (<https://books.openedition.org/irdeditions/10374>).

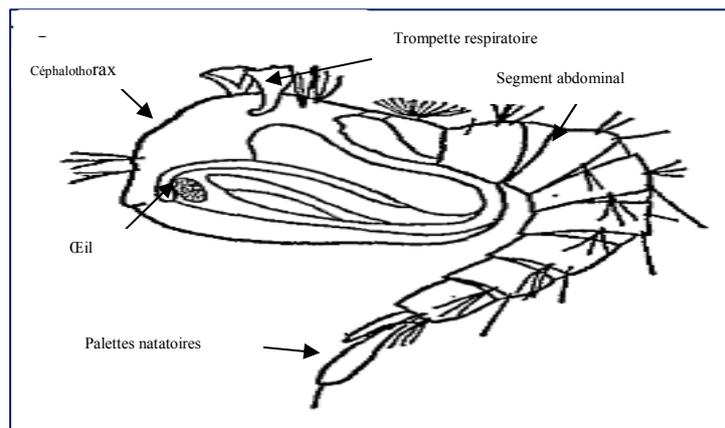


Figure 3 : Nymphe de Culicidae en vue latérale (Rickenbach.,1949) .

I.1.2.4/-L'adulte :

Ils sont de couleur sombre, à sternites abdominaux fortement marqués d'écailles noires, (Callo.1955) ; Leur Corps se divise en 3 parties (figure 4) : tête, thorax, abdomen

❖ La tête

La tête porte quatre éléments :

- Deux gros yeux composés (ommatidies).
- Deux antennes (de 15 articles) avec un fort dimorphisme sexuel (figure 4).
- Un appareil buccal de type suceur pour les mâles, et de type vulnérant pour les femelles (<https://books.openedition.org/irdeditions/10374>)
- Des palpes maxillaires presque toujours longs chez le mâle, le proboscis qui permet à la femelle de piquer et d'aspirer le sang ; le mâle ne pique pas et possède des stylets réduits. (Rickenbach.1949) .

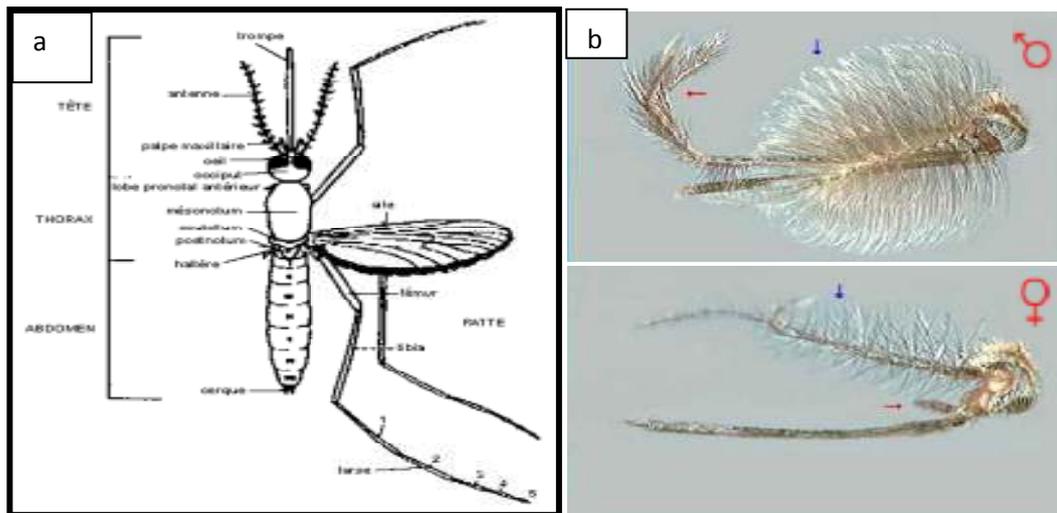


Figure 4: a)- morphologie générale d'un moustique adulte (d'après OMS 1973) ; ;b)- dimorphisme sexuel des moustiques Culicinae (ISRA.,2013).

❖ Le thorax :

Le thorax est segmenté en 3 parties visibles (pro-, méso- et méta-thorax) de tailles inégales. ; Il est composé de nombreuses plaques chitinisées sur la face dorsale (tergites), ventrale (sternites) et latérales (pleurites) ; il porte aussi deux paires de stigmates latéraux (pour la respiration) et Chaque segment porte, au niveau ventral, une paire de pattes.

Le 2^{ème} segment du thorax est le plus développé, c'est le segment alaire. Le 3^e segment porte une paire d'haltères, ou balanciers (<https://books.openedition.org/irdeditions/10374>)

❖ Abdomen

Il est constitué de 10 segments. Les sept premiers sont distincts et constitués d'une plaque dorsale (tergite) et d'une plaque ventrale (sternite) reliées latéralement par une membrane pleurale souple qui porte les stigmates abdominaux. Les 9^{ème} et 10^{ème} segments sont les segments (Rickenbach .1949) .

I.1.3/-Cycle de vie

Les moustiques sont des insectes à métamorphose complète (Delaunay et *al.*,2001). Le cycle de vie comporte deux phases : phase aquatique dite pré-imaginale (stade œuf, larve et nymphe) et phase aérienne dite imaginale (adulte mâle et femelle) (Duvallet et *al.*, 2017).

- Les femelles pondent les œufs à la surface de l'eau se forme de nacelle. Ils éclosent dès que l'embryon est complètement développé au bout de 2 à 5 j (Balenghien .2007)
- Les larves sont toujours aquatiques (Frédéric et *al.*, 2004) leurs évolution s'accomplit en quatre stade, et le temps total passé au stade larvaire est généralement de 8 à 10 jours à la température normale de l'eau (OMS.2003).

Les transformations qui permettent au moustique de passer du milieu aquatique au milieu terrestre débutent à la fin du développement larvaire par la lyse des muscles, qui aboutit à une nymphe (Duvallet et *al.*, 2017).

- Au stade adulte, les moustiques demeurent à la surface de l'eau jusqu'ils soient assez forts pour voler et chercher leur nourriture. Il faut compter 11 à 19 jrs jusqu'à l'adulte (Figure 5) (Christophe et *al.*, 2016).

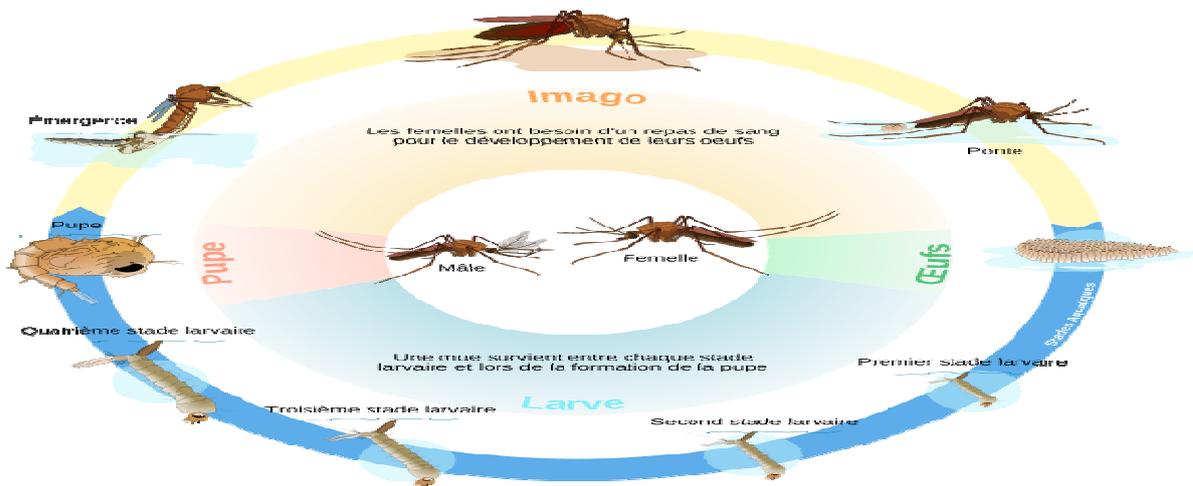


Figure 5: Cycle de vie *Culex pipiens pipiens*
(https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Culex_mosquito_life_cycle_fr.svg?uselang=fr).

I.1.4 /- Biologie des *Culex pipiens*

Culex pipiens parmi les 800 espèces de *Culex* (Ressiguiet .2011; Benzina et *al.*, 2018). C'est un moustique le plus fréquent dans le monde (Faraj et *al.*, 2006), il se développe bien dans les milieux urbains que ruraux, et dans les eaux polluées que propres.

Ses préférences trophiques sont très variables car, la femelle est plutôt ornithophile (Zientara.,2002 ; Luciano.2016), mais il s'attaque volontiers aux humains et aux mammifères lorsqu'ils cohabitent (la femelle est zoophile) (Faraj et *al.*, 2006), en plus elles ont une activité principalement nocturne (Delaunay et *al.*, 2001).

Les mâles et les femelles se nourrissent de nectar, alors que les femelles ont aussi besoin de sang pour produire leurs œufs, donc elles sont autogènes (Mezger et Roubaude .,1934 ; Callot.1945 ; Pasteur et *al.* ., 1977) .ils sont capables de détecter la chaleur et l'humidité émises lors de la transpiration des humains ou des animaux, ainsi que le CO₂ (Haas et *al.*, 2014).

Les adultes ne vivent pas plus de deux à trois semaines pour les mâles, et jusqu'à trois mois pour les femelles (Christophe et *al.*, 2016).

La présence d'une saison défavorable induit la diapause. Les femelles hibernent d'octobre à février (Balenghien et *al.*, 2007).

I.1.5/-Principales nuisances causées par *Culex*

Piqure :

- *Culex* est parmi les genres intéressent plus particulièrement la santé humaine. La piqure provoque une allergie importante notamment chez l'enfant ou le nouveau-né (visage, paupières...) (Pascal et *al.*, 2017).
- Les réactions allergiques aux piqûres de moustiques se présentent sous forme de réactions locales ou loco-régionales et les réactions systémiques sont rares (Drouet et *al.*, 2016).
- Les manifestations les plus fréquentes sont essentiellement liées à la réaction au moment du contact avec la salive des moustiques lors du repas sanguin (Haas et *al.*, 2014).

I.1.6/-Transmission de maladies

Les moustiques sont les insectes piqueurs les plus nocifs (Chapagain et *al.*, 2005 ; Benmalek et *al.*, 2018 ; Benzina et *al.*, 2018 ; Brugman et *al.*, 2018), et vecteurs de plus dangereuses maladies.(Joubari et *al.*, 2015).

Près de 700 millions de personnes contractent une maladie transmise par les moustiques chaque année, causant plus d'un million de décès. Ces dernières années, le taux de propagation de l'infection a augmenté de façon spectaculaire (Qureshi .2018).

Parmi les maladies les plus connues, on cite : le West Nile (Ludwig et *al.*, 2005; Tran et *al.*, 2015 ; Leggewie. et *al.*, 2016 ; Wagner et *al.*, 2017).

Fièvre jaune, dengue, Fièvre de la vallée du Rift, Encéphalite japonaise (Hamon et *al.*, 1967 ; Bernigaud et *al.*, 2016), ainsi que les filaires (Sabatinelli et *al.*, 1994).

I.1.7/-La lutte antivectorielle (LAV)

Son objectif est de minimiser les risques d'endémisation (installation durable d'une maladie dans une région) ou d'épidémisation, de diminuer la transmission d'agents pathogènes par des vecteurs et de gérer les épidémies de maladies à vecteur. (<https://dass.gouv.nc/votre-sante-sante-environnement/la-lutte-anti-vectorielle>). Il existe de nombreuses méthodes de lutte, parmi les :

I.1.7.1/-Lutte physique

La base de toute LAV repose sur une gestion environnementale des populations de moustiques qui passe tant par une modification des habitats destinée à prévenir, limiter ou supprimer les gîtes larvaires potentiels (drainage de milieux humides, traitement des eaux usées, remblai) que par une adaptation du comportement humain en vue de réduire au mieux le contact hôte-vecteur (gestion des déchets, suppression ou bâchage de récipients d'eau potentiels) (Becker et al., 2010).

I.1.7.2/-Lutte chimique

Méthode qui consiste à utiliser des produits phytopharmaceutiques de nature chimique pour combattre les organismes nuisibles (<http://www.agriculture-biodiversite-oi.org/Mediatheque/Glossaire/Lutte-chimique>)

Les plus importants insecticides : organochlorés, Organophosphorés, Carbamates, et Pyréthrinoides. (Maharaj et al., 2005) (<http://www.who.int/entity/whopes>).

I.1.7.3/-Lutte génétique

Elle conçoit la lutte contre les vecteurs par la modification de leur patrimoine génétique et, de là, par leur autodestruction (Hougarrd .1992).

I.1.7.4/-Lutte intégrée

Son principe est d'intégrer toutes les techniques de lutte disponibles contre un vecteur donné, en connaissant leurs impacts sur les populations ciblées et en tenant compte de leurs interactions (Suckling et al., 2014).

I.1.7.5/-Lutte biologique

Le contrôle biologique peut être défini comme « la réduction d'une population par l'utilisation de compétiteurs, prédateurs, parasites, pathogènes ou de toxines dérivées de ceux-ci » (Woodring *et al.*, 1996). Il s'agit ainsi de maintenir une population sous un seuil acceptable en termes de nuisance et de risque épidémique (dans le cas de la LAV) par l'intermédiaire d'un organisme (dit auxiliaire) ou de substances d'origine naturelle tout en évitant des effets délétères à l'écosystème (Regnault .2005).

La lutte biologique peut se fonder sur le recours aux poissons et aux arthropodes prédateurs, aux insectes et aux helminthes parasites, ainsi qu'aux maladies fongiques, bactériennes ou virales des vecteurs (Bergoin *et al.*, 2000 ; EFSA Panel on GMO.2013) .

I.1.8/-La résistance

On parle de la résistance lorsqu'apparaissent dans une population des individus possédant la faculté de survivre à des doses de substances létales pour la majorité des individus composant une population normale de la même espèce.

Chez les moustiques, le nombre d'espèces résistances augmente plus vite que les nouvelles molécules insecticides testées, pratiquement inexistantes depuis les années 1990.

On note différents types de résistances, dont les plus efficaces sont la résistance métabolique et la résistance par mutation de cible.

Chez les culex pipiens, les résultats ont montré que cette espèce ont développé une résistance contre les principales familles d'insecticides aux modes d'action différents : organochlorés : (DDT), Organophosphorés : Malathion, Carbamates : Bendiocarbe, Pyréthroides : Permethrine (Skovmand *et al.*, 2018).

I.2 /-Les champignons

I.2.1/-Metarhizium anisopliae

Metarhizium anisopliae (Metchnikoff) Sorokin 1883, appelé aussi muscle vert causer la maladie de muscardine ,est connu auparavant, sous le nom de *Entomophthora anisopliae* (zimmermann.,1993) ;C'est un champignon anamorphique ,microscopique avec une reproduction asexuée (Scholte et al.,2008 ; Yanez et France .,2010)

Metarhizium anisopliae (Metchnikoff), est un champignon cosmopolite. (Bashir et Shafie.,2017). Il est connu pour infecter des insectes de plus de sept ordres (kimberly et seow.,2017) ;y compris les ravageurs des agro-forêts cultures et vecteurs de maladies humaines et animales.(Butt et al.,2013 ; Renserradj et Mihoubi.,2014) ;Il a été rapporté qu'il infecte environ 200 espèces d'insectes et d'autres arthropodes et qu'il n'est pas infectieux ni toxique pour les mammifères et les organismes non ciblés (Bashir et shafie.,2017) .

I.2.1.1/- La morphologie des spores

Les conidies sont monocellulaires, cylindriques avec des extrémités arrondies (Figure 7). Les cellules conidiogènes sont considérées comme des phialides. De couleur blanche, elles deviennent vertes à la lumière ensuite progressivement plus sombre avec le temps (Krutmuang et Mekchay.,2005)

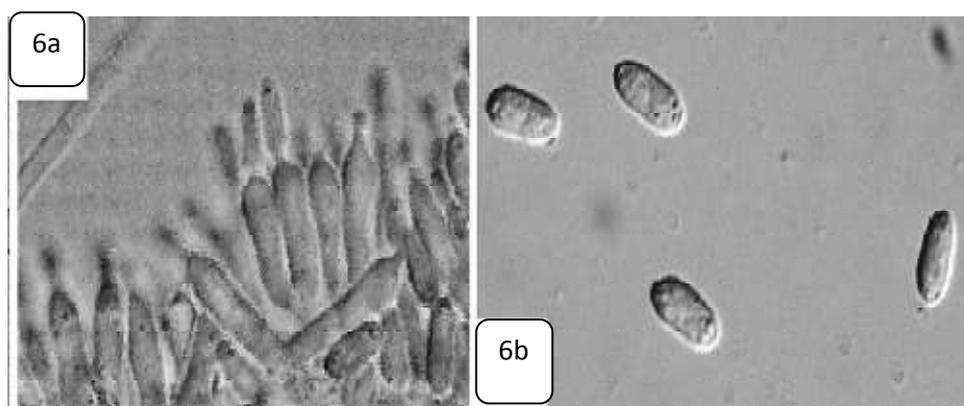


Figure 6: *M. anisopliae*. 6a. Phialides . 6b. conidies (Biscoff et al .,2009).

I.2.1.2/-Position systématique

D'après Kirk *et al.* (2001). La taxonomie de champignon, *Metarhizium anisopliae* est classé comme suit (Scholte et al., 2004):

Règne	:	Fungi
Embranchement	:	Ascomycota
Classe	:	Sardorinomycetes
Sous classe	:	Hypocreomycetidae
Ordre	:	Hypocreales
Famille	:	Clavicipitaceae
Genre	:	Metarhizium
Espèce	:	<i>Metarhizium anisopliae</i>

I.2.1.3/Mode d'infection de *Metarhizium spp* avec leurs hôtes

Le mode d'action des champignons entomopathogènes se divise en quatre étapes distinctes qui sont l'adhésion, la germination, la différenciation et la pénétration.

L'adhésion est caractérisée par un mécanisme de reconnaissance et de compatibilité des conidies avec les cellules tégumentaires de l'insecte. La 2ème étape est la germination, elle va être dépendante des conditions environnantes et aussi de la physiologie de l'hôte (composition biochimique de la cuticule) qui peut favoriser ou inhiber la germination.

L'avant dernière phase est la différenciation, caractérisée par la production d'appressorium, structures terminales qui vont servir de point d'encrage, de ramollissement de la cuticule et favoriser la pénétration.

La dernière phase est la pénétration de l'hôte qui se fait par la combinaison de pression mécanique et enzymatique telles que les lipases, les protéases et les chitinases (Bissad et al., 2010 ; Bethany et al., 2014). Après la mort de l'hôte, les hyphes émergent généralement le cadavre et, sous conditions abiotiques appropriées, les conidies sont produites à l'extérieur de l'hôte (Figure 7). Ceux-ci sont ensuite dispersés par le vent ou l'eau (Scholte et al., 2008 ; Arkam et al., 2017).

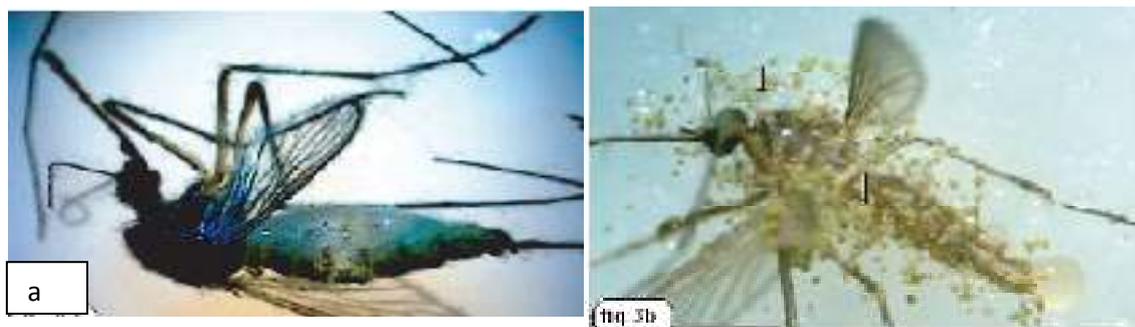


Figure 7 : *Culex quinquefasciatus* (b) mosquito adults infected by *Metarhizium anisopliae* and none infected (control)(a) (Seye et al.,2012)

I.2.1.4/-Mode d'infection de *Metarhizium*spp dans les larves d'insectes aquatiques

Le mode d'infection de *M. anisopliae* n'est toujours pas clair. Les conidies étaient incapables de s'attacher fermement aux larves aquatiques, résultant de l'incapacité de *M. anisopliae* à pénétrer dans l'hôte pour infecter et se reproduire.

Le mode d'infection le plus probable de *M. anisopliae* est l'ingestion de spores par les larves ; à cause de la présence de conidies dans les pellets fécaux des larves de moustiques Conidia avaient été ingérée (kimberly et seow.,2017).

I.2.1.5/-Formulation de Conidia pour *Metarhizium anisopliae* et *Metarhizium acridum*

L'effet de la formulation d'huile, de la formulation d'émulsion huile-dans-eau et de la formulation d'eau de *M. anisopliae* conidia a été testé et comparé pour différents hôtes. Des conidies formulées à l'huile provoquées mortalité plus élevée chez les hôtes par rapport aux conidies formulées dans l'eau (Valizadehei al., 2011).

L'efficacité des conidies formulées à l'huile a été proposée en raison de sa capacité à protéger les conidies de la chaleur, de la lumière du soleil et de l'humidité, en plus d'améliorer la fixation des conidies à la cuticule de l'hôte, la formulation d'huile peut empêcher les conidies d'obtenir l'eau nécessaire à la germination, en particulier en période de sécheresse.

Les conidies «sèches» étaient plus virulentes que les conidies «humides», Les conidies "humides" ont été formulées dans 0,03% à 0,1% de Tween 80 aqueux et les conidies 0,1% de Tween 80 a coulé au lieu de s'étaler uniformément sur la surface de l'eau. (kimberly et seow.,2017).

I.2.2/-Aspergillus flavus

Aspergillus flavus est un champignon filamenteux (Nayara et al., 2018) saprophyte opportuniste le plus dévastateur de plusieurs cultures vivrières et fourragères riches en acides gras, il est également capable de provoquer des maladies des Cultures économiquement importantes, telles que le maïs et les arachides, et produit des métabolites secondaires toxiques, cancérigènes, hépatotoxiques et tératogènes chez les humains et les animaux appelés aflatoxines (Mitema et al., 2017 ; Baqur et al., 2018 ; Lan et al., 2018 ; Rajasekaran et al., 2018).

A. flavus est génétiquement presque identique à *A. oryzae* (RFEP., 2018).il est le deuxième seulement après *A.fumigatus* en tant que cause de l'aspergillose invasive humaine([10.1016@j.bjid.2017.10.005](https://doi.org/10.1016@j.bjid.2017.10.005)).

I.2.2.1/-Taxonomie

A.flavus est classé comme :

Règne	:	Fungi.
Phylum	:	Ascomycota.
Classe	:	Euascmycetes (Eurotiomycetes).
Ordre	:	Eurotiales (flavus taxonimie).
Famille	:	Trichocomaceae.
Genre	:	<i>Aspergillus</i> .
Espèce	:	<i>Aspergillusflavus</i> (Maren.,2007)

I.2.2.2/-Caractéristiques de croissance et de toxinogénèse d'*Aspergillus flavus*

Comme d'autres espèces d'*Aspergillus*, *A. flavus* a des caractéristiques de croissance et de toxinogénèse qui sont résumé dans le tableau 1 suivant :

Tableau 01 : Caractéristiques de croissance et de toxinogénèse d'*Aspergillus flavus* (Anes.,2012).

Croissance	Min	Opt	Max
Température (C°)	10-12	33	43-48
PH	2.1	7.5	11.2
a _w	0.78-0.84	0.97	/
Toxinogénèse	Min	Opt	Max
Température (C°)	13	16-31	37
a _w	0.82	0.95-0.99	/

I.2.2.3/-Cycle de vie

Le cycle de vie des champignons comprend deux types de reproduction (Figure 8) :

Une reproduction asexuée, au cours de laquelle une spore ou un fragment de mycélium croit et se développe sur un substrat. Le mycélium émet des conidiophores à l'extrémité desquels des conidies sont émises puis disséminées ; la reproduction sexuée, implique la rencontre de deux mycéliums de signes sexuels .

Un mycélium à n chromosomes va rencontrer un autre mycélium à polarité complémentaire pour donner lieu à la fusion des cytoplasmes, ce qui engendre un nouveau mycélium à 2n chromosomes. Les cycles de vie diffèrent d'un champignon à un autre selon leur type de spores (Boudih .,2013).

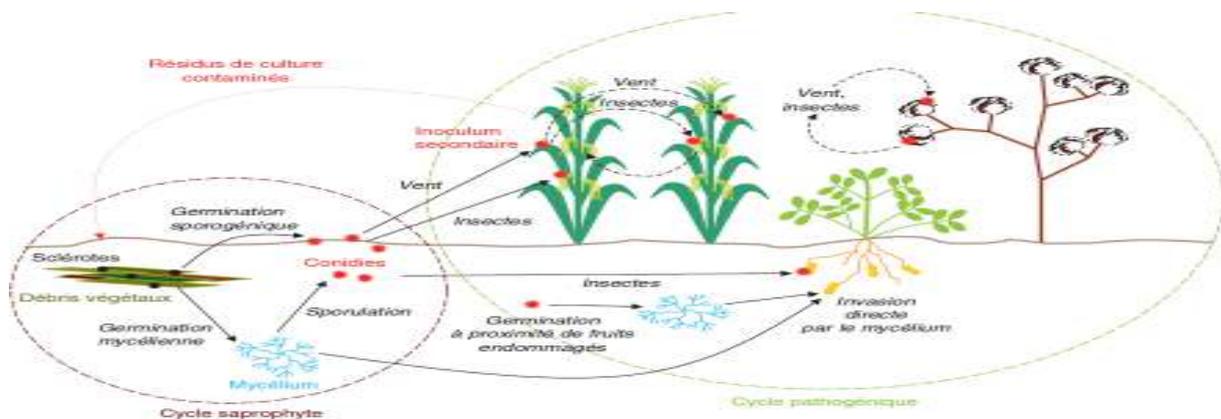


Figure 8: Cycle de vie des champignons phytopathogènes de type *Aspergillus* (Helène et al., 2013).

I.2.2.4/-Ecologie

A. flavus semble passer la majeure partie de sa vie à croître saprophyte dans le sol, où il joue un rôle important en tant que recycleur d'éléments nutritifs, soutenu par les débris végétaux et animaux. La capacité de *A. flavus* à survivre dans des conditions difficiles lui permet de rivaliser facilement autres organismes pour substrats dans le sol ou dans la plante. Ce champignon passe l'hiver soit comme mycélium ou en tant que structures résistantes connues sous le nom de sclérotes. Les sclérotes germer pour produire des hyphes supplémentaires ou ils produisent des conidies (spores asexuées), qui peuvent être davantage dispersé dans le sol et l'air (Figure 9)(Hidayati et al .,2007).



Figure 9: *Aspergillus flavus* sous microscope optique G :X 10.(originale).

I.2.2.5/-Toxines

Les aflatoxines (AF) sont un groupe de mycotoxines produites par l'*Aspergillus flavus*. Il existe quatre principal types d'aflatoxine; B1, B2, G1, G2. Le type le plus toxique ; aflatoxine B1 est directement liée aux divers effets de la santé comme le cancer de foie.

A. flavus en tant que producteur de mycotoxines (Lai et al., 2015). Elle peut produire d'autres métabolites secondaires tels que la dihydroxyaflavinine, l'indole, la paspalinine et la versicolorine (Hidayati et al .,2007).

II /-MATERIEL ET METHODES

Dans ce présent chapitre, nous avons abordé la conduite d'élevage du *Culex pipiens*, la préparation des doses à base des champignons entomopathogènes (*Metarhizium anisopliae* et *Aspergillus flavus*) ainsi que leurs impact sur les larves des stades L₂-L₃, et L₃-L₄.

Lieu et périodes de stage

Le stage a été réalisé au niveau de deux structures scientifiques : laboratoire d'éco-épidémiologie parasitaire et génétique de population (Institut Pasteur de Dely Brahim. Alger) et l'insectarium (Institut Pasteur de Sidi Fredj). Cette étude a eu lieu de janvier 2018 à juin 2018 ; soit sur une durée de 6 mois.

II.A/-MATERIEL

II.A.1/- Matériel biologiques

Culex pipiens

Les larves proviennent de gîtes non traités situés dans la région d'Ouargla ; l'élevage se fait par la suite au laboratoire d'entomologie de l'IPA.

Les champignons entomopathogènes

La souche d'*Aspergillus flavus* a été fournie par le service de mycologie médicale de l'IPA. Elle a été isolée à partir d'un patient.

M. anisopliae a été isolé à partir d'un produit à base de champignon appelé "Green Muscle". Ce biopesticide consiste en des spores du champignon entomopathogène *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* obtenu de l'INPV.

II.A.2/-Matériels de travail

Voir l'annexe I

II.B/-Méthodes

II.B. 1/-IDENTIFICATION DES LARVES

II.B.1.1./-Montage des larves

L'identification des spécimens a été réalisée après déshydratation par passage dans l'alcool à concentration 90° pendant 15 minutes pour éliminer l'eau contenue dans l'échantillon et enfin le montage des larves de 4^{ème} stade entre lame et lamelle avec une goutte de l'alcool polyvinylique (PVA), en sectionnant à l'aide d'une fine aiguille la larve au niveau de 7^{ème} segment abdominale deux partie, la partie antérieure est montée face dorsale et la partie postérieure est montée latéralement, les lames sont posées sur une surface plate puis d'examinées sous microscope photonique (la date et le lieu de la récolte doivent être mentionnées sur les lames) (figure 10).

La méthode de préparer le montage PVA (voir l'annexe I).

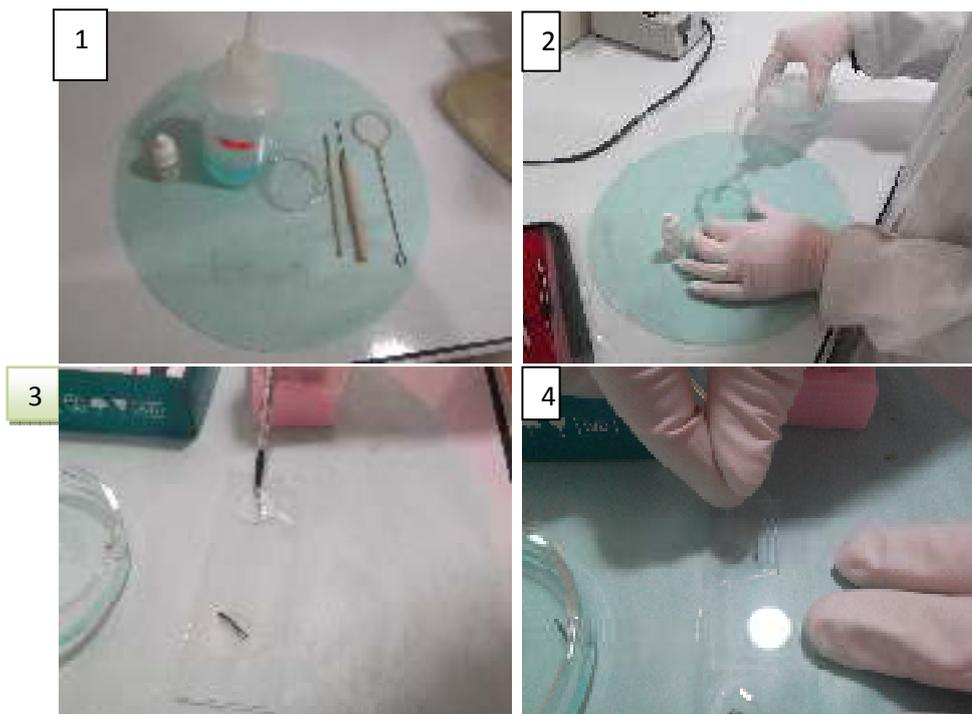
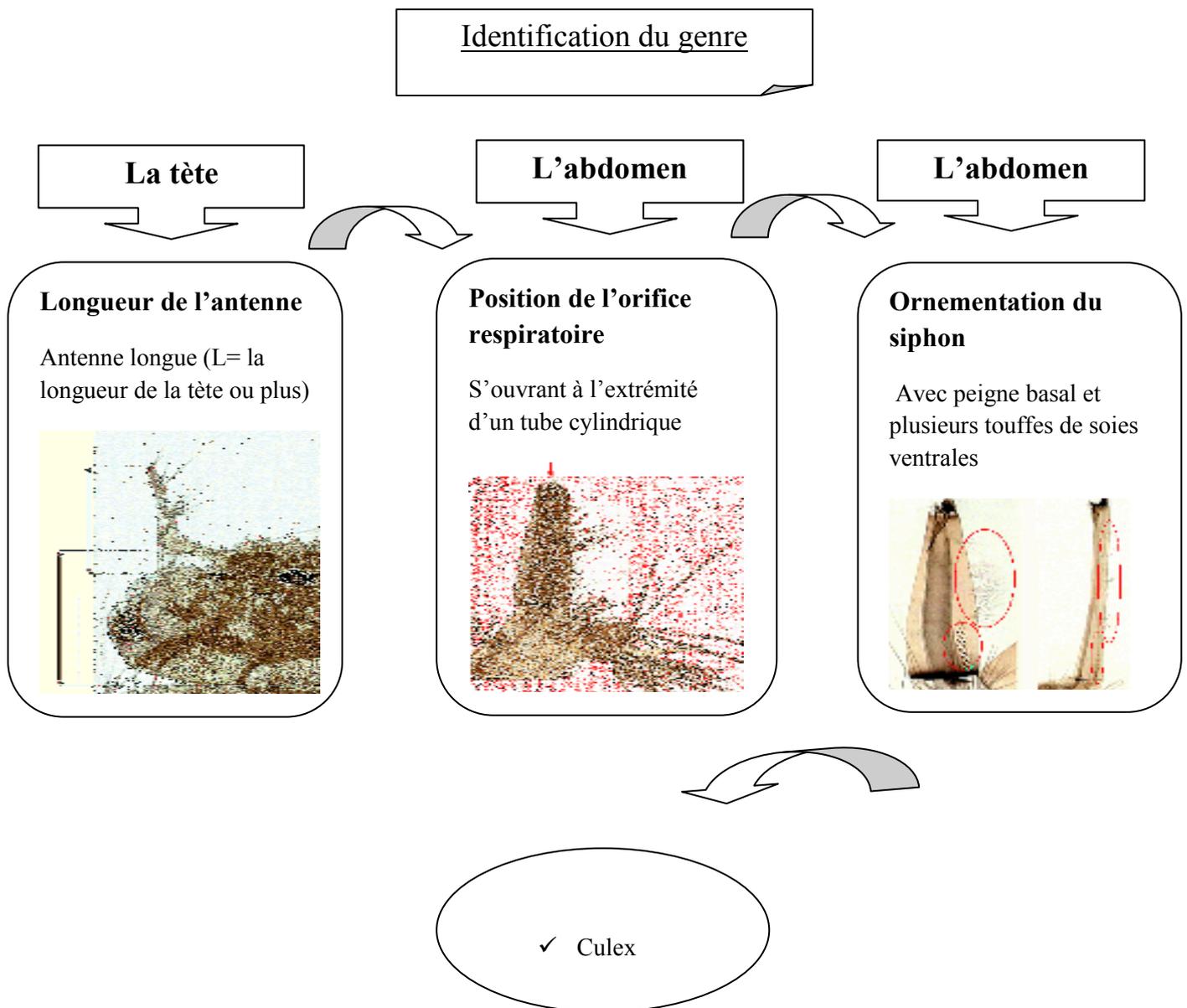


Figure 10 : Les étapes de montages les larves du *Culex pipiens*

II.B. 1.2/-IDENTIFICATION PAR LOGICIEL

L'identification des caractères morphologiques des larves de la région de Ouargla a été faite à l'aide de loupe binoculaire et microscope photonique; nous avons utilisés principalement le logiciel d'identification des moustiques de l' Afrique méditerranéenne de Brunhes et al.,(1999)(Messai et al.,2010 et Bouabida et al.,2012), débutont notre identification par la détermination de genre puis l'espèce pour les larves de 4^{ème} stade à l'aide de choix successifs proposés par des images. Nous avons suivi les étapes comme tel (Figure 11):



Identification de l'espèce de Culex

La tête

Insertion de la soie antennaire 3-A

A proximité de 4-A.



La tête

Forme de l'épine préclypéale 1-C

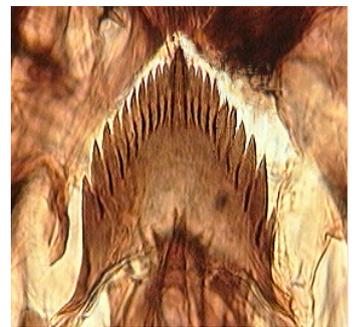
Mince et effilée à l'apex



La tête

Nombre de dents du mentum

08 dents ou plus de part et autre de dents médian



L'abdomen

Forme général du siphon

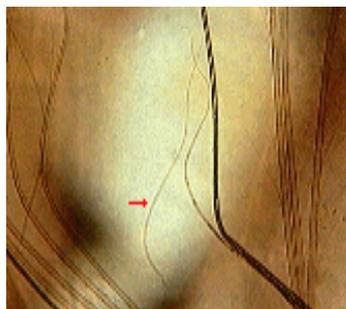
A bords droits



La tête

Nombre de branches de la soie 4-C

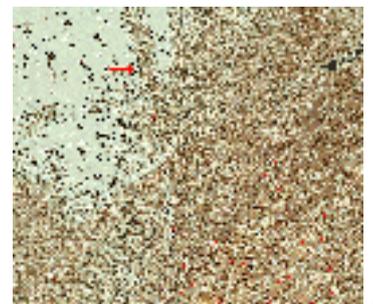
01 branche



La tête

Nombre de branches de la soie 5-C

04 branches et plus



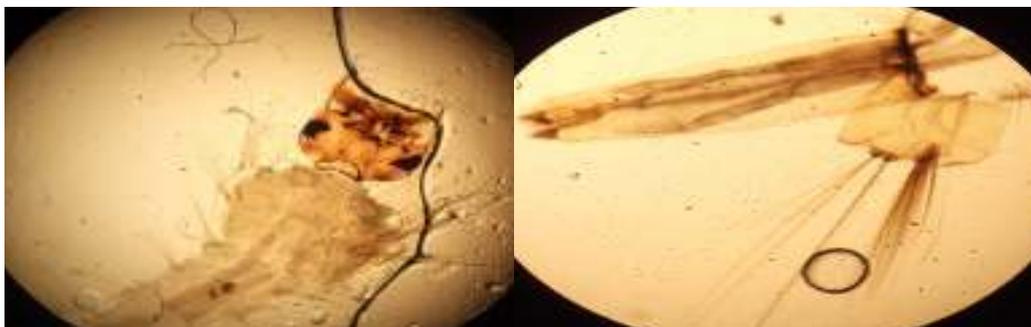
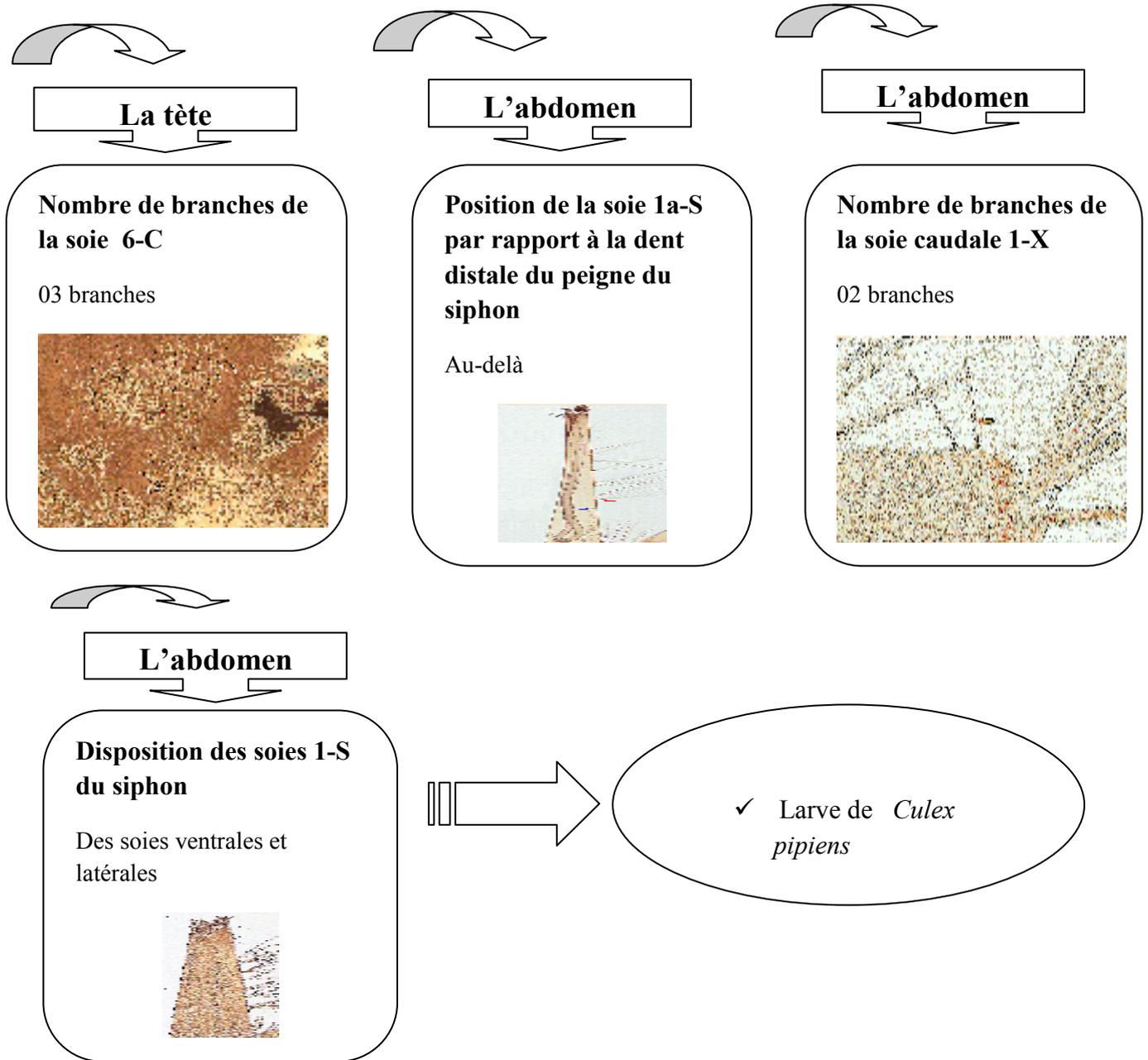


Figure 11 : larve de *Culex pipiens* identifié (originale).

II.B.2/-L'ÉLEVAGE DE *Culex pipiens*

Les larves ont été élevées dans des boîtes en plastiques de 25 cm x 08 cm x 20 cm (figure a12). Elles sont nourries de croquette des chats.

Les nymphes sont recueillies à l'aide d'une pipette compte-gouttes et sont placées dans des pondeurs à l'intérieur des cages, de dimensions 30 x 30 cm, afin d'y émerger ;(figure b10).

Les adultes, mâles et femelles, sont nourris d'une solution sucrée à 10 % de saccharose.

Les femelles sont gorgées toutes les 48h avec du sang de souris.

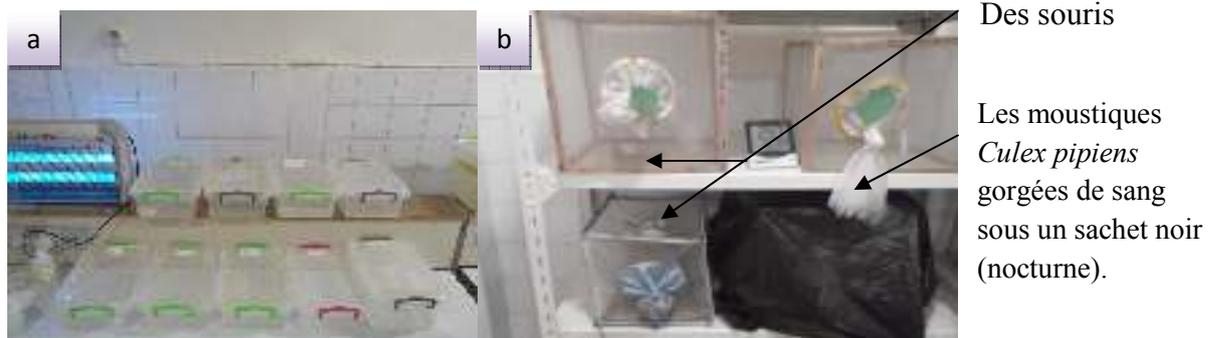


Figure12 : Méthode d'élevage des *Culex pipiens* à l'insectarium (original).

Les moustiques sont élevés dans des conditions contrôlées à 25 °C et 80 % d'humidité et une photopériode de 16 :8.

II.B.3/-ISOLEMENT PURIFICATION ET IDENTIFICATION DES CHAMPIGNONS ENTOMOPATHOGENES

La multiplication de champignons *Metarhizium anisopliae* et *Aspergillus flavus* sont été réalisés sur un milieu de culture nutritif Sabouraud chloramphenicol selon les étapes suivantes (figure 13) :

- ❖ Liquéfier le milieu.
- ❖ Couler le milieu dans des boîtes de pétri stériles (2 tubes de milieu par une seule boîte de pétri)
- ❖ Laisser refroidir les boîtes jusqu'à solidification du milieu.
- ❖ Repiquer les champignons dans les boîtes de pétri à l'aide d'une anse de platine
- ❖ Incuber les boîtes de pétri à une température de 25°C pendant 7 à 14 jours.



Figure 13: Isolement et repiquage des champignons entomopathogènes (original).

II.B.3.1/-PURIFICATION DES CHAMPIGNONS

Les souches *Metarhizium anisopliae* et *Aspergillus flavus* ont étéensemencées dans des boîtes de Pétri contenant le milieu Sabouraud chloramphénicol. Les colonies fongiques obtenues ont subi une purification, par un repiquage successifs sur le mêmes milieu de culture (figure 14).



Figure 14 : Purification des champignons entomopathogène (*M. anisopliae* et *A. flavus*) (original).

II.B.3.2./-IDENTIFICATION

L'identification des champignons fait essentiellement appel aux caractères cultureux (Identification macroscopique) et à la morphologie (identification microscopique)

II.B.3.2.1/-Identification macroscopique

L'observation des colonies développées, dans la boîte de pétri, se fait tout d'abord à l'œil nu puis à loupe binoculaire pour voir la couleur du mycélium aérien, sa variation au cours du temps, couleur du revers de la boîte, ... etc.

II.B.3.2.2/-Identification microscopique

Il s'agit de l'observation des fructifications du champignon à savoir la morphologie des chaînes de spores et celle du mycélium pour *M. anisopliae* et l'aspect des vésicules, des phialides, le mode de groupement des conidies (spores), l'ornementation et la couleur des conidies pour *A. flavus*; Pour cela nous avons fait le montage suivant :

Les préparations microscopiques se font à l'état frais entre lame et lamelle. La manipulation consistait à mettre un petit fragment mycélien sur la lame propre avec une présence de goutte de montage (bleu de coton), on fait passer la lame sur la flamme de bec bunsen par un mouvement de va et vient à fin de fondre la gélose. (Botton., 1990), et en suit la lame recouvert délicatement d'une lamelle en évitant de créer des bulles d'air ou des débordements.

II.B.4/-Etude de l'activité de *Metarhizium anisopliae* et d'*Aspergillus flavus* sur les larves de *Culex pipiens*.

Nous avons procédé à des bio-tests en utilisant des champignons entomopathogènes *Metarhizium anisopliae* et *Aspergillus flavus*.

II.B.4.1/-Méthode de préparation des solutions entomopathogènes

A l'aide d'une spatule stérile, des petits fragments du champignon ont été prélevés, par grattage de la surface de la boîte de pétri pour être introduits dans une fiole contenant 20 ml d'eau distillée et quelques gouttes de tween 80. après agitation le mélange est filtré à travers un morceau de gaze.

La solution obtenue (solution mère) a été mise en agitation pendant 10 minutes à l'aide d'un vortex pour une libération maximale des spores.

Matériel et méthodes

Après Centrifugation à 3000 tour / 10min, on jette **le surnagent** et on garde seulement **le Culot** (figure A15,et B15) .

La concentration de la solution entomopathogène a été évaluée à l'aide d'une cellule hematométrique « Cellule de Thoma » (figure C15) six différentes concentrations de la solution entomopathogène ont été utilisées pour le traitement des larves ; 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 et 10^9 spores/ml.

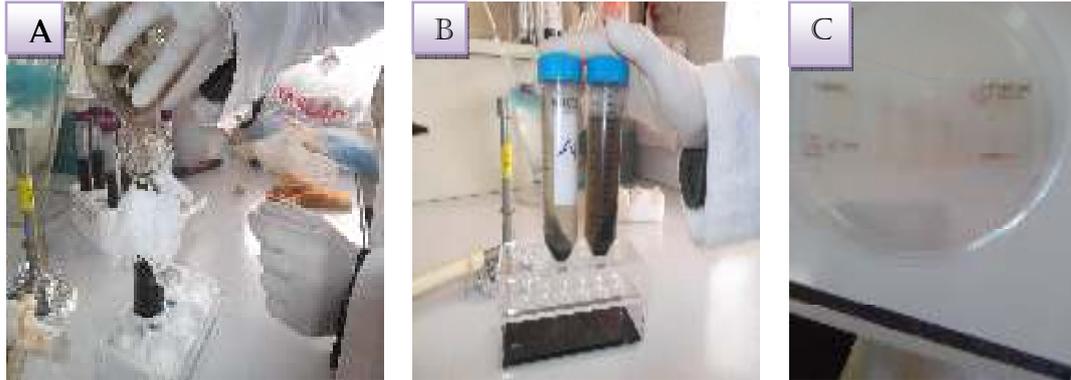


Figure 15: Méthode de préparation de la solution mère; filtration après grattage(A) ; après centrifugation des solution mères(B) , la cellule de Thoma)(C) (original).

II.B.4.2/-Préparation des concentrations

Une fois la concentration de la solution mère est calculée, on réalise les autres concentrations qu'on veut obtenir à l'aide de la loi d'équilibre (Figure 16) :

$$C_1 V_1 = C_2 V_2$$

C_1 : La concentration en spore obtenue à partir du volume V_1 .

C_2 : La concentration voulue (à obtenir).

V_1 : Volume d'eau mis dans la solution mère.

V_2 : Volume d'eau correspondant à la concentration choisie C_2 .



Figure 16 : Les six concentrations des spores de deux champignons (Original).

II.B.4.3/-Réalisation des biotests

Pour les bio- essais nous nous sommes intéressés aux larves de *Culex pipiens* des stades larvaires (L_3 , L_4) et (L_2 , L_3) pour les deux champignons utilisés.

Protocole expérimental

Un dispositif simple en blocs à 6 niveaux et à 3 répétitions pour les témoins et les 6 doses choisies a été élaboré afin de traiter les larves. Le dispositif consiste à :

Les tests ont été réalisés avec les différentes concentrations de la solution entomopathogène dans 21 gobelets contenant chacun 100ml de solution (99 ml eau distillée et 1ml de la solution entomopathogène) et 10 larves de moustiques de la même espèce .Le même nombre de larves a été placé dans un gobelet témoin contenant 100 ml de l'eau distillée (figure 17) Pour chacune des 6 concentrations de la solution entomopathogène ainsi que pour le témoin, trois tests de sensibilités a été effectuées avec trois répétitions pour chaque concentration.

- ❖ Les tests ont été faite dans des périodes différents au laboratoire à une température ambiante d'environ 25°C puis traiter.

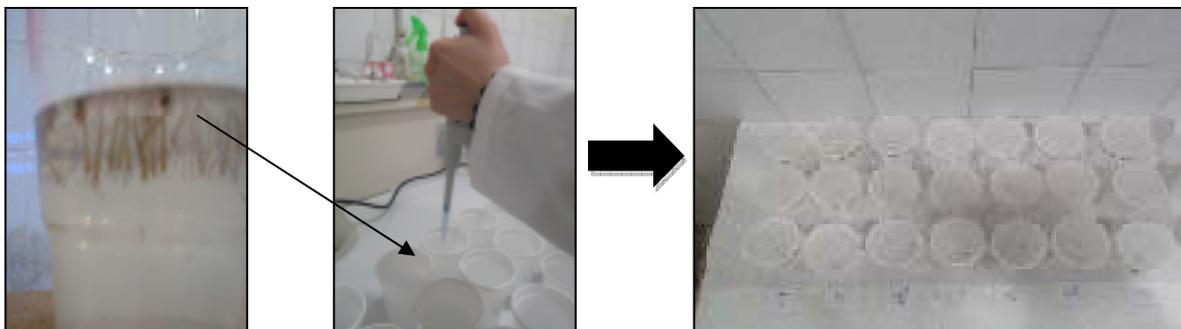


Figure17 : Protocole expérimental de l'activité larvicide de *Metarhizium anisopliae* et d'*Aspergillus flavus* sur la mortalité des larves de *Culex pipiens*.

II.C/-Test de confirmation

La mortalité des larves est contrôlée quotidiennement à compter du premier jour. Les cadavres sont observés au microscope optique (G : X40) en vue de la détection d'éventuelles multiplications intra-hémocoelienne du champignon. Nous considérons qu'il y a mortalité par mycose lorsque le champignon a colonisé tout ou une partie de l'hémocoel. **(Riba et al .,1984)**

II.D/-TRAITEMENT DES DONNEES

II.D.1/-POURCENTAGE DE MORTALITE

Les comptages permettent d'obtenir la sensibilité larvaire, exprimée par le taux de mortalité (%) en fonction du temps d'exposition et de la dose du toxique. Selon les recommandations de l'OMS (1963), Le pourcentage de mortalité a été calculé en utilisant la formule **(1)** :

$$(1) \text{ Pourcentage de mortalité} = \frac{\text{Nombre des larves mortes}}{\text{Nombre des larves introduites}} \times 100$$

Cependant si le taux de mortalité des témoins est compris entre 5 et 20%, une correction est effectuée selon la formule **(2)** Abbott (1925) qui permet d'éliminer la mortalité naturelle et de connaître la toxicité réelle du larvicide. Si la mortalité est supérieure à 20%, le test est annulé et doit être renouvelé.

$$(2) \text{ Pourcentage de mortalité} = \frac{\text{Mortalité des larves traitées\%} - \text{mortalité des témoins}}{100 - \text{mortalité des témoins}} \times 100$$

II.D.2/-L'analyse Probit

Pour estimer la DL50 (dose nécessaire et suffisante pour tuer la moitié d'une population) et de la TL50 (temps léthal au bout du quel on obtient 50% de mortalité) nous avons utilisé pour chaque dose la transformation en Probit des pourcentages de mortalités corrigées (Cavalier.,1976). Notons que les valeurs sont tabulées. A partir des équations de droites de régression « Probit-logarithme » nous pouvons calculer la DL50 et le TL50 en remplaçant Y par le probit 5. Ces transformations permettent d'établir les droites de régression de type :

$$Y = a x + b$$

Y : probit des mortalités corrigées.

x : logarithmes de la dose ou des temps.

a : la pente.

- ❖ le DL 50% est déterminée directement par la droit de régression sur le graphe , la valeur de X correspond au probit de 50% est en remplaçant Y par 5 pou déterminer la DL50% ;
- ❖ le temps létale 50 (TL50) correspond au temps nécessaire pour que périssent 50% et des **n** individus exposés à une dose ou à une concentration déterminée d'insecticide (Ramade , 2007) ; il est calculé à partir de la droit de régression des probits correspond aux pourcentages des mortalités corrigées en fonction du temps de contact(pris en logarithme népérien) .

II.D.3/-Analyse statistique

Les données collectées sont saisies à l'aide d'une maquette avec le tableur EXCEL puis présentées sous forme de tableaux ou de graphiques. Les analyses statistiques sont effectuées avec les logiciels Graph Prism version 5.03. Les données brutes soumises à l'analyse de la variance (ANOVA), les moyennes (\pm écartype) sont comparées grâce aux tests de comparaisons multiples de Dunnett (compare tous les colonnes VS colonnes témoins). Les valeurs de P inférieures à 0.05 sont considérées comme significatives.

Matériel
et
méthodes

III/-RESULTATS ET DISCUSSION

1/-Identification des isolats

1.1/-*Metarhizium anisopliae*

L'identification est basée sur les caractères macroscopiques et microscopiques des champignons obtenus en culture pure.

1.1.1/-Aspect macroscopique

Après ensemencement sur le milieu Sabouraud chloramphenicol, les colonies des souches apparaissent au bout de 7 jours d'incubation à 25°C et à l'obscurité. Les caractères culturaux des colonies poudreuses de couleur blanche devenant verdâtre foncée après la maturation (Figure 18a).



Figure 18a: Aspect macroscopique de la souche *Metarhizium anisopliae* cultivé sur le milieu de gélose Sabouraud chloramphenicol (original).

1.1.2/- Aspect microscopique

Metarhizium anisopliae a une critère majeur dans l'identification du champignon, il produit des spores vert, allongées avec des coté parallèles (figure 18b) les conidiophores sont relativement courts irrégulièrement ramifiés (Greathead et al.,1994).



Figure 18b : Aspect microscopique des spores et des conidiophores sous microscope photonique G : X10. (Original).

1.2/-*Aspergillus flavus*

1.2.1/-Identification macroscopique

Il peut être réalisé sur Sabouraud + CMP qui favorise la croissance et la sporulation de la plupart des *Aspergillus* : on décrira la surface et le revers. Le recto : duveteux à poudreux, blanc puis jaune à jaune-vert et le verso : incolore, rosé à brun rouge foncé (Figure 19)

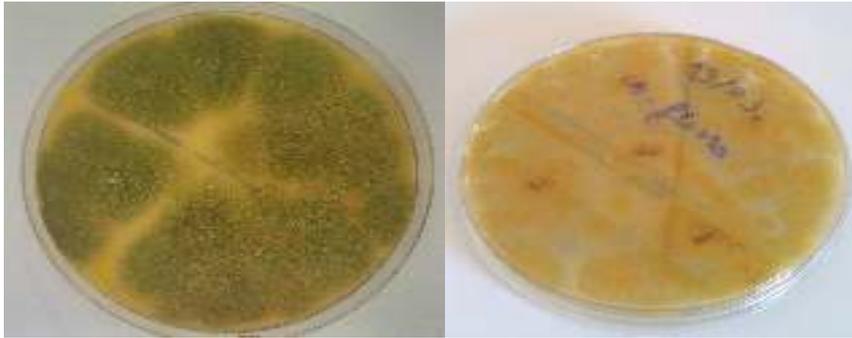


Figure 19 : Aspect macroscopique (recto et verso) d'*A.flavus*(original).

1.2.2-Identification microscopique

Ses conidiophores sont formés de stipes rugueux et se terminent par une vésicule sphérique, fertile sur plus des trois quarts de sa surface, portant à la fois des métules et des phialides. Les conidies sont finement rugueuses et sphériques(figure 20).

Les principaux caractères d'*Aspergillus flavus* sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau 2: les principaux caractères microscopiques de l'*A.flavus*.

	Tête aspergillaire	Conidiophore	Visicule	Conidies
<i>Aspergillus flavus</i>	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Radiée Uni ou bisériée 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Long (jusqu'à 2.5 mm) ✓ Souvent verruqueux incolore ✓ Parois épaisses 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Sphérique (20-50µm) 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Grosses (3 à 5 µm) ✓ Globuleuses, vert pale, échinulées



Figure 20: Tête aspergillaire (uni et bisériée) sous microscope G : X 40(original).

2/-Test de confirmation

Les larves de *Culex pipiens* sont mises en contact avec les deux champignons pendant 96h. Ce contact a provoqué la mort des larves. L'examen microscopique des spécimens, au microscope optique (G: X40) a montré la présence de conidies au niveau de tous le corps (appareil buccal, thorax, abdomen et siphon respiratoire) (Butt et al., 2013)(Figure 22).

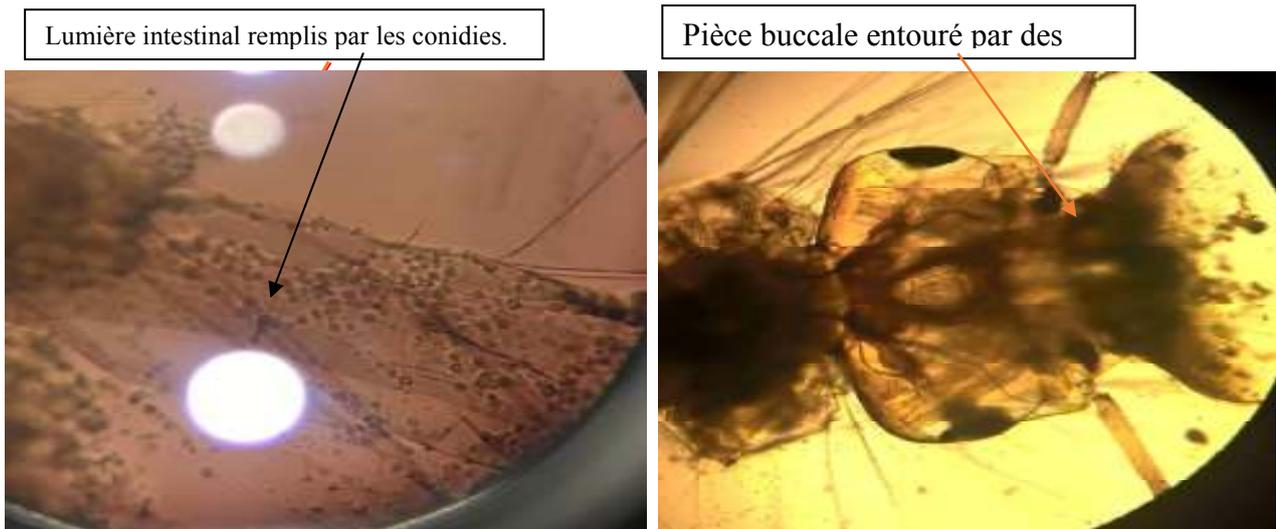


Figure 21 : Larve de *Culex pipiens* (morte) après traitement avec des champignons entomopathogènes sous microscope photonique G : X40 (original).

3/-Effet de *Metarhizium anisopliae* et *Aspergillus flavus* sur les larves de *Culex pipiens*

Ce troisième chapitre est consacré à l'exposition des résultats et leurs interprétations. L'application de différentes doses de *Metarhizium anisopliae* et *Aspergillus flavus* avait pour objectif d'évaluer l'impact de ces dernières sur plusieurs stades larvaires de *Culex pipiens*, dans le but de déterminer leurs niveaux de mortalités (létales), les temps létaux pour chaque dose utilisée ainsi que leur DL50%.

3.1/-Effet du *M. anisopliae* sur les larves de *Culex pipiens*

3.1.1/- Variation du taux de mortalité de larves de 2^{ème} et 3^{ème} stade de *Culex pipiens* de 1^{er}, 2^{ème} et 3^{ème} tests.

Les résultats du 1^{er}, 2^{ème} et de 3^{ème} test de *M. anisopliae* sur les larves de stades 2 et 3 de *Culex pipiens* qui sont obtenu à partir de tableau 3 (voir annexe I,II) sont portés sur les courbes ci-dessous .

Pour le premier test, la plus forte mortalité observée chez les larves traitées par *M. anisopliae* de 2^{ème} et 3^{ème} stade est de 100%. Elle a été obtenue au bout du 48h de traitement à la dose D₆ (10⁹ s/ml). Par ailleurs, une faible mortalité a été observée chez les larves de 2^{ème} et 3^{ème} stade, avec 10.37% à la dose D₁ (10⁴s/ml). Pour le reste des doses, on remarque une augmentation progressive de la mortalité (figure22).

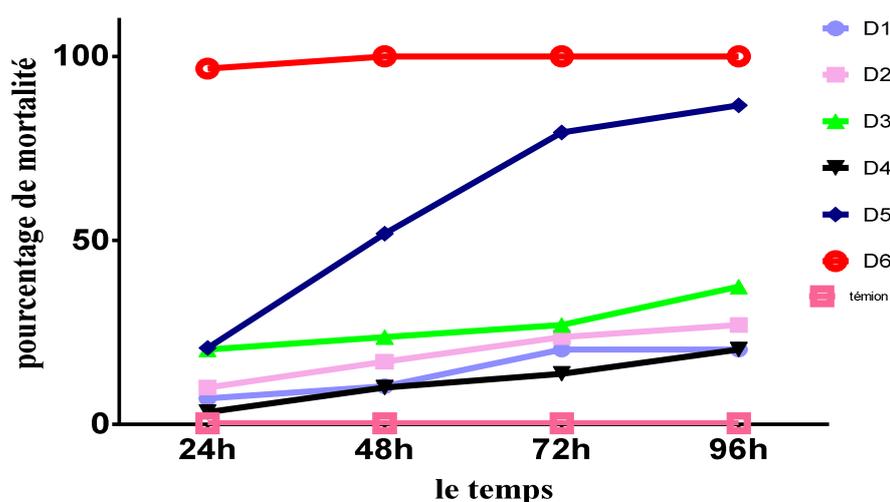


Figure 22 : Pourcentages de mortalité des larves de stades L2 et L3 de *Culex pipiens* après 5 jours de traitement avec *M. anisopliae* cultivée.

Pour le deuxième test, Une mortalité supérieure à 50% a été observée à D4 (10^7 s/ml) au bout de 48h, chez les larves traitées avec *M. anisopliae*, nous avons eu un pourcentage de mortalité des larves traités avec *M. anisopliae* de 2^{èmes} et 3^{ème} stades de 93.33% à la dose D6 (10^9 s/ml). Ce qui représente le pourcentage le plus élevé de mortalité obtenu au bout du 96h de traitement. De plus, une faible mortalité a été observée chez les larves traitées avec *M. anisopliae* de 2^{ème} et 3^{ème} stade, avec une valeur de 30% à la dose D₁ (10^4 s/ml). Pour les autres doses, nous avons noté une augmentation progressive de la mortalité. (Figure 23).

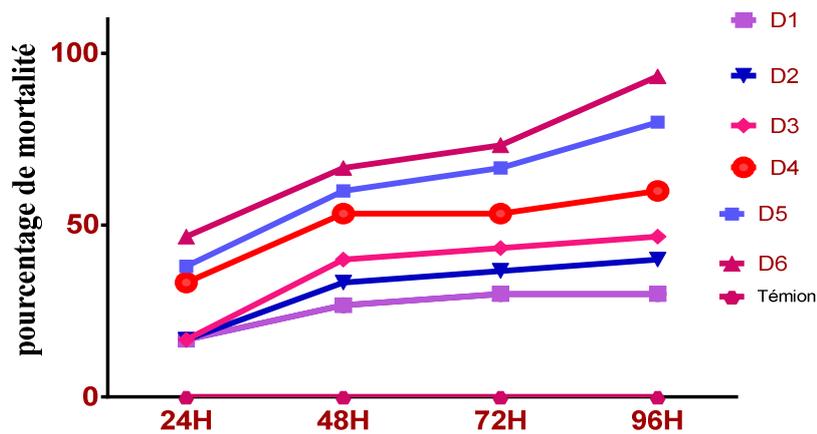


Figure 23 : Pourcentages de mortalité des larves de stades L2 et L3 de *Culex pipiens* après 5 jours de traitement avec *M. anisopliae* cultivée.

Le dernier test, nous avons eu un pourcentage de mortalité des larves traitées avec *M. anisopliae* de 2^{ème} et 3^{ème} stades de 50% à la dose D5 (10^8 s/ml) au bout de 48h., et 100% de mortalité à la dose D6 (10^9 s/ml), Ce qui représente le pourcentage le plus élevé de mortalité obtenu au bout du 96h de traitement. De plus, une faible mortalité a été observée chez les larves traitées par *M. anisopliae* de 2^{ème} et 3^{ème} stade, avec une valeur de 36.67% à la dose D₁ (10^4 s/ml). Pour les autres doses, nous avons noté une augmentation progressive de la mortalité. (Figure 24).

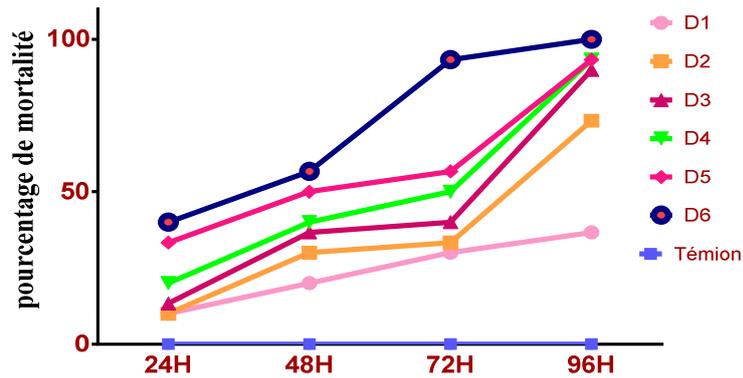


Figure 24 : Pourcentages de mortalité des larves de stades L2 et L3 de *Culex pipiens* après 5 jours de traitement avec *M. anisopliae* cultivée.

3.1.2/- Variation du taux de mortalité de larves de 3^{ème} et 4^{ème} stade de *Culex pipiens* de 1^{er}, 2^{ème} et 3^{ème} tests.

Les résultats du 1^{er}, 2^{ème} et de 3^{ème} tests *M. anisopliae* sur les larves de stades 3 et 4 de *Culex pipiens* qui sont obtenus à partir de tableau 4 (annexe II) sont portés sur les courbes ci-dessous.

Les résultats de 1^{er} test de *M. anisopliae* sur les larves de stades 3 et 4 montrent que la mortalité chez les témoins ne dépasse pas 20%. Les pourcentages de mortalité corrigés sont différents des pourcentages de mortalité observés. La mortalité des larves traitées après 72h à la dose D5 (10^8 s/ml) est dépassée 50%.

D'après la figure 25, on remarque que la mortalité des larves du *Culex pipiens* évolue dans le temps mais varie selon les doses testées. En effet, la plus forte mortalité a été enregistrée à une forte dose D6 (10^9 s/ml) de 100% de mortalité, suivie par les doses moyennes D₂, D₃, D₄, D₅, et finalement une faible mortalité de 23.33% à D₁ (10^4 s/ml) à 96h.

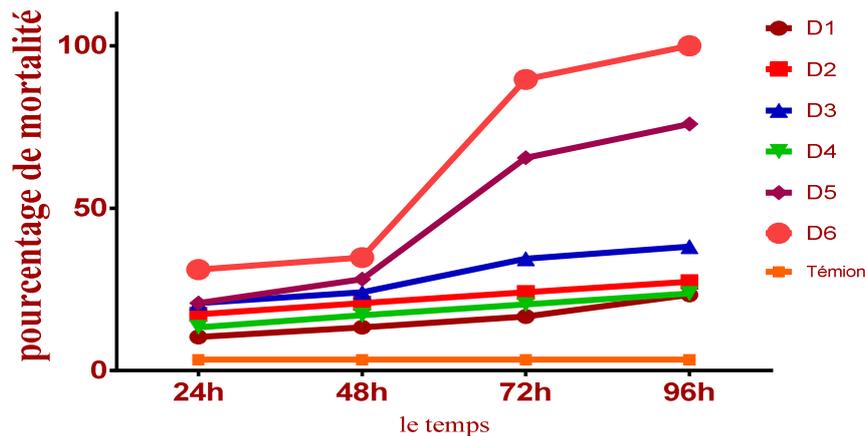


Figure 25 : Pourcentages de mortalité des larves de stades L3 et L4 de *Culex pipiens* après 5 jours de traitement avec *M.anisopliae* cultivée

D'après la figure 26, les résultats de 2^{ème} test *M. anisopliae* sur les larves de stades 3 et 4 montrent que la mortalité chez les témoins commence à apparaître après 24h avec pourcentage de 6.66% de mortalité et les pourcentages de mortalité corrigés sont différents des pourcentages de mortalité observés.

Nous avons aussi remarqué que la mortalité des larves à D6 (10^9 s/ml) avec un pourcentage de 53.33 de mortalité au 48h. Et une faible mortalité de 10% à D₁ (10^4 s/ml).

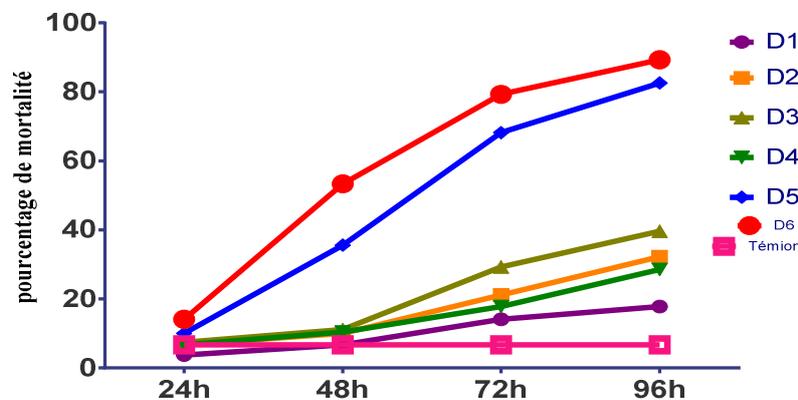


Figure 26 : Pourcentages de mortalité des larves de stades L3 et L4 de *Culex pipiens* après 5 jours de traitement avec *M.anisopliae* cultivée

La figure 27, montre que les pourcentages de mortalité corrigés sont égaux aux pourcentages de mortalité observés (témoin est égale de 3.33%) .La mortalité est supérieure à 50% a été observée au bout de 48h à la dose D6 (10^9 s/ml), chez les larves traitées par *M. anisopliae* .Au 96h, nous avons remarqué que la plus forte mortalité des larves est à D6 (10^9

s/ml) avec un pourcentage de 75.56% de mortalité. Et 38.14% de mortalité à la dose D₁ (10⁴ s/ml). Cette dernière étant la dose la plus faible.

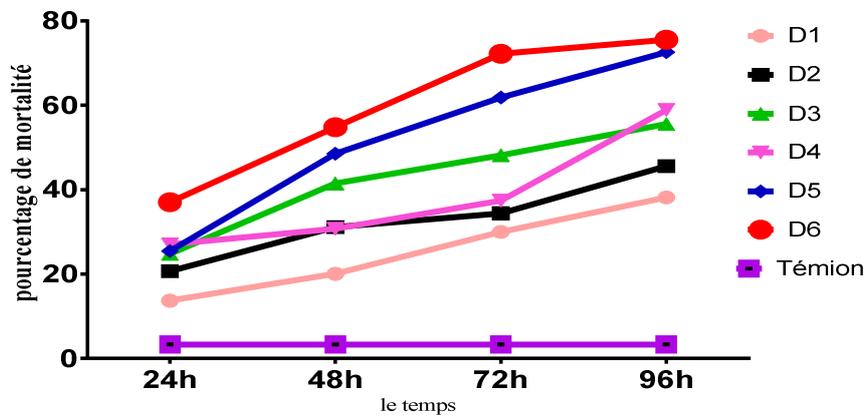


Figure 27: Pourcentages de mortalité des larves de stades L3 et L4 de *Culex pipiens* après 5 jours de traitement avec *M.anisopliae* cultivée

3.1.3/-Estimation des DL50%

Le DL50% a été déterminée à partir de l'équation issue de la droite de régression tableau 5 et 6 (voir annexe II et III), qui a été élaboré à partir des transformations des pourcentages de mortalité en probits, correspondant de 24h à 96h après le traitement des larves de *Culex pipiens*, et les doses en logarithmes décimaux (Figure 28,29).

Au cours de cette étude nous avons comparées les trois tests de *M.anisopliae* sur les larves de 2^{ème} et 3^{ème} stades (figure 28), qui sont traitées dans des périodes différents.

Afin d'évaluer la reproductibilité des DL 50 obtenus par les trois tests sur les larves aux stades L2 et L3, nous avons analysé les DL50 par une ANOVA à un facteur, une comparaison des tests un à un par le test de Tukey Les résultats ont montré qu'il n'y avait pas de différence significative entre les trois tests avec une valeur de $P_{\text{value}} = 0.8801$ ($p < 0.05$).

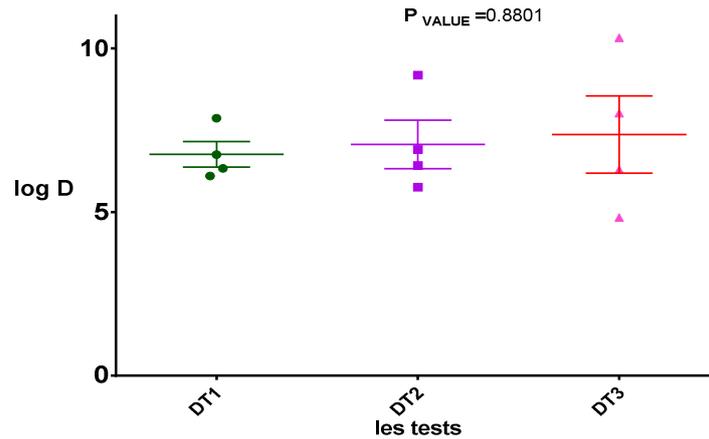


Figure 28: les DL50% des larves L2 et L3 de 1er ,2ème et 3ème tests .

DT1, DT2 et DT3 :DL50%de 1^{er} Test, DL50%de 2^{ème} Test et DL50%de 3^{ème} Test.

Nous avons comparées les trois tests de *M. anisoliae* sur les larves de 3^{ème} et 4^{ème} stades (figure 29), qui sont traitées dans des périodes différents.

L'analyse statistique par ANOVA à un facteur des doses létales 50%, une comparaison des tests un à un par le test de Tukey n'a pas montré de différence significative entre les doses létales chez les larves de stades L3 et L4 avec une valeur de $P_{\text{value}} = 0.9506$ ($p < 0.05$).

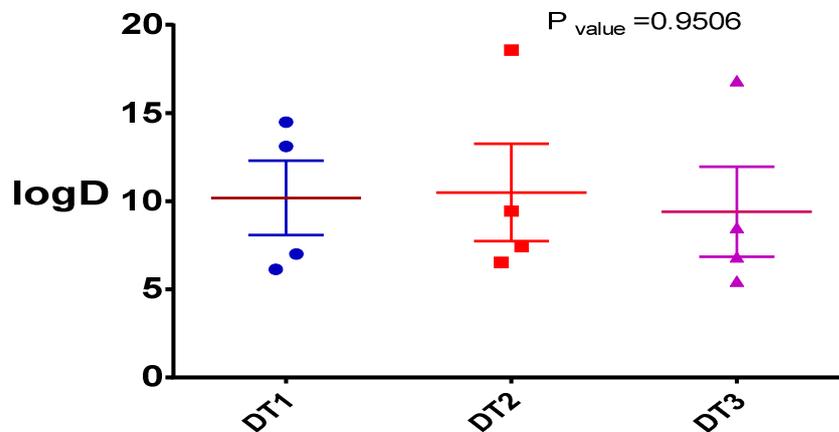


Figure 29: les DL50% des larves L3 et L4 de 1^{er} , 2^{ème} et 3^{ème} tests .

DT1, DT2 et DT3 :DL50%de 1er Test, DL50%de 2ème Test et DL50% de 3ème Tes

Ces résultats montrent bien que les trois tests de *Metarhziium anisopliae* sur les larves *Culex pipiens* de stades L2et L3, L3et L4 sont efficaces pour tuer 50% du la population dans une période d'incubation.

3.1.4/-Estimation des TL50%

Les probits des pourcentages de mortalités cumulées ainsi que le logarithme décimal des temps pour les six doses et les deux stades larvaires (L2, L3) et (L3,L4) pour les trois tests, sont portés sur les tableau 7 et 8 (voir annexe III et IV). Les temps létaux calculés, varient d'un test à une autre, d'une dose à une autre et d'un stade à un autre pour chaque traitement. Le temps le plus élevé 17.8J a été obtenu à la dose D1 (10^4 s/ml). Le temps le plus court était égal à 1.29 h à la dose D6 (10^9 s/ml) pour le 1^{er} test chez les larves de 2^{ème} et 3^{ème} stades ; Le temps le plus élevé 34.5J a été obtenu à la dose D1 (10^4 s/ml). Le temps le plus court était égal à 1.55J à la dose D6 (10^9 s/ml) pour le 1^{er} test chez les larves de 3^{ème} et 4^{ème} stades. Les valeurs des TL50 relatives à chaque dose, à chaque stade larvaire et à chaque traitement sont tirées à partir des équations de régressions tableau 7 et 8 (voir annexe III et IV).

Pour pouvoir estimer la reproductibilité des résultats en TL50 entre les trois tests sur les stades L2 et L3, L3 et L4, nous avons effectué analyse par une ANOVA à un facteur. Une comparaison des tests un à un par le test de Tukey. Les résultats de cette analyse n'ont pas de différence significative entre les trois tests avec une valeur de $P_{\text{value}}=0.429$ ($p<0.05$) (figure 46) pour les 2^{ème} et 3^{ème} stades larvaires (Figure 30) et de $P_{\text{value}}=0.0552$ avec ($P<0.05$) pour les 3^{ème} et 4^{ème} stades larvaires (Figure 31).

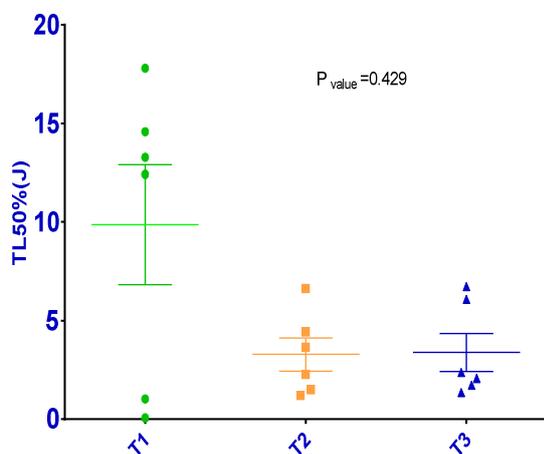


Figure 30: Evaluation des droites de régression et valeurs de TL50% chez les larves L2 et L3

T1, T2 et T3 : test 1, test2 et test 3.

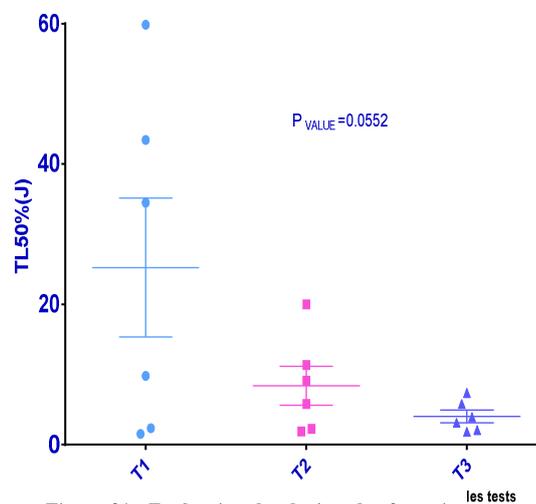


Figure 31 : Evaluation des droites de régression et valeurs de TL50% chez les larves L3 et L4.

T1, T2 et T3 : test 1, test2 et test 3.

3.1.5/-La comparaison entre les doses de *Metarhizium anisopliae*

Au cours de notre étude nous avons comparé le taux de la mortalité des larves de *Culex pipiens* exposées aux six doses de *M. anisopliae* par rapport aux témoins.

Pour les L2 et L3 :

La figure 32,33 et 34 montre que la mortalité moyenne des larves de *Culex pipiens* de stade 2 et 3 traitées par *M. anisopliae* de 1^{er} 2^{ème} et 3^{ème} tests.

L'analyse statistique par ANOVA à un facteur des six doses de *M. anisopliae* , a révlélé une différence significative entre le témoin et les six doses de *M. anisopliae* avec une valeur de p <0.0001 (p < 0.05).Une comparaison des six doses une à une avec le témoin par le test de Dunnett a montré qu'il avait une différence significative entre le témoin et six doses de *M.anisopliae* (D1,D2,D3,D4,D5etD6) au bout de 4^{ème} jours pour le 1^{er} test . Une différence significative entre le témoin et les six doses D1 ,D2,D3 ,D4, D5 et D6 à partir de 48h (2j) . Une différence significative entre le témoin et les six doses de *M.anisopliae* (D1,D2,D3,D4,D5etD6)à partir de 72h (3J) et à 96h (4j) .L'ANOVA aussi fait ressortir une différence significative avec une valeur de p <0.0001(p < 0.05),cette différence est **fortement** significative .

Les résultats que nous avons obtenus s'expriment sous forme de l'histogramme représentant les différences significatives entre les témoins et les six doses de *M .anisopliae* avec des temps différents (Figure 32,33 et 34).

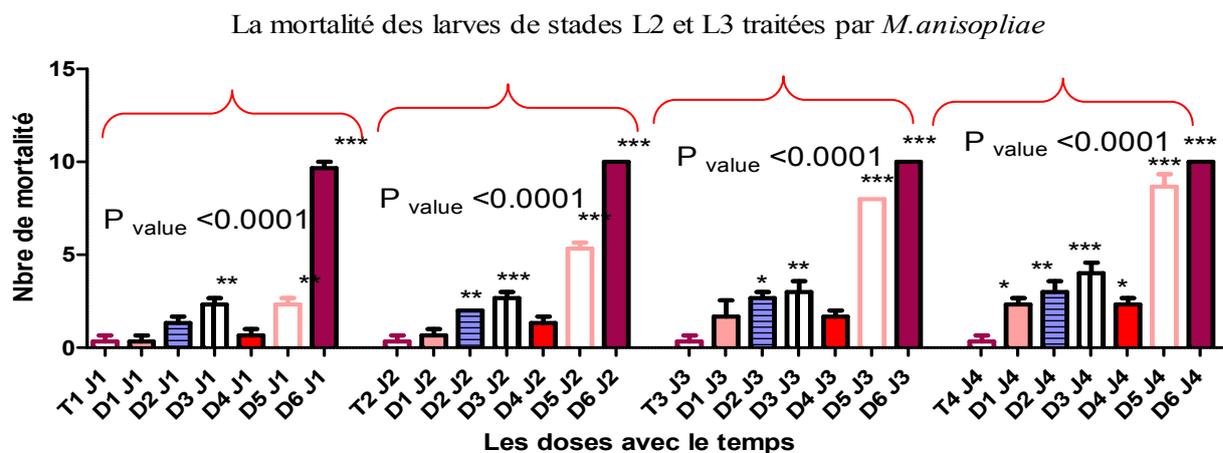


Figure 32: la mortalité moyenne des larves (L2 et L3) du *Culex p* traités avec *M.anisopliae* et la significativité entre les doses et le témoin pour le 1^{er} test .

*Significative. **très significative. ***fort significative

La mortalité des larves de stades L2 et L3 traitées par *M.anisopliae*

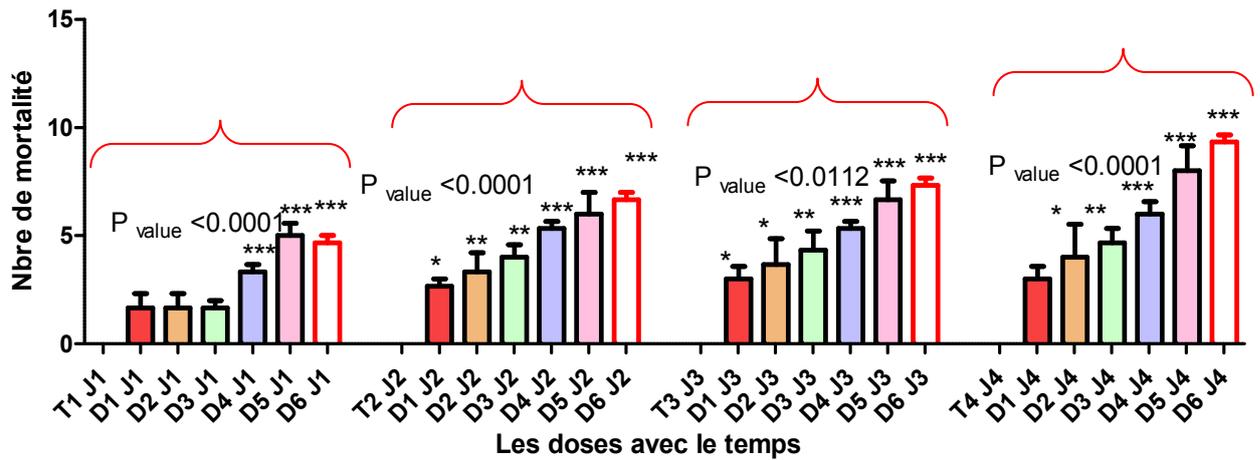


Figure 33 : la mortalité moyenne des larves (L2 et L3) du *Culex p* traitées par *M.anisopliae* et la significativité entre les doses et le témoin par le 2^{ème} test .

*Significative. **très significative. ***fort significative

La mortalité des larves de stades L2 et L3 traitées par *M.anisopliae*

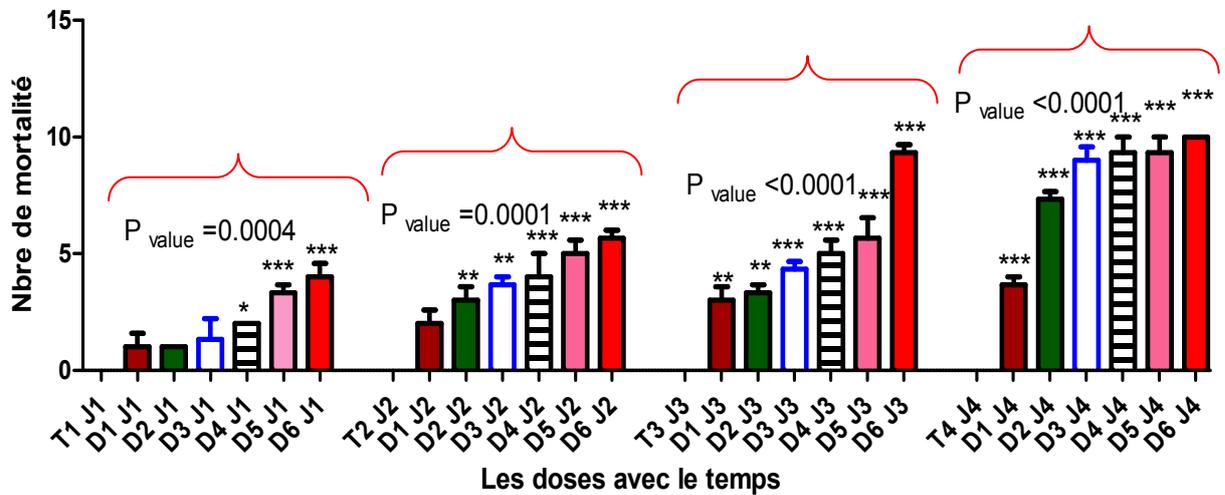


Figure 34 : la mortalité moyenne des larves (L2 et L3) du *Culex p* traitées par *M.anisopliae* et la significativité entre les doses et le témoin pour le 3^{ème} test .

*Significative. **très significative. ***fort significative

Pour les larves L3 et L4 :

La figure 35,36, et 37 montre que la mortalité moyenne des larves de *Culex pipiens* de stade 3 et 4 traitées par *M. anisopliae* de 1^{er} 2^{ème} et 3^{ème} tests.

L'analyse statistique par ANOVA à un facteur de six doses de *M. anisopliae* , a révélé une différence significative entre le témoin et les doses de *M. anisopliae* avec une valeur de $p < 0.0001$ ($p < 0.05$). Une comparaison des six doses un à un avec le témoin par le test de Dunnett a montré qu'il avait une différence significative entre le témoin et les six doses avec une valeur de P_v variante. Une différence significative entre le témoin et les six doses de *M. anisopliae* au bout de 96h (4J) pour le 1^{er} test , Une différence significative entre le témoin et deux doses de *M. anisopliae* (D5 et D6) à partir de 48h (2J) et 72h (3J) et entre le témoin et les cinq doses D2,D3 ,D4, D5 et D6 à 96h (4j) pour le 2^{ème} test , Une différence significative entre le témoin et les six doses de *M. anisopliae* (D1,D2,D3,D4,D5 et D6)à partir de 48h (2J),72h (3J) et à 96h (4j) pour le 3^{ème} test . L'ANOVA aussi fait ressortir une différence significative avec une valeur de $p < 0.0001$ ($p < 0.05$),cette différence est **fortement** significative .

Les résultats que nous avons obtenus s'expriment sous forme de l'histogramme représentant les différences significatives entre les témoins et les six doses de *M. anisopliae* avec des temps différents (Figure 35,36, et37).

La mortalité des larves de stades L3 et L4 traitées par *M. anisopliae*

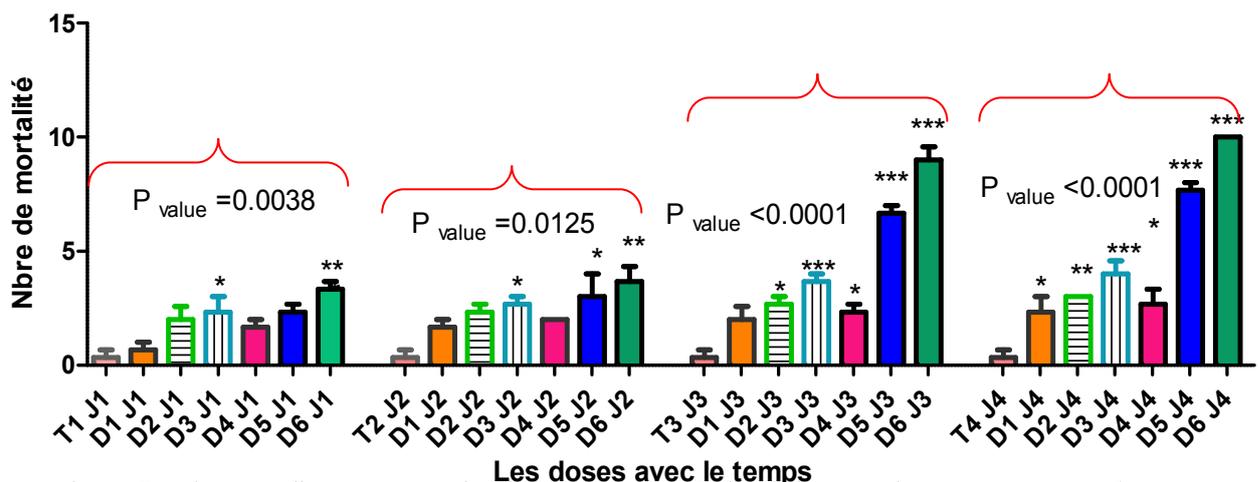


Figure 35 : la mortalité moyenne des larves (L3 et L4) du *Culex p* traités par *M. anisopliae* et la significativité entre les doses et le témoin pour le 1^{er} test .

*Significative. **très significative. ***fort significative

La mortalité des larves de stades L4 et L3 traitées par *M.anisopliae*

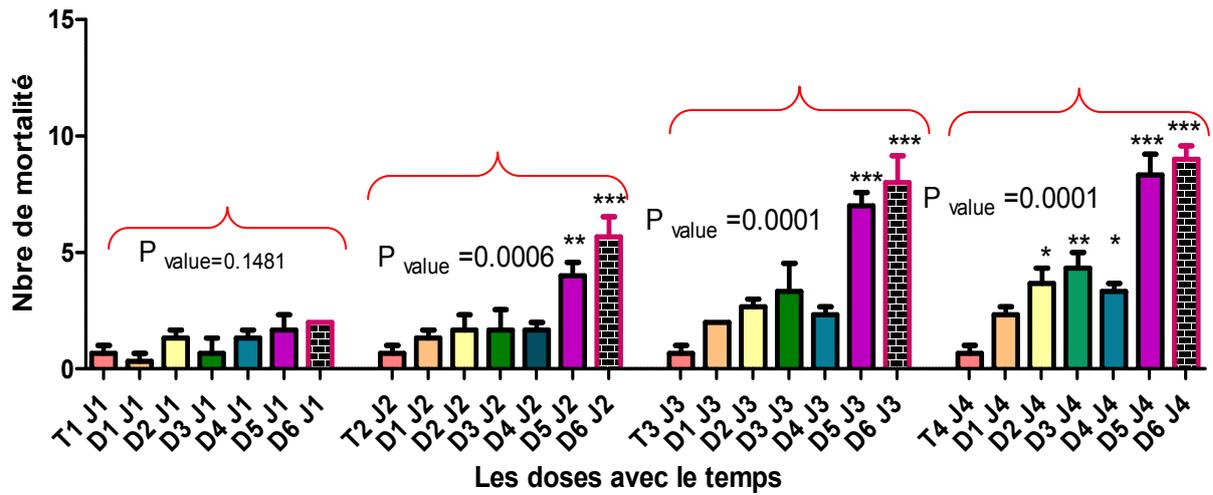


Figure n°36 : la mortalité moyenne des larves (L3 et L4) du Culex p traités par *M.anisopliae* et la significativité entre les doses et le témoin pour le 2^{ème} test .

*Significative. **très significative. ***fort significative

La mortalité des larves de stades L4 et L3 traitées par *M.anisopliae*

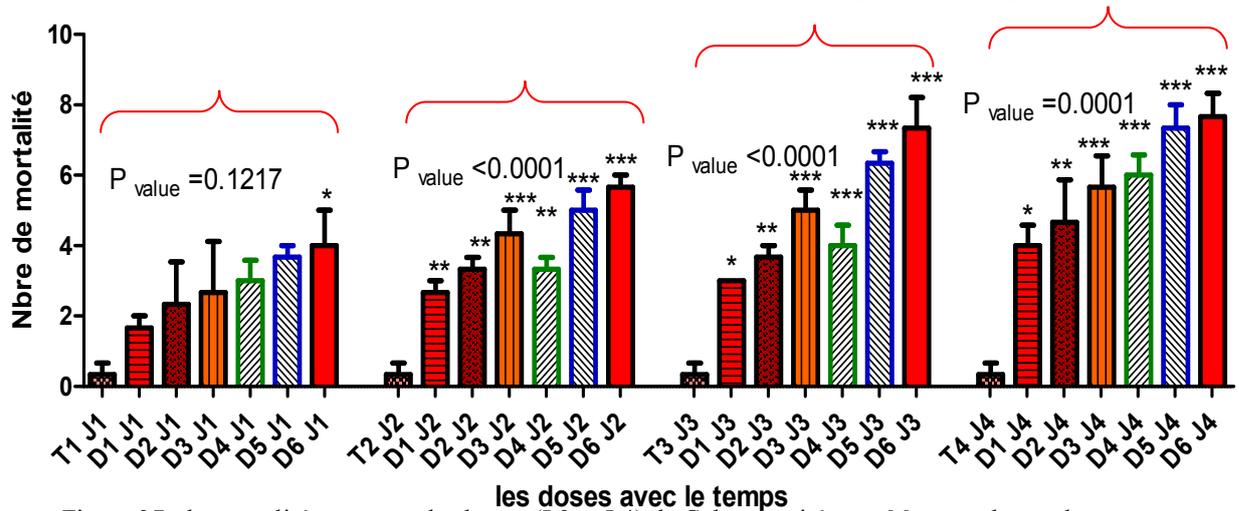


Figure 37 : la mortalité moyenne des larves (L3 et L4) du Culex p traités par *M.anisopliae* et la significativité entre les doses et le témoin pour le 3^{ème} test .

*Significative. **très significative. ***fort significative

3.2. Effet d'*Aspergillus flavus* sur les larves de *Culex pipiens*

3.2.1. Variation du taux de mortalité de larves de 2^{ème} et 3^{ème} stade de *Culex pipiens* de 1^{er}, 2^{ème} et 3^{ème} tests .

Les résultats du 1^{er}, 2^{ème} et de 3^{ème} test d'*A.flavus* sur les larves de stades 2 et 3 de *Culex pipiens* qui sont obtenu a partir de tableau 9 (annexe IV) sont portés sur les courbes ci-dessous.

Pour le premier test, la plus forte mortalité observée chez les larves traitées par *A.flavus* de 2^{ème} et 3^{ème} stade est de 54.81%. Elle a été obtenue au bout du 96h de traitement à la dose D₆ (10⁹ s/ml). Par ailleurs, une faible mortalité a été observée chez les larves de 2^{ème} et 3^{ème} stade, avec 20.74% à la dose D₁ (10⁴s/ml). Pour le reste des doses, on remarque une augmentation progressive de la mortalité (figure38).

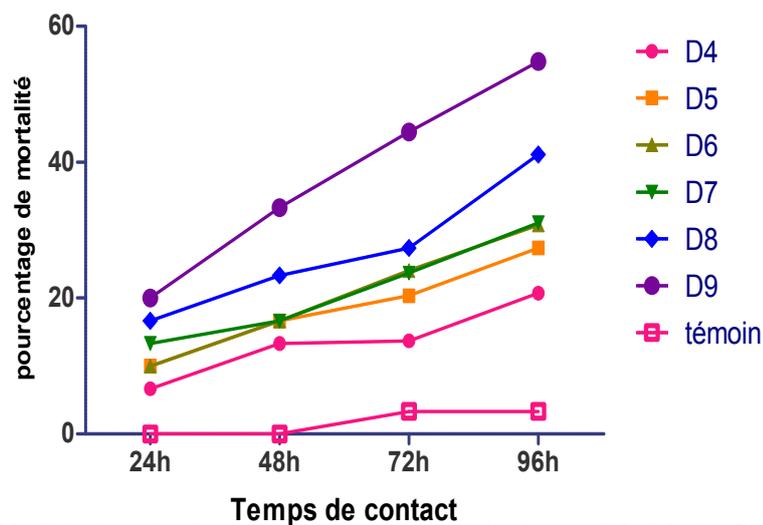


Figure n°38 : Résultats des Pourcentages de mortalité des larves (L2+L3) de *Culex pipiens* après 5 jours de traitement par *A.flavus* (test 01).

Pour le deuxième test, nous avons eu un pourcentage de mortalité des larves traités par *A.flavus* de 2^{èmes} et 3^{ème} stades de 60.74% à la dose D₆ (10⁹ s/ml). Ce qui représente le pourcentage le plus élevé de mortalité obtenu au bout du 96h de traitement. De plus, une faible mortalité a été observée chez les larves traitées par *A.flavus* de 2^{ème} et 3^{ème} stade, avec une valeur de 17.78% à la dose D₁ (10⁴s/ml). Pour les autres doses, nous avons noté une augmentation progressive de la mortalité. (Figure 39).

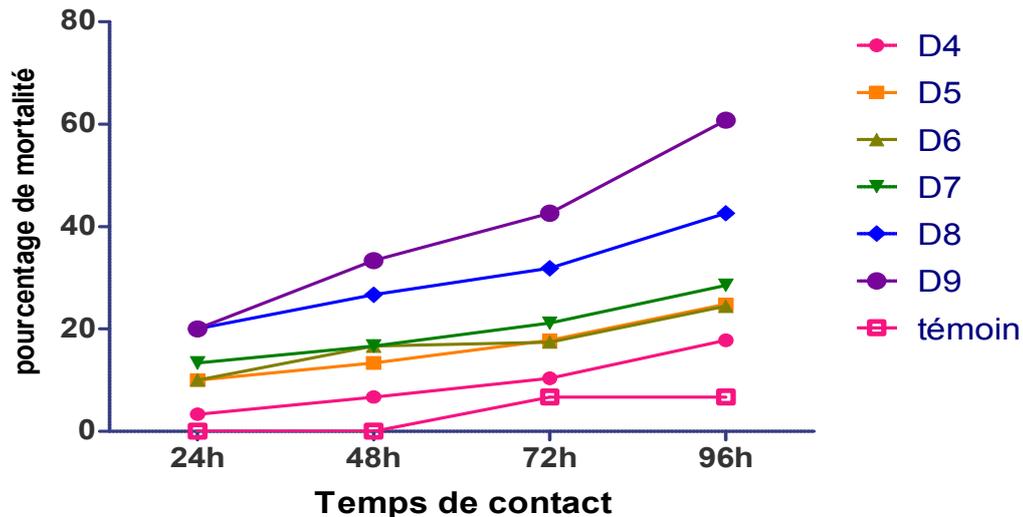


Figure n°39: Pourcentages de mortalité des larves (L2 et L3) de *Culex pipiens* après 5 jours de traitement par *A.flavus* (test 02).

Le dernier test, montre que le pourcentage de mortalité le plus élevé des larves traitées par *A. flavus* est observé à la dose D₆ (10^9 s/ml). Il a atteint 57.04% au bout du 96h. La plus faible mortalité observée chez les larves traitées par *A.flavus* de 2^{èmes} et 3^{èmes} stade était égale à 17.41% à la dose D₁ (10^4 s/ml). On remarque une augmentation progressive de la mortalité pour le reste des doses (figure 40).

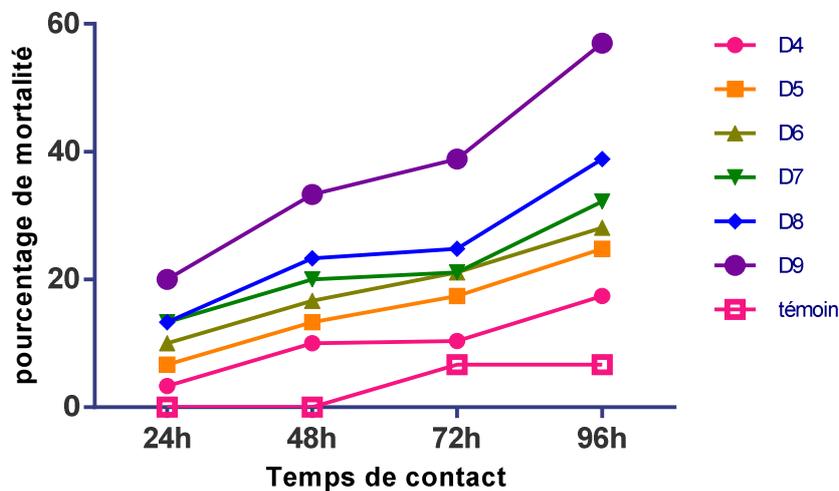


Figure n°40 : Pourcentages de mortalité des larves (L2 et L3) de *Culex pipiens* après 5 jours de traitement par *A.flavus* (test 03).

3.2.2. Variation du taux de mortalité de larves de 3^{ème} et 4^{ème} stade de *Culex pipiens* de 1^{er}, 2^{ème} et 3^{ème} tests .

Les résultats du 1^{er}, 2^{ème} et de 3^{ème} test d'*A.flavus* sur les larves de stades 3 et 4 de *Culex pipiens* qui sont obtenu à partir de tableau 10 (annexe V) sont portés sur les courbes ci-dessous.

Les résultats de test1 d'*A.flavus* sur les larves de stades 3 et 4 montrent que la mortalité chez les témoins est ne dépasse pas 20%. Les pourcentages de mortalité corrigés sont différents des pourcentages de mortalité observés. La mortalité observée après 96h est ne dépasse pas 40% avec toutes les doses.

D'après la figure n°41, on remarque que la mortalité des larves du *Culex pipiens* évolue dans le temps mais varie selon les doses testées. En effet, la plus forte mortalité a été enregistrée à une forte dose $D_6=10^9$ (37.78 %) suivi par les doses moyennes $D_2=10^5$, $D_3=10^6$, $D_4=10^7$, $D_5=10^8$, et finalement une faible mortalité (13.7%) à la dose D_1 (10^4 s/ml).

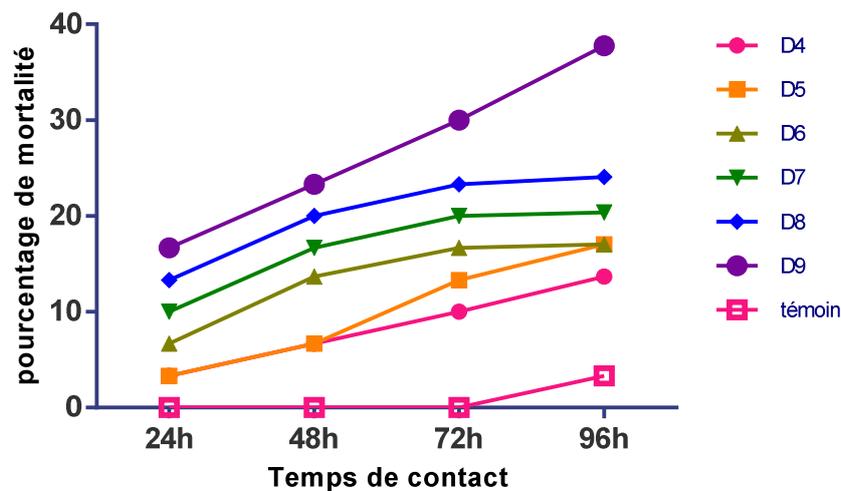


Figure n°41 : Pourcentages de mortalité des larves (L3 et L4) de *Culex pipiens* après 5 jours de traitement par *A.flavus*.(test 01)

D'après la figure 42, les résultats de test 2 d'*A.flavus* sur les larves de stades 3 et 4 montrent que la mortalité chez les témoins commence à apparaître après 72h avec pourcentage de 3.33% de mortalité et les pourcentages de mortalité corrigés sont différents des pourcentages de mortalité observés.

Nous avons aussi remarqué que la plus forte mortalité des larves est à la dose 10^9 avec un pourcentage de 37.78 de mortalité au 96h. Et une faible mortalité de 13.33% à la dose D_1 (10^4 s/ml).

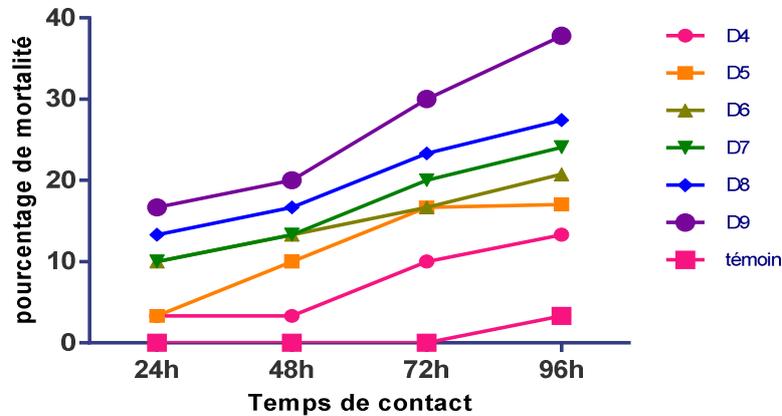


Figure n°42 : Pourcentages de mortalité des larves (L3 et L4) de *Culex pipiens* après 5 jours de traitement par *A.flavus*. (Test 02)

La figure 43, montre que les pourcentages de mortalité corrigés sont égaux aux pourcentages de mortalité observés (le témoin est égale à 3.33% après 96h). Au 96h, nous avons remarqué que la plus forte mortalité des larves est à la dose 10^9 avec un pourcentage de 44.24% de mortalité. Et 6.89% de mortalité à la dose D_1 (10^4 s/ml). Cette dernière étant la dose la plus faible.

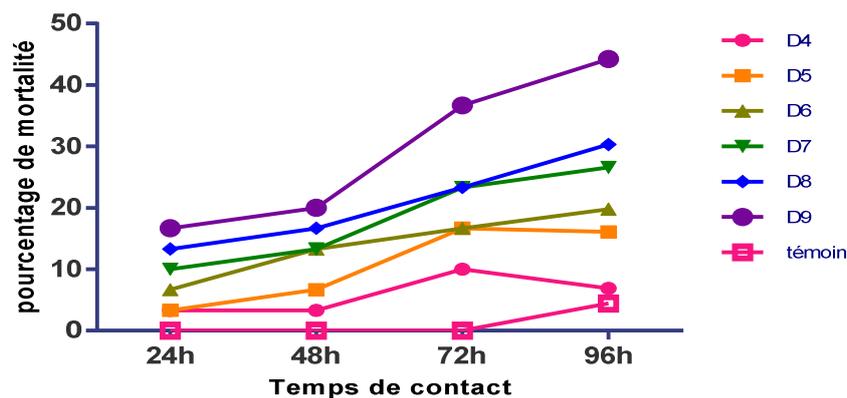


Figure n°43 : Pourcentages de mortalité des larves (L3 et L4) de *Culex pipiens* après 5 jours de traitement par *A.flavus*. (Test 02)

3.2.3. Estimation des DL50%

Les doses létales (DL50%) de la population cible (les larves de *Culex pipiens*) ont été obtenues à partir des droites de régression des logarithmes décimaux des doses en fonction des taux de mortalité corrigé chez les larves de moustiques *Culex p* traités par *Aspergillus flavus*.

Pour les larves L2+L3 de *Culex p* traitées, nous avons déterminé les DL50 à partir des droites de régressions des 3 tests à 24h, 48h, 72h et 96h (tableau 11 Annexe VI).

Les comparaisons des doses létales (DL50) de trois tests sur L2 et L3 de *Culex pipiens* sont représentées sur la figure 44.

Afin d'évaluer la reproductibilité des DL 50 obtenus par les trois tests sur les larves de stades L2 et L3, nous avons analysé les DL50 par une ANOVA à un facteur, une comparaison des tests un à un par le test de Tukey, les résultats ont montre qu'il n'y avait pas de différence significative entre les trois tests avec une valeur de $P_{\text{value}}=0.3982$ ($P < 0.05$).

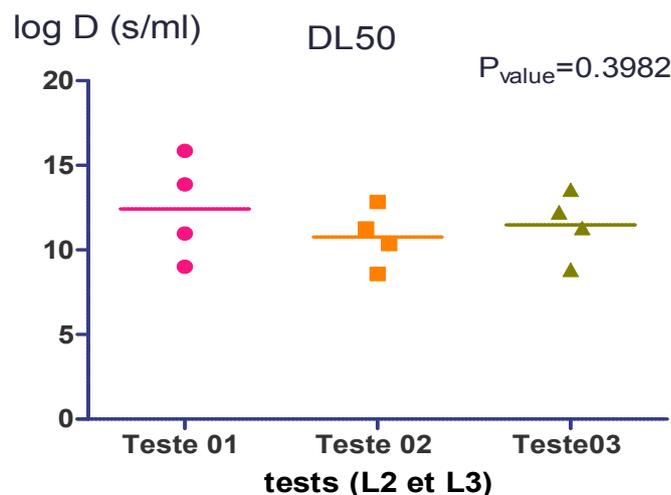


Figure 44: les DL50 de larves L2 et L3 de 1^{er}, 2^{ème} et de 3^{ème} tests.

Nous avons aussi analysé par une ANOVA à un facteur les DL50% du traitement par contact d' *Aspergillus flavus* sur les larves (L3 et L4) du *Culex pipiens* des trios tests à 24h, 48h, 72h et 96h, qui sont obtenu a partir de tableau 12 (annexe VI).

L'analyse statistique par ANOVA à un facteur, et une comparaison des tests un à un par le test de Tukey de ces tests sur les larves L3 et L4 traitées par *Aspergillus flavus*, a révélé d'absence de déférence significatives entres les trois tests avec une valeur $P_{\text{value}} = 0.3190$ ($p > 0.05$) (figure 45),

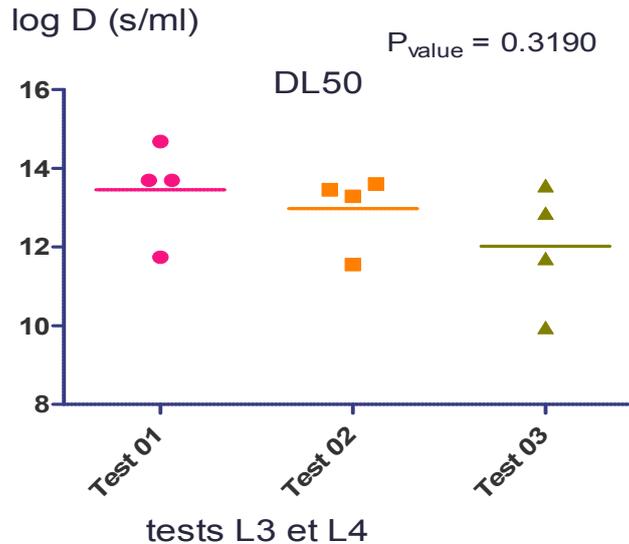


Figure 45 : les DL50 de larves L3 et L4 de 1^{er}, 2^{ème} et de 3^{ème} test.

3.2.4. Estimation des TL50%

Les probits des pourcentages de mortalités cumulées ainsi que le logarithme décimal des temps pour les six doses et les deux stades larvaires (L2, L3) et (L3,L4) pour les trois tests, sont portés sur les tableau 13 et 14 (voir annexe IV et VII). Les temps létaux calculés, varient d'un test à une autre, d'une dose à une autre et d'un stade à un autre pour chaque traitement. Le temps le plus élevé est 23.97J a été obtenu à la dose D3 (10^6 s/ml). Le temps le plus court était égal à 3J à la dose D6 (10^9 s/ml) pour le 2^{ème} test chez les larves de 2^{ème} et 3^{ème} stades ; Le temps le plus élevé 49.61J pour le 1^{er} test a été obtenu à la dose D5 (10^8 s/ml). Le temps le plus court était égal à 5.68jJ à la dose D6 (10^9 s/ml) pour le 3^{ème} test chez les larves de 3^{ème} et 4^{ème} stades . Les valeurs des TL50 relatives à chaque dose, à chaque stade larvaire et à chaque traitement sont tirées à partir des équations de régressions tableau 13 et 14 (voir annexe IV et VII).

Pour pouvoir estimer la reproductibilité des résultats en TL50 entre les trois tests sur les stades L2 et L3 , L3 et L4, nous avons effectué analyse par une ANOVA à un facteur. une comparaison des tests un à un par le test de Tukey. Les résultats de cette analyse n'ont pas de différence significative entre les trois tests avec une valeur de $P_{\text{value}}=0.4303$ ($p<0.05$) (figure 46) pour les 2^{ème} et 3^{ème} stades larvaires (Figure 46) ,et de $P_{\text{value}}<0.09913$ avec ($P<0.05$) pour les 3^{ème} et 4^{ème} stades larvaires (Figure 47) .

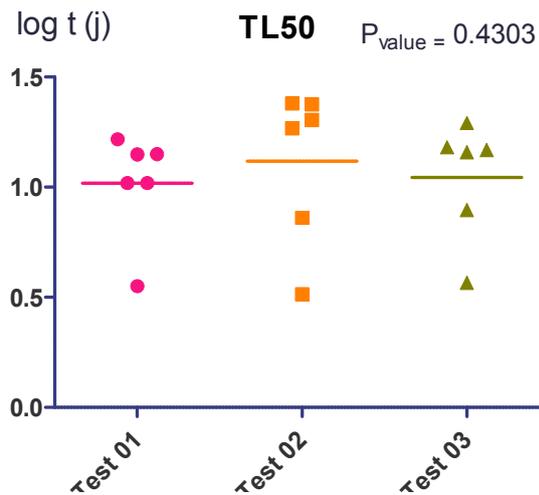


Figure 46: les TL50 de larves L2 et L3 de 1^{er}, 2^{ème} et de 3^{ème} test.

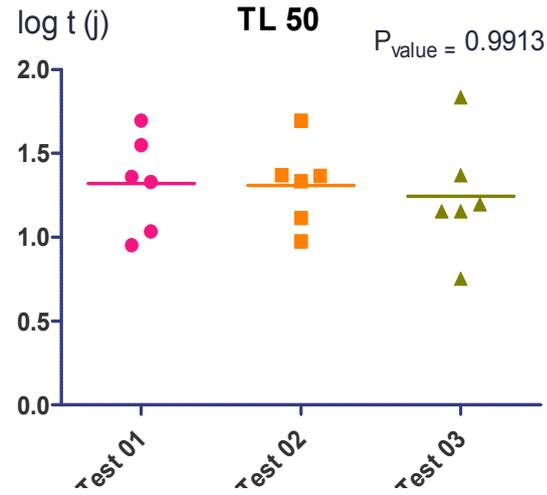


Figure 47: les TL50 de larves L3 et L4 de 1^{er}, 2^{ème} et de 3^{ème} test.

3.2.5/-Analyse des doses en fonction des temps de traitement

L'analyse statistique par ANOVA à un facteur des tests d'*Aspergillus flavus* sur les larves L3 et L4, a révélé de présence de différence significatives entre les trois tests.

Une comparaison des six doses un à un avec le témoin par le test de Dunnett a montré qu'il avait une différence significative entre le témoin et les six doses d'*A.flavus* à partir de 24h (1^{er} j) pour D5 (10^8 s/ml) et D6 (10^9 s/ml) avec une valeur de P_v variée. Les résultats que nous avons obtenus sont représentés sous forme d'histogramme avec les différences significatives entre les témoins et les six doses d'*A.flavus*, à des temps différents pour tous les tests, et à des stades différents (L2, L3) et (L3, L4).

Pour les L2 et L3 : à partir de l'analyse statistique par ANOVA à un facteur des tests, les 2^{ème}, 3^{ème} et 4^{ème} jours dans les trois tests, la valeur de $P_v < 0.0001$, ce qui nous montre que les trois tests dans ces jours de traitement par *A.flavus* sont fortement significatifs.

Pour le 1^{er} jour, les P values étaient de $P_v < 0.0051$, $P_v < 0.0011$, $P_v < 0.001$, respectivement pour les tests 1, 2 et 3. Ces résultats de l'analyse par ANOVA à 1 facteur sur les stades L2 et L3, a montré une variabilité très significative entre le témoin et les six doses de ces trois tests (figure 48, 49, 50).

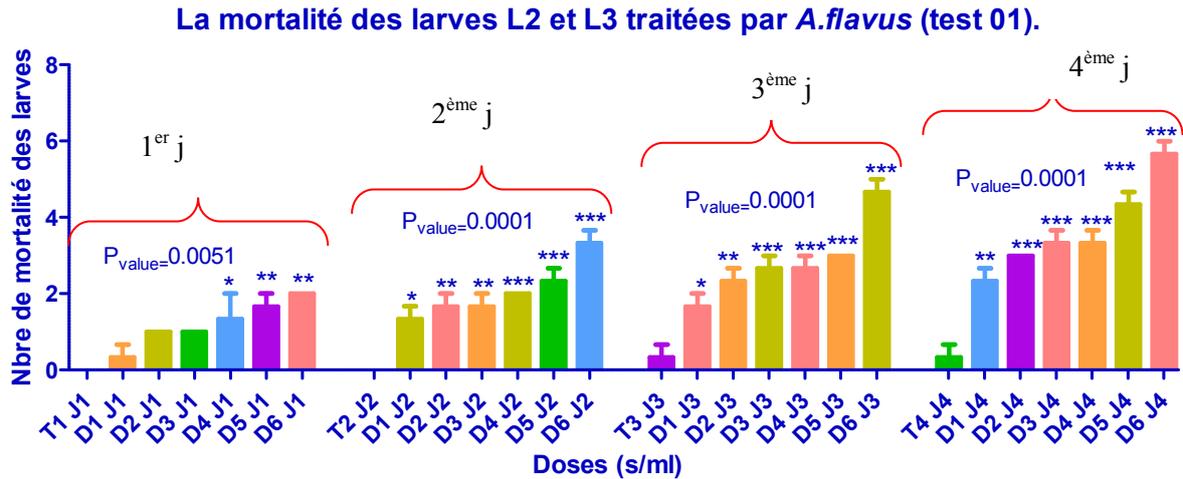
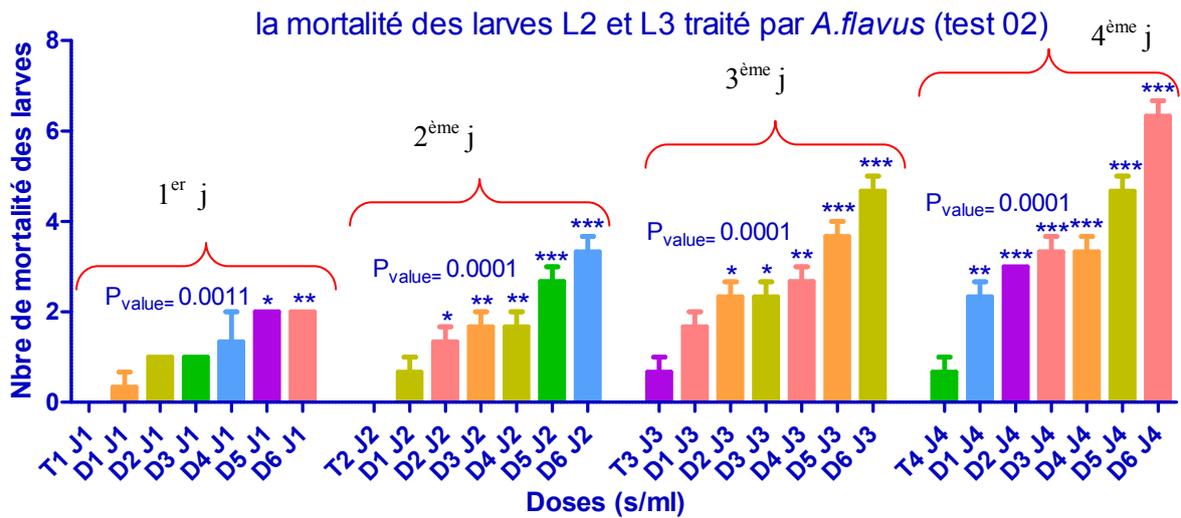


Figure n°48 : la mortalité moyenne des larves (L2 et L3) du *Culex p* traités par *A.flavus* et la significativité entre les doses et le témoin.

*Significative. **très significative. ***fortement significative



*Significative. **très significative. ***fortement significative

Figure n°49 : la mortalité moyenne des larves (L2 et L3) du *Culex p* traités par *A.flavus* et la significativité entre les doses et le témoin.

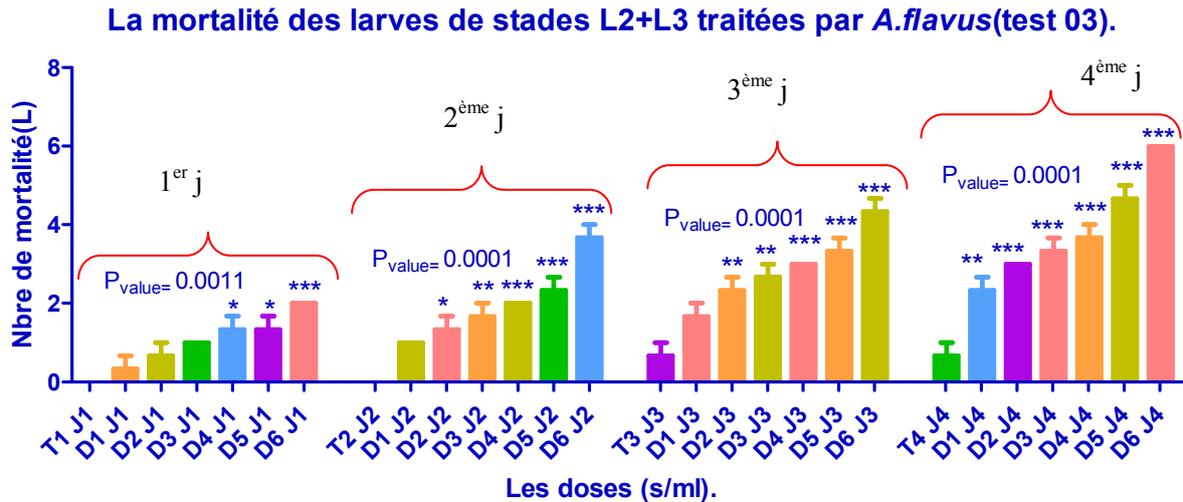


Figure n°50 : la mortalité moyenne des larves (L2 et L3) du *Culex p* traités par *A.flavus* et la significativité entre les doses et le témoin.

*Significative. **très significative. ***fortement significative

Pour les larves de L3 et L4 : Le P_v après 72h et 96h (3^{ème} et 4^{ème} jours) est égal à 0.0001 dans les trois tests, et donc on a eu une variabilité fortement significative entre le témoin et les six doses de traitement par *A.flavus* pour les trois tests.

Nous avons noté pour le 1^{er} test, suite aux comparaisons par le Post test de Dunett, que plus la dose augmente plus la différence est fortement significative. De même pour les temps d'incubations, plus ils augmentent, plus la différence est significative par rapport au témoin négatif. Les valeurs du p value vont de 0.0054 au 1^{er} jour à 0.0001 au 4^{ème} jour (figure 51).

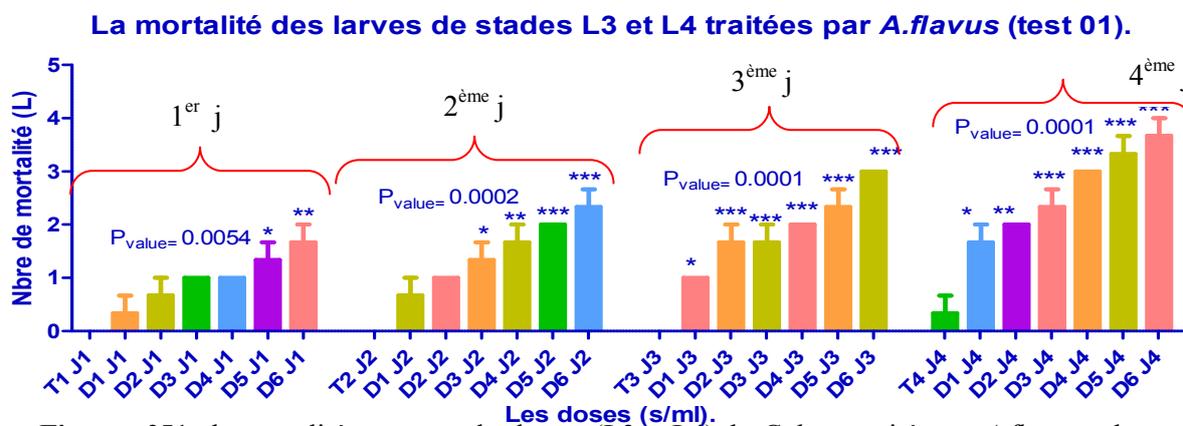


Figure n°51 : la mortalité moyenne des larves (L3 et L4) du *Culex p* traités par *A.flavus* et la significativité entre les doses et le témoin.

*Significative. **très significative. ***fortement significative

Résultats et discussion

Nous avons noté pour le 2^{ème} test, suite aux comparaisons par le Post test de Dunett, que plus la dose augmente plus la différence est fortement significative. De même, pour les temps d'incubations, plus ils augmentent, plus la différence est significative par rapport au témoin négatif. Les valeurs du p value vont de 0.0034 au 1^{er} jour à 0.0001 au 4^{ème} jour (figure 52).

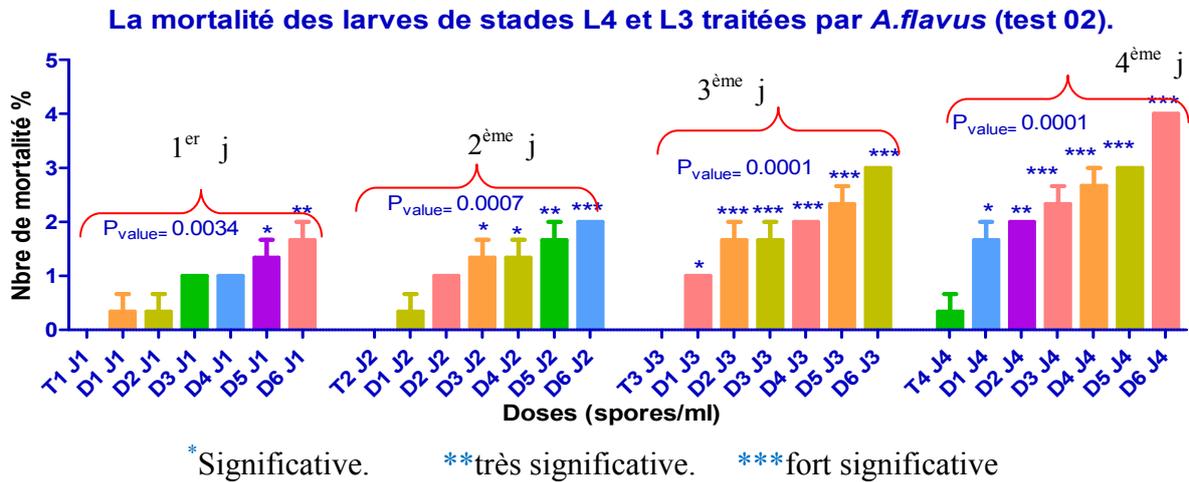


Figure n°52 : la mortalité moyenne des larves (L3 et L4) du *Culex p* traités par *A.flavus* et la significativité entre les doses et le témoin.

Nous avons aussi noté pour le 3^{ème} test, suite aux comparaisons par le Post test de Dunett, que plus la dose augmente plus la différence est fortement significative. De même pour les temps d'incubations, plus ils augmentent, plus la différence est significative par rapport au témoin négatif. Les valeurs du p value vont de 0.0093 au 1^{er} jour à 0.0001 au 4^{ème} jour (figure 53).

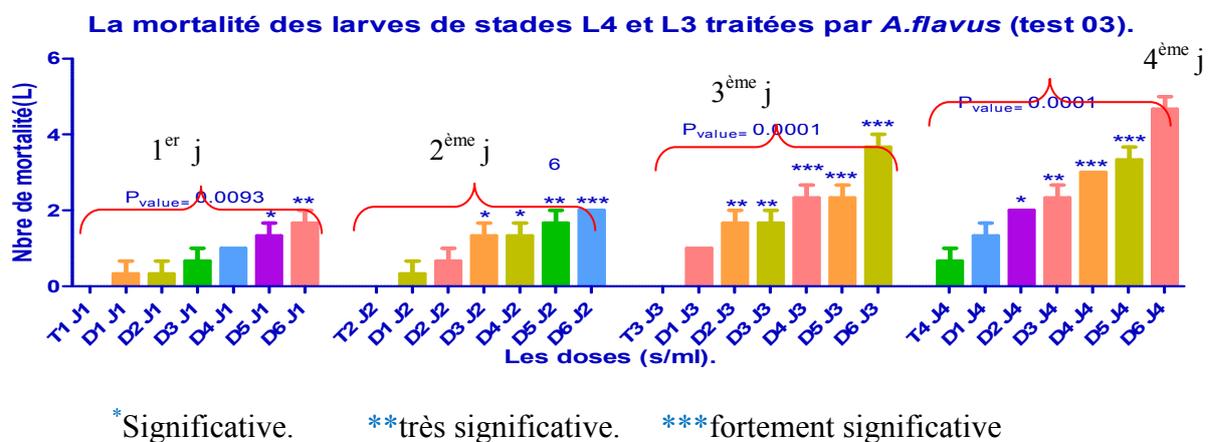


Figure n°53 : la mortalité moyenne des larves (L3 et L4) du *Culex p* traités par *A.flavus* et la significativité entre les doses et le témoin.

Discussion

Dans ce présent travail, qui entre dans l'évaluation de l'activité larvicide des champignons entomopathogènes contre les larves de moustiques, nous nous sommes intéressés aux aspects microbiologiques et larvicides des champignons entomopathogènes *Metarhizium anisopliae* et *Aspergillus flavus*. Plusieurs parties ont été développées.

Les travaux de la première partie ont été orientés vers l'isolement des deux champignons, le *Metarhizium anisopliae* à partir d'un produit à base de champignon appelé Green mascule et l'*Aspergillus flavus* isolé à partir d'un patient. L'isolement a été réalisé par l'utilisation du milieu de culture Sabouraud chloramphenicol. C'est un milieu solide, qui n'est pas riche en nutriments mais il a été démontré qu'il favorise le développement des champignons (MIM., 2002), d'ailleurs, d'après une étude fondée par Bawin et al, Un milieu riche en nutriments ne stimulerait donc pas la sporulation, en plus, leurs étude a révélé qu'un milieu à l'état solide répondaient mieux aux exigences physiologiques des champignons testés, permettant des productivités de spores trois à vingt-quatre fois plus élevées que les milieux semi-solides et sept à cinquante fois plus élevées que les milieux liquides (Bawin et al., 2016).

Dans la Deuxième partie de travail de recherche, notre intérêt est porté sur les bio-tests avec les deux champignons entomopathogènes *Metarhizium anisopliae* et *Aspergillus flavus* sur les différents stades larvaires (L2-L3) et (L3-L4) de *Culex pipiens* élevés en laboratoire d'entomologie.

La reproductibilité d'un test est essentielle pour valider scientifiquement une expérience. En effet pour chaque champignon et chaque stade larvaire, nous avons répétés les bio-tests trois fois afin de confirmer que l'expérience a été faite dans les mêmes conditions et que les démarches de mesures sont strictes.

L'évaluation de la reproductibilité des DL 50 obtenus à partir des trois tests sur les larves de stades L2 et L3, se fait par l'analyse d'ANOVA à un facteur, une comparaison des tests un à un par le test de Tukey sont montrés qu'il n'y avait pas de différence significative entre les trois tests avec une valeur de $P_{\text{value}} = 0.8801$ ($p < 0.05$). Des même résultats a été obtenu avec les larves de 3^{ème} et de 4^{ème} stade larvaire avec $P_{\text{value}} = 0.9506$ ($p < 0.05$).

Pour la comparaison entre les TL50 des trois tests sur les deux stades larvaires (L2 et L3) et (L3, L4) qui sont traitées par *M.anisopliae*, et après l'analyse statistique, les résultats montrent aussi une absence de différence significative entre les trois tests avec une valeur de $P_{\text{value}}=0.429$ ($p<0.05$) pour les 2^{ème} et 3^{ème} stades larvaires et de $P_{\text{value}}=0.0552$ avec ($P<0.05$) pour les 3^{ème} et 4^{ème} stades larvaires.

Les comparaisons des doses létales un à un (DL50) de trois tests sur L2 et L3 de *Culex pipiens* traité par *Aspergillus flavus* par le test Tukey à un facteur montre qu'il n'y avait pas de différence significative entre les trois tests avec une valeur de $P_{\text{value}}=0.3982$ ($P <0.05$).

Pour les larves de 3^{ème} et de 4^{ème} stade larvaire, les résultats statistiques, a révélé l'absence de différence significatives entre les trois tests avec une valeur $P_{\text{value}} = 0.3190$ ($p > 0.05$)

Pour la comparaison entre les TL50 des trois tests sur les deux stades larvaires (L2 et L3) et (L3, L4), et après l'analyse statistique, les résultats montrent une absence de différence significative entre les trois tests avec une valeur de $P_{\text{value}}<0.4303$ avec ($p<0.05$) pour les stades larvaires 2 et 3, et de $P_{\text{value}} <0.9913$ avec ($p<0.05$) pour les stades larvaires 3 et 4. Donc nos tests sont faits dans les meilleurs conditions afin d'obtenir ces résultats.

D'après les travaux de Greenfielda et al, le *Metarhizium anisopliae* s'est avéré être efficace pour réduire la survie de tous les stades larvaires de *Culex* et même des deux autres genres, *Aedes* et *Anopheles*, dans des conditions de laboratoire. Cela a également été observé par d'autres travailleurs utilisant différentes espèces et souches fongique Clark et al., 1968 ; Alves et al., 2002 ; Wright et al., 2005 ; Scholte et al., 2007 ; Kanzok et Lorena, 2006 ; Luz et al., 2007 ; Suman et al., 2008 ; Siva et Kadarkarai., 2011), le *Metarhizium anisopliae* est efficace contre les larves et les adultes de *Culex pipiens* que ce soit au laboratoire ou en milieu naturel.

Nos résultats du traitement justifient l'efficacité de ces champignons sur les larves de moustiques de *culex pipiens* avec une différence remarquable de l'intensité de l'impact entre les deux champignons.

La durée du traitement par *Métarhizium anisopliae* de quatre jours est suffisante pour atteindre la mortalité complète des larves de 2^{ème} et de 3^{ème} stade larvaire, par contre chez les larves traitées par *l'Aspergillus flavus* pendant cette période, nous n'avons pas eu que la moitié de mortalité de même stade (L2 et L3). Nos résultats montrent que le *Métarhizium anisopliae* est

plus efficace que l'*Aspergillus flavus* ces résultats sont identiques a les résultats de Bawin et al., 2016.

Concernant les stades larvaires traités de moustiques *Culex pipiens*, la mortalité qui est enregistrée chez les larves de 2^{ème} et de 3^{ème} stade larvaire est toujours supérieur à la mortalité qui est enregistrée chez les larves de 3^{ème} et de 4^{ème} stade larvaire que se soit les traité par le *Metarhizium anisopliae* ou par l'*Aspergillus flavus*.

Les résultats que nous obtenons montrent que les stades larvaires les plus jeunes (L2 et L3) sont les plus sensibles que les plus âgées ce qui peut être attribué à une résistance acquise au cours de la croissance larvaire. Ces résultats sont similaires aux résultats de Bukhari et al., 2010.

Conclusion

La lutte contre les vecteurs par le seul usage des insecticides chimiques serait tout autant faire preuve d'inconscience. L'utilisation des substances naturelles dans la lutte contre les moustiques semble représenter une solution convenable aux problèmes de pollution, de l'environnement et de résistance aux composés chimiques. Ceci est à l'origine du choix de notre thème qui a consisté à l'étude des effets de la lutte contre les larves de moustiques *Culex pipiens* par deux champignons entomopathogène, *Métarhizium anisopliae* et *Aspergillus flavus*.

Nos résultats ont montré que l'activité larvicide de ces moisissures croît au fur à mesure que leur concentration augmente. Leur activité induit une diminution des mouvements des larves du moustique *Culex pipiens*, puis leurs mortalités après certain temps selon le champignon qui est utilisé et le stade traité. De plus, notre travail a fait ressortir l'efficacité de ces champignons sur les larves de moustiques de *Culex pipiens* avec une différence remarquable d'intensité, et d'impact entre les deux champignons.

Les résultats de notre étude indiquent que le *Métarhizium anisopliae* est plus efficace que l'*Aspergillus flavus* mais ces résultats préliminaires peuvent être complétés par d'autres études plus approfondies pour s'assurer qu'il s'agisse bien d'une réponse liée à l'effet toxique des champignons.

Concernant les stades larvaires traités de moustiques *Culex pipiens*, Les résultats que nous obtenons montrent que les stades larvaires les plus jeunes (L2 et L3) sont les plus sensibles ce qui peut être attribué à une résistance acquise au cours de la croissance larvaire.

Les larves les plus âgées (L3 et L4), sont plus résistants au *Métarhizium anisopliae* et *Aspergillus flavus*. Cette résistance a probablement été acquise, suite à l'effet de ces champignons entomopathogène.

Les résultats de l'utilisation de ces deux champignons, comme agents biologique de lutte contre les larves du *Culex* sont très prometteurs. Nos investigations ont apporté la preuve de la possibilité d'utilisation d'*Aspergillus flavus* contre les larves de *culex pipiens* comme un agent de lutte, de même que pour *Métarhizium anisopliae* mais avec un effet moins. Des études complémentaires sur les substances actives de ces champignons sont nécessaires pour le développement d'insecticides dont les molécules actives seraient d'origine biologique.

Références

Abbott, W.S. (1925). A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol*, 18: 265-267p.

Agence nationale de sécurité sanitaire alimentation, environnement, travail « ANSES ». (2012). *Aspergillus flavus* et autres moisissures productrices d'aflatoxines. Fiche de description de danger biologique transmissible par les aliments :3p.

Al-Dahbi A.M., Maki H. A-A.(2015).Biological and physiological effects of *Metarhizium anisopliae* on *Culex quinquefasciatus*. *IOSR Journal of Agriculture and Veterinary Science*. Vol 8, Issue 9 , 60-63p.

Alves S.B., Alves L.F.A., Lopes RB., Pereira R.M., et Vieira S.A.(2002). Potential of some *Metarhizium anisopliae* isolates for control of *Culex quinquefasciatus* (Dipt. Culicidae). *Journal of Applied Entomology*, 126: 504-509p.

Arkam F., Kara - Toumi F.Z, Tail - Halil G. et Saidi F.(2017).Effets des traitements avec le Green muscle® en milieu naturel (Nord-Ouest de l'Algérie) sur les larves de *Dociostaurus maroccanus* (Thunberg, 1815) et sur l'histologie du tégument. *Algerian Journal of Natural Products*, 5(3) ,530-540p.

Balenghien T., Fouque F., Sabatier P. et Bicout D.J. (2007). Quels sont les vecteurs du virus *west nile* dans le sud de la France. *Environnement, risques & santé* ,Vol. 6, n° 6 : 453-460p.

Baqur M. S., Al-Shuhaib A., Albakri S., Alwan N., Almandil S.A. et Borgio J.F. (2018). Optimal pcr primers for rapid and accurate detection of *Aspergillus flavus* isolates. *Microbial Pathogenesis* :19p.

Bashir E.M. et Shafie H.A.F.(2017).Laboratory evaluation of the effects of neem (*Azadirachta indica*) oil and *Metarhizium anisopliae* against some immature stages of the desert locust *Schistocerca gregaria* (Forsk.) (Orthoptera: Acrididae). *Journal of Agricultural and Veterinary Sciences (SJAVS)* Vol 18 (2) ,116-126p.

Bawin T., Seye F., Boukraa S., Zimmer J-Y., Delvigne F., Francis F. (2016). La lutte contre les moustiques (Diptera : Culicidae) : diversité des approches et application du contrôle biologique. *Entomological Society of Canada* ,Vol 147 (4), 476–500.

Becker N., Petric, D., Zgomba M., Dahl C., Boase, C., Lane, J. et Kaiser, A. (2003). Mosquitoes and their control. *Sprenger science et business madia* ,498p.

Benmalek L., Bendali-Saoudi F. et Soltani N. (2018). Iventory and distribution of mosquitoes (Diptira ; Culcidae) of the Burgas lakes (Northeast Algeria). *journal of entomologie and zoologie studies* ,6(1): 838-843p.

Benserradj O. et Mihoubi I. (2014). Larvicidal activity of entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* against mosquito larvae in Algeria, *Int.J. Curr.Microbiol.App.Sci* ,3(1): 54-62p.

Benzina F., Hamid S., Mohand-kaci H., Bessaad F. et Halouane F. (2018). Histological changes in the larvae of the domestic mosquito *Culex pipiens* treated with the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* , *Scientific Research and Essays: 13(1)*,10p.

Bernigaud C., Monsel G., Delaunay P., Do-Pham G., Foulet F., F.Botterel F. et Chosidow O. (2016). Principales parasitoses cutanées : mise au point Main parasitic skin disorders . *Médecine interne* ,38(1): 17-27p.

Bethany P. J. G., Lord A.M ., Dudley E. et Butt T.M. (2014). Conidia of the insect pathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*, fail to adhere to mosquito larval cuticle. *R. Soc. open sci.* 1,140193,9p.

Bischoff J.F., Rehner S.A. et Humber R.A. (2009). A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage , *mycology* ,101(4),512-530p.

Bissaad F. Z., Youcef M, Bounacerur F.B .et Doumandjimitiche B. (2010). Activité biologique d'un biopesticide le Green muscle sur le tégument du criquet pèlerin *Schistocerca gregaria* (Forskål, 1775) (Orthoptera, Acrididae). *Nature & Technologie* , n° 06, 51-58p.

Botton B., Bretton A., Fever M., Gautier S., Guy Ph., Larpent J.P., Reymond P., Sanglier J.-J., Vayssier Y et Veau P. (1990). *Moisissures utiles et nuisibles, importance industrielle*, (edn) Masson, Paris.

Bouabida H., Djebbar F. et Soltani N. (2012). Etude systématique et écologique des Moustiques (Diptera: Culicidae) dans la région de Tébessa (Algérie). *Faunistic Entomology* ,65 : 99-103p.

Boudih S. (2013). Identification des moisissures et de leurs métabolites secondaires colonisant des supports papiers : évaluation de la toxicité sur des cellules épithéliales respiratoires in vitro , thèse Agriculture , Alimentation , Biologie , Paris-est: 185-186p.

Brhunes J. et al. (1999). Les moustiques de l'Afrique méditerranéenne, logiciel d'identification et d'enseignement [The mosquitoes of *Mediterranean Africa*, software for identification and training]. Montpellier/Tunis, L'Institut de recherche pour le développement/L'Institut Pasteur de Tunis, 2000.

Brugman V.A., Hernández-Triana LM., Medlock J.M., Fooks A.R., Carpenter S. et Johnson., (2018). The Role of *Culex pipiens* L. (Diptera: Culicidae) in Virus Transmission in Europe. *International Journal of Environmental Research and Public Health*,15(2) : 01-30p.

Butt T.M ., Greenfield B.P.J., Greig C., Thierry G. G. Maffei T.G.G., Taylor J.W.D ., Piasecka J., Dudley E., Abdulla A., Dubovskiy I.M., Garrido-Jurado I., Quesada-Moraga E., Penny M.W . et Eastwood D.C.(2013). *Metarhizium anisopliae* Pathogenesis of Mosquito Larvae: A Verdict of Accidental Death. *Fungal Pathogenesis of Mosquito Larvae* Vol 8 ,Issue 12 ,1-11p.

Callot J.(1955). Etude sur les hybrides des biotopes de *Culex pipiens* linné, *Ann. De Parasitologie*, t. XXX, n°4, 363-373p.

Cavalier M. (1976). *Cours de phytopharmacie*. Ed. Institut National Agronomique, T.1, El-Harrach, 514p.

Christophe B., Gérald G. et Gilles B. (2016). Secrets d'insecte 1001 curiosités du peuple à 6 pattes : 238, 126-201p.

Clark T-B., Kellen W-R., Fukuda T-J., et Lindgren E. (1968). Field and laboratory studies of the pathogenicity of the fungus *Beauveria bassiana* to three genera of mosquitoes. *J. Invertebr. Pathol.* 11: 1-7p.

Delaunay P., Fauran P. et Marty P. (2001). Les moustiques d'intérêt médical, Ectoparasite et vecteur d'intérêt médical. *Française des Laboratoires* , N°338 : 27-36p.

Drouet M., Sarre M.E., Bonneau J.C. et Hoppe A.(2016). Moustiques et allergie. *Mosquitoes and allergy. française d'allergologie* :03p.

Duvallet G., Fontenille D. et Robert V.(2017). Entomologie médicale et vétérinaire , Institut de recherche pour le développement , édition Quae .677p.

EFSA Panel on Genetically Modified organisms(GMO). (2013). Guidance on the environmental risk assessment of genetically modified animals. *EFSA Journal*, 11(5) : 3200p.

El-Joubari M., Faraj C., Louah A. et Himmi O. (2015). Sensibilité des moustiques *Anopheles labranchiae*, *Culex pipiens*, *Ochlerotatus detritus* et *Ochlerotatus caspius* de la région de Smir (Nord-Ouest du Maroc) aux organophosphorés utilisés en santé publique, *Environ Risque Sante*, Vol. 14, n° 1, 72-79p.

Faraj C., Elkohli M .et Lyagoubi M.(2006). Cycle gonotrophique de *Culex pipiens* (*Diptera* :*Culicidae*), vecteur potentiel du virus West Nile, au Maroc : estimation de la durée en laboratoire. *Bull Soc Pathol Exot*, 99, 2, 119-121p.

Frédéric S., Laurence F. et André Y. (2004). Progrès en dermato-allergologie Lille: 90-94.

Haas H. et Tran A. (2014). Allergie aux piqûres de moustiques. Mosquito allergy. *Archives de pédiatrie* 21 : 913-917p.

Hamon J. et Mouchet J. (1967). La résistance aux insecticides chez *Culex pipiens fatigans* Wiedemann, *Bull.Org. mond. Sante*, 37 : 277-286 p.

Hati G. (1965). *Aspergillus parasiticus* infection in adult mosquitoes. *Bulletin of the Calcutta School of Tropical Medicine*, 13 : 18-19p.

Helène B. et Thierry D. (2013). Effets des pratiques agricoles sur la contamination des denrées par les mycotoxines issues de *Fusarium* et *Aspergillus spp* : 194-216p.

Hougarrd J.M.(1992).Lutte biologique contre les vecteurs, Entomologie médicale ,ORSTOM OMS/OCP .BP.2279 Bamako,Mali. *Bulletin de la Société Française de Parasitologie 1992, Tome IO, II* , 22363 :1-25p.

ISRA :Institut Sénégalais de Recherches Agricoles.,2013.Techniques de capture et d'identification des moustiques (Diptera : Culicidae) vecteurs de la fièvre de la vallée du Rift

Kanzok SM., et Lorena MJ., (2006). Entomopathogenic fungi as biological insecticides to control malaria. *Trends in Parasitology*, 22: 49–51p.

Kimberly M.S.A.et Seow M.H.(2017). Mode of Infection of *Metarhizium spp.* Fungus and Their Potential as Biological Control Agents. *Journal of Fungi*, 3, 30 : 2-20p.

Krutmuang P.et Mekchay S.(2005). Pathogenicity of Entomopathogenic Fungi *Metarhizium anisopliae* Against Termites, *Conference on International Agricultural Research for Development*.

Lai X., Zhang H., Liu R. et Liu C. (2015). Potential for aflatoxin B₁ and B₂ production by *Aspergillus flavus* strains isolated from rice samples, *saudi journal of biologic sciences* , Vol 22(2): 176-180p.

Lan H., Wu L., Sun R., Yang K., LiuY., Wu J., Geng L., Huang C. et Wang S. (2018). Investigation of *Aspergillus flavus* in animal virulence. *Toxicon* : 26p.

Leggewie M., Badusche M., Rudolf M., Jansen S., Börstler J., Krumkamp R., Huber K, Krüger A., Schmidt-Chanasit J., Tannich E., et Becker S.C. (2016). *Culex pipiens* and *Culex torrentium* populations from Central Europe are susceptible to West Nile virus infection , *One health*,: 88-94p.

Luciano T.M., Goff G., Boyer S. et Fontenille D. (2016). An updated checklist of mosquito species (Diptera: Culicidae) from Madagascar, *Parasite* , 23 : 20p.

Ludwig A., Bicout D., Chalvet-Monfray K. et Sabatier P. (2005). Modélisation de l'agressivité de *culex modestus*, vecteur potentiel de west nile en camargue, en fonction de données météorologiques. *Environnement, risques et santé* , Vol 4, n° 2,: 109-113p.

Luz C., Tai MHH., Santos AH., Rocha LFN., Albernaz DAS., et Silva HHG,(2007). Ovicidal activity of entomopathogenic Hyphomycetes on *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) under laboratory conditions. *Journal of Medical Entomology*, 44: 799–804p.

Maharaj,R.,Mthembu,D.J. et Sharp,B.L. (2005). Impact of DDT re-introduction on malaria transmission in Kwazulu-Natal. *S.Afr.Med.J* ,95(11) :871-874p.

Messai N., Berchi S., Boulknafd F.et Louadi K.(2010). Inventaire systématique et diversité biologique de Culicidae (Diptera: Nematocera) dans la région de Mila (Algérie). *Faunistic Entomology* , **63** (3) : p203-206.

Mitema A., Okoth S. et Rafudeen M.S. (2017). Vegetative compatibility and phenotypic characterization as a means of determining genetic diversity of *Aspergillus flavus* isolates. *Fungal Biology* ,Vol 122 (4) ,203-213p.

Nayara C. S., Rafaela T.R. A., Alexandre A., Carla P., Marília B.G., Thiago F.S.M., Eduardo J.P., Terezinha I.E.S. et Claudio C.O. (2018). Development of an analytical method for identification of *Aspergillus flavus* based on chemical markers using HPLC-MS. *Food chemistry, Vol 241* ,113-121p.

O.M.S. (1963). Méthodes à suivre pour déterminer la sensibilité ou la résistance des larves de moustiques aux insecticides. In Résistance aux insecticides et lutte contre les vecteurs. Treizième rapport du comité OMS d'experts des insecticides, Genève : OMS, *Sér .Rapp.techn.256*, 55-60p.

OMS :Organisation Mondiale de Santé.(1973).Methode à suivre pour déterminer la sensibilitéou la résistance des larves des moustiques .

Organisation Mondial de la Santé OMS., (2003) recherches sur de nouvelles methodes de lutte antivectorielle : 1-27p.

Pascal D., Brigitte L., Nicolas D., Géraldine G. et Pierre M. (2017). Rôle du laboratoire dans le diagnostic étiologique d'une lésion cutanée d'origine infectieuse au retour d'une zone tropicale. *Transmission des maladies culex* : 61-74p.

Pasteur N.,Rioux J.A.,Guilvard E et Pech-perieres J.(1977). Nouvelle mention, pour le « Midi » méditerranéen, de populations naturelles anautogènes et sténogames de *Culex pipiens pipiens* L. *Annales de Parasitologie* (Paris),t. 52, n° 2, 205- 210p.

Qureshi A. (2018). Mosquito-borne diseases, ZIKA virus disease : 27-45p.

Rapport finale d'évaluation préalable pour *Aspergillus oryzae* ATCC 1866. (2018) : 72 :4
Ratault C. et Vey A.,(1977). Production d'estirases et de N-AciTyl-D-Glucosaminidase dans le timent du Coltoptire Oryctes Rhinoceros par le champignon entomopathogine *Metarrhizium anisopliae* : 289-294p.

Regnault R. C. (2005). Enjeux phytosanitaires pour l'agriculture et l'environnement. Tec et Doc – Lavoisier, Paris, France : 1012 p 222.

Ressiguiet P. (2011). Contribution to the study of the blood meal of *Culex pipiens*. Exercise Thesis, National School of Toulouse-ENTV : 01- 80p.

Riba G., Keita A., Soares C.C. et Ferron J .P.(1986). Comparative studies of metarhizium anisopliae and tolypocladium cylindrosporium as pathogens of mosquito larvae ,*Par Hocn Ns or Mosqurro Lenven* ,469-473p.

Rickenbach R.(1949).*Culicidae* 25,569-581p.

Roubaud E. et Mezger J.(1933). La nourriture larvaire n'influe pas sur le développement de l'autoqénèse, chez les races de *culex pipiens* spécifiquement anautogènes. *Annales de Parasitologie, t. XII, n° 5,340-342p.*

Sabatinelli G., Ranieri E., Gianzif P., Papakay M. et Cancrini G. (1994). Rôle de *culex quinquefasciatus* dans la transmission de la filariose de bancroft dans la république fédérale islamique des comores (océan indien),*Parasite* ,1 : 71-76p.

Scholte E.J., Knols B.G.J. et Takken W.(2008). An entomopathogenic fungus (*Metarhizium anisopliae*) for control of the adult African malaria vector *Anopheles gambiae* *Entomologische Berichten*,68 (1): 21-26p.

Scholte E.J.,Knols B.G.J.,Samson R.A. et TakkenW.(2004).Entomopathogenic fungi for mosquito control, *journal of insect science* ,4:19,22p.

Scholte E-J., Takken W., et Knols B-G-J. (2007). Infection of adult *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* mosquitoes with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Acta Tropica*, 102: 151–158p.

Séguy E.(1931) .les moustiques biologiques et nouvelles méthodes de destruction , *la vie et la terre* ,N°7,387-396p.

Seye F.,Ndiaye M.,Faye O. et Afoutou J.M.(2012). Evaluation of Entomopathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae* Formulated with Suneem (Neem Oil) against *Anopheles gambiae* s.l. and *Culex quinquefasciatus* Adults. *Malaria Chemotherapy, Control & Elimination* Vol 1,6p .

Siva K., et Kadarkarai M. (2011). Laboratory and field evaluation of *Metarhizium anisopliae* for the control of Dengue vector, *Aedes aegypti* (Insecta: Diptera: Culicidae). *Toxicological & Environmental Chemistry*, 93(6): 1195-1201p.

Skovmand O. et Sanog E.(2018). Resistance of *Culex quinquefasciatus* to selected chemical and biological pesticides : 01-09p.

Suckling D.M., Stringer, L.D.,stephes,A.E., woods, B., Williams, DaG., Baker, G. et El-Sayed A.M. (2014). From integrated pest management to integrated pest eradication : technologies and future needs-*Manag.Sci*, 70 (2) : 179-189p.

Suman SM., Kamaraju R., Kumar MP., et Aditya PD. (2008). Efficacy of culture filtrates of *Metarhizium anisopliae* against larvae of *Anopheles stephensi* and *Culex quinquefasciatus*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol*, 35: 1199–1202p.

Tariq M. Butt T.M., Greenfield B.P.J., Greig C., Maffei T.G.G., Taylor J.W.D., Piasecka J., Dudley E., Abdulla A Dubovskiy I.M., Garrido-Jurado I., Quesada-Moraga E., Penny M.W., Eastwood D.C. (2013). *Metarhizium anisopliae* Pathogenesis of Mosquito Larvae: A Verdict of Accidental Death. *Fungal Pathogenesis of Mosquito Larvae*. Vol 8 , Issue 12 , 1-11p.

Tran A., Paz S., Semenza J., Sudre B. et Chevalier V., Annelise T., Shlomit P., Jan S., Bertrand S. et Véronique C. (2015). La fièvre de West Nile dans le Bassin Méditerranéen (West Nile fever in the Mediterranean Basin). *Bulletin épidémiologique, santé animale et alimentation* n° 66:66- 68p.

Wagner S., Mathis A., Chonenberger A. C. S., Becker S., Schmid t- Chanasit J., Silaghi C. et Verones E. (2017). Vector competence of field populations of the mosquito species *Aedes japonicus japonicus* and *Culex pipiens* from Switzerland for two West Nile virus strains: 32, 121–124 p.

Woodring J. et Davidson, E.W. (1996). Biological control of mosquitoes. Dans *The biology of disease vectors*. Sous la direction de B.J. Beaty et W.C. Marquardt. University Press of Colorado, Boulder, Colorado, Les États-Unis d'Amérique : 530–548p.

Wright MS., Raina AK., et Lax AR. (2005). A strain of the fungus *Metarhizium anisopliae* for controlling subterranean termites. *Journal of Economic Entomology*, 98: 1451-1458.

Yáñez M. et France A. (2010). Effects of fungicides on the development of the entomopathogenic fungus *metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. *Chilean Journal of Agricultural Research* , 70(3):390-398p.

Zientara S. (2002). Infection à virus "West Nile". Situation épidémiologique. Risques pour l'homme. Épidémiologie en France en 2000-2001, *Bull. Acad. Vét. de France*, 155, 67-72p.

Zimmermann G. (1993). The entomologie fungus *Metarhizium anisopliae* and its potential as abiocontrol agent, *Pesticide Science* ,37 :375-379p.

Sites internet :

www.fao.org/fileadmin/user_upload/remesa/docs/.../support_pedagogiquev2.pdf.

www.onmne.tn/fr/images/Culex%20Bouattour%204%20avril%202013.pdf.

[10.1016@j.bjid.2017.10.005.1970.20:2p](https://doi.org/10.1016@j.bjid.2017.10.005.1970.20:2p)

http://bioweb.uwlax.edu/bio203/s2013/ernst_ale2/classification.htm.

<http://eol.org/pages/1275674/overview>.

<http://www.agriculture-biodiversite-oi.org/Mediatheque/Glossaire/Lutte-chimique>.

https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Culex_mosquito_life_cycle_fr.svg?uselang=fr

<https://dass.gouv.nc/votre-sante-sante-environnement/la-lutte-anti-vectorielle>.

Insecticides recommandés par l’OMS pour les traitements larvicides

<http://www.who.int/entity/whopes>.

<https://books.openedition.org/irdeditions/10374>

Annexes

Matériel de travail

Matériel	Appareils
Bec bunsen , pipette pasteur boit de petri , verre à pied paraphilme , lame et lamelle cellule de Thoma , compteur tube conique , réception petit tamis, gélose sabouraud- chloramphénicol , détergent eau-javel portoir , Anse de platine , flacon en verre , tween 80.	Etuve Loupe binoculaire Microscope photonique Centrifugeur Réfrigérateur Modificateur Agitateur Vortex Micropipette

Préparation le milieu de montage PVA

Alcool polyvinylique12g

Acide formique20g

Hydrate de chloral24g

Phénol24g

- Mélanger à l'air libre les quatre produits à la fois.
- Verser le mélange dans un flacon et placer où bain marie pendant toute la nuit pour obtenir une solution aqueuse.
- Le mélange se fait préférentiellement sous agitation à chaud pendant quelques minutes.

Tableau 3: le pourcentage de mortalité moyenne et l'écartype des larves de L2 et L3 traités avec *M. anisopliae* de 1^{er}, 2^{ème} et 3^{ème} tests .

Les tests	D	T	24H	48H	72H	96H
M±E TEST 1	D1		7.04±6.12	10.37±0.64	20.37±9.45	20.37±9.45
	D2		10±10	17.04±5.13	23.70±10.91	27.04±14.67
	D3		20.37±9.45	23.70±10.91	27.04±14.67	37.41±14.07
	D4		3.33±5.77	10±10	13.70±5.48	20.37±9.45
	D5		20.74±1.28	51.85±3.21	79.26±1.28	86.67±11.55
	D6		96.67±5.77	100±00	100±00	100±00
M±E TEST 2	D1		16.67±11.55	26.67±5.77	30±10	30±10
	D2		16.67±11.55	33.33±15.28	36.67±20.82	40±26.46
	D3		16.67±5.77	40±10	43.33±15.28	46.67±11.55
	D4		33.33±5.77	53.33±5.77	53.33±5.77	60±10
	D5		38±29.87	60±17.32	66.67±15.28	80±20
	D6		46.67±5.1	66.67±5.77	73.33±5.77	93.33±5.77
M±E TEST 3	D1		10±10	20±10	30±10	36.67±5.77

M±E TEST 3	D1	10±10	20±10	30±10	36.67±5.77
	D2	10±0	30±10	33.33±5.77	73.33±5.77
	D3	13.33±15.28	36.67±5.77	40±10	90±10
	D4	20±0	40±17.32	50±10	93.33±11.55
	D5	33.33±5.77	50±10	56.67±15.28	93.33±11.55
	D6	40±10	56.67±5.77	93.33±5.77	100±00

Tableau 4: le pourcentage de mortalité moyenne et l'écartype des larves de L3 et L4 traités avec *M.anisopliae* de 1^{er}, 2^{ème} et 3^{ème} tests .

Les tests	D	T	24H	48H	72H	96H
M±E TEST 1	D1		10.37±0.64	13.33±11.5	16.67±15.28	23.33±11.5
	D2		17.41±6.51	20.74±1.28	24.07±5.25	27.41±4.49
	D3		10.08±10.08	24.07±5.25	34.44±5.09	38.15±7.40
	D4		13.33±11.5	17.04±5.13	20.37±9.45	23.70±14.8
	D5		20.74±1.28	28.15±14.11	65.56±5.09	75.93±5.25
	D6		31.11±1.92	34.81±8.34	89.63±10.02	100±00
M±E TEST 2	D1		3.70±6.42	6.67±11.55	14.07±5.13	17.78±5.88
	D2		6.67±11.55	10.00±17.32	21.11±9.49	32.22±11.28
	D3		7.41±6.42	11.11±11.11	29.26±17.58	39.63±8.34
	D4		6.67±11.55	10.37±10.02	17.78±5.88	28.52±5.70
	D5		10±17.32	35.56±11.76	68.15±8.98	82.59±15.57
	D6		14.07±5.13	53.33±17.78	79.26±20.04	89.26±11.13
M±E TEST 3	D1		13.70±5.48	24.07±5.25	30±00	38.14±7.40
	D2		20.74±20.74	31.11±1.92	34.44±5.09	45.56±18.95
	D3		24.81±22.67	41.48±10.32	48.15±10.50	55.56±13.88
	D4		27.05±14.67	30.74±8.91	37.41±14.07	58.89±8.39
	D5		25.44±19.72	48.52±7.88	61.85±7.40	72.59±10.96
	D6		37.04±22.45	54.81±8.98	72.22±15.75	75.56±12.62

M : moyenne E : Ecart type D1, D2, D3, D4, D5 et D6 : Doses expérimentées

Tableau 5 : Evaluation des droites de régression et valeurs de DL50% chez les larves de L2 et L3 traitées avec *M. anisopliae* de 1^{er}, 2^{ème}, et 3^{ème} tests .

Les tests	Le temps	Equation de régression	R ²	DL50%(s/ml)
1 ^{ER} TEST	24h	Y=0.5149X+0.9468	0.7671	7.44x10 ⁷
	48h	Y=0.6937X+0.3109	0.6999	5.74x10 ⁶
	72h	Y=0.6783X+0.7011	0.6252	2.17x10 ⁶
	96h	Y=0.6917X+0.7755	0.6849	1.28x10 ⁶
2 ^{E^{me}} TEST	24h	Y=0.291X+1.9772	0.8567	1.05X10 ⁹
	48h	Y=0.2209X+3.4728	0.9895	8.194X10 ⁶
	72h	Y=0.2349X+3.4901	0.9828	2.678X10 ⁶
	96h	Y=0.3883X+2.7611	0.9392	5.833X10 ⁵
3 ^{ème} TEST	24h	Y=0.2274X+2.6517	0.9293	2.1219X10 ¹⁰
	48h	Y=0.1926X+3.455	0.978	1.0514X10 ⁸
	72h	Y=0.3431X+2.8412	0.7621	1.959X10 ⁶

	96h	Y=0.6589X+1.8141	0.88	6.84X10⁴
--	------------	-------------------------	-------------	----------------------------

Tableau 6 : Evaluation des droites de régression et valeurs de DL50% chez les larves de L3et L4 traitées avec *M. anisopliae* de 1^{er}, 2^{ème}, et 3^{ème} tests .

Les tests	Le temps	Equation	R ²	DL50%(s/ml)
1^{ER} TEST	24h	Y=0.1143X+3.3438	0.6.96	3.089x10 ¹⁴
	48h	Y=0.1157X+3.4829	0.7042	1.295x10 ¹³
	72h	Y=0.4023X+2.1818	0.7378	1.012x10 ⁷
	96h	Y=0.0.6454X+1.043	0.6486	1.353x10 ⁶
2^Eme TEST	24h	Y=0.1189X+2.7908	0.9275	3.80x10 ¹⁸
	48h	Y=0.3231X+1.9479	0.8378	2.79x10 ⁹
	72h	Y=0.3691X+2.2539	0.7625	2.75x10 ⁷
	96h	Y=0.4314X+2.1757	0.8178	3.522x10 ⁶
3^Eme TEST	24h	Y=0.0734X+3.764	0.6459	6.82x10 ¹⁶
	48h	Y=0.1526X+3.7016	0.797	3.224x10 ⁸
	72h	Y=0.2109X+3.5594	0.8164	6.772x10 ⁶
	96h	Y=0.2089X+3.857	0.9782	2.94x10 ⁵

Tableau 7 : Evaluation des droites de régression et valeurs de TL50% chez les larves de L2 et L3 traitées avec *M. anisopliae* de 1^{er}, 2^{ème}, et 3^{ème} tests .

LES TESTS	LE TEMPS	EQUATION DE RIgression	R ²	TL50% (J)
1^{er} TEST	D1	Y=1.2152x+1.8014	0.9183	17.8
	D2	Y=1.1402x+2.1456	0.9968	13.28
	D3	Y=0.7599x+3.0667	0.8386	14.58
	D4	Y=1.6946x+0.8069	0.989	12.42
	D5	Y=3.3025x-0.4018	0.9932	1.02
	D6	Y=1.7562x+4.8005	0.7768	0.054(1.29h)
2^{ème} TEST	D1	Y=1.641x+1.3868	0.8411	6.63
	D2	Y=2.0852x+0.7731	0.8971	4.43
	D3	Y=2.3084x+0.5181	0.8436	3.64
	D4	Y=1.141x+3.0168	0.9006	2.27
	D5	Y=1.8076x+2.1668	0.9735	1.50
	D6	Y=2.288x+1.6648	0.848	1.19
3^{ème} TEST	D1	Y=1.5536x+1.57	0.9982	6.72
	D2	Y=1.4985x+1.7575	0.8734	6.07
	D3	Y=3.42x-1.0044	0.7866	2.37
	D4	Y=3.3209x-0.631	0.7715	2.06
	D5	Y=2.6894x+0.6582	0.72	1.71
	D6	Y=5.2173x-2.8749	0.8213	1.34

Tableau 8 : Evaluation des droites de régression et valeurs de TL50% chez les larves de L3 et L4 traitées avec *M. anisopliae* de 1^{er}, 2^{ème}, et 3^{ème} tests .

LES TESTS	LE TEMPS	EQUATION DE RIGRESSION	R ²	TL50% (J)
1^{er} TEST	D1	Y=0.859x+2.4932	0.9255	34.5
	D2	Y=0.5896x+3.2205	0.9665	43.44
	D3	Y=0.8664x+2.9445	0.902	9.79
	D4	Y=0.6388x+2.9831	0.9959	3.15
	D5	Y=2.6527x+0.3566	0.8732	2.34
	D6	Y=5.6373x-3.8593	0.7539	1.55
2^{ème} TEST	D1	Y=1.417x+1.2006	0.8602	20
	D2	Y=1.677x+1.0585	0.9419	2.34
	D3	Y=2.0947x+0.5091	0.9071	5.80
	D4	Y=1.4868x+1.3778	0.8952	11.37
	D5	Y=3.7372x-1.5016	0.991	2.28
	D6	Y=3.8767x-1.4272	0.9998	1.89
3^{ème} TEST	D1	Y=1.2496x+2.1894	0.9942	7.395
	D2	Y=1.0822x+2.678	0.9343	5.82
	D3	Y=1.4038x+2.3684	0.9926	3.12
	D4	Y=1.2093x+2.6115	0.7149	3.93
	D5	Y=2.1043x+1.4252	0.9986	2.08
	D6	Y=2.3722x+1.0954	0.9863	1.84

Tableau 9 : le pourcentage de mortalité moyenne et l'Ecar-type des larves de L2 et L3 traités au *A. flavus* pour le 1^{er}, 2^{ème} et 3^{ème} tests.

Tests (L2.L3)	Temps	Moyenne ± Ecart type	D1=10 ⁴	D2=10 ⁵	D3=10 ⁶	D4=10 ⁷	D5=10 ⁸	D6=10 ⁹
T1	24h	M±E	6,67±5,77	10,00±0.00	10,00±0.00	13,33±5,77	16,67±5,77	20,00±0.00
	48h	MC±E	13,33±5,77	16,67±5,77	16,67±5,77	16,67±5,77	23,33±5,77	33,33±5,77
	72h	MC±E	13,70±5,48	20,37±9,45	24,07±5025	23,70±10.91	27,41±4.49	44,44±9.62
	96h	MC±E	22,53±4.38	29,20±1.39	32,53±6.58	32,64±4.58	42,64±6.45	56,09±6.77
T2	24h	M±E	3,33±5,77	10,00±0.00	10,00±0.00	13,33±11,55	20,00±0.00	20,00±0.00
	48h	MC±E	6,67±5,77	13,33±5,77	16,67±5,77	16,67±5,77	26,67±5,77	33,33±5,77
	72h	MC±E	10,37±10,02	17,78±5,88	17,41±10,91	21,11±9,49	31,85±8,98	42,59±8.49
	96h	MC±E	17,78±5.88	24,81±4.49	24,44±14.57	28,52±5.70	42,59±8.49	60,74±5.59
T3	24h	M±E	3,33±5,77	6,67±5,77	10,00±0.00	13,33±5,77	13,33±5,77	20,00±0.00

	48h	MC±E	10,00±0.00	13,33±5.77	16,67±5,77	20,00±0.00	23,33±5,77	33,33±5,77
	72h	MC±E	10,37±10.02	17,41±10.91	21,11±9.49	21,11±9.49	24,81±9.49	38,89±9.62
	96h	MC±E	17,41±10.91	24,81±4.49	28,15±1026	32,22±1.92	38,89±9.62	57,04±2.57

M : moyenne E : Ecart type D1, D2, D3, D4, D5 et D6 : Doses expérimentées.

Tableau 10: le pourcentage de mortalité moyenne et l'écartype des larves de L3 et L4 traités au *A.flavus* pour le 1^{er}, 2^{ème} et 3^{ème} tests .

Tests (L3.L4)	Temps	Moyenne ± Ecart type	D1=10 ⁴	D2=10 ⁵	D3=10 ⁶	D4=10 ⁷	D5=10 ⁸	D6=10 ⁹
T1	24h	M±E	3,33±5,77	3,33±5,77	6,67±5,77	10,00±0.00	13,33±5,77	16,67±5,77
	48h	MC±E	6,67±5,77	6,67±5,77	13,70±5.48	16,67±5,77	20,00±0.00	23,33±5,77
	72h	MC±E	10,00±0.00	13,33±5,77	16,67±5,77	20,00±0.00	23,33±5,77	30,00±0.00
	96h	MC±E	13,70±5.48	17,04±5.13	17,04±5.13	20,37±9.45	24,07±5.25	37,78±3.85
T2	24h	M±E	3,33±5.77	3,33±5.77	10,00±0.00	10,00±0.00	13,33±5.77	16,67±5.77
	48h	MC±E	3,33±5.77	10,00±0.00	13,33±5.77	13,33±5.77	16,67±5.77	20,00±0.00
	72h	MC±E	10,00±0.00	16,67±5.77	16,67±5.77	20,00±0.00	23,33±5.77	30,00±0.00
	96h	MC±E	13,33±11.55	17,04±5.13	20,74±1.28	24,07±5.25	27,41±4.49	37,78±3.85
T3	24h	M±E	3,33±5.77	3,33±5.77	6,67±5.77	10,00±0.00	13,33±5.77	16,67±5.77
	48h	MC±E	3,33±5.77	6,67±5.77	13,33±5.77	13,33±5.77	16,67±5.77	20,00±0.00
	72h	MC±E	10,00±0.00	16,67±5.77	16,67±5.77	23,33±5.77	23,33±5.77	36,67±5.77
	96h	MC±E	8,97±10.16	16,12±4.55	19,82±2.50	26,60±3.98	30,31±2.89	44,24±4.14

M : moyenne E : Ecart type D1, D2, D3, D4, D5 et D6 : Doses expérimentées

Tableau 11 : Evaluation des droites de régression et valeurs de DL50% chez les larves de L2 et L3 traitées avec *A.flavus* de 1^{er}, 2^{ème}, et 3^{ème} tests .

Les tests (L2, L3)	Le temps	Equation de régression	R ²	DL50%(s/ml)
1^{ER} TEST	24h	Y=0.124x+3.034	0.9658	715000x10 ¹⁰
	48h	Y=0.1166x+3.3823	0.8257	7480x10 ¹⁰
	72h	Y=0.1526x+3.325	0.861	9.47x10 ¹⁰
	96h	Y=0.1669x+3.4954	0.9029	0.103x10 ¹⁰
2^{Eme} TEST	24h	Y=0.1906x+2.553	0.8602	68900x10 ¹⁰
	48h	Y=0.1931x+2.8179	0.9295	19x10 ¹⁰
	72h	Y=0.1989x+2.9441	0.9295	2.16x10 ¹⁰
	96h	Y=0.2169x+3.1388	0.8816	0.038x10 ¹⁰
3^{ème} TEST	24h	Y=0.1829x+2.5214	0.9172	3560x10 ¹⁰
	48h	Y=0.1566x+3.0856	0.9738	167x10 ¹⁰
	72h	Y=0.1669x+3.1154	0.9016	19.5x10 ¹⁰
	96h	Y=0.198x+3.2513	0.9263	0.0678x10 ¹⁰

Tableau 12 : Evaluation des droites de régression et valeurs de DL50% chez les larves de L3 et L4 traitées avec *A.flavus* de 1^{er}, 2^{ème}, et 3^{ème} tests .

Les tests (L3, L4)	Le temps	Equation de régression	R ²	DL50%(s/ml)
1^{ER} TEST	24h	Y=0.2029x+2.2481	0.9598	48200x10 ¹⁰
	48h	Y=0.1629x+2.8448	0.9251	5000x10 ¹⁰
	72h	Y=0.145x+3.1466	0.9889	4980x10 ¹⁰
	96h	Y=0.1337x+3.3242	0.839	55.7x10 ¹⁰
2^{Eme} TEST	24h	Y=0.1971x+2.3186	0.8891	4020x10 ¹⁰
	48h	Y=0.1765x+2.6488	0.8161	1950x10 ¹⁰
	72h	Y=0.1269x+3.2921	0.9187	2870x10 ¹⁰
	96h	Y=0.1491x+3.2772	0.9666	35.8x10 ¹⁰
3^{ème} TEST	24h	Y=0.2029x+2.2481	0.9598	3650x10 ¹⁰
	48h	Y=0.194x+2.504	0.8957	734x10 ¹⁰
	72h	Y=0.1597x+3.1302	0.8973	51x10 ¹⁰
	96h	Y=0.216x+2.8493	0.9735	0.905x10 ¹⁰

Tableau 13 : Evaluation des droites de régression et valeurs de TL50% chez les larves de L2 et L3 traitées avec *A.flavus* de 1^{er}, 2^{ème}, et 3^{ème} tests .

LES TESTS (L2, L3)	LE TEMPS	EQUATION DE RIGRESSION	R ²	TL50% (j)
1^{er} TEST	D1	Y=1.0235x+2.1095	0.9415	16.49

	D2	Y=1.0549x+2.2613	0.9447	10.42
	D3	Y=1.2775x+1.9363	0.9906	14.05
	D4	Y=1.0245x+2.4107	0.9422	14.05
	D5	Y=1.0771x+2.5095	0.8623	10.42
	D6	Y=1.5786x+1.952	0.9864	3.55
	2^{ème} TEST	D1	Y=1.5066x+1.011	0.9637
D2		Y=0.9662x+2.3333	0.9057	23.97
D3		Y=0.9266x+2.4467	0.9325	23.73
D4		Y=0.8957x+2.5948	0.9127	20.18
D5		Y=1.0176+2.7196	0.9259	7.25
D6		Y=1.746x+1.6932	0.9409	3.26
3^{ème} TEST	D1	Y=1.4251x+1.1942	0.92.7	19.51
	D2	Y=1.2841x+1.7274	0.9752	15.17
	D3	Y=1.116x+2.1775	0.9811	14.73
	D4	Y=0.9714x+2.5119	0.8807	14.50
	D5	Y=1.279x+2.088	0.9183	7.87
	D6	Y=1.5551x+1.9725	0.9254	3.68

Tableau 14 : Evaluation des droites de régression et valeurs de TL50% chez les larves de L3 et L4 traitées avec *A.flavus* de 1^{er}, 2^{ème}, et 3^{ème} tests.

LES TESTS (L2, L3)	LE TEMPS	EQUATION DE RIGRESSION	R ²	TL50% (j)
1^{er} TEST	D1	Y=1.3069x+1.3156	0.997	27.47
	D2	Y=1.5683x+0.9347	0.9934	35.37
	D3	Y=0.5947x+2.9491	0.8277	49.61
	D4	Y=0.8047x+26419	0.9517	22.98
	D5	Y=0.7423x+2.837	0.9715	21.35
	D6	Y=1.0587x+2.5187	0.8859	8.96
2^{ème} TEST	D1	Y=1.3326x+1.1588	0.7771	31.78
	D2	Y=1.6432x+0.9005	0.9562	13.02
	D3	Y=0.7717x+2.6264	0.9603	49.61
	D4	Y=0.9692x+2.3382	0.9379	23.23
	D5	Y=0.8671x+2.6467	0.973	21.56
	D6	Y=1.0455x+2.5365	0.8813	9.46
3^{ème} TEST	D1	Y=1.0705x+1.5584	0.7166	68.34
	D2	Y=1.6373x+0.8507	0.9364	14.25
	D3	Y=1.072x+2.0509	0.9973	23.48
	D4	Y=1.1601x+2.0589	0.9146	14.28
	D5	Y=0.9794x+2.4755	0.94	15.75

	D6	$Y=1.384x+2.0451$	0.8672	5.68
--	----	-------------------	--------	------