

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

Université Saad Dahleb –Blida1

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie des Populations et des Organismes



Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du Diplôme de Master en Biologie

Option : Entomologie médicale

Thème

**Evaluation de *Metarhizium anisopliae* à titre d'agent de lutte biologique
contre les larves de *Culiseta longirualta en conditions contrôlées***

Présenté par :

Amina TALEB - Lilia SAHRAOUI

soutenu le :

20/septembre/2015

Devant le jury :

<i>M^{me}</i> Makhlouf .C	MAA	USDB	présidente
<i>M^{me}</i> djazouli .F.Z	MCA	USDB	Examinatrice
<i>M^{me}</i> KARA-TOUMI F.Z	MCA	USDB	Promotrice

Année Universitaire 2014/2015

Remerciements

Nous remercions Dieu tout puissant et miséricordieux de nous avoir donné santé, courage, volonté et patience pour avoir réalisé ce travail.

Nous tenons à exprimer notre gratitude à notre promotrice pour avoir accepté de diriger ce travail, son soutien, sa clairvoyance et ses compétences nous ont été d'une aide inestimable.

Nous adressons nos remerciements et nos gratitude a madame Djazouli Professeur à l'université Saad Dahleb Blida qui nous a fait l'honneur d'accepter d'examiner ce travail sans oublier ses encouragements et ses conseils durant tout notre parcours universitaire

Nous remercions également Madame Makhoul de nous avoir honorées en acceptant de présider le jury.

Des remerciements particuliers s'adressent à **Mr : AZZARE** et son équipe de l'Institut Nationale des Protections des Végétaux (**INPV**).

Nos remerciements s'adressent également à toute l'équipe de l'INSP pour leurs Disponibilités, leurs qualités humaines nous ont profondément touchées.

Dédicace

Je dédie ce mémoire.....

A mes très chers parents Djamila et Lakhdar Taleb. Merci papa et maman pour votre amour infini.

A mes deux frères, mes bijoux, Mohamed Ali et Younes.

Au Docteur Belkasemi , Merci Docteur pour votre soutien et votre aide tout le long de l'année, je n'aurais pu achever ce travail sans votre aide et votre générosité.

A mes chères collègues de travail, Kheira ,Ghania, Sarah , Yasmine et Amel . Merci pour votre amitié et votre soutien.

A mon binôme Lilia Sahraoui , Merci Lilia.

Enfin, à ma seule et très chère Kikote , mon amie Bouzenboua Nesrine . Merci pour ton amitié sincère.

Amina

Je dédie ce mémoire à :

Mon très cher Mari :

Mr Yassine BOUZIDI, reçois à travers ce travail mon amour, mon respect, ma gratitude et ma profonde reconnaissance. Merci pour ton soutien.

Mes parents :

Ma mère, qui a œuvrée pour ma réussite, par son amour, son soutien, tous les sacrifices consentis et ses précieux conseils, pour toute son assistance et sa présence dans ma vie, reçois à travers ce travail aussi modeste soit-il, l'expression de mes sentiments et de mon éternelle gratitude.

Mon père, qui peut être fière et trouver ici le résultat de longues années de sacrifices pour m'aider à avancer dans la vie. Puisse Dieu faire en sorte que ce travail porte son fruit ; Merci pour les valeurs nobles, l'éducation et le soutien permanent venu de toi.

Younes et Rayene, Ce modeste travail doit vous servir d'exemple pour réussir et faire mieux que votre sœur ; Je vous aime.

Mes beaux-parents que j'aime ; Que dieu leur procure bonne santé et longue vie.

Mes belles-sœurs Amina et Wissam ; merci pour votre tendresse et amour, je vous aime.

Mon binôme Amina TALEBE ; qui a toujours était à mes cotés.

Sarah et son fils petit Mohamed, Mouna, Maria, Amel, Soussou, Dina, Hadjer, Khadija, Bouchera, jojo et Nabila, un grand merci a vous.

Mes grands parents : Yahia et Malika SAHRAOUI, SACI (que dieu lui accorde sa miséricorde) et Yamina BERRAHAL et Abdellah et Ardjouna BOUZIDI.

Je dédie ce mémoire de fin d'étude à deux personnes qui me son très cher à mon cœur Mohamed et Lynda BOUZIDI, merci pour tous je vous aime.

Et à tous ceux qui ont contribués de près ou de loin pour que ce projet puisse voir le jour, je vous dis merci.

Lilia

Résumé

Dans la recherche de méthode alternative à la lutte chimique, l'utilisation des biopesticides est de plus en plus développée contre les moustiques vecteurs de maladies. Pour apporter notre contribution, nous nous sommes intéressés à la réalisation des biotests microbiologiques et en comparant deux sorte de traitement préparer avec une souche fongiques entomopathogènes de *Metarhizium anisopliae* mise en culture (SMAC) et la poudre sporale du bio pesticide Green Muscle (SGM) contre les larves du 4ème stade de *Culiseta longirualta* une espèce qui appartient a la famille des *culicinae* et au genre des *culiseta* avec différentes concentrations. 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , et 10^9 spores/ml

Sur une durée de trois de mois de mai allant au mois de juillet des larves de on été collectés aux niveaux des différentes gites : G1, G2 pour la région de Blida et G1, G2, G3, G4 pour la région de El bordj puis transportés au laboratoire d'entomologie à l'institut national de santé publique (INSP) pour l'identification des espèces

Pendant 10 jours de traitement avec la solution entomopathogene a base de spores du Green Muscle(SGM) et 7 jours de traitement avec la solution entomopathogene du *Metarhizium anisopliae* en culture(SMAC), nous avons noté quotidiennement le nombre de larves mortes ,le pourcentages respectifs obtenus à partir du 1ier jour sont de 20%, pour les larves traitées par (SGM) et 96% pour les larves traitées par (SMAC), elle atteint 100% le 6ème jour après traitement avec (SGM) et 100% des le 2ème jour de traitement avec (SMAC) .

Nos résultats ont abouti à une DL50= $8,9.10^3$ spores/ml après 24h pour la souche en culture, une DL50 = $2,4.10^8$ spores/ml après le 3ème jour pour le Green Muscle, les résultats de la TL50 des larves traitées avec les deux solutions entomopathogene montrent que la sensibilité des larves est en fonction de la concentration de l'inoculum.

Nous pouvant certifier que le *metarhizium anisopliae* est un des agents de la lutte biologique les plus prometteur qui c'est imposé par son haut effet larvicides contre l'espèce de *culiseta longirualata*.

Mots clés : Chréa, Bourdj Bourredj, Inventaire, *Culiseta longirualta*, *Metarhizium anisopliae*, Green Muscle, Activité larvicide,

Abstract

In the research of alternatives to chemical treatments, biopesticides are being increasingly used against mosquitoes that are vectors for several diseases. For our contribution, we made bioassays in which we compared the effects of two treatment types based on entomopathogenic fungal strains of cultured *Metarhizium anisopliae* (SMAC) and a spore powder of the biopesticide “Green Muscle” (SGM) at different concentrations on larvae of *Culiseta longirualta*.

Over a period of three months from May up to July larvae have been collected at the levels of the different cottages: G1, G2 for the region of Blida and G1, G2, G3, G4 for El Bordj region and then transported in entomology laboratory in public health from the National Institute (INSP) for species identification

During ten treatment days with the entomopathogenic solution containing spores of Green Muscle, and seven treatment days with the entomopathogenic solution containing a culture of *Metarhizium anisopliae* we counted the number of dead larvae daily. The percentages of dead larvae were 20% on the first day for SGM and 96% for SMAC. They reach 100% on the sixth day for SGM and on the second day for SMAC.

Our results show that the $LD_{50} = 8.9 \cdot 10^3$ spores/ml after 24 hours for SMAC and $2.4 \cdot 10^8$ spores/ml for SGM after three days. The results of the LT_{50} for the larvae treated with the two entomopathogenic solutions show that the sensitivity of the larvae depends on the concentration of the inoculum.

Keywords: Blida, Bourd Bourredj, Inventory, *Culiseta longirualta*, *Metarhizium anisopliae*, Larvicidal activity

ملخص

في البحث عن طريقة بديلة للمكافحة الكيميائية، واستخدام المبيدات الحيوية تم تطوير بشكل متزايد ضد البعوض الحامل للمرض. للقيام بدورنا، ونحن مهتمون في تحقيق اختبارات بيولوجية الميكروبيولوجية والمقارنة بين اثنين النوع من العلاج أعدت مع الفطر ضد البعوضة (SGM) ومسحوق بوغ المبيدات الحيوية العضلة الخضراء (SMAC) حشرات سلالة متار هيزيوم أنيسوبلييه متقف مع تركيزات مختلفة. 105، 106، 107، 108، و 9 10 جرثيم / مل longirualta من المرحلة اليرقات 4

و 7 أيام في المعاملة مع الحل (SGM) خلال 10 يوما من العلاج مع الحل حشري النمو على جرثيم الأساسية لجنرال موتورز ، لاحظنا اليومي لعدد اليرقات الميتة، ونسب كل منها تم الحصول عليها (SMAC) حشري النمو متار هيزيوم أنيسوبلييه في الثقافة ، وصلت إلى 100٪ في يوم 6 بعد العلاج (SMAC) و 96٪ ليرقات المعالجة (SGM) يوم هي 20٪ ليرقات المعالجة st من 1 (SMAC) ، و 100٪ من 2 العلاج اليوم مع (SGM)

LD50 = 2،4.108 جرثيم / مل بعد 24 ساعة للسلالة في الثقافة، LD50 = 8،9.103 وقد أسفرت النتائج التي توصلنا إليها في اليرقات تعامل مع تظهر حشري النمو الحلين أن حساسية يرقات TL50 لالعضلة الخضراء، نتائج rd جرثيم / مل بعد اليوم 3 تقوم على تركيز قبيحة

والنشاط أنيسوبلييه، البحث البحث كلمات متار هيزيوم ، longirualta البعوضة الجرد، بوعريريج، برج البلدية، :البحث كلمات لليرقات

كلمات البحث : البلدية ، بوعريريج برج الجرد ، البعوضة ، متار هيزيوم

النشاط

GLOSSAIRE

Biopesticide : être vivant produisant des toxines capables de détruire certains insectes sans risque pour l'environnement

Entomopathogène : cause des maladies aux insectes

Gîte : Lieu où l'on trouve à se loger, où l'on couche habituellement ou temporairement

Hétérogène : qui est composé d'éléments de nature différente

Holométaboles : insectes qui ont des métamorphoses complètes et dont la forme adulte est toujours précédée par un stade nymphal immobile.

Hôte : Être vivant qui héberge un parasite

Inoculum : Quantité de germes ou de substance inoculée ou à inoculer lors d'un traitement

Spécimens : Echantillon contient plusieurs espèces

Liste des Abréviations

DDT : Dichloro-diphényl-trichloroéthane

DL50 : Dose létale suffisante pour tuer 50% des individus

O.M.S : Organisation Mondiale de la Santé

SGM : Solution de Green Muscle

SMAC : Solution de *Metarhizium Anisopliae* en culture

TL50 : Temps létal suffisant pour tuer 50% des individus

Liste des Figures

Figure 01 : Situation géographique de la région de Blida.....	01
Figure 02 : Présentation de la zone d'étude.....	04
Figure 03 : Carte schématique de la zone d'étude (original).....	04
Figure 04 : Oued Beni Aza (original).....	04
Figure 05 : carte de la région de Bordj Bou Arreridj	05
Figure 06 : Classification des <i>Culicidae</i> ou moustiques	08
Figure 07 : Cycle biologique des moustiques	09
Figure08 : (A) Observation en microscope électronique des conidiophores et des hyphes de <i>Metarhizium anisopliae</i> (B) Culture de <i>M. anisopliae</i> sur Sauboraud dextrose agar (SDA) à 25 °C , (C) Aspect microscopique des Conidies de <i>M. flavoviride</i> (X100), (D) Culture de <i>M. flavoviride</i> sur Sauboraud dextrose agar (SDA) à 25°C.....	14
Figure 09 : Aspect morphologique de <i>Metarhizium anisopliae</i>	15
Figure 10 : Aspect microscopique de <i>Metarhizium anisopliae</i> , a. x1600; b. x2800; c. x7000.....	15
Figure 11 : (A) Conidies de <i>Metarhizium anisopliae var anisopliae</i> , (B) Conidies de <i>Metarhizium anisopliae var majus</i>	16
Figure 12 . Schéma du cycle biologique des champignons entomopathogènes.....	17
Figure 13 : Mode de pénétration des champignons entomopathogènes dans la cuticule des insectes.....	19

Figure 14 : Insectes infectés par <i>Metarhizium anisopliae</i> (Muscardine verte).....	21
Figure 15: carte schématique des deux stations du site d'étude.....	28
Figure 16 : Gites larvaires Blida (photos original).....	29
Figure 17 : Gites larvaires de Bordj Bou Arreridj (photos original).....	30
Figure 18 : Matériel biochimique et les etapes de l'eclairssisement	31
Figure19 : Montage des spécimens sur lame lamelle.....	31
Figure 20 (a et b) : Structure de la suture maxillaire et longueur de l'antenne dans d'identification du genre Culex	32
Figure 21(a et b) : critère d'identification du genre Culex (position de l'orifice respiratoire et ornementation du siphon)	33
Figure 22 : Culiseta la tête Ornementation du tégument de l'antenne.....	33
Figure 23: <i>culiseta longiareolata</i> caractères du siphon les clés d'identification des larves proposées par (Rioux, 1958).....	34
Figure 24 : milieu PDA metarhizium anisopliae.....	35
Fig 25 : schéma illustrant les étapes de la préparation des deux traitements	37
Figure 26: Protocole expérimental mettant en évidence de l'effet de <i>Metarhizium anisopliae</i> Sur lamortalité des larves L4	38
Figure 27 : Principales espèces de culicidaea rencontrées dans les différents Gites.....	39
Figure 28 : Densité larvaire de chaque région	40
Figure 29 : Pourcentages de mortalité des larves de <i>Culiseta longiareolata</i> après 10jour de traitement par (SGM).....	43
Figure 30: Efficacité de <i>Metarhizium anisopliae</i> (SGM) vis-à-vis des larves de <i>Culiseta longiareolata</i>	44

Figure 31: Efficacité de *Metarhizium anisopliae* (SGM) dans le temps vis-à-vis des larves de *Culiseta longiareolatas* traitées par les différentes doses (D1, D2, D3, D4 et D5).....45

Figure 32: Pourcentage de mortalité des larves de *Culiseta longiareolata* après 7 jours de traitement par *Metarhizium anisopliae* (SMAC).....47

Figure 33 : Efficacité de *Metarhizium anisopliae* (SMAC) vis-à-vis des larves de *Culiseta longiareolata*.....48

Figure 34 : Efficacité de *Metarhizium anisopliae* (SMAC) dans le temps vis-à-vis des larves de *Culiseta longiareolata* traitées par les différentes doses (D1, D2, D3, D4 et D5).....49

Figure 35 : comparaison de l'efficacité des deux traitements (SGM) et (SMAC).....50

Liste des Tableaux

Tableau01 : Température maximal et minimale moyenne annuelle2013 /2014 (Blida).....	02
Tableau 02 : Les précipitations moyennes annuelles année 2013/2014 (Blida).....	02
Tableau 03 :lestempératures moyennes annuelles2013/2014(Bordj Bou Arreridj).....	05
Tableau04 : Les précipitations moyennes annuelles année 2013/2014(Bordj Bou Arreridj).....	06
Tableau 05 : Position systématique du moustique	07
Tableau 06 : résultats d'identification des espèces collectés dans les Gites de chaque région.....	39
Tableau 07 : Estimation de la densité larvaire dans les différents Gite de chaque région.....	40
Tableau 08 : position systématique de <i>culiseta longiareolata</i>	41
Tableau 09 : Pourcentage moyen de mortalité des larves de <i>Culiseta longiareolata</i> traitées par <i>Metarhizium anisopliae</i> (SGM).....	44
Tableau 10 : Logarithmes décimaux des doses et Probits des taux de mortalités au 3 ^{ème} jour.....	45
Tableau 11 : Equations des droites de régressions et valeurs des TL50 pour chaque dose de traitement utilisée.....	46
Tableau 12 : Pourcentage moyen de mortalité des larves de <i>Culiseta longiareolata</i> traitées par (SMAC).....	48
Tableau 13 : Logarithmes décimaux des doses et Probits des taux de mortalité au 1ier jour.....	49
Tableau 14 : Equations des droites de régressions et valeurs des TL50 pour chaque dose de traitement utilisée.....	50
Tableau 15 : moyennes des taux de mortalités des culisetas traités par le Green Muscle et le <i>Metarhizium anisopliae</i> en culture.	51

Introduction

Synthèse bibliographique

Chapitre I : présentation des zones d'études

I. Présentation de La région de Blida.....	01
I.1. Situation géographique.....	01
I.2. Caractéristiques climatique de la région d'étude.....	01
I.2.1. Température.....	01
I.2.2. Pluviométrie.....	02
I.2.3. Hygrométrie de l'aire.....	02
I.2.4. Sols.....	03
I.2.5. réseau hydrographique.....	03
II. Présentation de La région de Bordj Bou Arreridj.....	05
II.1. Situation géographique.....	05
II.2. Caractérisation du climat la de la région d'étude.....	05
II.2.1. Températures.....	05
II.2.2. précipitations.....	06
II.2.3. Hydrographie.....	06
II.2.4. Faune et flore.....	06

Chapitre II : les moustiques

I. Généralités sur les moustiques.....	07
I.1. Position systématique.....	07
I.2. Cycle de vie.....	0
I.3. Comportement trophique.....	09
I.4. Interets dans l'écosystème.....	10
I.5. Nuisance et intérêt médical.....	10

Chapitre III : Le champignon entomopathogène *Metarhizium anisopliae*

I. Les champignons entomopathogènes.....	12
--	----

II. <i>Metarhizium anisopliae</i>	12
II.1. Taxonomie et Classification.....	12
II.2. Morphologie.....	14
II.3. Mode d'infection.....	16
II.4. Production des toxines.....	20
III. Réponse immunitaire à l'infection microbienne chez l'insecte.....	21
IV. Facteurs affectant l'efficacité des champignons entomopathogènes.....	22
IV.1 Facteurs liés aux pathogènes.....	22
IV.2 Facteurs dépendant de l'hôte.....	22
IV.3 Facteurs de l'environnement.....	22
IV.3.1. Rayonnement solaire.....	22
IV.3.2. Température.....	23
IV.3.3. Humidité.....	23
IV.4 Effet du sol.....	24
V. Avantages de l'utilisation de <i>Metarhizium anisopliae</i>	25
VI. Production de <i>Metarhizium anisopliae</i>	26
VII. Formulation à base de champignons entomopathogènes.....	27
VIII. Les essais biologiques et l'évaluation de l'infection.....	27

Synthèse expérimentale

Matériel et méthodes

I. Présentations des stations d'études dans la région de Blida.....	28
II. Présentation des stations d'étude de la région de Bordj Bou Arreridj.....	28
III. Matériel de récolte des espèces de culicidés.....	28
IV. Collecte des larves.....	29
V. Montage et détermination des espèces.....	31

Etude de l'effet du *Metarhizium anisopliae* sur les larves *Culiseta longiareolata*

I. Isolement et identification du champignon entomopathogène <i>Metarhizium anisopliae</i>	33
I.1. La souche fongique.....	33
I.2. Milieux de culture.....	33

I.3. Méthode de préparation de la solution entomopathogène.....	34
I.3.1. Détermination de la concentration.....	35
I.3.2. Préparation des Doses.....	36
II. Réalisation des biotests.....	36
II.1. Protocole expérimental.....	36
II.2. L'analyse Probit.....	38

Résultats et discussion

I.RESULTATS

I.I. Inventaire et identifications des différentes espèces de moustique récoltées.....	39
I.I.1. Estimation de la densité larvaire.....	39
I.II. Position systématique de l'espèce identifiée.....	41
I.II.1. Identification des larves de <i>Culiseta longiareolata</i>	41
I.II .1.1. Identification du genre.....	41
I.II.1 .2. Identification de l'espèce	43
I.III. Evaluation de l'effet larvicide du Green Muscle et <i>Metarhizium anisopliae</i> en culture sur les larves <i>Culiseta longiareolata</i>	44
I.III.1. Estimation du taux de la mortalité corrigé (MC) des larves traitées par la solution entomopathogène a base de Green muscle (SGM).....	44
I.III.1.1. Calcul de la DL50.....	45
I.III.1.2. Calcul des TL50.....	46
I.III.2. Estimation du taux de la mortalité corrigé (MC) des larves traitées par la solution entomopathogène a base de <i>Metarhizium anisopliae</i> en culture.....	47
I.III.2.1. Calcul de la DL50.....	49
I.III.2. 2. Calcul des TL50.....	50
I.IV. comparaison de l'effet larvicide des deux traitements (SGM) et (SMAC).....	50
II. Discussion.....	52
Conclusion	57

Références bibliographiques

Annexes

introduction

Introduction

En Algérie, comme partout dans le monde les moustiques ont toujours été considérés comme source de nuisance pour l'homme, principalement en raison du fait qu'ils peuvent être des vecteurs de maladies tel que le paludisme ,dengue, fièvre jaune et la filariose .

Les femelles en période de reproduction ont besoin de sang pour le développement des œufs, Le repas sanguin nécessaire à la maturation des œufs peut occasionner chez l'hôte une vive irritation cutanée, pouvant même aller jusqu'à de graves réactions allergiques chez certaines personnes . Ce mode d'alimentation peut également être responsable de la transmission d'agents pathogènes qui peuvent provoquer des maladies chez l'homme et chez les animaux (Maire et Aubin, 1980; Belloncik *et al.*, 1982; Belloncik *et al.*,1983; Wood, 1985). Parmi les espèces connues dans la transmission des maladies à l'homme,nous citons Celles appartenant aux genres *Culex*, *Aedes* et *Anopheles* (Chauvet, 1978).

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. Cependant, les premières difficultés n'allaient pas tarder à être rencontrées :

l'apparition de gènes de résistance aux différents groupes chimiques insecticides, notamment, dans de nombreuses populations Culicidiennes vectrices du paludisme, de la filariose de Bancroft et de certaines arboviroses (Chauvet, 1978).

Selon le comité d'experts des insecticides (OMS 1970), chez les *Culicidae* : 19 espèces sont devenues résistantes dont 16 au DDT, 12 à la dièldrine et 9 aux composés organophosphorés (y compris *Culex pipiens* et *Aedes aegypti*).

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. Depuis, il est devenu de plus en plus nécessaire d'accorder une priorité aux insecticides biologiques comme moyen de lutte contre les insectes nuisibles.

Parmi ces organismes, les champignons entomopathogènes 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). L'un des plus intéressants appartient à la classe des *Ascomycètes* : il s'agit de *Metarhizium anisopliae* connu comme agent pathogène sur plus de 8 ordres d'insectes (Veen, 1968; Samuels *et al.*, 1989).

La pathogénicité de *Metarhizium anisopliae* sur les larves de moustiques à été mise en évidence par plusieurs auteurs dans le monde (Ramoska, 1981 ; Daoust et Roberts, 1982 ; Scholte *et al.*, 2004 ; Seye *et al.*, 2012)

En Algérie, de nombreux travaux ont eu pour objectif l'étude des différents moyens de lutte, biologique ou conventionnelle, utilisés contre les moustiques. Parmi ces travaux, citons ceux entrepris par Soltani *et al.*,(1999) concernant l'utilisation de deux insecticides chimiques, à savoir l'Alsyline et le Triflumuron. Quant aux études visant l'activité larvicide des microorganismes, rappelons celle de Mansouri *et al.*,(2013) consacrée à l'utilisation de *acillus thuringiensis* sur les larves de *Culex pipiens*. Cependant, à notre connaissance aucun travail en Algérie concernant l'évaluation de l'activité larvicide du champignon entomopathogène *Metarhizium anisopliae* sur les larves de moustique n'a été publié à ce jour.

Dans ce contexte, notre contribution par cette étude est orientée vers un objectif visant à évaluer l'effet entomopathogène de ce champignon sur les larves de l'espèce *Culiseta longerauat*.

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, une espèce indicatrice de pollution .

La première partie de notre travail est consacrée à la description de données bibliographiques relatives à l'entomopathogène *Metarhizium anisopliae*, aux moustiques d'une manière générale .

La seconde partie est consacrée au travail expérimental et est structurée en deux chapitres composés d'une partie illustrant les différentes techniques utilisées et d'une autre partie exposant, comparant et discutant les résultats obtenus.

synthese bibliographique

I. Présentation de La région de Blida

I.1. Situation géographique

Le chef-lieu de wilaya, est situé à 40 km au sud de la capitale Alger, à environ 20 km des côtes du Sahel algérois. Son territoire s'étend sur une superficie de 1482,8 km², limité par les wilayas de Tipaza et Alger au nord, Ain Defla à l'ouest, Médéa au sud, Boumerdes et Bouira à l'est, 36° de latitude Nord et 3° de longitude Est (figure 1), La plaine de Mitidja représente 53% du relief de la Wilaya de Blida (Loucif Seiad, 2003).



Fig1 : Situation géographique de la région de Blida. (Loucif Seiad, 2003).

I.2. Caractéristiques climatique de la région d'étude .

La région de Blida est caractérisée par un climat de type méditerranéen subhumide avec un hiver frais. L'enneigement est assez fréquent, de décembre à janvier sur le massif de Chréa à haute altitude (Loucif Seiad, 2003).

I.2.1. Température

Les températures les plus élevées sont enregistrées durant le mois d'aout 33°C en moyenne, et les plus basses sont de l'ordre de 6°C en janvier et 5 °C en février (Loucif Seiad, 2003), Le tableau suivant permet d'en évaluer la variation.

Tableau01 : Température maximale et minimale moyenne annuelle 2013 /2014

mois	températures	
	T max moy (C°)	T min moy (C°)
Janvier	18	6
Février	18	5
Mars	21	7
Avril	22	9
Mai	25	14
Juin	29	16
Juillet	31	19
Aout	33	20
Septembre	30	18
Octobre	27	15
Novembre	20	10
Décembre	18	7

(Loucif Seiad, 2003)

I.2.2. Pluviométrie :

La pluviométrie est irrégulière, avec une moyenne d'environ 120 mm de pluie par an. Fréquemment, de très fortes averses sont enregistrées, provoquant l'érosion des sols et des dégâts aux cultures (Loucif Seiad, 2003). Les mois les plus pluvieux se situent entre décembre et avril (115mm et 80 mm) et les mois les plus secs entre juin et septembre avec des précipitations moyennes de 4 et 30 mm (Tableau 2)

Tableau 02 : Les précipitations moyennes annuelles année 2013/2014 .

mois	janv	fevr	mars	avri	mai	jui	juil	aout	sept	oct	nov	dec
Pmm	80	81.8	73.4	61.1	39.9	16.4	4.6	7.4	34.2	60	70	115

(Loucif Seiad, 2003)

I.2.3. Hygrométrie de l'air

L'hygrométrie de l'air oscille entre 60 et 78 %. Le régime thermique est modéré dans l'ensemble, avec des moyennes qui varient de 12,5 °C en janvier à 25,5 °C en août. Néanmoins, des pics de température de + 37 °C peuvent être enregistrés en été (juillet et août) et les gelées sont observées en hiver, surtout en basse plaine (Mouzaia, Oued El Alleug et Boufarik) (Loucif, 2003).

I.2.4. Sols

Les sols sont caractérisés en majorité par des sols de type peu évolué, avec des dépôts alluviaux récents et profonds. La texture est hétérogène, de grossière à fine. Certaines zones sont caractérisées par des sols calcimagnésiques à teneur en fer élevée, de texture limono-argileuse à argilo-limoneuse, peu profonds à profonds sur encroûtement calcaire et potentiellement fertiles. En général, le taux de matière organique est faible (Loucif, 2003).

I.2.5. Le réseau hydrographique

Le réseau hydrographique de la wilaya est constitué par les cours d'eau suivants : – le Mazafran et ses affluents (Oued Djer, Oued Bouroumi et Oued Chiffa), qui ont un écoulement de 300 Mm³ /an ; – l'Oued El Harrach et son principal affluent Oued Djemaa, dont l'écoulement est évalué à 273 Mm³ /an.

➤ Site d'étude : oued Beni Aza

L'oued Beni Aza se situe au nord de l'Algérie dans la wilaya de Blida. Il prend naissance sur les hauteurs de Chréa et traverse la wilaya de Blida au niveau des communes d'Ouled Yaïch et de Beni Mered puis celle d'Ouled Alleug. Il se réunit avec l'oued Mazafran au niveau du lieu dit Magtaa Kheira et se déverse dans la mer Méditerranée après un parcours de 33,8 km (Figures 1 et 2) (Loucif Seiad, 2003).

II. Présentation de La région de Bordj Bou Arreridj

II.1. Situation géographique

La wilaya de Bordj Bou Arreridj occupe une place stratégique au sein de l'Est algérien. Elle se trouve à mi-parcours du trajet séparant Alger de Constantine. Le Chef lieu de la wilaya est située à 220 km à l'est de la capitale, Alger. La wilaya de Bordj Bou Arreridj s'étend sur une superficie de 3 921 km². La wilaya est située au Nord- Est du pays sur les Haut-Plateaux. Elle est limitée par les wilayas suivantes : Au Nord: par Bejaia, à l'Est: par Sétif , au Sud: par M'Sila et a l'Ouest: par Bouira (Figure 5)



Fig 5 : carte de la région de Bordj Bou Arreridj

II.2. Caractérisation du climat la de la région d'étude :

II.2.1. Températures

La Wilaya de Bordj Bou Arreridj se caractérise par un climat continental, qui offre des températures chaudes en été et très froides en hiver.

Tableau 03: les températures moyennes annuelles 2013/2014

Moi	Sep	Oct.	Nov.	Déc.	Janv.	Fév.	Mars	Avar	Mai	Juin	Juin	Aout
TM (°C)	21	15	10	6	6	6	9	11	16	22	26	26

Les températures maximales moyennes, du mois le plus chaud, varient entre 22°C et 26°C, les températures minimales moyennes du mois le plus froid oscillent entre 6°C et 9°C (Tableau 04)

II.2.2. précipitations

Les valeurs les plus élevées de la pluviométrie sont enregistrées durant la période hivernale avec un maximum enregistré au mois de septembre (63mm). La période sèche s'étale du mois Juin jusqu'au mois d'Aout avec une valeur minimale enregistrée de 11mm au mois de Juin et août (Tableau 04).

Tableau 04 : Les précipitations moyennes annuelles année 2013/2014 .

Moi	Sep	Oct.	Nov.	Déc.	Janv.	Fév.	Mars	Avar	Mai	Juin	Juin	Aout
P (mm)	63	33	35	31	32	26	27	35	41	16	11	11

(Anonyme 2015).

II.2.3. Hydrographie

La wilaya de Bordj Bou Arreridj possède de nombreuses sources d'eau, elle enregistre la présence de thermes naturels, dont les eaux sont dotées de vertus curatives. La plus connue est *Hammam El Biban*, à l'ouest qui a été rénovée et *Hammam Ibaynan*, au nord. Le principal cours d'eau traversant la wilaya est l'Oued Bou Sellam ainsi que l'Oued el Ksub dans le sud de la wilaya. Le thermalisme est de plus exploité dans les 200 sources thermales de la wilaya source (Anonyme 2015).

II.2.4. Faune et flore

Riche de par son relief naturel varié avec ses montagnes, ses forêts, ses hautes plaines et sa steppe, la wilaya de Bordj Bou Arreridj héberge une faune et une flore diversifiée. La flore est composée des forêts naturelles de [pins d'Alep](#) du nord et de l'ouest de la wilaya et les [cédraies](#) du sud-est, notamment celles de [Ras El Oued](#), ainsi que des chênes (Anonyme 2015).

Les mammifères recensés sont : le lièvre bru, le lapin de garenne, le porc-épic, le chacal, le hérisson, le chat-forestier, la hyène rayée, le chat-sauvage des steppes et la genette. Pour les oiseaux, pas moins d'une cinquantaine d'espèces, endémiques de la zone, sont présentes (Anonyme 2015).

les moustiques

I. Généralités sur les moustiques

I.1. Position systématique

Le moustique est le nom commun des insectes de la famille des *Culicidés* qui forme le sous ordre des nématocères dans l'ordre des diptères (Tableau05). Leur corps est élancé, ils possèdent de longues antennes à plus de six articles. Leurs pattes sont fines et longues, Seules les femelles sont hématophages (Berchi, 2000).

Tableau 05 : Position systématique du moustique

Classification	Dénomination	Signification
Règne	Animalia	Etre vivant heterotrophe
Sous règne	Metazoa	Organisme eucaryote pluricellulaire
Embranchement	Arthropoda	Corps segmenté (métamère) pourvu d'un squelette externe (cuticule)
Sous embranchement	Hexapoda	Possèdent trois paires de pattes articulées
Classe	Insecta	Corps composé de trois parties(tête, thorax, abdomen) et d'une paire d'antennes
Sous-classe	Pterygota	Adulte possédant deux paires d'ailes
Infra-classe	Neoptera	Ailes pourvues d'un champ jugal et repliées en arrière au repos
Super-ordre	Holometabola	Larves et adultes différent radicalement. La larve est aptère et grandit sans changer de forme.
Ordre	Diptera	Une seule paire d'aile assure la fonction de vol, la deuxième assure la stabilité de l'insecte lors du vol (balanciers)
Sous-ordre	Nematocera	
Famille (Meigen,1818)	Culicidae	Non vernaculaire : Moustiques

(Berchi, 2000).

La famille des *Culicidés* se divise en trois sous-familles : les *Culicinae*, les *Anophelinae* et les *Toxorhynchitinae* (Figure 6). Cette dernière est formée d'un seul genre qui n'est pas représenté en Europe occidentale (Duchauffour,1976;Matille,1993) ni en Afrique Méditerranéenne (Brunhes *et al.*, 1999). Environ 3500 espèces sont décrites de part le monde (Marquardt *et al.*, 2005), dont trois-quarts environ sont originaires des zones subtropicales et tropicales humides.

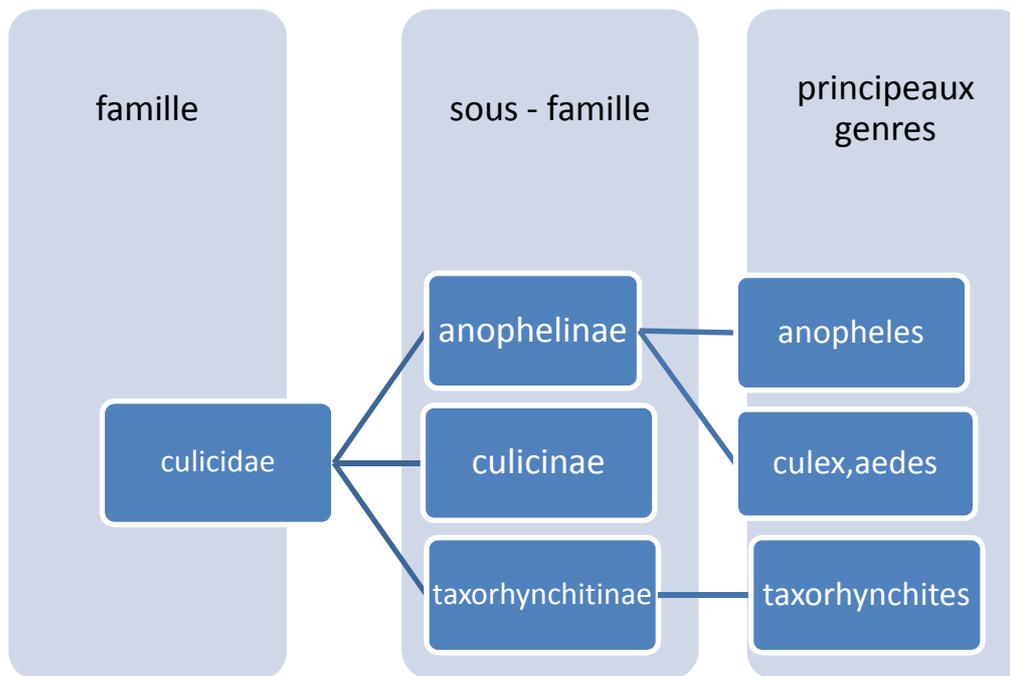


Fig 6 : Classification des *Culicidae* ou moustiques (Anopheles Group, 2012)

Une liste taxonomique rapportée par Brunhes *et al.*,(1999) mentionne 66 espèces présentes en Algérie. Elles appartiennent à deux sous-familles, (*Culicinae* et *Anophelinae*) et se répartissent en 6 genres : *Anopheles* (Meigen,1818), *Culex* (Linnaeus,1758), *Culiseta* (Felt,1904), *Aedes* (Meigen,1818), *Orthopodomyia* (Theobalt,1904) et *Uranotaenia* (Lynch Arribalzaga,1891)

I.2. Cycle de vie

Les moustiques ont une métamorphose complète, ils sont holométaboles. Ils sont présents sur tous les continents sauf en Antarctique, à proximité de pièces d'eau stagnantes, nécessaires au développement de stades immatures (Lehane, 1991; Clements, 1999).

Les moustiques se développent dans deux milieux radicalement différents en fonction de leur stade de vie : aérien au stade imaginal (adulte) et aquatique aux stades larvaires et nymphals (Figure07) (Clements, 1992).

Les individus immatures passent par quatre stades de développement larvaires successifs, qui se nourrissent principalement de microorganismes, algues et détrit. Ils ont une respiration aérienne qui se fait à l'aide d'un siphon (*Culicinae*) ou des stigmates respiratoires (*Anophelinae*). Après un stade nymphal de transformation complète de l'organisme (Insecte holométabole), l'imago émerge pour investir le milieu aérien (Figure05) (Clements, 1992).

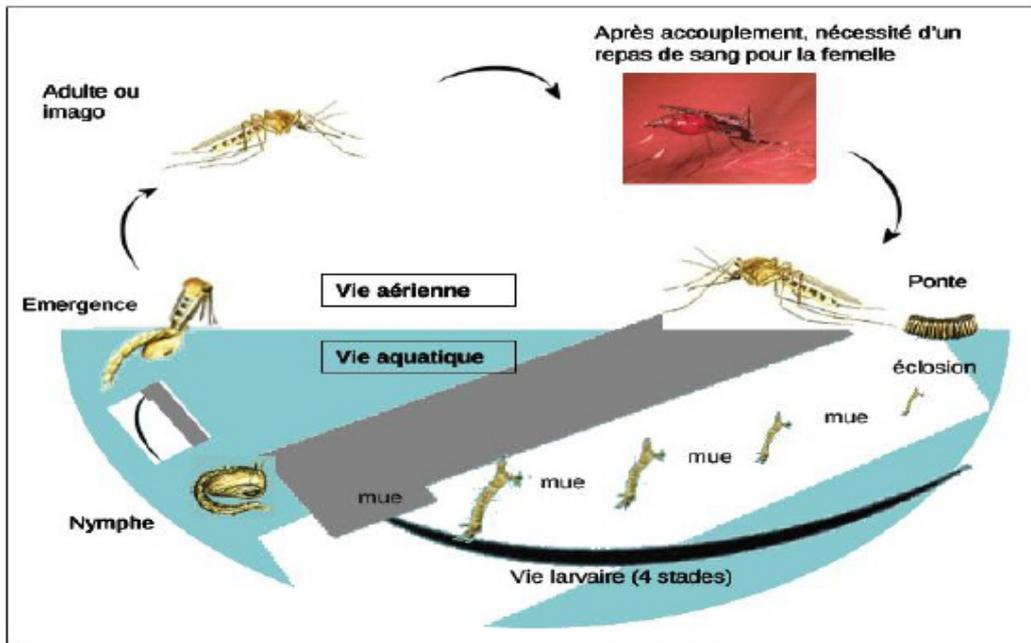


Fig 07: Cycle biologique des moustiques (Berchi, 2000).

De l'éclosion de l'œuf au stade adulte, le cycle dure environ 15 à 20 jours, lorsque les conditions de température et de nourriture sont favorables.

Les moustiques respirent à la surface de l'eau l'oxygène aérien, sauf pour les genres *Coquillettidia* (Dyar,1905) et *Mansonia* (Blanchard,1901) qui puisent l'oxygène circulant dans les racines de certaines plantes aquatiques.

Les *Culex* pondent leurs œufs groupés, collés les uns aux autres formant une "nacelle" flottante. Les *Anophèles* pondent leurs œufs un à un à la surface d'eau généralement claires, ombragées ou ensoleillées, herbacées ou non. Les œufs d'*Aedes* sont pondus isoler dans l'eau ou sur des supports secs, car ils sont résistants à la sécheresse et peuvent atteindre la mise en eau plusieurs mois. Ils éclosent très rapidement dès qu'ils sont immergés (Riuox, 1958).

I.3. Comportement trophique

Les adultes se nourrissent de nectar de plantes, et après accouplement la femelle recherche un animal vertébré pour effectuer un repas de sang nécessaire au développement des œufs. Les femelles de certaines espèces peuvent toutefois pondre sans avoir pris de repas de sang, il s'agit alors d'une ponte autogène. Certains comportements imaginaires peuvent présenter un intérêt pratique (Riuox et Cousserans,2008).

Les différences de modes d'accouplement permettent de distinguer des espèces *eurygames* et *sténogames*. Les premières ont besoin de grands espaces pour effectuer leur vol nuptial

(*Aedes detritus* Haliday, 1833). Par contre, les espèces dites *sténogames* s'accouplent au sol, sur la végétation érigée (*Aedes coluzii*) ou sur les murs des grottes et des habitations (*Culex pipiens* Linné, 1758).

L'étendue des aires de dispersion dépend des capacités de déplacement, propres à chaque espèce (portée de vol de quelques mètres pour *Culex pipiens*, de plusieurs kilomètres pour *Aedes caspius* et *Aedes detritus*) et du vent. Mais, quelque soit l'espèce, les plus fortes densités s'observent généralement au voisinage des gîtes larvaires, ainsi dans les milieux ouverts ou la présence de vent est importante, les adultes trouvent un abri dans les arbustes les plus proches (Linné, 1758).

Certaines espèces, qui évoluent habituellement à l'extérieur les *exophiles*, peuvent pénétrer dans les habitations pour se nourrir (*endophiles*) et digérer le repas sanguin ou pour hiverner (*gîtes de diapause*). Les espèces de moustiques sont plus nombreuses dans les zones tropicales et équatoriales que dans les régions tempérées car ces insectes supportent mal les écarts thermiques (Linné, 1758).

Les femelles de moustiques n'ayant jamais pris de repas sanguin sont parfois capables de donner une première ponte fertile. Ce phénomène, observé pour la première fois par (Théobald en 1901), est signalé par (Roubaud, 1929), qui lui attribue le nom d'autogenèse par opposition à l'anautogenèse qui est la nécessité de prendre un repas de sang pour produire une première ponte.

1.4. Intérêts dans l'écosystème

Les moustiques représentent un maillon essentiel dans le fonctionnement d'un écosystème aquatique. En effet, par sa présence en grand nombre, ils représentent une biomasse importante dont se nourrissent de nombreux organismes (batraciens, poissons...). Ils sont ainsi un maillon important de la chaîne trophique des zones humides. De plus, de part leur régime alimentaire, les larves participent au processus de destruction de la matière organique. Leur régime omnivore, avec l'ingestion de feuilles en décomposition par exemple, accélère la décomposition des matières organiques dans les écosystèmes aquatiques (Riuox et Cousserans, 2008).

1.5. Nuisance et intérêt médical

Les moustiques ont été toujours considérés comme source de nuisance pour l'homme, en raison du fait qu'ils sont responsables des plus grandes endémies dans le monde, ils constituent le groupe de vecteurs le plus important en santé publique humaine et vétérinaire (OMS, 1999)

Dans la sous famille des *Culicinae* les genres vecteurs des agents pathogènes sont: *Culex*, *Aedes* et *Anopheles*. Sur le plan santé, la pique par les adultes femelles de nombreux *Culicidés* anthropophiles, nécessaire à la maturation des pontes, ne se résume pas seulement au désagrément passager lié à la prise de sang (Failloux et Rodhain 1999). Cette prise directe du fluide dans les capillaires sanguins va permettre à différentes formes de vies (virus, protozoaires, ver et nématodes) d'exploiter les moustiques comme voie de transfert vers les hôtes vertébrés (OMS, 1999), Ainsi, les agents pathogènes comme par exemple les protozoaires(ex: *Plasmodiumfaciparum* responsable du paludisme) utilisent le moustique comme vecteur puis l'homme comme hôte pour la réalisation de leur cycle biologique infectant ainsi à l'homme de nombreuses maladies.

**Le champignon
entomopathogène
*Metarhizium anisopliae***

I. Les champignons entomopathogènes

Les agents pathogènes sont des organismes vivants pouvant engendrer une maladie à leur hôte. Les pathogènes des insectes appelés entomopathogènes comprennent : les bactéries (ex : *Bacillus thuringiensis*, *B. sphaericus*), les protozoaires (ex : *Amoebidea*), les virus (ex : Entomopox virus) et les champignons qui font l'objet de notre étude.

Parmi les microorganismes utilisés en lutte biologique, plus de 700 espèces de microchampignons sont entomopathogènes (Starnes *et al.*,1993) et jouent un rôle important dans la régulation naturelle des populations d'insectes (Ferron, 1978 ; Wraight et Roberts, 1987).

Ils appartiennent au sous-taxon des *Mastigomycotina*, *Zygomycotina*, *Ascomycotina* et *Deuteuromycotina*. Le plus grand nombre de pathogènes se trouvent dans la classe des Zygomycètes, mais les plus utilisées en lutte biologique proviennent des Deuteromycètes (*Fungi imperfecti*).

Ces derniers appartiennent aux champignons à hyphes septés, se [multipliant de façon non sexuée](#). Les espèces des genres *Beauveria*, *Metharizium*, sont les plus utilisées en lutte biologique (Wraight et Roberts, 1987; Goettel, 1992) et ont un intérêt agronomique considérable dans la lutte biologique contre les ravageurs de cultures et sont donc l'objet d'études de plus en plus poussées.

II. *Metarhizium anisopliae*

Metarhizium anisopliae était le premier pathogène utilisé délibérément pour le contrôle des insectes ravageurs par le Russe Eli Metchinnicoff (le père de la lutte microbiologique) dans les années 80. Il a été isolé et identifié sur la paille de céréale près d'Odessa en Ukraine sous le nom *Anisopliae austria* ou il l'a nommé *Entomophthora anisopliae*. En 1883 Sorokin assigna ce champignon à la muscardine verte au genre *Metarhizium*. Depuis il est connu sous le nom de *Metarhizium anisopliae*.

II.1. Taxonomie et Classification

La classification de *Metarhizium anisopliae* a été sujette à plusieurs révisions au cours des dernières années. Par le passé, l'espèce a été classée principalement sous la division des Deutéromycètes, dans la classe des Hyphomycètes. Les membres de cette sous-division ayant comme spécificité le fait de ne jamais produire, ou très rarement, des spores sexuées.

Cette classe est en fait caractérisée par la présence de formes mycéliennes portant des spores asexuées, appelées conidies, engendrées sur des cellules conidiogènes spécialisées.

Par contre, à l'heure actuelle, la plupart des mycologistes n'acceptent plus les *Deuteromycota* et ses sous-classes comme formant un assemblage taxonomique. Plusieurs espèces de champignons ont été associées avec des membres de la division des *Ascomycota* sur une base d'homologie d'ADN, dont l'espèce *M.anisopliae* (Inglis *et al.*, 2001). Cette espèce fait dès lors partie du règne des *Mycota*, de la division des *Ascomycota* et de l'ordre des *Hypocreales*.

La classification de ce genre a été basée sur des caractères morphologiques des cellules et des conidies (Bidochka et Small, 2005).

- Règne :** *Fungi*
- Embranchement :** Dikarya
- Sous-embranchement :** *Ascomycota*
- Classe :** Pezizomycotina
- Ordre :** *Hypocreales*
- Famille :** *Clavicipitaceae*
- Genre :** *Metarhizium*
- Espèce :** *Metarhizium anisopliae*

La première révision de ce genre a été faite par Tulloch (1976), où il a utilisé les caractéristiques morphologiques des conidies pour distinguer entre deux formes de *Metarhizium* ; à savoir *Metarhizium flavoviride* et *Metarhizium anisopliae* (Figure08). Ce dernier a été subdivisé en deux variétés ; *Metarhizium anisopliae* var *anisopliae* et *Metarhizium anisopliae* var *majus*

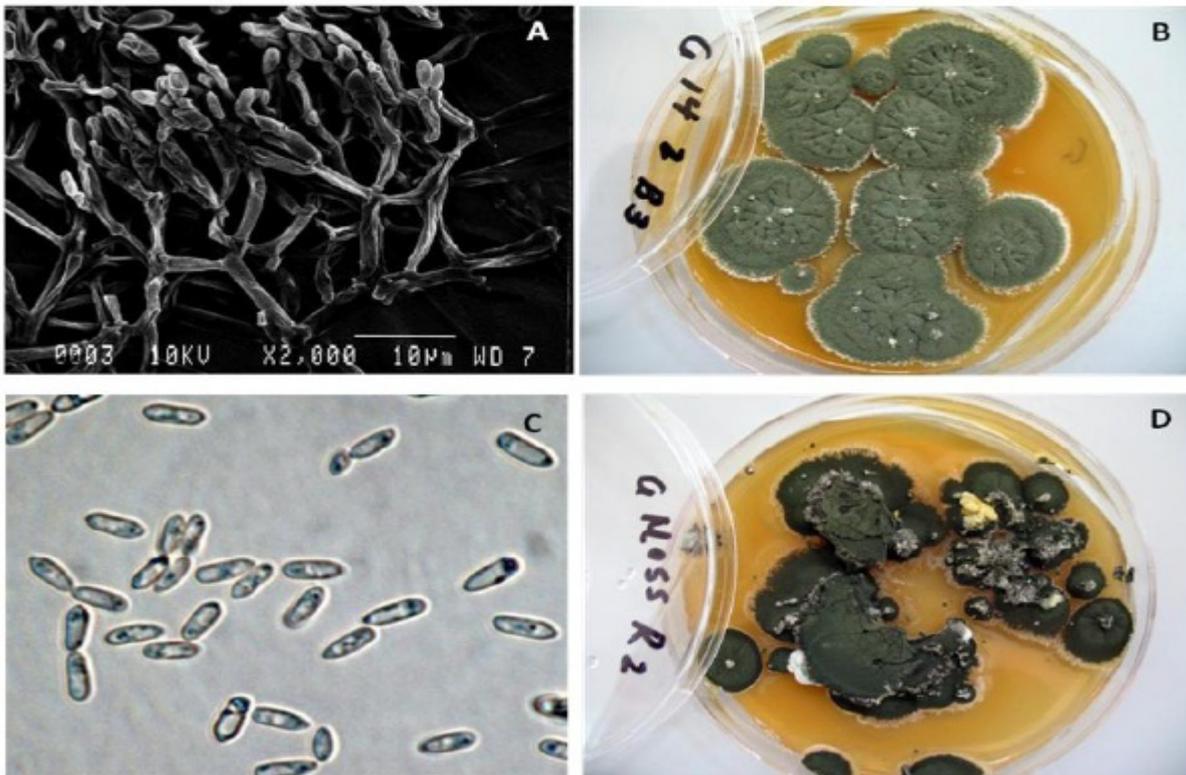


Fig08: (A) Observation en microscope électronique des conidiophores et des hyphes de *Metarhizium anisopliae* (B) Culture de *M. anisopliae* sur Sauboraud dextrose agar (SDA) à 25 °C, (C) Aspect microscopique des Conidies de *M. flavoviride* (X100), (D) Culture de *M. flavoviride* sur Sauboraud dextrose agar (SDA) à 25°C. Photo Credits: (A) Fumio Iharu, National Institute of Fruit Tree Science, Japan. (B, D) T. Goble, Rhodes University, South Africa. (C) Dan Johnson, University of Lethbridge, Canada.

II.2. Morphologie

Les caractéristiques taxonomiques dominantes sont les traits morphologiques des structures de sporulation. Le genre *Metarhizium* est défini par l'agencement des chaînes porteuses de phialides, des colonies de conidies cylindriques ou légèrement ovotides, sèches et généralement de couleur verte. Les colonies sont formées d'une agrégation de ces chaînes conidiennes (Zimmerman, 2007). *Metarhizium anisopliae* apparaît blanc lorsqu'il est jeune et il devient vert foncé après la maturation des spores (Figure 09).

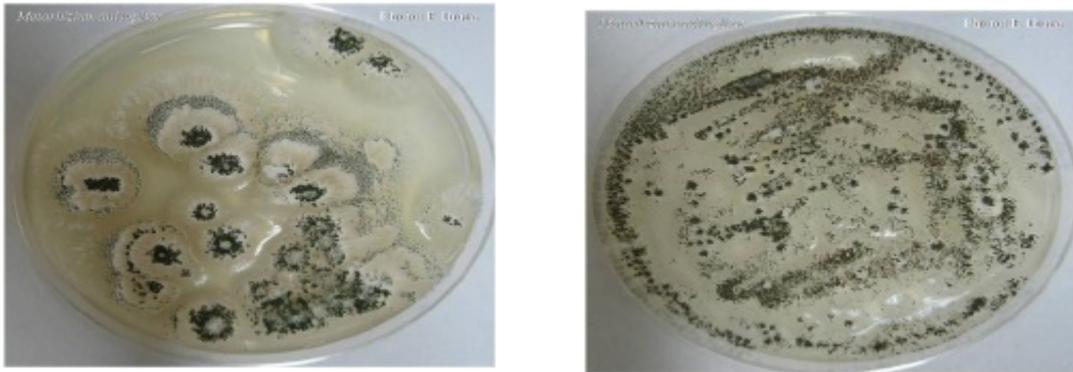


Fig 09: Aspect morphologique de *Metarhizium anisopliae* (Ihara *et al.*, 2001) .

Cette espèce est caractérisée par des conidiophores de longueur variable, sont relativement courts, irrégulièrement ramifiés ou non et arrangés en groupes compacts formant une masse de spores (Figure10), les spores étant allongées avec des cotés parallèles (Bischoff *et al.*, 2009)

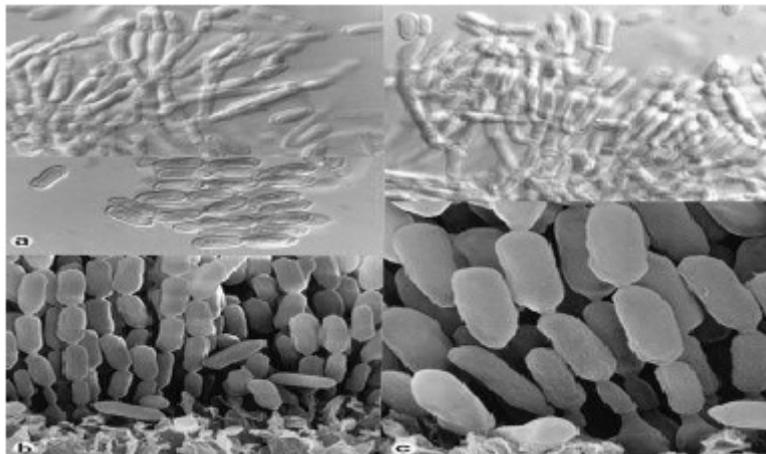


Fig 10 : Aspect microscopique de *Metarhizium anisopliae*, a. x1600; b. x2800; c. x7000(Bischoff *et al.*, 2009)

Il existe deux formes de *Metarhizium anisopliae* dont la différence se base sur la taille des conidies : (1) la forme *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* à spores courtes, dont les conidies mesurent de 5 à 8 μm de longueur et (2) la forme *Metarhizium anisopliae* var. *majus* à spores longues, dont les conidies mesurent de 10 à 14 μm de longueur (Figure 11).

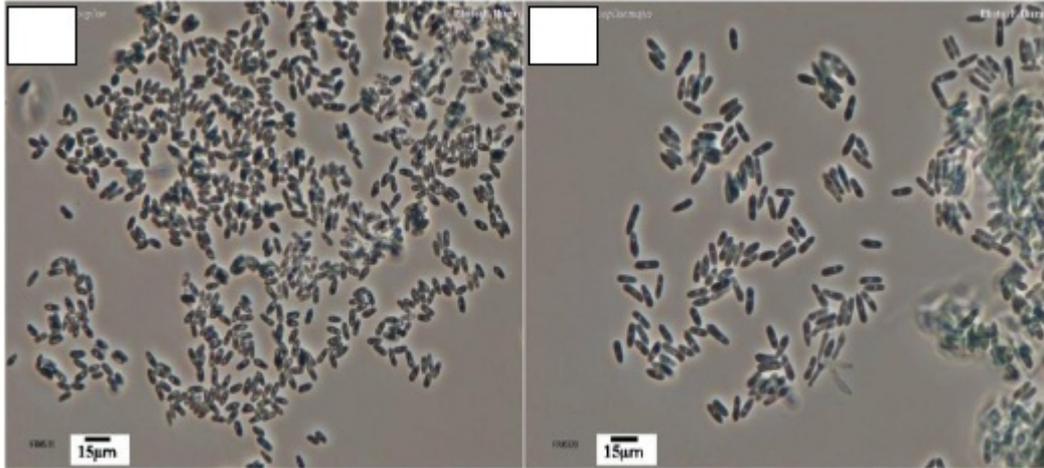


Fig 11: (A) Conidies de *Metarhizium anisopliae* var *anisopliae* , (B) Conidies de *Metarhizium anisopliae* var *majus* (Tulloch ,1976)

II.3. Mode d'infection

Généralement, les champignons entomopathogènes tuent ou réduisent la vigueur des hôtes qu'ils infectent. Ces ennemis naturels sont plus efficaces lorsque l'insecte ciblé est préalablement affaibli par un autre facteur comme un stress nutritif. Compte tenu de leur mode de transmission et de leurs besoins abiotiques. Aussi, ils sont généralement très efficaces lorsque la densité des populations d'insectes ciblés est très élevée. Quoiqu'il en soit, le système immunitaire des insectes peut fortement influencer la pathogénicité de ces ennemis naturels.

La cuticule de l'insecte est une barrière structurellement et chimiquement complexe pour la pénétration du champignon. L'épicuticule contient une protéine stable au phénol et est couverte d'une couche cireuse contenant des acides gras, des lipides et des stérols (Andersen, 1979). La procuticule contient de nombreuses fibrilles de chitine enfouies dans une matrice protéinique. Celle-ci peut représenter jusqu'à 70 % du poids sec de la cuticule.

Contrairement aux autres microorganismes (virus, bactéries, nématodes, protozoaires) où l'infection de l'hôte découle de leur ingestion obligatoire, les champignons peuvent infecter les insectes par pénétration directe à travers la cuticule (Clarkson et Charnley 1996).

Au contact de la cuticule de l'insecte, la spore, l'unité infectieuse du champignon, germe et pénètre au travers du tégument en combinant des pressions mécaniques et enzymatiques (St Leger, 1993). Le champignon croît rapidement dans l'hémocoel

Les insectes susceptibles au champignon meurent généralement dans un délai de 3 à 10 jours. Quand l'insecte meurt.

Le champignon entre dans un stade hyphal, colonise les organes internes puis sporule à la surface de l'insecte. Le cycle infectieux est généralement le même pour tous les champignons entomopathogènes.

Le processus de pénétration est l'étape la plus importante de la pathogénèse (Ferron *et al.*, 1993). Le mode d'infection des champignons entomopathogènes se divise en quatre étapes distinctes: **l'adhésion, la germination, la pénétration et la dissémination** (Figure 12).

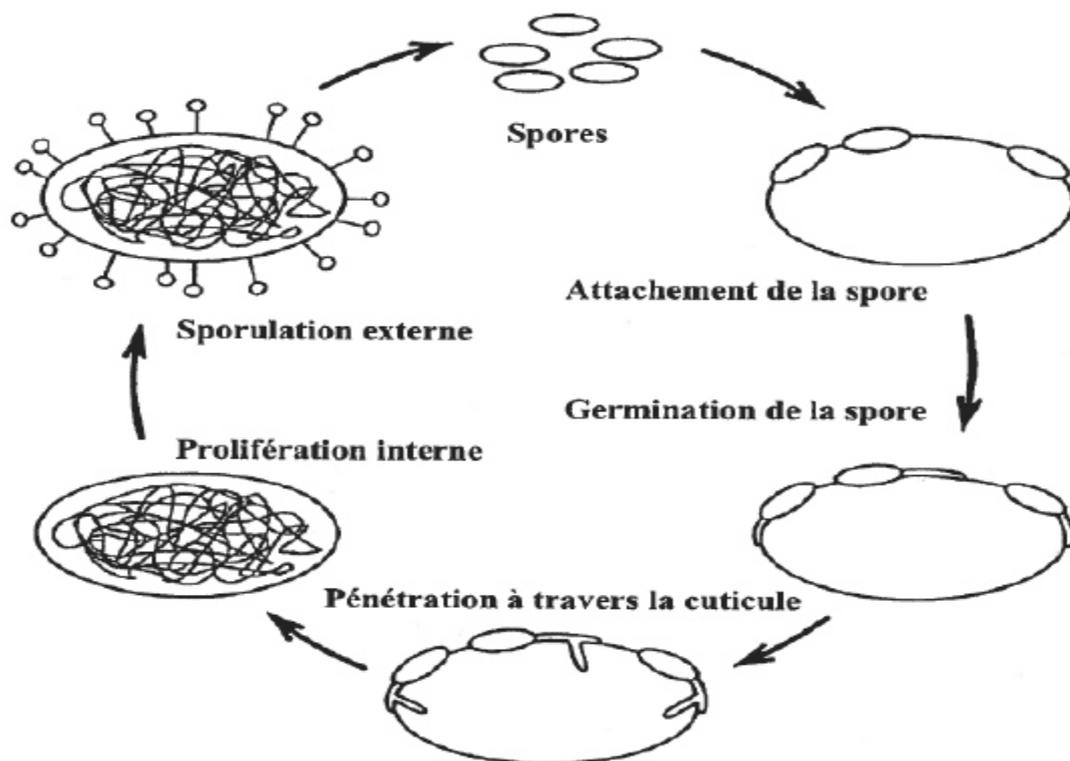


Fig 12. Schéma du cycle biologique des champignons entomopathogènes (Ferron *et al.*, 1993)

□ **Phase d'adhésion :** L'adhésion est la première étape du processus d'infection. Les spores entrent en contact passivement avec les insectes à l'aide des agents naturels tels que le vent et l'eau. L'adhésion est déclenchée par un mécanisme de reconnaissance et de compatibilité

des spores avec le tégument de l'insecte.

L'infection est initiée à travers le tégument de l'insecte hôte (Khachatourians, 1991; Tanada et Kay, 1993), mais les spores peuvent aussi entrer par le système respiratoire (Clark *et al.*, 1968), le tube alimentaire (Miranpuri et Khachatourians, 1991) et la cavité buccale (Siebeneicher *et al.*, 1992). L'attachement des spores à la cuticule est donc assujéti aux forces hydrophobiques non spécifiques et aux charges électrostatiques (Boucias *et al.*, 1988 ; Butt, 1990). Cependant, des systèmes de reconnaissance spécifiques, dont des polysaccharides fongiques extracellulaires, des lectines et des enzymes extracellulaires, ont été identifiées sur la surface de la spore et peuvent être impliqués dans l'attachement de celle-ci (Boucias *et al.*, 1991; Napolitano et Juárez, 1997). Par exemple, Grula *et al.*, (1984) ont démontré que les hémagglutinines de la surface des spores sont inhibées par différents sucres haptènes (ex. glucose, glucosamine et N-acétylglucosamine). Ainsi, l'incubation des spores avec ces sucres réduit leur affinité à l'insecte. Une fois en contact avec la cuticule, la spore produit activement un mucilage hygroscopique qui permet la modification de l'épicuticule de l'insecte facilitant la germination des spores et peut aussi créer un environnement favorable aux enzymes extracellulaires libérées par ces dernières (Boucias *et al.*, 1991).

□ **Phase de germination** : La seconde phase d'infection est la germination. Celle-ci dépend de l'état physiologique de l'hôte et aussi des conditions environnementales, notamment la température et l'humidité (Butt et Becket, 1994 ; Butt *et al.*, 1994). La germination aboutit à la production d'appressoria, structures terminales servant à l'ancrage de la cuticule et favorisant la pénétration. La valeur nutritive de la cuticule joue un rôle important pour la production d'appressoria. Cependant, des études ont démontré qu'une cuticule nutritive favorise la croissance mycélienne plutôt que la pénétration (Magelhaes *et al.*, 1981 ; Ferron *et al.*, 1993). La germination *in vitro* se produit en réponse aux sources de carbone (ex. glucose, glucosamine, chitine et amidon) et/ou d'azote (St Leger *et al.*, 1986a, 1986b). Cependant, les acides gras et les lipides situés au niveau de l'épicuticule peuvent aussi influencer la germination de spores (Lecuona *et al.*, 1997).

La germination dépend de la tolérance aux composants potentiellement toxiques au niveau de l'épicuticule (ex. acides gras à chaîne courte, phénols) (St Leger *et al.*, 1990) et de l'antagonisme de la flore saprophyte sur la cuticule de l'insecte (Charnley, 1989).

□ **Phase de pénétration** : La pénétration de *Metarhizium anisopliae* dans l'hôte s'effectue généralement à travers les orifices naturels, la cuticule ou bien par l'ingestion. En présence

d'un niveau élevé d'azote et de carbone, le tube germinatif continue de s'allonger et forme un hyphe (St Leger *et al.*, 1992). Comme plusieurs autres champignons filamenteux, la dureté de la surface, l'hydrophobicité, la topographie et les nutriments disponibles influencent la différenciation d'une structure infectieuse ou appressorium

.Le développement de l'appressorium implique l'activation de l'AMPc et la libération de Ca^{2+} comme signaux moléculaires intracellulaires (St Leger *et al.*, 1990).

La pénétration est réalisée par pression mécanique et hydrolyse enzymatique (Goettel *et al.*, 1990) (Figure 13).

Précisément, l'hyphes fongique sécrète des enzymes extracellulaires telles que les protéases, les lipases et les chitinases, qui attaquent et dissolvent la cuticule, permettant aux spores de pénétrer à travers la cuticule et de se développer dans le corps de l'insecte (Hajek et St Leger, 1994). Ces enzymes correspondent aux différents polymères de la cuticule, des protéines, des chitines et des lipides de l'insecte (Charnley et St Leger, 1991). Les protéases sont les plus importantes enzymes extracellulaires et jouent un rôle primordial dans la pénétration (Campos *et al.*, 2005).

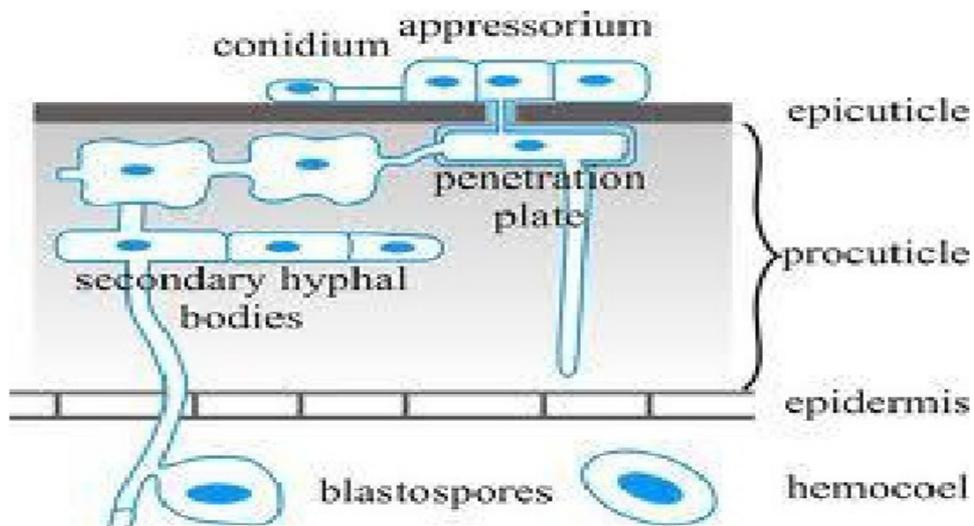


Fig 13: Mode de pénétration des champignons entomopathogènes dans la cuticule des insectes (Clarkson and Charnley., 1996)

□ **Phase de dissémination :** Une fois que le champignon a franchi avec succès la cuticule et percé l'épiderme adjacent de la cuticule, il entre dans le système circulatoire ouvert de l'insecte, l'hémocoel. Le champignon se multiplie par la suite à l'intérieur de tous les organes de l'insecte hôte et il s'accroît sous forme de blastospores. Ceci peut faciliter la dispersion et l

colonisation de l'hémocoel et optimise l'assimilation rapide des nutriments. Il semble que une utilisation efficace des sucres sanguins est nécessaire pour une croissance optimale du pathogène. Bien que le glucose joue un rôle central dans le métabolisme de l'insecte, il est généralement présent à très faibles concentrations.

II.4. Production des toxines

Une fois que le champignon atteint l'hémocoel, il entame la production d'hyphes qui circuleront à travers l'hémolymphe pour ce faire le champignon doit surmonter les mécanismes immunitaires de l'hôte. L'espèce *Metarhizium anisopliae* produit des composés toxiques non enzymatiques tels que les destruxines (DTX) et les cytochalasmes qui lui permettent de surmonter les mécanismes de défense de l'hôte et de proliférer (Inglis et al., 2001). Les toxines ont des effets divers sur différents tissus d'insectes. Les DTX dépolarisent la membrane du muscle de l'insecte en activant les canaux calcium. En outre la fonction des hémocytes d'insectes peut être empêchée par les DTX (Bradfish, 1990). Sous les conditions optimales la mort de l'insecte survient normalement entre 3 à 5 jours à partir du moment de l'infection.

Une fois l'insecte meurt, l'espèce produit un antibiotique : l'oosporine qui lui permet de surmonter la compétition des bactéries saprophages dans le tube intestinal de l'insecte (Ingl et al., 2001). Le champignon entame alors une phase saprophytique. Les spores sont produites par les conidiophores qui émergent du cadavre, préférentiellement au niveau inter segmentaire si les conditions environnementales sont adéquates. Le cadavre est alors couvert par un feutrage mycélien vert nommé Muscardine constitué d'hyphes et de conidiophores portant des conidies (Figure 14). La phase saprophytique ne dépend pas de l'humidité relative par contre elle est influencée par la température (Ferron, 1977).



Fig 14 : Insectes infectés par *Metarhizium anisopliae* (Muscardine verte)
(Boucias et Pendland , 1998)

III. Réponse immunitaire à l'infection microbienne chez l'insecte

Les insectes fournissent un exemple particulier d'une immunité naturelle, dite non spécifique, qui n'implique pas les lymphocytes et les anticorps comme chez les mammifères (Fugita, 2002 ; Hoffmann et Reichhart, 2002). Afin d'empêcher l'invasion par les agents pathogènes, les insectes ont développé, au cours de leur évolution, différents mécanismes de défense. D'ailleurs, la colonisation de l'hémocoèle est strictement dépendante de l'aptitude de l'agent infectieux à surmonter les mécanismes immunitaires de défense de l'insecte (Ferron *et al.*, 1993). L'arsenal défensif des insectes est constitué de barrières structurelles passives comme la cuticule. Le tégument chitineux de l'insecte constitue donc une barrière primaire efficace contre l'invasion par la majorité des micro-organismes. En absence de blessure, La principale voie d'infection des insectes par les bactéries, les virus et les parasites, est le tube alimentaire. Cependant, comme marqué précédemment, les champignons entomopathogène sont l'habilité de pénétrer à travers la cuticule pour établir l'infection.

En plus des barrières passives, il existe une cascade de réponses actives lorsque les

pathogènes ont atteint l'hémocoèle de l'insecte (Hoffmann et Reichhart, 2002).

Ces réponses actives incluent la mélanisation, les réactions cellulaires (ex. phagocytose, encapsulation), les réactions humorales (ex. phénoloxidase, lectines) et la production des inhibiteurs de protéases (Gillespie *et al.*, 2000).

Les antigènes microbiens sont reconnus par le système immunitaire naturel de l'insecte grâce à des unités répétitives constituées de polysaccharides trouvés dans les glycoprotéines de la surface microbienne.

IV. Facteurs affectant l'efficacité des champignons entomopathogènes

Le potentiel infectieux des champignons entomopathogènes comme agent de lutte biologique dépend de leurs propriétés physiologiques de la population de l'hôte et des conditions du milieu (Ferron *et al.*, 1991).

IV.1 Facteurs liés aux pathogènes

La virulence et la spécificité de l'hôte sont deux éléments essentiels dans le choix d'un bon candidat à la lutte biologique. Il a été démontré que les insectes d'une même population révèlent une sensibilité qui diffère selon les isolats de *M.anisopliae* (Todorova *et al.*, 1994). À une échelle industrielle, les épreuves biologiques standardisées de laboratoire sont essentielles afin de vérifier le potentiel insecticide des préparations produites et de suivre leur stabilité de conservation (Ferron *et al.*, 1991).

IV.2 Facteurs dépendant de l'hôte

Il est maintenant reconnu que tous les stades de développement de l'insecte, de l'oeuf jusqu'à l'adulte, peuvent être sensibles à l'infection fongique. Par exemple *P. fumosoroseus* est trouvé à l'état naturel sur une large gamme d'hôtes (plus de 40 espèces d'insectes appartenant à 8 ordres) dont les Homoptères et parmi eux les aleurodes (Todorova *et al.*, 1994).

L'épizootie fongique survient généralement à de fortes densités de la population hôte favorisant ainsi la probabilité de contact entre le pathogène et l'hôte, de même qu'entre les insectes infectés et non infectés (Ferron *et al.*, 1991).

IV.3 Facteurs de l'environnement

L'efficacité des champignons entomopathogènes contre les insectes est souvent influencée par des conditions environnementales.

IV.3.1. Rayonnement solaire

L'effet des radiations solaires est l'un des paramètres environnementaux les plus importants pour la persistance des spores fongiques entomopathogènes. L'exposition à la lumière du soleil même pour quelques heures en particulier la partie d'UVB du spectre (285-315nm) peut complètement inactiver les conidies de *Metarhizium anisopliae* (Braga *et al.*, 2001).

Il ya des différences significatives dans la sensibilité aux radiations, les micro habitats jouent un rôle important en augmentant la persistance des conidies fongiques en fournissant l'ombre des arbres (Inglis *et al.*,2001).

Malgré son effet nocif sur la persistance des conidies, la lumière peut stimuler certaines étapes du cycle évolutif des champignons entomopathogènes cultivés *in vitro* ou *in vivo* (Silvy et Riba, 1989). De plus, afin d'assurer une protection contre ces rayons, les coelomycètes, tels que le genre *Aschersonia*, produisent des cellules conidiogènes dans des pycnides fortement pigmentés (McCoy *et al.*, 1990).

IV.3.2. Température

La température est un autre facteur important qui peut affecter le taux de germination, la croissance, la sporulation et la survie des champignons entomopathogènes. Hastuti et ses collaborateurs (1999) ont démontré que 100 % des larves de *Paropsis charybdis* (Coleoptera: Chrysomelidae) sont tuées par *B. bassiana* après une incubation de 21 jours à 35°C, alors que 93 % des larves sont mortes à une température d'incubation de 15°C. La température optimale qui assure la survie d'un champignon diffère selon les taxa. Ainsi, les spores des entomophthorales semblent être plus sensibles que les spores de la plupart des entomopathogènes. Généralement, les températures au-dessus de 35°C empêchent la croissance et le développement des champignons entomopathogènes.

Les variations de températures (élevées et basses) affectent la vitesse de l'infection des insectes par l'inhibition de la germination des spores, ce qui affecte à son tour la formation du tube germinatif et la pénétration à travers la cuticule de l'insecte (Ekesi *et al.*, 1999 ; Fargues et Luz., 2000 ; SozaGomez et Alves, 2000 ; Mitsuaki, 2004).

Les conidies de *B. bassiana* et de *M anisopliae* ne peuvent pas survivre plus que 15 minutes à 40°C (McCoy *et al.*, 1990).

IV.3.3. Humidité

L'humidité environnementale est un paramètre très important pour la germination des

conidies dans la nature. Elle affecte aussi la persistance et la survie des champignons entomopathogènes. La plupart de ces champignons exigent au moins 95 % de l'humidité relative à la surface de l'insecte afin de germer (Hallsworth et Magan, 1999).

Un certain nombre d'études a indiqué que les conditions sèches juste après l'application des champignons entomopathogènes sont moins pathogènes car les souches de *Metarhizium* et *Beauveria* peuvent germer et infecter efficacement les insectes à une basse humidité à condition qu'il y ait suffisamment d'humidité dans les microhabitats (Inglis *et al.*, 2001). L'humidité relativement élevée dans les endroits abrités fournit un micro-environnement favorable pour le développement des spores (Liu *et al.*, 2003).

Les effets de la température et de l'humidité sont intimement reliés d'où la tolérance de quelques champignons à des températures extrêmes lorsqu'il y a plus d'humidité ou lorsque la condensation se produit aisément et la perte d'eau est réduite au minimum. Le vent peut aussi modifier de manière significative l'humidité microclimatique et considérablement influencer le comportement fongique (McCoy *et al.*, 1990).

IV.4 Effet du sol

Le sol constitue un réservoir naturel pour les insectes infectés par des mycètes fongiques sur le feuillage qui plus tard tombent sur le sol (Keller et Zimmermann, 1989). En effet, les champignons dans le sol sont protégés contre la dessiccation, le rayonnement ultraviolet et les températures extrêmes (McCoy *et al.*, 1990). En général, la simple présence des microflores dans le sol peut influencer l'efficacité des entomopathogènes (Grodén et Lockwood, 1991).

Comprendre l'écologie des champignons entomopathogènes dans l'environnement, en particulier le sol est une chose importante, nécessaire pour l'application correcte de ces champignons dans le champ. Meyling et Eilenberg (2007) fournissent un diagramme schématique qui détermine l'écologie de *Beauveria* et de *Metarhizium* dans le sol et comment ces espèces sont dispersées ainsi que leur cycle dans l'environnement.

V. Avantages de l'utilisation de *Metarhizium anisopliae*

Le Champignon *M. anisopliae* est devenu la base de plusieurs programmes de lutte intégrée, notamment dans les secteurs agricoles où la présence de résidus de pesticides, dans les aliments constitue une source de préoccupation majeure. Le champignon *M. anisopliae* est inoffensif pour la santé humaine, et sans danger pour l'environnement (Faria et

Wraight, 2001).

Plusieurs facteurs favorisent une plus grande utilisation de *M.anisopliae* dans le futur, en particulier l'augmentation des couts sociaux résultant de l'utilisation massive des pesticides chimiques et de production des nouveaux insecticides chimiques. Les occasions d'utiliser cet entomopathogène conjointement à d'autres agents de lutte biologique et à diverses pratiques culturales et pesticides courants se sont accrues considérablement avec la découverte denouveaux isolats plus efficaces, l'optimisation des formulations et l'amélioration des procédés d'application.

Le champignon *M .anisopliae* comporte d'autres avantages. En effet, son activité insecticide est plus rapide que d'autres agents entomopathogènes et sa durée de conservation est longue. De plus sa production exige des milieux de culture relativement peu dispendieux. Son application s'effectue à l'aide d'équipements standards, et ses effet sur les insectes bénéfiques et les organismes non ciblés sont nuls à négligeables (Zimmermann 2007). Le champignon *M .anisopliae* peut infecter l'hôte par ingestion ou par simple contact, contrairement aux autres agents entomopathogènes, qui doivent être ingérés pour infecter (Cloutier et Cloutier 1992). Ce mode d'action particulier rend tous les stades (œuf, larve, adulte) sensibles. De plus, les conidies peuvent persister dans l'environnement par la propagation des enzooties ou des épizooties.

VI. Production de *Metarhizium anisopliae*

Le champignon *M.anisopliae* possède deux phases de croissance. La phase végétative est caractérisée par la croissance du mycélium formé d'hyphes et la phase reproductive est celle pendant laquelle les spores sont formées et relâchées dans l'environnement (Kamp et Bidochka, 2002).

Selon les conditions de croissance, trois types de spores peuvent être produits par le champignon. Lorsqu'il croit en milieu solide, *M.anisopliae* produit des conidies aériennes. En milieu liquide, il produit surtout des blastospore, des conidies submergées (Jenkins et al., 1998). Les blastospores sont généralement de grande taille que les conidies et tendent à avoir une durée de vie plus courte que celles-ci lors de l'entreposage (Vega et al., 2003). Chez les champignons *M. anisopliae* et *Hirsutella thompsonii*, les blastospores ont une stabilité limitée et sont moins virulentes que les conidies (Hegedus et al., 1990). De plus, les blastospores sont plus sensibles à la dessiccation que les conidies (Burges, 1998). Pour ces raisons, les formulations contenant des conidies sont plus souvent utilisées sur le terrain.

Les champignons entomopathogènes peuvent être produits de différentes façons : par méthode simple en sacs plastiques en utilisant comme milieu du riz stérile, des grains concassés de maïs, de l'orge ou d'autres produits, en fermentation liquide ou en fermenteurs semi-solides.

La production en milieu solide présente l'avantage qui est facile à réaliser et que les conidies produites ont tendance à être plus tolérantes à la dessiccation et plus stables que les spores produites en culture liquide. Malheureusement, les méthodes de fermentation solide présentent de nombreuses contraintes techniques et économiques (problèmes de stérilisation de substrats, échanges de gaz, contrôle de température, maintien d'une culture pure et récupération du produit à partir du substrat). La fermentation liquide est une méthode plus économique. Elle assure un environnement nutritionnel homogène et les facteurs environnementaux (pH, température, aération) sont facilement contrôlés par rapport à la fermentation solide.

Plusieurs paramètres de croissance doivent être considérés afin d'obtenir de grandes quantités de spores et une forte virulence de celles-ci. Il a été démontré que la température d'incubation est un paramètre important lors de la production de champignons. La température optimale peut varier non seulement entre les espèces de champignons, mais aussi entre les isolats de la même espèce (Jenkins et al, 1998 ; Lopez-Lastra et al., 2002 ; Mondal et Bhattacharya, 2004). Pour *Nomuraea rileyi*, un autre entomopathogène, la température optimale pour la croissance optimale du mycélium se situe entre 22 et 26°C (Edelstein et al, 2004).

D'autres part, une étude a démontré que la production de conidies de *M. anisopliae* était plus importante à 20°C qu'à 23°C (Nelson et al, 1996). Le niveau d'humidité peut aussi influencer la croissance et la sporulation de *M. anisopliae*. Des degrés d'humidité différents ont permis la production de conidies. La photopériode normale (Nelson et al, 1996) ou à un cycle de lumière/obscurité de 12 :12 (Kamp et Bidochka, 2002) pourrait aussi affecter la production de conidies.

VII. Formulation à base de champignons entomopathogènes

Pour obtenir les conditions optimales de production, on doit considérer non seulement le rendement en conidies, mais aussi la stabilité des conidies. Les formulations granulées peuvent être obtenues soit par enrobage des spores préalablement récoltées (Leland et Behle, 2005) , soit par croissance et sporulation du champignon à la surface d'un support nutritif granulé. Ce premier procédé, déjà appliqué à de nombreux microorganismes auxiliaires, facilement

industrialisable, est encore insuffisamment éprouvé au champ pour les champignons entomopathogènes et ses perspectives d'utilisation agronomique ne peuvent pas être précisément estimés.

Les produits formulés, contenant de matériels tels que de protecteurs UV, d'huiles, d'humectants et de nutriments pour stimuler la germination et la croissance des spores, ont un grand potentiel pour obtenir des meilleurs résultats (Bateman, 1994; Burges, 1998 ; Goettel *et al.*, 2000 ;Wraight *et al.*,2001).

Par exemple, les huiles permettent une meilleure adhésion et un épandage adéquat des spores sur la cuticule hydrophobique de l'insecte (Ibrahim *et al.*,1999).

De plus, les conidies des champignons entomopathogènes formulées dans l'huile végétale pure et en présence d'adjuvants semblent être plus résistantes aux radiations UV que les conidies non-formulées (Alves *et al.*,1998 ; Moore *et al.*, 1993).

VIII. Les essais biologiques et l'évaluation de l'infection

Les tests biologiques ou les bio tests sont une forme d'expérimentation pour l'estimation de la puissance ou comparant l'efficacité de deux ou de plusieurs substances par le biais de la réaction entre hôte et stimulus (Rangaswamy, 1995).

En entomologie, le sujet (hôte) peut être un insecte, le stimulus peut être un pesticide ou un agent microbien et la réponse peut être le changement dans les caractéristiques des insectes en termes de poids, de forme, de taille, d'appétit, de changement, de comportement ou de la mort. La virulence peut être mesurée dans un essai biologique en exposant un nombre connu d'hôtes à un nombre connu d'agents pathogènes et en observant le nombre de morts au cours du temps (Reichelderfer, 1993).

synthese experimentale

présentation des zones d'études

I. Présentations des stations s'études dans la région de Blida

Le site d'étude de Blida est l'oued Beni Azza, nous l'avons divisé en deux stations bien éloignées (Figure 15), la première station à l'amont là où l'oued prend naissance sur les hauteurs de Chréa et la deuxième station à l'aval de l'oued au niveau de la commune de Beni Mered.

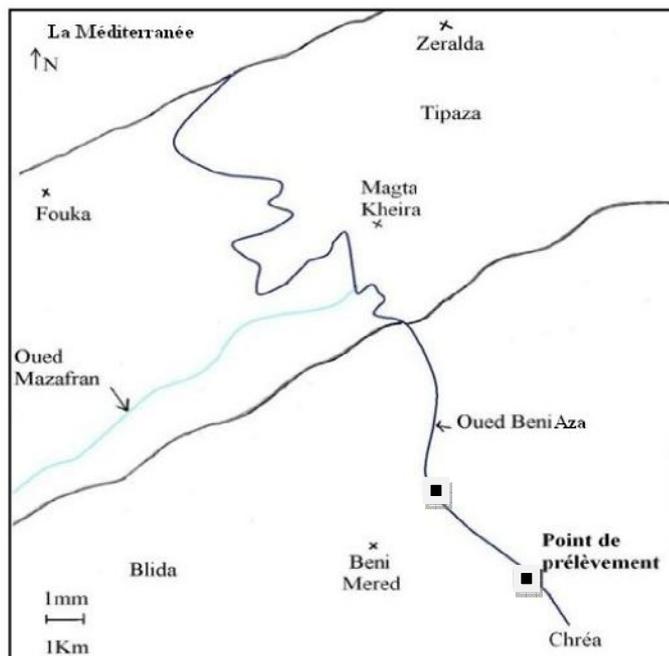


Figure 15: carte schématique des deux stations du site d'étude

II. Présentation des stations d'étude de la région de Bordj Bou Arreridj

La station d'étude de la ville de Bordj Bou Arreridj est une ferme située à 12 km du centre ville, la ferme contient un grand bassin d'eau stagnante pour alimenter la culture des terres, nous l'avons séparé en quatre parties

III. Matériel de récolte des espèces de culicidés

Le matériel de récolte est constitué de :

- Bouteilles en plastique d'un litre et demi
- Une louche de 1 L
- Un bac en plastique
- Des gants
- Des étiquettes et Coton

IV. Collecte des larves

Les larves ont été collectées aux niveaux des différents gîtes : G1, G2 pour la région de Blida et G1, G2, G3, G4 pour la région de El bordj (Figure 16 ,17)



Figure 16 : Gîtes larvaires Blida (photos original)

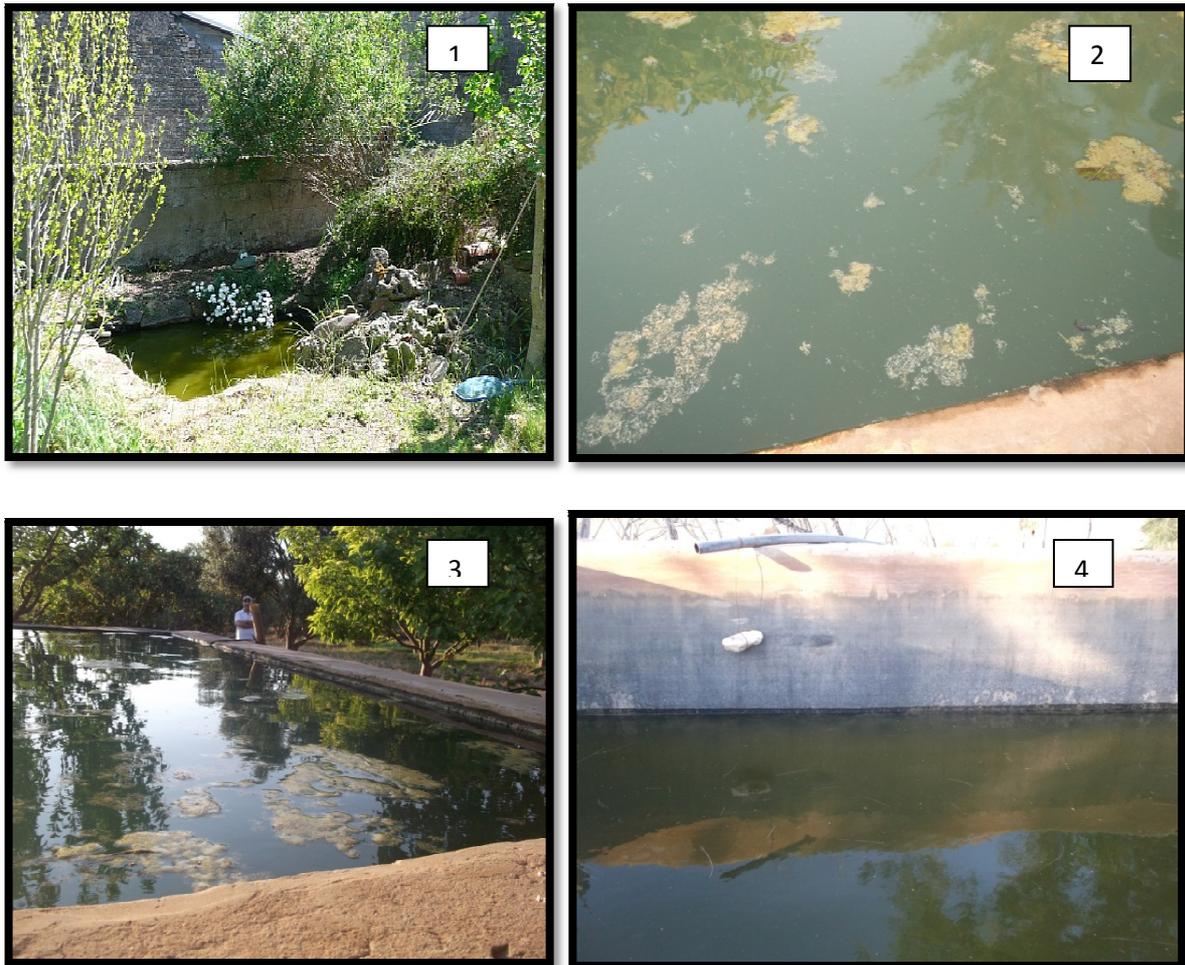


Figure 17 : Gîtes larvaires de Bordj Bou Arreridj (photos original)

La méthode de collecte utilisée est celle du «Dipping» ou trempage (Papierok et.al, 1975) Elle consiste à prélever l'eau du gîte à l'aide d'une louche ou d'un petit récipient, nous avons plongé la louche rapidement dans l'eau plusieurs fois en diversifiant les points de prélèvement (10 prélèvements par Gîte) , le contenu de la louche a été versé à chaque fois dans un bac en plastique

Les spécimens collectés ont été transportés au laboratoire d'entomologie à l'institut national de santé publique (INSP, Algé) pour l'identification des espèces ; Les larves ont été séparées des lymphes à l'aide d'une pipette compte goutte et mises dans des bacs étiquetés (voir annexe 04) Après toute cette opération, il est essentiel de densifier la population larvaire du gîte. Ainsi sur chaque site, la densité larvaire est appréciée par le nombre de larves récoltées par prélèvement. La formule de la densité larvaire est la suivante :

$$D = \frac{L}{NV} \%$$

Avec: L le nombre total de larves obtenues; N le nombre de prélèvements; V le volume de la louche.

V. Montage et détermination des espèces

L'identification des espèces de moustiques collectés a été réalisée au niveau du laboratoire d'entomologie à l'institut national de santé publique d'Alger (INSP).

Après éclaircissement dans une solution de potasse (KOH) à 10 % (10 minutes), rinçage à l'eau distillée dans trois bains pendant 2 à 3 minutes, Une déshydratation par passage dans l'alcool à concentration croissante (70°, 90° et 100°) pendant 15 minutes a été réalisée afin d'éliminer l'eau contenue dans l'échantillon (Figure 18). Montage entre lame et lamelle est réalisé dans une goutte de Baume de Canada (Figure 19).

Pour la détermination des spécimens, nous avons utilisé les clés d'identification des larves proposées par (Rioux 1958).



Figure 18 : Matériel biochimique et les étapes de l'éclaircissement



Figure 19 : Montage des spécimens sur lame lamelle

Nous avons suivi un certain nombre de critères pour pouvoir identifier les larves.

- **Identification du genre**

a-Tête :

- Longueur de l'antenne est le premier critère d'identification du genre (**fig 20**)
- Structure hypostomale (suture maxillaire): Complete ou nettement marquée (**figure20 a,b**)

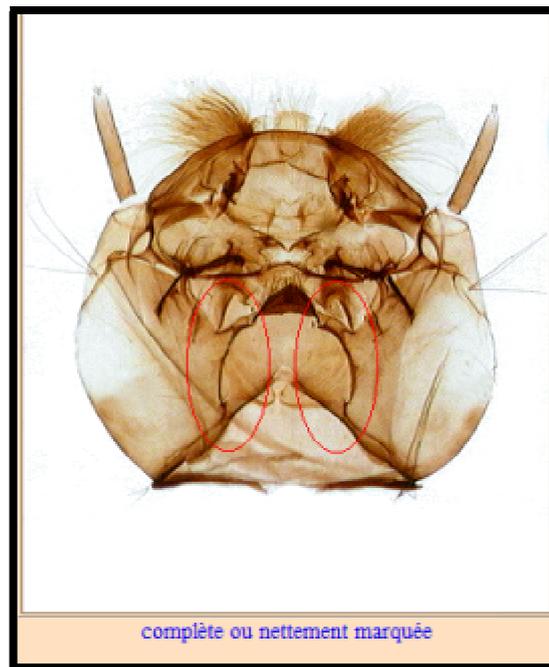
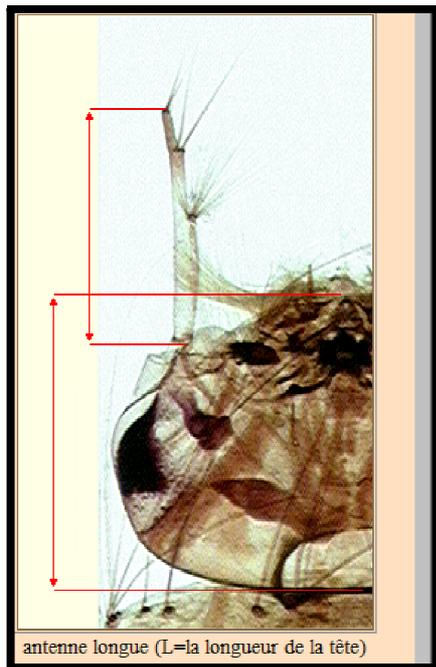


Figure 20 (a et b) : Structure de la suture maxillaire et longueur de l'antenne dans d'identification du genre *Culex* (**Brunhes et al, 1999**)

Abdomen :

- Position de l'orifice respiratoire (siphon) est l'une des critères les plus marqués pour l'identification du genre dans ce cas l'orifice respiratoire s'ouvre à l'extrémité d'un tube cylindrique (figure)
- Ornementation du siphon Avec peigne basale et plusieurs touffes de soies ventrales (figure21 a,b)

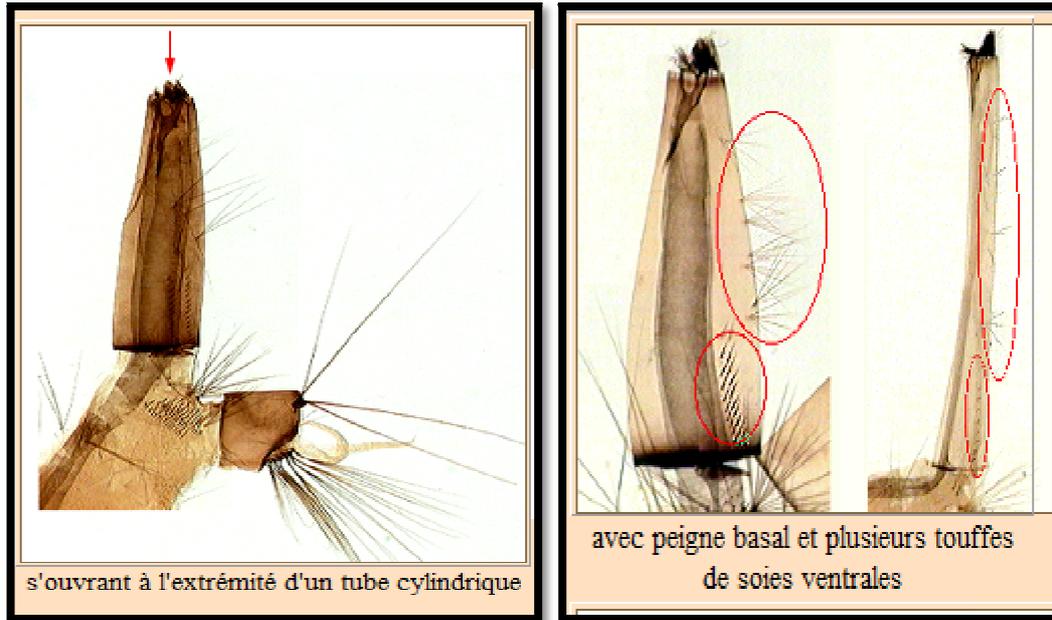


Figure 21(a et b) : critère d'identification du genre *Culex* (position de l'orifice respiratoire et ornementation du siphon) (**Brunhes *et al*, 1999**)

- **Identification de l'espèce :**

a. Tête

- Taille de l'antenne et de la soie antennaire 1-A
- Ornementation du tégument de l'antenne est lisse

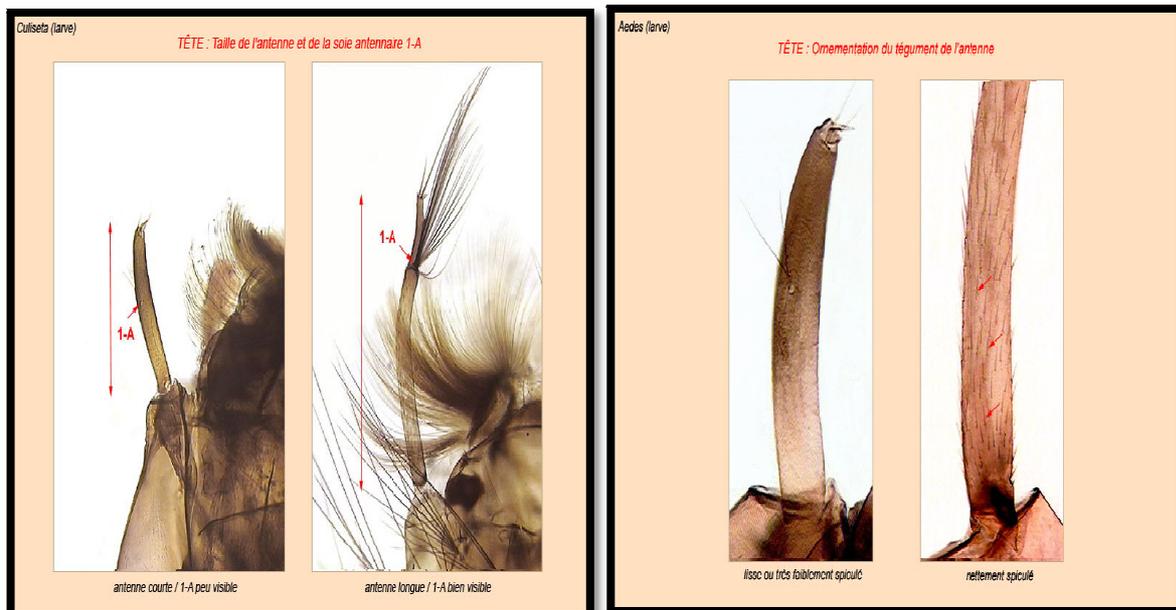


Figure 22 : *Culiseta* la tête Ornementation du tégument de l'antenne

B. Abdomen

- Taille et forme du siphon est courte et trapu
- Extension du peigne du siphon dépasse la moitié du siphon

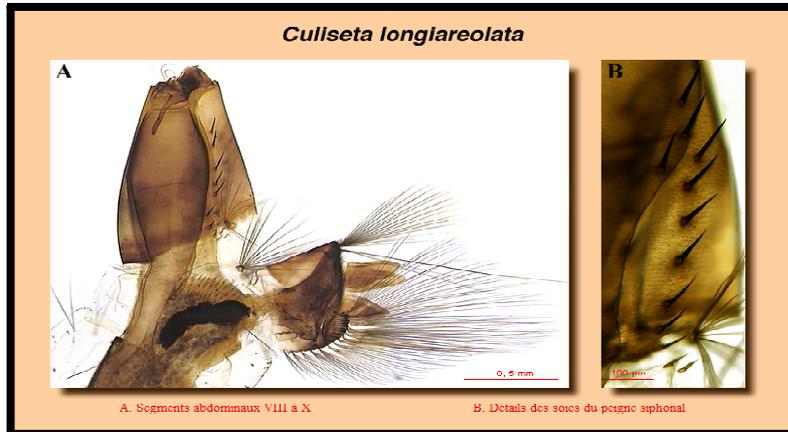


Figure 23: *Culiseta longiareolata* caractères du siphon les clés d'identification des larves proposées par (Rioux, 1958).

L'identification de cette espèce ne présente pas de difficultés ; ses antennes non spéculées et son siphon court presque conique, sont des caractères très originaux.

Etude de l'effet du *Metarhizium anisopliae* sur les larves *Culiseta* *longiareolata*

I. Isolement et identification du champignon entomopathogène *Metarhizium anisopliae*

I.1. La souche fongique

Les conidies de champignon *M. anisopliae* utilisées dans cette étude sont obtenues à partir d'un biopesticide Green Muscle® en prévenance de l'Institut National de la Protection des Végétaux d'El Harrach, Alger. La multiplication de ce champignon a été réalisé sur un milieu de culture nutritif PDA (Potatos Dextrose Agar) dans des boites de Pétri incubées à une température de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ pendant trois semaines.

I.2. Milieux de culture

Le milieu choisi est:

PDA : Potatos Dextrose Agar préparé, ce milieu est composé selon RAPILLY (1968) Selon la methode de (Clark et al. 1985 ; Ulacio et al, 1997) Pour préparer les suspensions, 1g de poudre sporale du Green Muscle (Figure 22-a) dilué dans 10 ml d'eau distillée stérile, puis une série de dilutions décimales a été effectuée. Après la préparation des dilutions, une agitation vigoureuse à l'aide du Vortex a été réalisée afin de permettre une bonne homogénéisation des solutions.

Par ailleurs selon (Ikasari et Mitchell, 1994), les milieux ont été ensemencés par étalement dans des boites de Pétri à raison de 1ml par dilution. Les boites ont été incubées à dans une étuve (BINDER) à 25°C et observées quotidiennement pendant trois semaines (Figure 24).

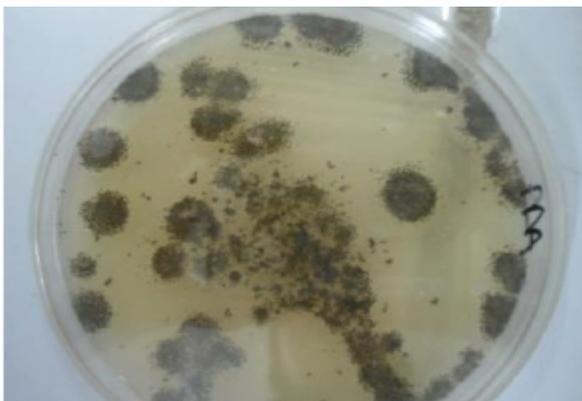


Figure 24 : milieu PDA metarhizium anisopliae .

I.3. Méthode de préparation de la solution entomopathogène

La préparation de l'inoculum a été réalisée

- 1- par grattage de la surface de la boîte de Pétri contenant le milieu PDA , ou Les souches de *Metarhizium anisopliae* ont été multipliées :solution de metarhizium anisopliae en culture (SMAC)
- 2- directement a partir d'une suspension mère préparer a base de spore du biopesticide Green Muscle , en prévenance de l'Institut National de la Protection des Végétaux d'El Harrach. :solution a base de Green Muscle (SGM)

Notre objectifs était d'établir une comparaison entre l'effet larvicide de *M. Anisopliae* a l'état vivant dans la nature (en culture) et la forme résistante (spore)

➤ A partir de la culture (SMAC)

A l'aide d'une pipette pasteur les surfaces des boîtes sont grattées ,la gratture obtenue est versée dans une petite fiole contenant 10 ml d'eau physiologique, puis agitation pendant 10 min. Après filtration du mélange , le filtrat est conservé dans un tube à essais hermétiquement fermé à 4°C (voir annex 04).

➤ A partir de la poudre sporale du biopesticide Green Muscle (SGM)

Dans un Erlen Meyer nous avons faire dilué 0,5g de poudre sporale avec 10 ml d'eau distillée , suivie d'une agitation pendant 10 min a l'aide d'un vortex , ajustement puis à ajouter l'eau distillée jusqu'a 100 ml dans un Erlen Meyer pour compléter la solution mère

I.3.1. Détermination de la concentration des spores

La concentration du champignon a été évaluée à l'aide de la cellule de Malassez, une dilution de 1/20^{ème} (1 ml du filtrat + 20 ml d'eau physiologique) a été réalisée.

- ✚ Comptage des spores contenu dans les six rectangles a donné : 37, 38, 46, 19, 16, 18, spores.
- ✚ La moyenne des spores par rectangle : $M = \Sigma \text{spores} / 6 = 174 / 6 = 29 \text{spores}$.
- ✚ La moyenne des spores dans la cellule entière : la cellule de Malassez contient 100 rectangles. Alors : $M_2 = 29 \times 100 = 2900 \text{spores} (2900 \text{ spores} / \text{mm}^3)$.
- ✚ Multiplication par coefficient de dilution (40ml), $2900 \times 40 = 116000$

I.3.2. Préparation des Doses

Après avoir obtenu La concentration mère de la solution entomopathogène des concentrations croissante de la solution sporale ont été ajoutés a différents volumes d'eau distillé Cinq différentes concentrations de la solution entomopathogène ont été obtenues et utilisées pour le traitement des larves ; 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , et 10^9 spores/ml (Fig 25).

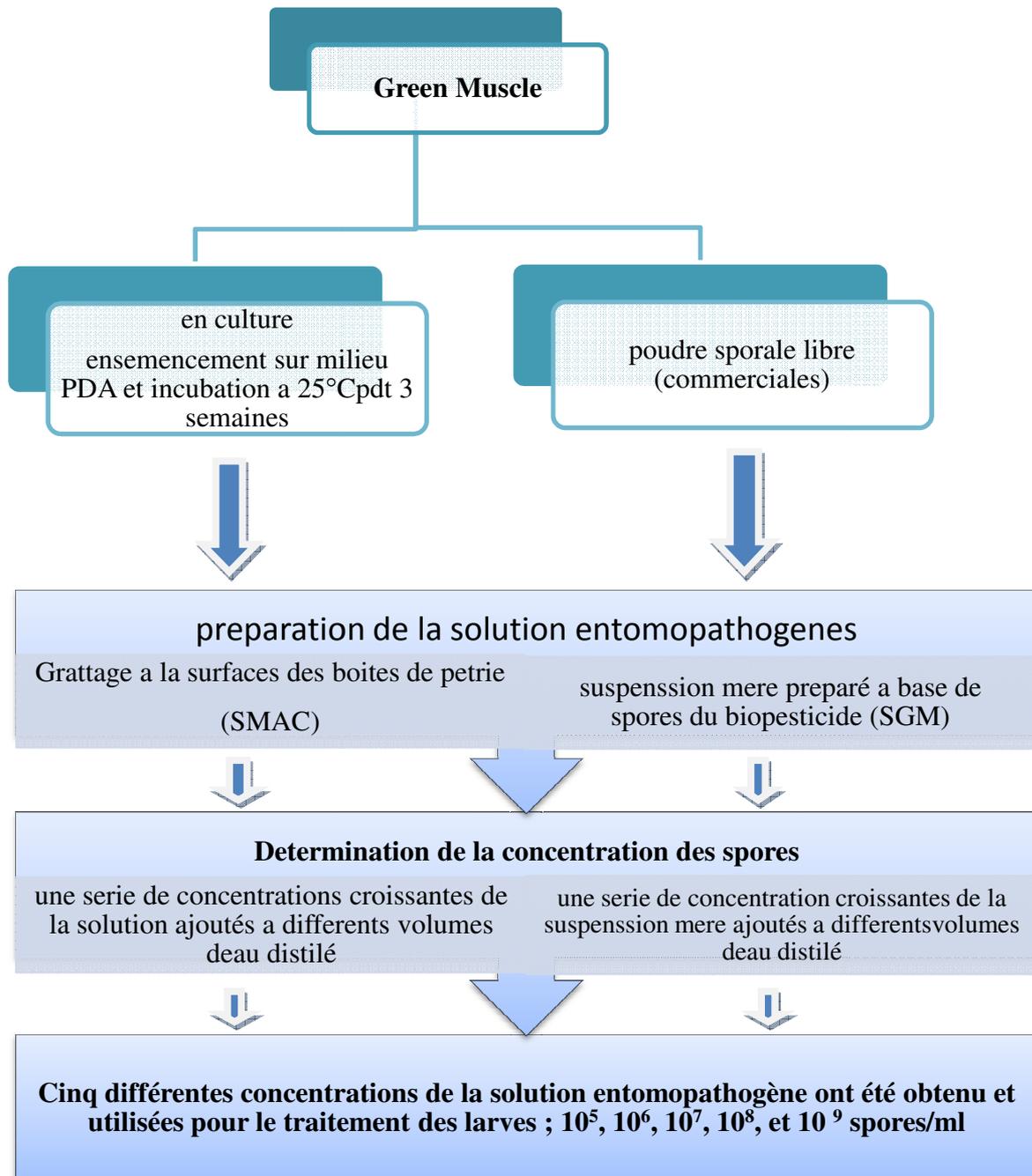


Fig 25 : schéma illustrant les étapes de la préparation des deux traitements

II. Réalisation des biotests

Pour les bio-essais nous avons sélectionné des larves de *Culiseta longiareolata* au 4^{ème} stade larvaire (L4)

II.1. Protocole expérimental

Un dispositif simple en blocs à 5 niveaux et à 3 répétitions pour les témoins et les 5 doses choisies a été élaboré afin de traiter les larves. Le dispositif consiste à

- Préparer 5 godets en plastique remplis à $\frac{3}{4}$ de l'eau du gîte
- Déposer dans chaque godet 25 larves au 4^{ème} stade
- Recouvrir chaque godet d'un morceau de tulle
- Renfermer avec un élastique en caoutchouc
- Mettre le dispositif au laboratoire à une température ambiante d'environ 25°C et traiter.

Les tests ont été réalisés avec les différentes concentrations de la solution entomopathogène dans des godets contenant chacun 50 ml de solution (49 ml eau distillée et 1 ml de la solution entomopathogène) et 25 larves de moustiques du 4^{ème} stade de la même espèce (Figure 26). Le même nombre de larves a été placé dans un godet témoin contenant 50 ml de l'eau distillée. Pour chacune des 5 concentrations de la solution entomopathogène ainsi que pour le témoin, trois répétitions ont été effectuées.

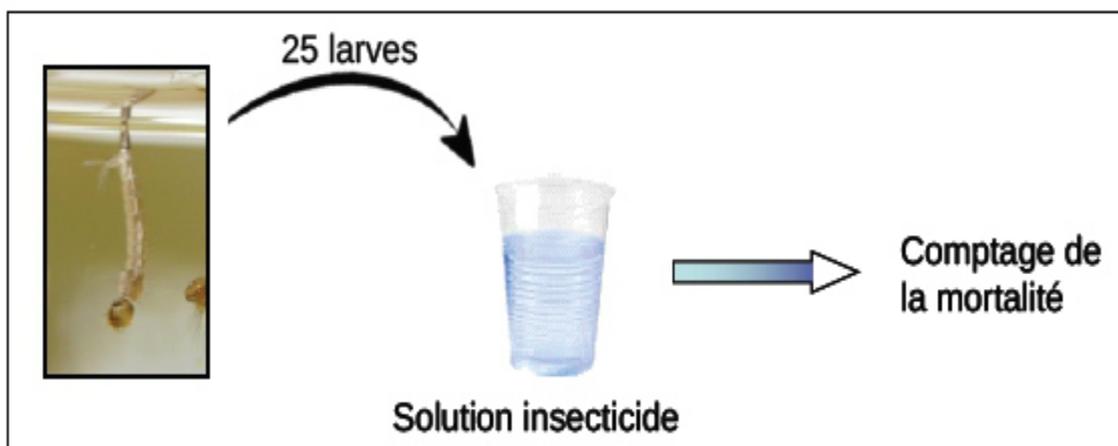


Figure 26: Protocole expérimental mettant en évidence de l'effet de *Metarhizium anisopliae* Sur la mortalité des larves L4

Ces 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) :

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

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

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

II.2. L'analyse Probit

D'après (Cavalier, 1976), pour estimer la DL50 (dose nécessaire et suffisante pour tuer la moitié d'une population) et de le TL50 (temps létal au bout du quel on obtient 50% de mortalité) nous avons utilisé pour chaque dose la transformation en Probit des pourcentages de mortalités corrigées 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 :

$$Y = ax + b$$

Y : probit des mortalités corrigées

x : logarithmes de la dose ou des temps

a : la pente

resultats et discussion

I-RESULTATS

I.I. identifications des différentes espèces de moustique récoltées

Résultats

L'identification des spécimens collectés dans les 2 gites d'oued Beni Azza et les 4 gites du bassin deau d'El Bordj nous a donnée les résultats suivants

Tableau 06 : résultats d'identification des espèces collectés dans les Gites de chaque région

Région Espèces	Blida		Bordj Bou Arreridj			
	Gite 01	Gite 02	Gite 01	Gite 02	Gite 03	Gite 04
<i>Culiseta longiareolata</i>	200	600	200	200	130	70
Total	800		600			

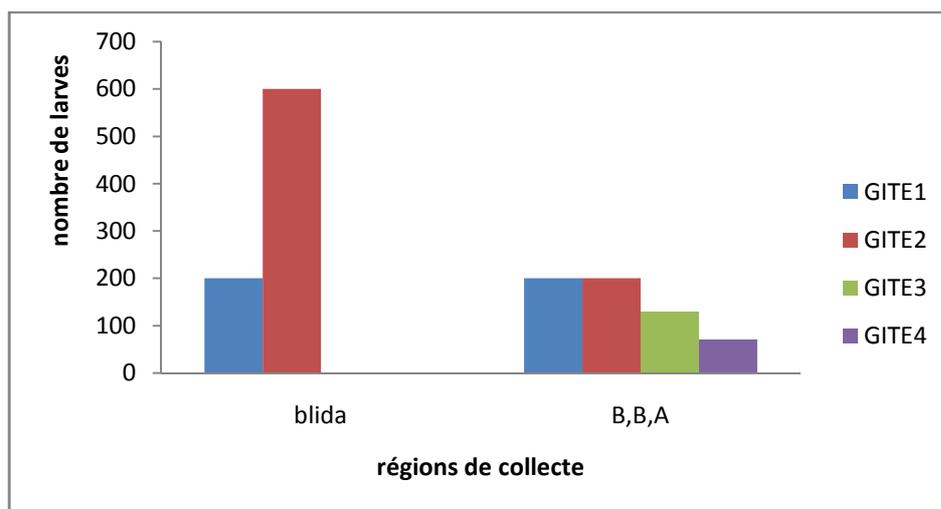


Figure 27 : Principales espèces de culicideae rencontrées dans les différents Gites

I.I.1. Estimation de la densité larvaire

La densité larvaire est appréciée par le nombre de larves et de nymphes récoltées par prélèvement

Tableau 07 : Estimation de la densité larvaire dans les différents Gite de chaque régions

Région	Blida		Bordj Bou Arreridj			
	Gite 01	Gite 02	Gite 01	Gite 02	Gite 03	Gite 04
Nbr total larve obtenu	200	600	200	200	130	70
Densité %	20	60	20	20	13	7

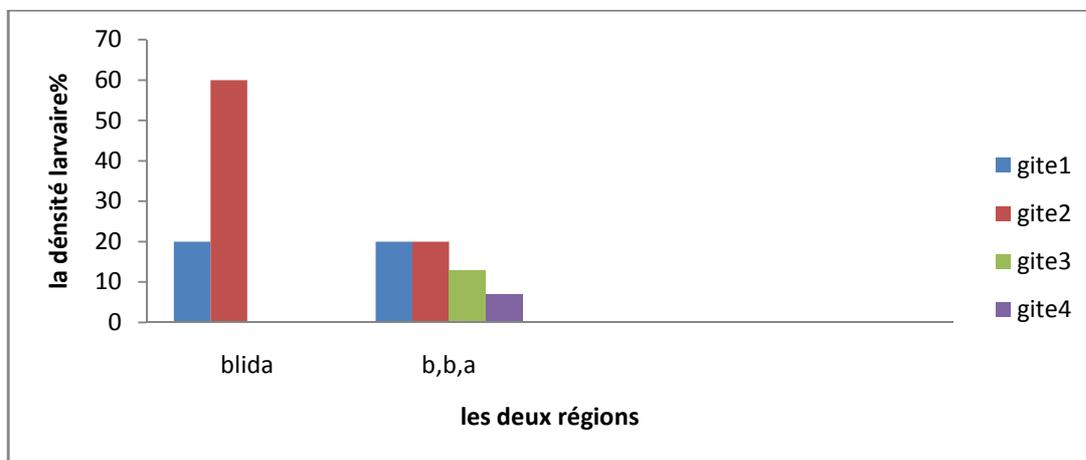


Figure 28 : Densité larvaire de chaque région

Interprétation

Sur une durée de trois mois de mai au juillet une seule espèce de *Culicidae* a été recensée dans les sites d'étude Oued Beni Azza et le bassin de Boredj Bou arreridj *Culiseta longiareolata*, cette espèce a été rencontrée dans tous les gîtes prospectés, et semble la plus dominante dans nos deux régions d'étude durant cette période d'expérimentation.

I.II - Position systématique de l'espèce identifiée :

Tableau 08 : position systématique de *Culiseta longiareolata*

Classification	
<u>Règne</u>	<u>Animalia</u>
<u>Embranchement</u>	<u>Arthropoda</u>
<u>Classe</u>	<u>Insecta</u>
<u>Sous-classe</u>	<u>Pterygota</u>
<u>Ordre</u>	<u>Diptera</u>
<u>Sous-ordre</u>	<u>Nematocera</u>
<u>Famille</u>	<u>Culicidae</u>
<u>Sous-famille</u>	<u>Culicinae</u>
<u>Genre</u>	Culista
Espece	<i>Culiseta longiareolata</i>

(Aitken, 1954)

I.II.1. Identification des larves de *Culiseta longiareolata*

Nous avons suivi un certain nombre de critères pour pouvoir identifier les larves.

I.II .1.1. Identification du genre :

a-Tête :

- Longueur de l'antenne est le premier critère d'identification du genre, les résultats obtenus sont les suivants : Antenne longue (L=la longueur de la tête)
- Structure hypostomale (suture maxillaire) : Complete ou nettement marquée

b-Abdomen :

- Position de l'orifice respiratoire (siphon) est l'une des critères les plus marqués pour l'identification du genre dans ce cas l'orifice respiratoire s'ouvre à l'extrémité d'un tube cylindrique .
- Ornementation du siphon Avec peigne basale et plusieurs touffes de soies ventrales.

D'après les résultats d'identification du genre nous avons trouvé le genre : *culiseta*

I.II.1 .2. Identification de l'espèce :

a.Tête

- Taille de l'antenne et de la soie antennaire 1-A
- Ornementation du tégument de l'antenne est lisse

B. Abdomen

- Taille et forme du siphon est courte et trapu
- Extension du peigne du siphon dépasse la moitié du siphon

L'identification de cette espèce ne présente pas de difficultés ; ses antennes non spéculées et son siphon court presque conique, sont des caractères très originaux.

I.III. Evaluation de l'effet larvicide du Green Muscle et *Metarhizium anisopliae* en culture sur les larves *Culiseta longiareolata*

I.III.1. Estimation du taux de la mortalité corrigé (MC) des larves traitées par la solution entomopathogène à base de Green muscle (SGM)

La mortalité des larves évolue avec les doses et la durée de traitement (Figure 29). Au bout de 10 jours aux différentes doses testées, une mortalité de 100% a été obtenue (Tableau 09).

Tableau 09 : Pourcentage moyen de mortalité des larves de *Culiseta longiareolata* traitées par *Metarhizium anisopliae* (SGM)

Temps (jours) / Doses (spores/ml)	Taux de mortalités des larves(%)									
	<i>J</i> ₁	<i>J</i> ₂	<i>J</i> ₃	<i>J</i> ₄	<i>J</i> ₅	<i>J</i> ₆	<i>J</i> ₇	<i>J</i> ₈	<i>J</i> ₉	<i>J</i> ₁₀
<i>D</i> ₀	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>D</i> ₁ (10 ⁵)	5.33	12	21.33	32	60	73	81.33	92	96	100
<i>D</i> ₂ (10 ⁶)	5.33	16	22.66	34.66	65.33	80	81.33	92	96	100
<i>D</i> ₃ (10 ⁷)	8	16	30.66	42.66	66.66	81.33	93.33	96	100	100
<i>D</i> ₄ (10 ⁸)	9.33	22.66	45.33	66.66	83.66	93.33	96	100	100	100
<i>D</i> ₅ (10 ⁹)	20	36	61.33	89.33	97.33	100	100	100	100	100

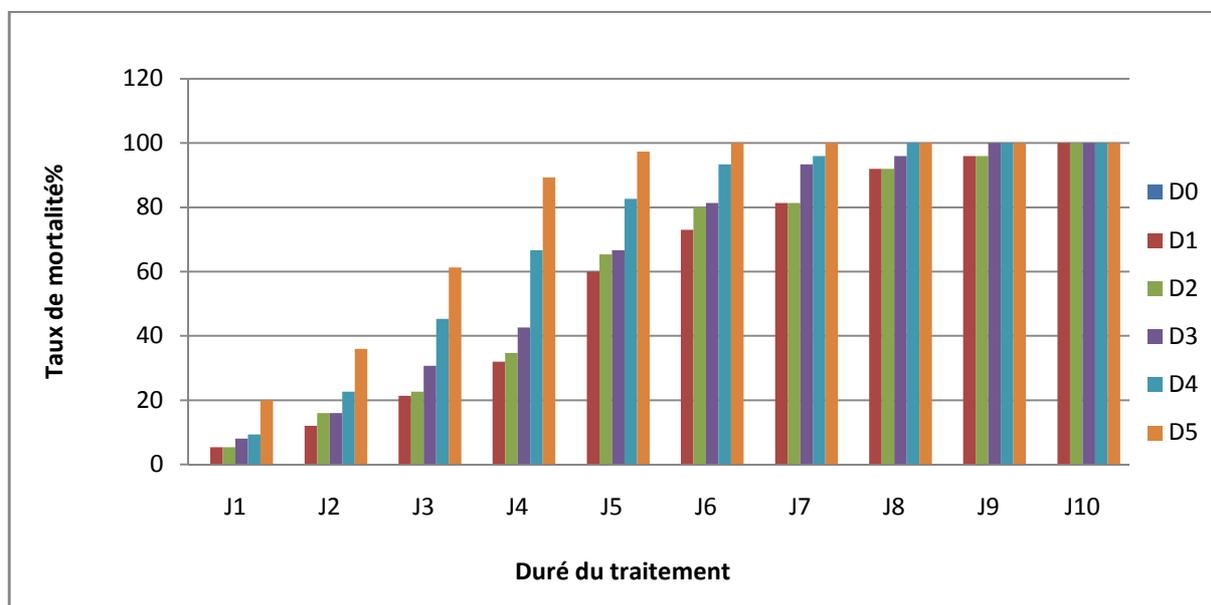


Figure 29 : Pourcentages de mortalité des larves de *Culiseta longiareolata* après 10jour de traitement par (SGM)

Interprétation

Le tableau (09) et la figure(29) montrent que la mortalité des larves traitées par la souche M2 a commencé à partir du 1ier jour de traitement pour les 5 doses(D1, D2,D3,D4 et D5) avec

des taux respectifs de 5,33, 5,33, 8, 9,33 et 20% pour atteindre les 100% le 6^{ème} jour pour la dose D5, le 8^{ème} jour pour D4, 9^{ème} jour pour la D3 et le 10^{ème} jour pour la D2 et la D1 respectivement .

I.III.1.1. Calcul de la DL50

Une fois la transformation des pourcentages de mortalité en Probits. Correspondant à 3 jours après le traitement et les doses en Log décimaux effectués (Tableau 10). Nous avons déterminé la DL_{50} à partir de l'équation issue de la droite de régression (Figure 30)

Tableau 10: Logarithmes décimaux des doses et Probits des taux de mortalités au 3^{ème} jour

Doses (spores/ml)	D1 (105)	D2 (106)	D3 (107)	D4 (108)	D5 (109)
Logarithme décimal des doses	5	6	7	8	9
Pourcentages de mortalité	21,33	22,66	30,66	45,33	61,33
Probits des pourcentages de mortalité	4,19	4,23	4,48	4,87	5,28

A partir de la droite de régression qui suit nous avons déterminé la DL50 chez les larves de Une seule espèce de *Culicidae* a été recensées dans les sites d'étude oued beni azza et le bassin de Boredj Bou Arreridj *Culiseta longiareolata* : $Y = 0,282x + 2,636$ avec $R^2 = 0,931$ Pour une mortalité de 50% , Y est égale à 5 (Probit)

$$x = \frac{5 - 2,636}{0,282} \quad x = 8,38$$

$$\text{antilog } x = 2,41534960$$

Cette concentration a été arrondie à 2,4 .108 spores/ml

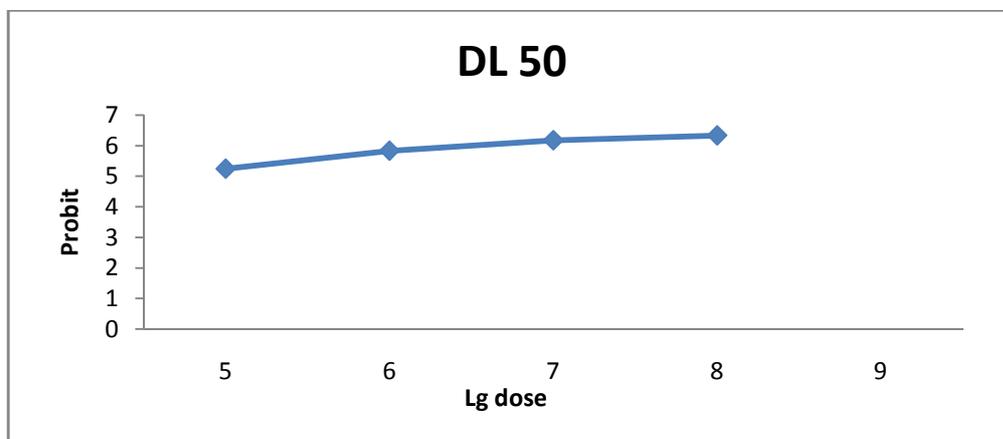


Figure 30: Efficacité de *Metarhizium anisopliae* (SGM) vis-à-vis des larves de *Culiseta longiareolata*

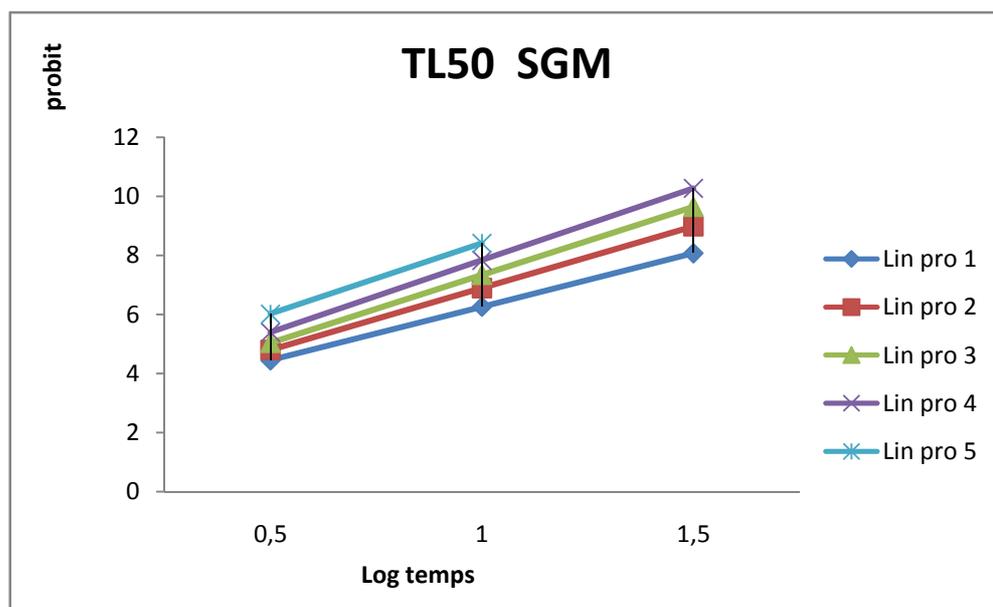
I.III.1.2. Calcul des TL50

Pour calculer les TL50, nous avons transformé les pourcentages des mortalités en probit et le temps en log décimal (Tableau 16 en annexe 02).

A partir des équations des droites de régressions (Figure 31) nous avons calculé les valeurs des TL50 portées sur le tableau 11 pour chaque dose.

Tableau 11: Equations des droites de régressions et valeurs des TL50 pour chaque dose de traitement utilisée.

Doses	Equations des droites de régressions	R2	TL50 (jours)
D1 : 105 spores/ml	$Y = 3,7718x + 2,7927$	0,920	3,85
D2 : 106 spores/ml	$Y = 4,1809x + 2,7104$	0,854	3,53
D3 : 107 spores/ml	$Y = 4,6053x + 2,7369$	0,846	3,10
D4 : 108 spores/ml	$Y = 4,8789x + 2,9584$	0,907	2,62
D5 : 109 spores/ml	$Y = 4,7798x + 3,6284$	0,921	1,94



Lin pro :lineaire probits

Figure 31: Efficacité de *Metarhizium anisopliae* (SGM) dans le temps vis-à-vis des larves de *Culiseta longiareolatas* traitées par les différentes doses (D1, D2, D3, D4 et D5).

I.III.2. Estimation du taux de la mortalité corrigé (MC) des larves traitées par la solution entomopathogène à base de *Metarhizium anisopliae* en culture

Il est à noter que les observations sur 7 jours sont faites dans le but de vérifier l'efficacité des traitements appliqués sur le stade larvaire L4 de *Culiseta longiareolata* avec le champignon *Metarhizium anisopliae* (SMAC)

Les essais biologiques de *Metarhizium anisopliae* (SMAC) sur les larves de *Culiseta longiareolata* ont montré que le début de mortalité des larves traitées avec les 5 doses, a été enregistrée dès le 1ier jour. Ou nous avons remarqué une mortalité massive des larves traitées.

Les résultats relatifs aux pourcentages de mortalités moyennes des larves traitées sont mentionnés dans le tableau 12 et représentés par la figure 32.

Tableau 12 : Pourcentage moyen de mortalité des larves de *Culiseta longiareolata* traitées par *Metarhizium anisopliae* (SMAC)

Temps (jours) / Doses (spores/ml)	Taux de mortalités des larves(%)									
	<i>J</i> ₁	<i>J</i> ₂	<i>J</i> ₃	<i>J</i> ₄	<i>J</i> ₅	<i>J</i> ₆	<i>J</i> ₇	<i>J</i> ₈	<i>J</i> ₉	<i>J</i> ₁₀
<i>D</i> ₀	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>D</i> ₁ (10 ⁵)	60	80	88	92	96	96	100	100	100	100
<i>D</i> ₂ (10 ⁶)	80	92	96	96	96	98.66	100	100	100	100
<i>D</i> ₃ (10 ⁷)	88	96	100	100	100	100	100	100	100	100
<i>D</i> ₄ (10 ⁸)	92	100	100	100	100	100	100	100	100	100

Interprétation

Les résultats portés sur le tableau 12 montrent que la mortalité chez les témoins est nulle. Les pourcentages de mortalité corrigés sont égaux aux pourcentages de mortalités observés et une mortalité supérieure à 50% a été observée à partir du 1ier jour. Le graphe des mortalités cumulées représentées sur la figure 32 présentent la même allure et évoluent dans le même sens, se caractérisent par un décalage dans le temps en réponses aux doses aux quelles les larves ont été soumises

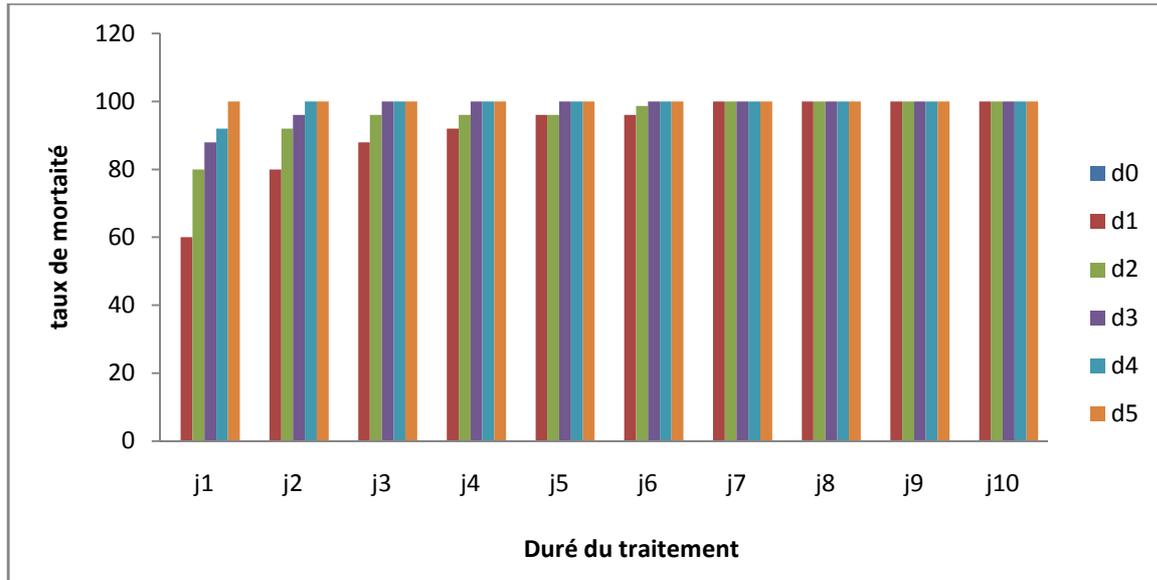


Figure 32: Pourcentage de mortalité des larves de *Culiseta longiareolata* après 7 jours de traitement par *Metarhizium anisopliae* (SMAC)

I.III.2.1. Calcul de la DL50

La DL50 a été déterminée à partir de l'équation issue de la droite de régression (Figure 33) qui a été élaborée à partir de transformation des pourcentages de mortalité en probits. correspondant au 1ier jour après le traitement, et des doses en log décimaux (Tableau 13).

Tableau 13 : Logarithmes décimaux des doses et Probits des taux de mortalité au 1ier jour

Doses (spores/ml)	D1 (105)	D2 (106)	D3 (107)	D4 (108)	D5 (109)
Logarithme décimal des doses	5	6	7	8	9
Pourcentages de mortalité	60	80	88	92	96
Probits des pourcentages de mortalité	5.25	5.84	6.18	6.34	6.75

$$Y = 0,357x + 3,587 \quad R^2 = 0,9698$$

$$x = 3,957$$

Cette concentration a été arrondie à 8,9.103 spores/ml

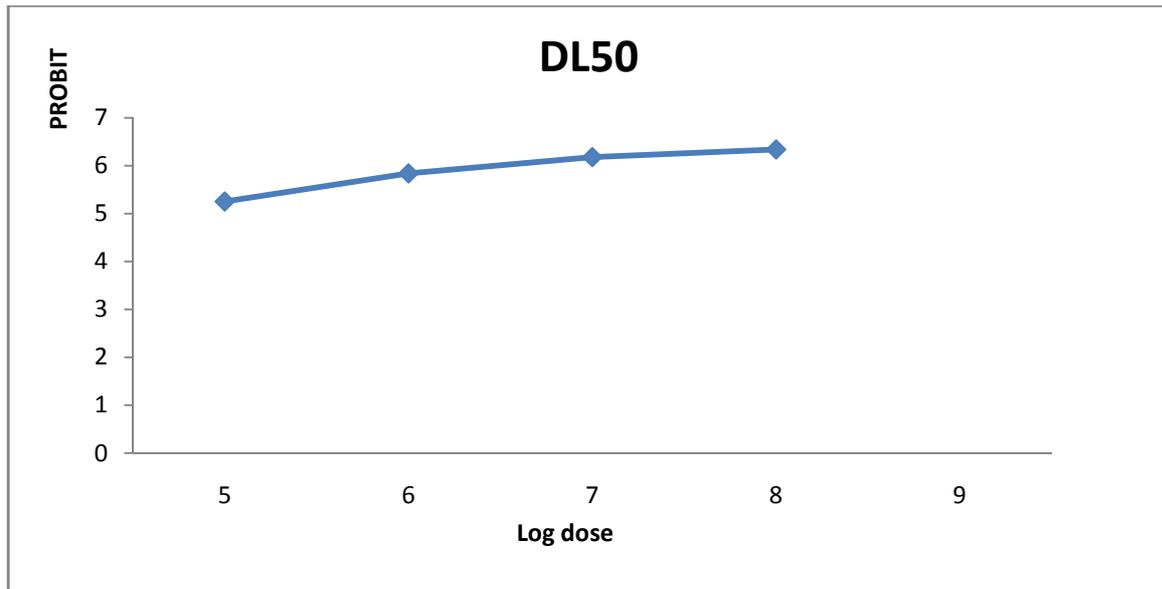


Figure 33 : Efficacité de *Metarhizium anisopliae* (SMAC) vis-à-vis des larves de *Culiseta longiareolata*

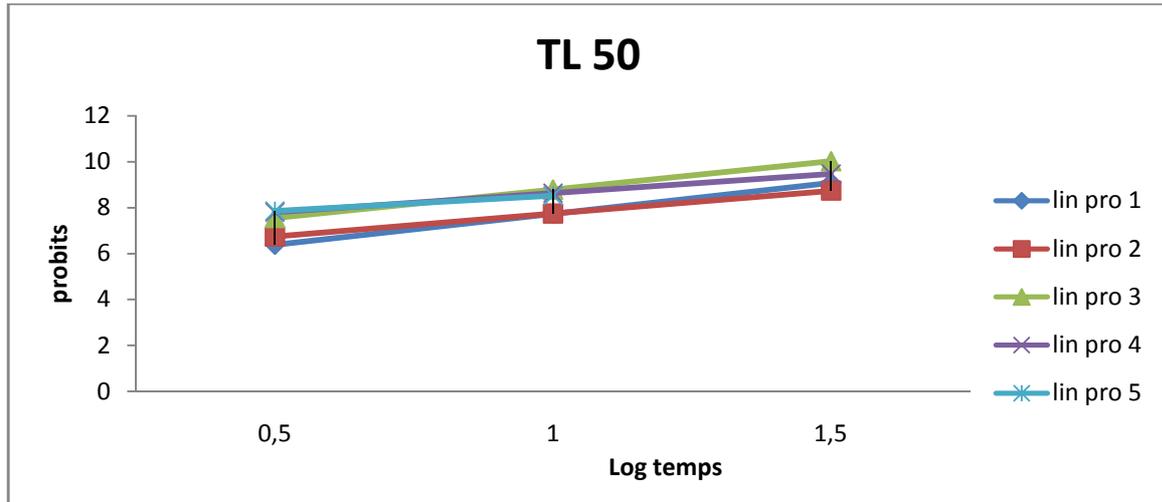
I.III.2. 2. Calcul des TL50

Le calcul des TL50 rapporté aux doses nous renseigne sur l'importance de l'effet du champignon dans le temps. Les probits des pourcentages de mortalité ainsi que le logarithme décimal des temps pour chaque dose sont portés sur le tableau 17 en (Annexe 03).

10 portées sur le tableau 14 pour chaque dose.

Tableau 14: Equations des droites de régressions et valeurs des TL50 pour chaque dose de traitement utilisée

Doses	Equations des droites de régressions	R2	TL50 (jours)
D1 : 105 spores/ml	$Y = 2,6875x + 5,0428$	0,8128	0,96
D2 : 106 spores/ml	$Y = 1,9893x + 5,7514$	0,7541	0,42
D3 : 107 spores/ml	$Y = 2,4682x + 6,3176$	0,8283	0,29
D4 : 108 spores/ml	$Y = 1,6643x + 6,9679$	0,6126	0,06
D5 : 109 spores/ml	$Y = 1,3275x + 7,195$	0,8589	0,02



Lin pro :lineaire probits

Figure 34 : Efficacité de *Metarhizium anisopliae* (SMAC) dans le temps vis-à-vis des larves de *Culiseta longiareolata* traitées par les différentes doses (D1, D2, D3, D4 et D5)

I.IV. comparaison de l'effet larvicide des deux traitements (SGM) et (SMAC)

Pour cela nous avons calculés les moyennes des taux de mortalités des culisetas traités par le Green Muscle et le metarhizium anisopliae en culture ,les resultats sont mentionnés dans le tableau 15 et représentés par la figure35

Tableau 15 : moyennes des taux de mortalités des culisetas traités par le Green Muscle et le metarhizium anisopliae en culture

Moyenne /Doses	Green Muscle (SGM)	Métarhizium anisoplia (SMAC)
Moyenne dose D_0	00	00
Moyenne dose D_1	57.3	91.2
Moyenne dose D_2	59.3	95.9
Moyenne dose D_3	63.5	98.4
Moyenne dose D_4	71.5	99.2
Moyenne dose D_5	80.4	100

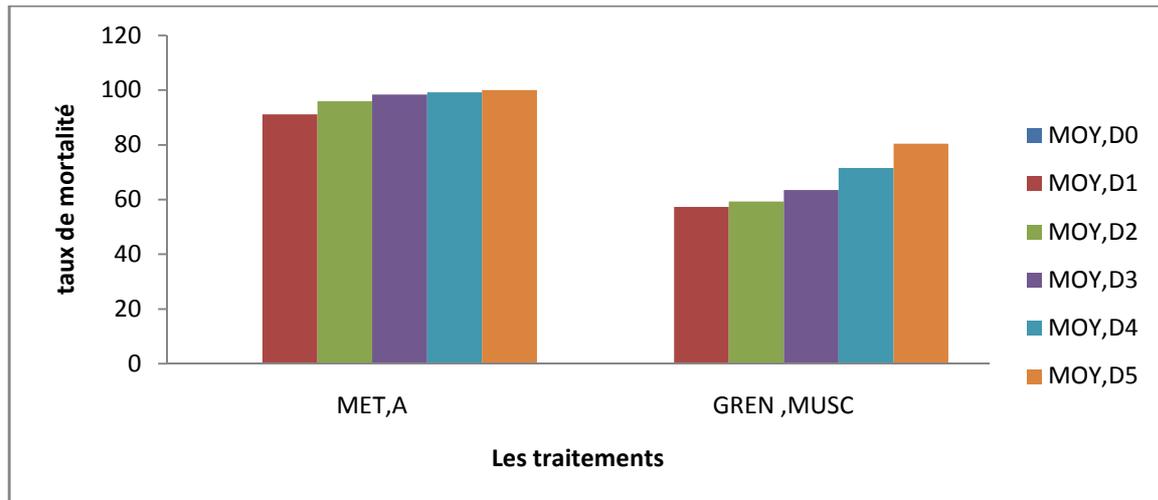


Figure 35 : comparaison de l'efficacité des deux traitements (SGM) et (SMAC)

Interprétation

D'après les moyenne de mortalité nous avons remarqué que la mortalité des larves traitées avec la (SMAC) est plus rapide et intense par rapport à la mortalité des larves traitées avec la solution (SGM) . La mortalité complète des larves à été atteinte au 2ème jour pour la (SMAC) , 6 émejour pour la region de Bordj avec la (SGM) .

II. Discussion

La majorité des insectes sont sensibles aux microorganismes dont les champignons, les bactéries et les virus (Scholte et al, 2004). Approximativement, 750 espèces de champignons décrites sont des pathogènes obligatoires ou facultatifs sur un ou plusieurs stades de développement des insectes dans des habitats aquatiques, terrestres et souterrains (McCray et al., 1973).

au cours de notre étude Une seule espèce de Culicinae a été récolté au niveau des différents gîtes prospectés : il s'agit de *Culiseta logiareolata* Ceci est du probablement à sa large répartition (**Brunhes, 2001**), Cette espèce est multivoltine peut présenter une diapause hivernale chez les imagos femelle (région froides) et chez les larves (région tempérées). Les adultes sont présents toute l'année avec un maximum de densité au printemps et un autre en automne. se rencontre dans les gîtes artificiels et naturels (**Rioux,1958**). **Lounaci (2003)** a signalé son existence dans le gîte de marais de Reghaia, dans les gîtes de l'Institut agronomique d'El Harrach et au niveau de l'étable d'El-Alia. (**Agoun, 1996 ;Berchi, 2000**)

ont signalé la présence de cette espèce dans différents types de gîtes à Constantine. **Hamaidia (2004)** signale son existence dans des gîtes pollués, des gîtes permanents à eau stagnante riche ou pauvre en végétation et dans des gîtes temporaires à eau stagnante ou courante avec ou sans végétation, dans les régions de Tébessa et Souk- Ahras.

Le recensement d'une seule espèce *Culiseta longirualta* est probablement du au programmes de lutte contre le paludisme en Afrique (INSP., 2015), aussi la région de Blida a bénéficiée d'un programme de prévention par pulvérisation d'insecticide ce qui a permis d'éradiquer la plupart des espaces et de mettre un point sur le phénomène de résistance développé par le système immunitaire chez les *Culiseta*

De même nous avons testé et comparé deux sortes d'inoculum préparé avec une souche fongique entomopathogène de *Metarhizium anisopliae* mise en culture et de spore du biopesticide Green Muscle, en prévenance de l'Institut National de la Protection des Végétaux d'El Harrach contre les larves du 4ème stade de *Culiseta longirualta* avec différentes concentrations. Nos résultats ont montré un effet significatif quant à la mortalité

des larves. En effet nous avons remarqué que le taux de mortalité des larves témoins utilisées pour les 2 tests était nul. Ces mêmes résultats ont été constatés par (Alves et al., 2002) ou ils n'ont enregistré aucune mortalité des larves témoins durant la période des bio essais.

En effet, nous avons aussi constaté que ce champignon agit dès le premier jour du traitement. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par (Alves et al., 2002) qui ont enregistré un début de mortalité des larves de *Culex quinquefasciatus* traitées par *Metarhizium anisopliae* à partir du 1^{er} jour de traitement. Cependant le pourcentage de mortalité des larves était de 50% après 24h traitées à la dose 10^9 spores/ml avec la solution entomopathogène à base de *Metarhizium anisopliae* en culture (SMAC). Ce même taux de mortalité a été enregistré sur les larves traitées avec les spores de Green Muscle (SGM) après 3 jours. Nos résultats vont dans le même sens que ceux obtenus par Alves et al, (2002) ou ils ont enregistré un taux de mortalité 50% des larves de *Culex quinquefasciatus* traitées par *Metarhizium anisopliae* 1037 par le mode de contact après 24h.

Ensuite, nous avons comparé l'efficacité de la solution entomopathogène à base de *Metarhizium anisopliae* en culture (SMAC) et sous forme de poudre sporale Green Muscle (SGM) sur les larves L4 du *Culiseta longiareolata*, d'après les résultats de mortalité nous avons remarqué que la mortalité des larves traitées avec la (SMAC) est plus rapide et intense par rapport à la mortalité des larves traitées avec la solution (SGM). La mortalité complète des larves a été atteinte au 2^{ème} jour pour la (SMAC) et au 6^{ème} jour pour la (SGM). Nos résultats corroborent ceux obtenus par (Alves et al., 2002) qui ont étudié la comparaison de l'effet des deux souches de champignons *Metarhizium anisopliae* 1037 et *Metarhizium anisopliae* E9 sur les larves de *Culex quinquefasciatus*. Ils ont trouvé que la souche *M. anisopliae* 1037 est plus virulente que *M. anisopliae* E9, avec un taux de mortalité de 93,33% après 5 jours de traitement par rapport à un taux de mortalité de 55,55% de *M. anisopliae*

D'après Roberts (1967) ce champignon entomopathogène attaque les larves de moustiques préférentiellement par le siphon respiratoire. C'est pourquoi ce germe tue davantage de moustiques lorsqu'il est appliqué à la surface de l'eau. Mais, en fait si les larves sont mises dans des suspensions conidiennes de fortes concentrations (10^7 spores/ml) le champignon peut tuer celles-ci avant toute colonisation fongique intrahémocoelienne. Les faits rapportés par cet auteur sont en totale concordance avec nos résultats (Benserradj et Mihoubi, 2014).

L'étude de la virulence du champignon entomopathogène *Metarhizium anisopliae* vis-à-vis de différentes espèces de moustiques à fait l'objet de plusieurs travaux :

Des essais au laboratoire réalisés par Daoust et Roberts (1982) pour l'étude de l'effet de cette même souche sur la mortalité des larves de *Culex pipiens*, *Culiseta longiareolata* et ont révélé un taux de mortalité de 50% après 3 jours de traitement en utilisant une dose de 1mg de conidies. Contrairement à Ramoska (1982) qui a observé ce taux de mortalité au bout d'un mois.

Par ailleurs, Mohamed et al.,(1983) ont testé la sensibilité –résistance de *Culex pipiens*, *Culex quinquefasciatus* au *Metarhizium anisopliae* et ont affirmé que tous les stades du moustique sont très sensibles aux souches avec un taux de mortalité allant de 86 à 100% aux plus fortes doses, ce qui va dans le sens de nos résultats.

Lepage et al., (1992) ont utilisé plusieurs souches de champignons entomopathogènes (*Metarhizium anisopliae*, *Cordyceps militaris* et *Tolypocladium cylindrosporium*) en un plusieurs traitement afin de lutter contre quelques diptères piqueurs, Ils ont conclu que de toutes les souches testées, *Metarhizium anisopliae* semble le plus intéressant pour la lutte microbiologique contre les larves de diptères piqueurs. Dans ce sens Saint-Louis et al.,(2001) ont confirmé que *Metarhizium anisopliae* est un champignon promoteur pour une lutte biologique de par son efficacité sur tous les stades de développement d'un insecte et pourrait être un excellent candidat comme mesure alternative aux pesticides de synthèse dans le cadre d'une lutte biologique ou une lutte intégrée.

Les travaux de Ravallec et al.,(2003) ont démontré que *Metarhizium anisopliae* avait un effet distinct sur les larves d'*Aedes albopictus*. Ceux-ci ont développé la muscardine verte maladie due à *Metarhizium anisopliae* qui s'est propagé dans tout le corps des larves. En effet, ces mêmes auteurs ont révélé en 2006 que les larves d'*Aedes albopictus* soumises à de fortes doses de *Metarhizium anisopliae* ont montré une mort progressive (100% de mortalité au bout de 20 jours de traitement). Selon eux, si la dose de l'inoculum est assez élevée, les mycotoxines sont libérées dans l'hémocoel de l'insecte et c'est dans le mésantéron que les spores subissent une protéolyse alcaline (une larve de 4^{ème} stade ingère 3.10^5 spores).Effectivement, au fur et a mesure, les larves finissent par perdre leur capacité digestive.

L'étude de l'effet de la (SMAC) ainsi que la (SGM) sur la mortalité des larves de *Culiseta longiareolata*, nous montre que le traitement a mis en évidence une efficacité très hautement significative comparativement aux témoins et les larves ont été sensibles envers ces deux traitements malgré leur effet différent.

Après correction des pourcentages des mortalités obtenues après traitement des larves par la solution entomopathogène de *Metarhizium anisopliae* en culture, nous les avons convertis en probit selon la table des probits et nous avons également convertit le facteur temps et le facteur dose en logarithmes afin de calculer la DL50 et les TL50. Nos résultats ont abouti à une DL50= et $8,9.10^3$ spores/ml après 24h pour la souche en culture, une DL50 = $2,4.10^8$ spores/ml après le 3ème jour pour la (SGM). Les DL50 de ce champignon, enregistrées par les différents auteurs sont de 109.10^5 spores/ml sur les larves de *Aedes albopictus* (Hazrat et al., 2012) après 3 jours d'application. et 8ppm pour les larves de *Aedes triseritatus* (Lepage et al., 1992). Quant aux larves de *Culex quinquefasciatus*, les DL50 obtenues étaient respectivement $1,97.10^4$ spores/ml pour la souche *M. anisopliae* 1037 et $3,01.10^5$ spores/ml pour et *M. anisopliae* E9 (Alves et al., 2002).

Concernant les TL50, notre étude montre qu'ils sont inversement proportionnels aux doses appliquées. En effet, avec les traitements (SGM) et (SMAC), les TL50 relevés sont respectivement 1,94 et 0,02 jours représentant les temps les plus courts à la dose la plus élevée et des TL50 de 3,85 et 0,96 jours correspondant aux temps les plus longs à la dose la plus faible

Nos résultats corroborent ceux obtenus par Alves et al., (2002). Ces auteurs ont constaté que les LT50 différaient selon les doses appliquées et les méthodes d'application : un TL50 égale 1 jour quand ils avaient appliqué des conidies de *Metarhizium anisopliae* à la surface de l'eau et TL50 égale 3,6 jours après traitement avec la même souche sous forme de spores sèches.

Les résultats de l'effet larvicide de *Metarhizium anisopliae* que nous avons obtenus sont en corrélation avec ceux observés par plusieurs auteurs (Alves et al., 2002; Scholte et al., 2005; Amora et al., 2010) et permettent de conclure que les espèces de *Metarhizium anisopliae* testées quelque soit la méthode utiliser ont une action pathogène sur les larves de *Culiseta longiareola*

conclusion

Conclusion générale et perspectives

Dans ce présent travail de thèse, qui entre dans le cadre de l'axe d'évaluation de l'activité larvicide du champignon entomopathogène contre les larves de moustiques, nous nous sommes intéressés aux aspects microbiologiques du champignon entomopathogène *Metarhizium anisopliae*, deux parties ont été développées

- Les travaux de la première partie ont été orientés vers l'identification des espèces de moustiques collectés au niveau du laboratoire d'entomologie à l'institut national de santé publique d'Alger (INSP) et préparation de la solution entomopathogène .
- Dans la Deuxième partie des travaux de recherche de cette thèse, notre intérêt s'est porté vers les bio tests avec les deux inoculum contre les larves de *Culiseta longiareolata*

L'étude de l'effet des souches de *metarhizium anisopliae* en culture (SMAC) et la poudre sporale Green Muscle (SGM) a montré que le taux de mortalité des larves traitées augmente en fonction du temps et de la dose utilisée. La mortalité a commencé après le 1ier jour de traitement avec les deux inoculum (SMAC) et (SGM) pour les cinq doses D1 (10^5 spores/ml), D2 (10^6 spores/ml), D3 (10^7 spores/ml), D4 (10^8 spores/ml) et D5 (10^9 spores/ml) . Comparativement aux témoins (D0) aucune mortalité n'a été observée durant les biotests. En effet les pourcentages respectifs obtenus à partir du 1ier jour sont de 20%, pour les larves traitées par (SGM) et 96% pour les larves traitées par (SMAC) . En augmentant la dose la mortalité devient plus rapide, elle atteint 100% le 8ème jour après traitement Par (SGM) par contre, les larves traitées par état vivant en culture (SMAC) , leur mortalité était très rapide et intense, car nous avons enregistré 100% de mortalité le 2ème jour de traitement. Nous avons également pu calculer la DL50 et les TL50. La DL50 a été estimée à $2,4 \cdot 10^8$ spores/ml, et $8,9 \cdot 10^3$ spores/ml pour tuer 50% de larves traitées avec la (SGM) ainsi q'avec (SMAC) respectivement. Les résultats de la TL50 des larves traitées avec les deux solutions entomopathogene montrent que la sensibilité des larves est en fonction de la concentration de l'inoculum.

la comparaison de l'effet larvicide des deux traitements (SGM) et (SMAC) par calcul des moyennes des taux de mortalités des culisetas démontre l'intensité et la rapidité du traitement (SMAC) par rapport au (SGM)

En résumé, les résultats de ce modeste travail nous ont permis de confirmer et de préciser l'importance du potentiel toxémique de *Metarhizium anisopliae* à l'égard des larves de moustiques. Les études sur les toxines de cet agent, notamment en ce qui concerne l'approfondissement de leurs mécanismes d'action au niveau cellulaire et biochimique, devraient être faites afin d'arriver à la compréhension du mécanisme d'agression particulier que manifeste *M. anisopliae* chez les larves de moustiques sur un plan appliqué et fournir des données utilisables pour la mise au point de formulations appropriées de propagules de ce champignon pathogène, permettant à la fois le maintien de son potentiel d'infection et l'expression optimale de son effet toxémiques, ou de ses métabolites à propriétés insecticides

annexes

Annexe 1

Le Milieu de culture

PDAY (Potato dextrose agar yeast)

Pomme de terre.....	200g
Glucose	20 g
Agar.....	20g
Extrait de levure.....	2g
Dodine.....	50µg
Eau distillée.....	200ml

200g de pomme de terre épluchée, coupée en petits dès, ont été bouillée dans 500 ml d'eau distillée, puis filtré. Par ailleurs un mélange de 500 ml d'eau distillée avec le glucose est mélangé avec de l'Agar. Après agitation jusqu'à l'homogénéisation. A ce mélange on ajoute le filtrat obtenu. L'ensemble est autoclavés à 120°C pendant 20min pour la stérilisation. Après refroidissement, le milieu obtenu est coulé dans des boites de Pétri stériles.

Annexe 02

Tableau 16: Transformation du temps en Logarithme décimal et les pourcentages de mortalité cumulés des larves en Probits

	Log temp s	Temps (Jours)									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
		-	0.30	0.48	0.60	0.70	0.78	0.84	0.90	0.95	1
D1 (10 ⁵ spores/ml)	MC %	5,33	12	21.33	32	60	73.3 3	81.33	92	96	97.3 3
	Prob	3,35	3,82	4.19	4.53	5.25	5.61	5.88	6.41	6.75	6.88
D2 (10 ⁶ spores/ml)	MC %	5.33	16	22.66	34.66	65.3 3	80	81.33	92	96	100
	Prob	3.35	4.01	4.23	4.59	5.38	5.84	5.88	6.41	6.75	8.09
D3 (10 ⁷ spores/ml)	MC %	8	16	30.66	42.66	66.6 6	81.3 3	93.33	96	100	100
	Prob	3.59	4.01	4.48	4.80	5.41	5.88	6.48	6.75	8.09	8.09
D4 (10 ⁸ spores/ml)	MC %	9.33	22.6 6	45.33	66.66	82.6 6	93.3 3	96	100	100	100
	Prob	3.66	4.23	4.87	5.41	5.92	6.48	6.75	8.09	8.9	8.09
D5 (10 ⁹ spores/ml)	MC %	20	36	61.33	89.33	97.33	100	100	100	100	100
	Prob	4.16	4.64	5.28	6.23	6.88	8.09	8.09	8.09	8.09	8.09

Annexe 03

Tableau 17: Transformation du temps en Logarithme décimal et les pourcentages de mortalité cumulés des larves en Probits

	Log temps	Temps (Jours)						
		1	2	3	4	5	6	7
		-	0.30	0.48	0.60	0.70	0.78	0.84
D1 (10 ⁵ spores/ml)	MC%	60	80	88	92	96	96	100
	Prob	5.25	5.84	6.18	6.41	6.75	6.75	8.09
D2 (10 ⁶ spores/ml)	MC%	80	92	96	96	96	96	100
	Prob	5.84	6.41	6.75	6.75	6.75	6.75	8.09
D3 (10 ⁷ spores/ml)	MC%	88	96	100				
	Prob	6.18	6.75	8.09				
D4 (10 ⁸ spores/ml)	MC%	92	92					
	Prob	100	8.09					
D5 (10 ⁹ spores/ml)	MC%	96	100					
	Prob	6.75	8.09					

Annexe 04 :

Méthode de préparation de la solution entomopathogène



Grattage des boites



Agitation/10min



Filtration



Solution mère



Les 5 doses de traitements utilisés

reference bibliographique

- 1- Abbott W.S.1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. J. Econ. Entomol. 18: 265-266.
- 2-Aitken, T.H.G.1954. The Culicidae of Sardinia and Corsica (Diptera). Bulletin of Entomological Research, 45, 437-494.
- 3-Alves S.B., Alves L.F.A., Lopes R.B., Pereira R.M et Vieira S.A 2002. Potential of some *Metarhizium anisopliae* isolates for control of *Culex quinquefasciatus* (Dipt. Culicidae). J. Appl. Entomol. 126: 504–509.
- 4-Amora S.S.A., Bevilaqua C.M.L., Feij F.M.C., Pereira R.H.M.A., Alves N.D., Freire F.A.M., Kamimura M.T.K., De Oliveira D.M., Lima E.A.L.A et Rocha. M.F.G 2010. The effects of the fungus *Metarhizium anisopliae* var. *acidum* on different stages of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). Acta Tropica. 113 :214–220.
- 5-Andersen S.O.1979. Biochemistry of insect cuticle. Annual Review Entomol. 24 :2961
- 6- Anonyme a2002 .Les hauts plateaux sétifiens, Amicale des hautes plateaux sétifiens, 2002, Tome 1
- 7- Arribalzaga .L, 1891, Sporulation in *Culex dolosus* Evolution de la voie lectine-complément et de son rôle dans l'immunité innée. Nature Rev. Immunol. 2: 346-353
- 8- Aubin A 1980. Les moustiques du Québec (Diptera : Culicidae) . Essai de synthèse écologique. Mémoires de la Société Entomologique du Québec.6 :107.
- 9- Bateman R.P., Price R.E., Muller E.J et Brown H.D 1994. Controlling brown locust hopper bands in South Africa with a mycoinsecticide spray. In: Proc Brighton Crop Protection Conf, Pests and Diseases. Brit .Crop. Protect.Council, Farnham. 2 :609–616.
- 10-Becker N 1998. The use of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (BTI) against mosquitoes, with special emphasis of the ecological impact. Israel. J. Entomol. 63-69.
- 11-Behle ,2005. Ectoparasite virulence is linked to mode of transmission. Proc. R. Soc. Lond. B. 256:211-217
- 12- Belloncik S., Aubin A., Maire A., Boisvert J., Gagnon R ., Thng C., Trudel C. et Arts O.B H 1983. Arbovirus studies in the Trois-Rivières, province of Québec.
- 13-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): 54-62.

14-Benserradj O., Albrieux F et Mihoubi I 2014. Production and identification of Destruxins in crude extract of the fungus *Metarhizium anisopliae* by liquid chromatography-electrospray time-of-flight mass spectrometry. *Int. J.Pharm.Sci.Rev.Res.*27 (1) :172-177.

15- Berchi S 2000 . Bioécologie de *Culex pipiens* L. (Diptera : Culicidae) dans la région de Constantine et perspectives de luttés. Thèse doc. Es – science, Université de Constantine, Algérie : 133p.

16- Bhattacharya, 2004. Horizontal and vertical ectoparasite transmission of three species of Mallophaga, and individual variation in European bee-eaters (*Merops apiaster*) *Journal of Parasitology*. 87(2): 256-262

17-Bidochka M.J et Small C 2005. Phylogeography of *Metarhizium*, an insect pathogenic fungus. In: F.E. Vega & M. Blackwell (Eds.) *Insect-Fungal Associations*. 28-49. Oxford University Press Inc., New York.

18-Bischoff J.F., Rehner S.A et Humber R.A 2009. A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage , *Mycologia*, 101 : 512-530.

19-Blanchard 1901. Resistance to temephos, an organophosphorous insecticide, in *Culex Pipiens* from Tunisia, north Africa. *Journal of the American Mosquito Control Association* 9(3): 335-337.

20-Boucias D.G., Pendland J.C et Latge J.P 1988. Nonspecific factors involved in attachment of entomopathogenic Deuteromycetes to host insect cuticle. *Appl. Environ..Microbiol.*54 :1795-1805.

21- Boucias D.G et Pendland J.C1991. Attachment of mycopathogens to cuticle. In: *The Fungal Spore and Disease Initiation in Plants and Animals*. (Cole GT, Hoch HC (Editors)). Plenum Press, New York.

22-Boucias DG, Pendland JC. 1998. *Principles of insect pathology*. Boston, MA: Kluwer Academic Publishers.568 p.

23-Bradfish G. A. et Harmer S. L1990. Omega-Conotoxin GVIA and nifedipine inhibit the depolarizing action of the fungal metabolite, destruxin B on muscle from the tobacco budworm (*Heliothis virescens*). *Toxicon*. 28 (11): 1249-1254.

24-Braga G., Flint S., Miller C., Anderson A. et Roberts D 2001. Variability in response to UV-B among species and strains of *Metarhizium* isolated from sites at latitudes from 61°N to 54°S. *J Invertebr Pathol* .78 :98-108

25-Brunhes J., Rhaim A., Geoffroy B., Angel G et Hervy J.P 1999. *Les moustiques de l'Afrique méditerranéenne. Logiciel d'identification et d'enseignement*. IRD édition

26-Burges D.H 1998. Formulation of mycoinsecticides. In: Formulation of microbial biopesticides: beneficial microorganisms, nematodes and seed treatments. Ed. by Burges HD, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 31-185.

27-Butt TM 1990. Fungal infection processes. A Mini-Review 5th Int. Colloquium of Invertebrate Pathology. Adelaide. Soc. Inverbr. Pathol. 121-124.

28-Butt T.M et Becket A 1994 . Pathogenicity of entomogenous fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* against crucifer pests and the honey bee. *Biocontr. Sci. Techn.* 4 :207-214.

29- Butt T.M., Ibrahim L., Ball B.V et Clark S.J 1994. Pathogenicity of the entomogenous fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* against crucifer pests and the honey bee. *Biocontr.; Sci. Technol.* 4 :207-214

30-Campos R.A., Arruda W., Boldo J.T., da Silva M.V., de Barros N.M., de Azevedo J.L., Schrank A et Vainstein M.H 2005 .Boophilus microplus infection by *Beauveria amorpha* and *Beauveria bassiana* :SEM analysis and regulation of subtilisin-like protease and chitinases .*Cur .Genet.*50:257-261.

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

32-Charnley A.K 1989 .Mechanisms of fungal pathogenesis in insects. In :Biotechnology of fungi for improving plant growth. Whipps JM, Lumsden RD (eds), Cambridge Univ .Press ,UK .p.85-123

33- Charnley A.K et St Leger 1991. The role of cuticle degrading enzymes in fungal pathogenesis of insects. In :The fungal spore and disease initiation in plants and animals. Plenum Publishing Co., New York, p 267-286.

34-Chauvet G., Ravaonjanahary C. et Brunhes J 1971. Sensibilité et résistance à divers insecticides organophosphorés chez *Culex pipiens fatigans* Wied. En milieu urbain à Madagascar. *C.R. Soc. Biol.*165 (2) : 444-484.

35- Chauvet G 1978. Lutte biologique contre les vecteurs d'affections humaines et tropicales. Moyens actuels et perspectives. *Méd. Trop.* 6 : 651- 657

36-Clark T.B., Kellen W.R. , Fukuda R et Lindegren, J. E 1968. Field and laboratory studies on the pathogenicity of the fungus *Beauveria bassiana* to three genera of mosquito. *J. Invertebr. Pathol.* 11: 1-8.

37- Clark H.E, Geldriche E.F.B, Kabler P.W et Huff C.B 1985. Identification of Industrial microorganismes. *Appl. Microbiol. Process Biochem.* 30 :723-727

38-Clarkson J.M et Charnley A.K 1996 .New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects, *Trends Microbiol.*4 :197-204.

39-Clements A.N 1992. Biology Of Mosquitoes : Development, Nutrition And Reproduction Chapman & Hall, London

40-Cloutier C et Cloutier C 1992. Les solutions biologiques de lutte pour la répression des insectes et acariens ravageurs des cultures. Dans: La lutte biologique, Tech & Doc Lavoisier (Vincent, c., Coderre, D.) 671p.

41-Coosmans M., Barutwanayo M et Delacoelette C.H 1992. Lutte anti-paludique intégrée dans une région rizicole au Burundi. Mém. Soc. belge. Ent. 35 :97-101.

42-Daoust R.A., Ward M.G et Roberts D.W 1982. Effect of formulation on the virulence of *Metarhizium anisopliae* conidia against mosquito larvae, J .Invertebr.Pathol, 40 :228–236.

43-Duchauffour P 1976. Atlas écologique des sols do monde. Ed. Masson, Paris, 178p

44- Dyar.1905 A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. Mycol Res .104 :134– 150

45-Edelstein J.D., Lecuona R.E et Trumper E.V 2004. Selection of culture media and In Vitro assessment of temperature-dependent development of *Nomuraea rileyi*. Biol.Contr.33: 773-742.

46-Ekesi S., Maniania N.K. et Among-nyarko K 1999. Effect of temperature on germination, radial growth and virulence of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* on *Megalurothrips sjostedti*. Bioconrt Scie and Technol 9 :177-185

47-Failloux A.B. et Rodhain F 1999. Apport des études de génétique des populations de moustiques (Diptera: culicidae) en entomologie médicale. Exemples choisis en Polynésie française. Anna. Soci ; Entomol .France .35 (1): 1-16.

48-Fargues J et Robert P.H 1986. Potentialités insecticides des destruxines ,mycotoxines produites par l'hyphomycète entomopathogène, *Metarhizium anisopliae* (Metsch), Congrès sur la protection de la santé humaine et des cultures en milieu tropical , Marseille, 357-362

49- Fargues J et Luz C 2000. Effects of fluctuating moisture and temperature regimes on sporulation of *Beauveria bassiana* on cadavers of *Rhodnius prolixus*. Biocontrol. Sci.Technol. 8: 323-334.

50- Fargues J et Bourguet D 2005. La lutte microbiologique contre les insectes ravageurs des cultures: contraintes, bilan et perspectives. Enjeux phytosanitaires pour l'agriculture et l'environnement. E. T. DOC. Paris-Londres-New-York, Lavoisier: 1013.

51-Faria M et Wraight S.P 2001. Biological control of *Bemisia tabaci* with fungi. Crop Protect. 20 :767-778.

52-Ferron P 1975 . Les champignons entomopathogènes : évolution des recherches au cours des dix dernières années. Bull . SROP/WPRS. 54 p

- 53- Ferron P 1977. Influence of relative humidity on the development of fungal infection caused by *Beauveria bassiana* (Fungi Imperfecti Moniliales) in imagos of *Acanthoscelides obtectus* (Col.: Bruchidae). *Entomophaga* . 22 :393-396.
- 54-Ferron P 1978. Biological control of insect pests by entomopathogenic fungi. *Ann Rev Entomol.* 23 :409-442.
- 55- Ferron P., Fargues J et Riba G 1991. Fungi as microbial insecticides against pests. In: Arora D.K., Ajello L., Mukerji K.G (eds) *Handbook of Applied Mycology. Volume 2: Humans, Animals, and Insects.*18: 665–706. Marcel Dekker, Inc, New York.
- 56- Ferron P., Fargues J et Riba G 1993. Les champignons agents de lutte microbiologique contre les ravageurs D5, 65-92. (*Handbook of applied mycology, vol. 2, Humans, Animals and Insects, 1991*).
- 57- Felt 1904. Classification des espèces Champignons comme éliciteurs des réponses immunitaires des insectes.. 44: 46-58
- 58-Fugita T 2002 . Evolution of lectin-complement pathway and its role in innate immunity. *Nature Rev. Immunol.* 2 :346-353
- 59-Gillespie J.P., Bailey A.M., Cobb B et Vilcinskas A 2000. Fungi as elicitors of insect immune responses. *Arch Insect Biochem Physiol.* 44 :49–68
- 60-Goettel M.S., St Leger R.J., Rizzo N.W., Staples R.C et Roberts D.W 1989. Ultrastructural localization of a cuticle-degrading protease produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* during penetration of host (*Manduca sexta*) cuticle. *J. General. Microbiol.* 135 :2233-2239.
- 61-Goettel M.S 1992. Des champignons comme agents de lutte biologique. In *La lutte biologique contre les acridiens, sous la direction de C.J. Lomer et C. Prior* p.122-131. Ibadan, Nigeria: CAB International/IITA.
- 62- Goettel M.S et Inglis G.D 1997. Fungi: hyphomycetes. In: Lacey LA (ed.) *Manu Tech. Insect. Pathol.* 5 (3):213–248. Academic Press, San Diego.
- 63- Goettel M.S., Inglis G.D et Wraight S.O 2000. Fungi. In: *Field manual of techniques in invertebrate pathology.* Lacey LA, Kaya HK (eds), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 255-282
- 64-Groden E et Lockwood J L 1991. Effects of soil fungistasis on *Beauveria bassiana* and its relationship to disease incidence in the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*, in Michigan and Rhode Island soils. *J. Invertebr. Pathol.* 57 :7-76.
- 65-Grula E.A., Woods S.P et Russel H 1984. Studies utilizing *Beauveria bassiana* as an entomopathogen. In: *Infection processes of fungi. Conference Report.* Robert DW, Aist JR (eds). Rockefeller Foundation, New York. 147-152

- 66-Hallsworth J.F et Magan N 1996. Culture age, temperature and pH affect the polyol and trehalose contents of fungal propagules. *Appl Environ. Microbiol.*62 :2435-2442.
- 67- Hallsworth J.F et Magan K.E 1999. Hallsworth and N. Magan, Water and temperature relations of growth of three entomogenous fungi *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces farinosus*, *J. Invertebr. Pathol.*261-266.
- 68-Hamon J., Mouchet J., Coz J., Challier A., Subra R. et Adam J.P 1972 . Résistance aux insecticides et contrôle des vecteurs de maladies en Afrique Occidentale et Centrale. *Doc.Tech. OCCGE. 5* : 217.
- 69-Hastuti B.S., Glare T.R. et Chapman, R. B 1999. Effect of temperature and humidity on the susceptibility of *Paropsis clarybdis* to *Beauveria bassiana*. *Proc. 52nd N.Z. Plant Protection Conf.*103-107.
- 70-Hazrat B., Soaib A.H et Imtinan A.K 2012. Isolation and efficacy of entomopathogenic fungus (*Metarhizium anisopliae*) for the control of *Aedes albopictus* Skuse larvae: suspected dengue vector in Pakistan. *Asian Pacific.J .Trop. Biomed.* 298-300.
- 71-Hegedus D.D., Bidochka M.J et Khachatourians G.G. 1990. *Beauveria bassiana* Submerged Conidia Production in a Defined Medium Containing Chitin, Two Hexosamines or Glucose', *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 33 :641647
- 72-Hoffmann J.A et Reichhart J.M 2002. *Drosophila* innate immunity: An evolutionary perspective. *Nature Immunol.* 3:121-126.
- 73-Ibrahim L., Butt T.M., Beckett A et Clark S.J 1999. The germination of oilformulated conidia of the insect pathogen *Metarhizium anisopliae*. *Mycol. Res.* 103:901-907.
- 74-Ihara F., Yaginuma K., Kobayashi N., Mishiro K et Sato T 2001. Screening of entomopathogenic fungi against the brown-winged green bug, *Plautia stali* Scott (Hemiptera: Pentatomidae). *Appl.Entomol.Zool.* 36 (4): 495-500.
- 75-Ihara F., Yaginuma K., Kobayashi N., Mishiro K et Sato T 2001. Screening of entomopathogenic fungi against the brown-winged green bug, *Plautia stali* Scott (Hemiptera: Pentatomidae). *Appl.Entomol.Zool.* 36 (4): 495-500.
- 76- Ikasari L et Mitchell D. A 1994. Protease production by *Rhizopus oligosporus* in solid state fermentation. *Appl. Microbio. Biotechnol.* 10 :320 – 324.
- 77- Inglis G.D., Goettel M.S, Butt T.M et Strasser H 2001. Use of hyphomycetous fungi for managing insect pests. In: Butt TM, Jackson CW, Magan N (eds) *Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential.* CABI Publishing, Wallingford, UK, 23–55.
- 78-Jenkins N.E., Heviefio G., Langewald J., Cherry A.J et Lomer C.J 1998. Development of mass production technology for aerial conidia for use as mycopesticides. *Biocontrol News Information.* 19 :21–31

79-Juarez 1997 Detoxification of destruxins in *Galleria Mellonella* L larvae. *Comp. Biochem. Physiol.* 103C :227-229.

80-Kamp A.M et Bidocbka M.J 2002 .Conidium production by insect pathogenic fungi on commercially available agars. *Lett. App. Microbiol.* 35 :74-77.

81-Keller S et Zimmermann G.J 1989. Mycopathogens of soil insects. [n Wilding, N., N. Collins, N. M.Hammond, P. M. Webber, and I. F. Webber (eds.), *Insect-Fungus Interactions*. Academic Press, London, p. 240-269.

82-Khachatourians G.G.(1991).Physiology and genetic of entomopathogenic fungi. In : *Handbook of applied mycology*.Mukeji DK, Drouhet E (eds).Marcel Dekker Inc.,New York,USA. 613-663.

83-Lecuona R., Clement J.L., Riba G., Joulie C et Juarez P 1997.Spore germination and hyphal growth of *Beauveria* sp .on insect lipids. *J .Econ .Entomol* .90:119-123

84-Lehane M. J 1991. *Biology of blood-sucking insects*. Chapman & Hall, London, UK.

85- Leland J.E et Behle R.W 2005. Coating *Beauveria bassiana* with lignin for protection from solar radiation and effects on pathogenicity to *Lygus lineolaris*. *Bicontr.Sci. Technol.*15: 309-320.

86- Lepage S., Charpentier G., Pecqueur D., Vey A et Quiot J.M 1992. Utilisation des toxines de champignons entomopathogènes dans la lutte contre les Diptères piqueurs. *Mém. Soc. Belge. Ent.* 35 :139-143.

87-Liu Z.Y., Milner R.J., McRae C.F et Lutton G.G 1993. The use of dodecane in selective media for the isolation of *Metarhizium* spp. from soil. *J. Invertebr. Pathol.* 62 :248–251.

88- Liu B.L et Tzeng Y.M 1999. Water content and water activity for the production of cyclodepsipeptides in solid-state fermentation by *Metarhizium anisopliae*. *Biotechnol .Lett.* 21: 657–661.

89- Liu B.L., Chen J.W et Tzeng Y.M 2003. Production of cyclodepsipeptides destruxin A and B from *Metarhizium anisopliae*. *Biotechnol Prog* .16 :993–999.

90- Liu B.L et Tzeng Y.M 2011. Development and applications of destruxins: A review. *Biotechnol Adv.*1-13

100- Lopez Lastra C.C., Hajek A.E et Humber R.A. 2002.Comparing methods for preservation of cultures of entomopathogenic fungi. *Can. J.Bot.* 80 :1126-1130

101-Loucif .2003 ; *Arch. Inst. Pasteur Alger.*, 62 (2003), pp. 63–76

102- Luz C., Fargues J., Romaña C.A., Moreno J., Goujet R., Rougier M et Grunewald J. 1994. Potential of entomopathogenic hyphomycetes for the control of the triatomine vectors of Chagas' disease. *Proc6 Int Coll Invertebr Path Microbiol Control.* 1 :272- 276.

- 103-Magelhas B.P., Lord J.C., Wraight S.P., Daoust R.A et Roberts D.W. 1981. Pathogenicity of *Beauveria bassiana* and *Zoopthora radicans* to the coccinellid predators *Coleomegilla maculate* and *Eriopis connexa*. *J.Invertebr.Pathol.* 52:471-473
- 104-Maire A et Aubin A 1980. Les moustiques du Québec (Diptera : Culicidae) . Essai de synthèse écologique. *Mémoires de la Société Entomologique du Québec.*6 :107.
- 105-Mansouri M., Bendali-Saoudi F., Benhamed D et Soltani N 2013. Effect of *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* against *Culex pipiens* (insecta:Culicidae). Effect of Bti on two non-target species *Eylais hamata* (Acari:Hydrachnidia) and *Physa marmorata* (Gastropoda: physidae) and Dosage of their GST biomarker. *Ann. Biol. Res.* 4 (11):85-92
- 106-Marquardt W.C., Black W.C., Higgs S., Freier J.E., Hagedorn H.H., Kondratieff B., Hemingway J et Moore C.G 2005. *Biology of Disease Vectors*. Second Edition, Elsevier Academic Press.
- 107-Matille L 1993. Les diptères d'Europe occidentale. Introduction, technique d'étude et morphologie. *Nématocères, Brachycères, Orthoraphes et Aschizes*. Ed. Boubée, T1, Paris : 439p.
- 108-McCoy A., Quintela E.D et Faria M 1990. Environmental Persistence of Entomopathogenic Fungi. In, *New direction in biological control*. R.R. Baker and P.E. Dunn (eds), A.R. Liss, New York, 139-159.
- 109-McCray Jr E.M., Womelderoff D.J., Husbands R.C et Eliason D.A 1973. Laboratory observation and field tests with *Legidium* against California Mosquitoes. *Proc Cali Mosq Control Assoc* 41 :123–128.
- 110-Meyling N.V et Eilenberg J 2007. Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: Potential for conservation *boil. contr.* 43 :145-155.
- 111-Miranpuri G.S et Khachatourians G.G 1991. Infection sites of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in the larvae of the mosquito *Aedes aegypti*. *Entomol.* 16 :215234
- 112-Mitsuaki S 2004. Effect of temperature on growth of *Beauveria bassiana* F-263, a strain highly virulent to the Japanese pine sawyer, *Monochamus alternatus*, especially tolerance to high temperatures. *Appl Entomol Zool.* 39 : 469-475.
- 113-Mohamed A.K., Hernandez D et Nelson R.S 1983. Susceptibility of various instars of *Culex quinquefasciatus* to two strains *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. *Journ. Flor. Anti- Mosquito. Asso.* 54 (1) : 5-8.
- 114-Mondal P et Bhattacharya A.K 2004. Assessment of different media for mass multiplication of entomopathogenic fungus. *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin *Proc.Nat.Acad.Sci.India.*74:161-169

- 115-Moore D., Bridge P.D., Higgins P.M., Bareman R.P et Prior C 1993. Ultra-violet radiation damage *Metarhizium flavoviride* conidia sunscreens. Ann.Appl. Biol. 122 :605-616.
- 116-Napolitano R et Juárez M.P 1997 .Entomopathogenous fungi degrade epicuticular hydrocarbons of *Triatoma infestans* .Arch.Biochem.Biophys. 344 :208-214.
- 117-Nelson T.L., Low A et Glare T.R 1996. Large scale production of New Zealand strains of *Beauveria* and *Metarhizium*, Proc. 49th New Zealand .Plant Production Conf.257-261.
- 118-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, p 55-60.
- 119 - O.M.S 1970. Résistance aux insecticides et lutte anti vectorielle. Sér.Rapp.Techn.443
- 120-Papierok.,Taylor V., Caillouetk., Byrd B et Wesso D.M., 1975. Impact of West Nile virus outbreak upon St. Tammany Parish Mosquito Abatement District. J.AM Mosq Control Assoc. 21 :33-38.
- 130-Pendland.1998 .,Mosquito behavior and vector control. Ann. Rev. Entomol. 50: 53-70.
- 131-Ramoska W.A., Watts S et Watts H.A 1981. Effects of sand formulated *Metarhizium anisopliae* spores on larvae of three mosquito species. Mosquito News .41 :725-728
- 132- Ramoska W.A 1982. An examination of the longterm epizootic potential of various artificially introduced mosquito larval pathogens. Mosquito News. 42 :603-607.
- 133-Rangaswamy R 1995. A textbook of agricultural statistics. New Age International (P.) Limited, New Delhi. 496 p .
- 134-Ravallec M., Riba G et Vey A 1989. Sensibilité d' *Aedes albopictus* (Diptera : Culicidae) à l'hyphomycète entomopathogène *Metarhizium anisopliae*. Entomophaga.34 :209-217.
- 135- Ravallec M., Robert P. et Coz J 2003. Sensibilité d'un prédateur culiciphage *Toxorynchites ambionensis* à l'hyphomycète entomopathogène *Metarhizium anisopliae* (Sorokin). Cah. ORSTROM .Sér. Ent. Médic. Parasitol.24 (4): 275-278.
- 136- Ravallec M, Riba G et Vey A 2006. Sensibilité d'*Aedes albopictus* (Dipt., Culicidae) à l'hyphomycète entomopathogène *Metarhizium anisopliae*. Biocontr. 34 (2):209-217.
- 137-Reichelder C.F 1993. Biological assays with insect pathogens. In: N. B. Mandava (ed.). CRC handbook of natural pesticides: methods. V.I Theory practice and detection. New Delhi. CBS Publishers and Distributors. 489-515.
- 138-Richard I et Samuels 1998. A sensitive bioassay for destruxins,cyclodepsipeptides from the culture filtrates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. An. Soc. Entomol.Bras. 27 (2)

139-Rioux et Causserans 2008. La démoustication du littoral méditerranéen : base écologique, stratégie opérationnelle, devenir. Bulletin De l'académie des Sciences et Lettres De Montpellier. 39 :343-356.

140- Rioux J.A 1958. Les Culicidae du "Midi" méditerranéen. Etude systématique et écologique, Ed. Paul lechevalier, Paris: 301p.

141-Robert P.H et Fargues J 1986. Toxicité par ingestion des destruxines A, B et E pour les larves de *Musca domestica* L. Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, Paris Série III 303 : 641- 643.

142- Roberts D. W1967. Some effects of *Metarhizium anisopliae* and its toxins on mosquito larvae. In "Insect Pathology and Microbial Control" (P. A. van der Laan, Ed.), p 243-246. North-Holland, Amsterdam.

143- Roberts D.W 1973. Means for insect regulation: Fungi . Ann . N.Y., Acad . Sci . 217: 76-83

144- Roberts D.W 1981. Toxins of entomopathogenic fungi . Dans "Microbial control of pests and plant diseases» 1970-1980. Editeur Burges, H.D. , Academic Press, New-York . 441-464.

145-Roddam L.F et Rath A.C .1997. Isolation and characterization of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* from Subantartic Macquarie Island. J. Invertebr. Pathol. 69 (3): 285-288.

146-Roubaud E 1929. Cycle autogène d'attente et générations hivernales suractives inapparentes chez le moustique commun *Culex pipiens* L.C.R. Acad.Sci.,Paris. 88 :735-738

147-Saint -Louis M., Firlej A., Gagne I., Grjelchan M., Kouassi M., Pelletier F., Provost C. et VanoosThuis F 2001. Eléments de recherche pour une meilleure utilisation des prédateurs et des champignons entomopathogènes en lutte biologique. Antennae. 8 (2): 1-6.

148-Samuels R.I, Charnley A.K, Reynolds S.E 1988. The role of destruxins in the pathogenicity of three strains of *Metarhizium anisopliae* for the tobacco hornworm *Manduca sexta*. Mycopathologia. 104 :51–58.

149- Samuels K.D.Z., Heale J.B. et Llewellyn M 1989. Characteristics relating to the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* toward *Nilaparvata lugens*. J. Invertebr. Pathol. 53: 25-31.

150-Scholte E.J., Knols B.G et Takken W 2004 . Auto dissemination of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* amongst adults of the malaria vector *Anopheles gambiae* sensu stricto. Mala. J. 3 :45.

151-Seida 2003, développement durable des écosystèmes ,changement climatique etl' impacte sur l'environnement

152-Senal J., Fraselle J., Impens R., Kummert J., Lepoivre Ph., Meulmans M., Seilleur P., Vandevéken J. et Viseur J 1993. Traité de pathologie végétale. Gembloux. Belgique.

153-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. 1:1-6.

154-Siebeneicher S.R., Vinson S.B et Kenerley C.M 1992. Infection of the red imported fire ant by *Beauveria bassiana* through various routes of exposure .J. Invertebr.Pathol.59 : 280-285.

155-Silvy C et Riba G 1989. Biopesticides contre maladies, insectes, mauvaise herbe. Dossier de l'environnement N° 9, 157-200.

156-Soltani N., Rehim N., Beldi H et Bendali F 1999. Activité du Triflumuron sur *Culex pipiens* (Diptera : Culicidae) et impact sur deux espèces larvivoires non visées. Ann. Soc. Entomol. Fr. (N.S.), 35 (suppl.) :502-508.

157-Soza-Gómez D.R et Alves S. B 2000. Temperature and relative humidity requirements for conidiogenesis of *Beauveria bassiana* (Deuteromycetes: Moniliceae). Anais da Sociedade Entomológica do Brasil (english version) 29 :515-521

158-St Leger RJ. (1986a). Cuticule- degrading enzymes of entomothogenic fungi : Synthesis in culture on cuticle. J. Inverbr.Pathol. 48 :85-95

159- St Leger RJ.(1986b). Cuticule- degrading enzymes of entomothogenic fungi : cuticule degradation in vitro by enzymes from entomothogens.. J. Inverbr.Pathol. 47 :167-177.

160- St Leger R.J., Lacetti L.B., Staples R.C et Roberts D.W 1990. Protein kinases in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. J. Gen. Microbiol .136 :1401-1411.

161- St Leger R.J., Allee L.L., May B., Staples R.C et Roberts D.W 1992. World-wide distribution of genetic variation among isolates of *Beauveria spp*. Mycol.Res. 96: 1007-1015.

162- St Leger R.J 1993. Biology and mechanisms of insect-cuticle invasion by deuteromycete fungal pathogens, In :Parasites and pathogens of insects .Beckage NE, Thompson SN,(eds),Federici BA (eds.).Academic Press Inc.,New York,USA .2 : 211-225

163-Starnes R.L., Liu C.L et Marone P.G 1993. History, use and future of microbial insecticides. Amer. Entomol. 39 :83-91.

164-Tanada Y et Kaya H.K. 1993. Insect pathology. Academic Press Inc.,San Diego, USA , 666 p

165-Todorova S.J., Côté L.C., Martel P et Coderre D 1994. Heterogeneity of two *Beauveria bassiana* strains revealed by biochemical tests, protein profiles and bioassays on *Leptinotarsa decemlineata* (Col: Coccinelidae) larvae. Entomophaga. 39 :159-169.

166-Theobalt 1904 Occurrence of entomopathogenic fungi in soils in Southern Italy. *Entomol.* 31 :157-166.

167-Tulloch M 1976 .The genus *Metarhizium*. *Transactions of the British Mycological Society.* 66 :497-411.

168-Ulacio D., Perez C et Pineda Y.J 1997. Mycoflora in tobacco plant roots (*Nicotiana tabacum*) in portuguesa state, Venezuela. *Bioagro.* 9 (1): 3-11.

169-Veen K.H.et Ferron P 1966. A selective medium for the isolation of *Beauveria tenella* and of *Metarhizium anisopliae*. *J. Invertebr.Pathol.* 8 :268–269.

170- Veen K.H 1968. Recherches sur la maladie due à *Metarhizium anisopliae* chez le criquet pèlerin . *Meded . Land bouwhoge school, Wageningen .* 68 :1-77.

171-Vega F.E., Jackson M.A., Mercadier G et Poprawski T.J 2003. The impact of nutrition on spore yields for various fungal entomopathogens in liquid culture, *World J. Microbiol. Biotechnol.* 19 :363-368.

172-Wood D.M. 1985. Diptères piqueurs du Canada qui s'attaquent à l' homme et au bétail. *Agriculture Canada . Publication 1781/f .* 38.

173-Wraight R.J et Roberts D.W 1987. Insect control effort with fungi. *Devel. Industr. Microbiol.* 28 :77-87.

174- Wraight S.P., Jackson M.A et de Kock S.L 2001. Production, stabilization and formulation of fungal biocontrol agents. In: Butt TM, Jackson CW, Magan N (eds) *Fungi As Biocontrol Agents, Progress, Problems and Potential.*253–288. CABI Publishing, New York.

175-Zimmermann G 2007. Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Biocontr.Sci.Technol .*17 :879-920.