

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE DE BLIDA 1
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET LA VIE
DEPARTEMENT DES BIOTECHNOLOGIES



Mémoire de fin d'étude

En vue de l'obtention du diplôme de Master II Académique

En Sciences de la nature et de la vie

Option : Phytopharmacie et Protection des Végétaux

Thème

Contribution à l'étude des potentialités entomopathogènes
de quelques souches microbiennes

Présenté par :

M^{elle} ABED NAWEL et M^{elle} TAHTAH KHAOULA

Membre du jury :

Présidente	Mme SABRI K.	M.A.A.	U.S.D.B.1
Promotrice	Mme ALLAL BENFKIH L.	Professeur	U.S.D.B.1
Examinatrice	Mme AMMAD F.	M.C.A.	U.S.D.B.1
Co promoteur	Mr HAFSA M.	Doctorant	U.S.D.B.1

Année universitaire : 2019/2020

Remerciements

Nous tenons à remercier en premier lieu DIEU, le tout Puissant de nous avoir donné courage, santé et patience pour achever ce travail.

Nos remerciements les plus sincères s'adressent à notre honorable encadreur

Mme ALLAL BEN FEKIH L., PROFESSEUR qui a bien voulu, par son aimable bienveillance, diriger cette étude, qui a fait preuve d'une grande patience. Ses conseils, ses orientations, sa compétence, sa gentillesse et ses intérêts portés pour ce sujet de recherche nous ont permis de mener à terme ce travail. Son encadrement était le plus exemplaire.

Je tiens également à remercier tout particulièrement Mr HAFSA M., DOCTORANT, Co-promoteur, pour son soutien, ses précieux conseils sa gentillesse et son encouragement à travailler.

Nos remerciements vont aussi à Mme SABRI K., MAA, d'avoir eu l'amabilité d'accepter volontairement et aimablement de présider ce Jury.

Nous tenons à remercier également Mme AMMAD F., M.A.A, d'avoir acceptée, d'examiner ce travail. Qu'elle trouve ici nos sincères sentiments de gratitude et de respect.

Notre reconnaissance et nos grand respect s'adressent à la source de bonheur «nos parents» qui nos soutenue avec patience et prouvé leur confiance. Nous leur exprime notre éternelle gratitude.

Nous nous permettons d'adresser nos remerciements à nos familles, qui ont contribués Beaucoup d'une manière ou d'une autre, durant toute la période de ce travail.

À tous ceux qui nous ont aidés de près ou de loin à réaliser ce travail, auxquels

Nous disons tout simplement merci.

DEDICACE

JE DEDIE CE MODESTE TRAVAIL AUX GENS LES PLUS CHERS A MON CŒURS, ET QUE J'AI ME PLUS QUE TOUT AU MONDE.

A ma chère Mère Hayette

Pour tous les sacrifices que tu as consentis à mon égard et dont je suis à jamais redevable, pour ton grand amour, ta tendresse et tes encouragements. Sans ton aide, ce travail n'aurait jamais vu le jour.

Je t'aime et ce mémoire ne peut jamais exprimer toute la gratitude que j'ai pour toi.

Que Dieu te garde et t'accorde longue vie et bonheur.

A mon très cher père Mustapha

Tu m'as toujours appris le sens de la responsabilité, de la raison, du devoir et de la confiance en soi. Aucune dédicace ne peut exprimer mon profond amour, ma sincère gratitude et ma profonde reconnaissance pour les sacrifices que tu as consentis.

Je te dois beaucoup et je ferais de mon mieux pour rester un sujet de fierté à tes yeux.

À mes chers grands parents qui m'ont toujours soutenu par leurs encouragements et leurs conseils et leurs douaa.

A MON FIANCE POUR TOUS SES ENCOURAGEMENTS

A MES SŒURS WISSEM ET ZINEB

A MES NEVEUX ABEDERRAHIM ET MIRA

A MES FRERES ABDERRAOUF ET MOHAMED NADIR

A MA CHÉRIE binôme Nawel et à toute sa famille

A MES CHÉRIES MELBOUS DJAZIA ET BERDANE SELMA

A TOUS CEUX QUI SONT CHÈRES

KHAOULA.



Dédicace

Je dédie ce modeste travail à :

*Les deux êtres les plus chères au monde pour toute leur tendresse et les sacrifices consentis à mon éducation et ma formation et qui n'ont d'égal que le témoignage de la profonde reconnaissance. Mon père et
Ma mère*

A mes deux oncles qui sont comme un père

Mon oncle Ahmed, qui vient de nous quitter à jamais sans nous prévenir, sans nous faire ses adieux, qui m'a toujours soutenu par leur encouragement, conseils et leur douaa. J'espère que ton âme repose en paix là où tu es et que Dieu t'accueille dans son vaste paradis.

Mon oncle Mohamed qui m'a toujours poussé et motivé dans mes études par leur conseils et encouragement j'espère que dieu vous garde en bonne santé et vous protège.

A mes chère sœurs Lamia , Hayet et Fella et mon petit frère Abed pour leurs compréhension et leurs grande tendresse , qui 'en plus de m'avoir encouragé tout le long de mes études, je vous souhaite une très belle vie pleine de bonheur et de réussite .

A mes chers neveux : Riad , Oussama et Abdelkhalak et mon adorable nièce Ines .

A ma jumelle , ma sœurlette Selma qui m'a toujours encouragé pendant toute ma vie je vous remercie pour ton amitié chère à mon cœur et je vous souhaite une très belle vie pleine de joie .

A ma chère binôme khaoula et toute sa famille, qui m'a encouragé pendant toute cette période. Je vous souhaite la réussite dans ta vie.

Nawel.

Contribution à l'étude des potentialités entomopathogènes de quelques souches microbiennes

Résumé

Ce travail est une contribution à la recherche de souches fongiques et bactériennes dotées de pouvoir insecticide sur les insectes ravageurs, en tant que moyen de contrôle alternatif à l'utilisation des méthodes de lutte chimique polluantes pour la diversité et l'environnement. L'objectif est d'isoler et identifier des isolats à partir du sol de vergers pour les bactéries, et des cadavres d'insectes pour les champignons et d'étudier leur effets sur les pucerons et les larves d'aleurodes. L'isolement effectué à partir du sol a mis en évidence l'existence des bactéries du genre *Bacillus*, confirmée par l'identification microscopique, macroscopique et biochimique. L'isolement des champignons à partir des cadavres d'insectes a révélé la présence de sept souches fongiques dont quatre se sont montrés phytopathogènes. Les trois souches restantes ont été testées sous forme de solutions brutes, sur les pucerons d'agrumes par trempage et pulvérisation sur le feuillage infesté. Le test de pathogénicité de la souche bactérienne isolée a révélé un effet entomopathogène sur les larves d'aleurodes avec un taux de 50% de mortalité après 24h. Les trois souches fongiques S₁ S₂ et S₃ ont eu un effet sur la mortalité des pucerons. Dans la méthode de trempage, la souche S₁ a induit un taux plus élevé de 26,67% par rapport à celui de la 3^{ème} souche (20%) et celui de la 2^{ème} souche (16,66%). D'après nos résultats, d'une part les souches fongiques et bactériennes isolées semblent avoir un effet entomopathogène important contre les ravageurs étudiés. D'autre part, le taux de mortalité des pucerons varie selon la méthode d'application de traitement et par le mode d'action de chaque champignon entomopathogène.

Mots clés : insecticide, champignons, bactéries, entomopathogène, puceron, aleurode.

Contribution to the study of the entomopathogenic potential of some microbial strains

Abstract

This work is a contribution to the search for fungal and bacterial strains endowed with insecticidal power on pest insects, as an alternative means of control to the use of chemical control methods polluting for diversity and the environment. The goal is to isolate and identify isolates from orchard soil for bacteria, and insect corpses for fungi, and to study their effects on aphids and whitefly larvae. Isolation from soil demonstrated the existence of bacteria of the genus *Bacillus*, confirmed by microscopic, macroscopic and biochemical identification. The isolation of the fungi from the dead insects revealed the presence of seven fungal strains, four of which were found to be phytopathogenic. The remaining three strains were tested as crude solutions on citrus aphids by soaking and spraying the infested foliage. The pathogenicity test of the isolated bacterial strain revealed an entomopathogenic effect on whitefly larvae with a mortality rate of 50% after 24 hours. The three fungal strains S1 S2 and S3 had an effect on aphid mortality. In the soaking method, strain S1 induced a higher rate of 26.67% compared to that of the 3rd strain (20%) and that of the 2nd strain (16.66%). According to our results, on the one hand, the fungal and bacterial strains isolates seem to have a significant entomopathogenic effect against the studied pests On the other hand, the aphid mortality rate varies depending on the method of treatment application and the mode of action of each entomaphthogenic fungi.

Keywords: Insecticide, fungi, bacteria, entomopathogen, Aphid, Whitefly.

المساهمة في دراسة القدرة الممرضة للحشرات لبعض السلالات الميكروبية

ملخص

يعد هذا العمل مساهمة في البحث عن سلالات فطرية وبكتيرية تتمتع بقوة مبيدات حشرية على حشرات الآفات، كوسيلة بديلة للمكافحة استخدام طرق مكافحة الكيمائية الملوثة للتنوع والبيئة. والهدف من ذلك هو عزل وتحديد عزالت من تربة البستان بحثا عن البكتيريا، وجثث الحشرات للفطريات، ودراسة تأثيرها على حشرات المن واليرقات البيضاء. أظهرت العزلة عن التربة وجود بكتيريا من جنس العصوية، مؤكدة من خلال التحديد المجهرى والعينى والكيميائى الحيوى. وكشف عزل الفطريات عن الحشرات الميتة عن وجود سبع سلالات فطرية، أربعة منها وُجد أنها ممرضة للنبات. تم اختبار السلالات الثلاثة المتبقية كمحاليل خام على حشرات الموالح عن طريق نقع ورش الأوراق المصابة. كشف اختبار الأمراض للسلالة البكتيرية المعزولة عن وجود تأثير ممرض للحشرات على يرقات الذبابة البيضاء بنسبة موت **50%** بعد **24** ساعة. كان للسلالات الفطرية الثلاثة S1 S2 و S3 تأثير على معدل موت حشرات المن. في طريقة النقع، تسببت السلالة S1 في ارتفاع معدل **26.67%** مقارنة بالسلالة الثالثة (**20%**) والسلالة الثانية (**16.66%**). وفقاً لنتائجنا، من ناحية، يبدو أن السلالات الفطرية والبكتيرية المعزولة لها تأثير ممرض للحشرات على الآفات المدروسة. من ناحية أخرى، فإن معدل وفيات المن يختلف باختلاف طريقة تطبيق العلاج وطريقة عمل كل نوع من الفطريات المسببة للحشرات.

الكلمات المفتاحية: الفطريات، البكتيريا، الذبابة البيضاء، حشرات المن، مبيد حشري.

Liste des abréviations

Bt : *Bacillus thuringiensis*

C° : Degré celsius

Cm : centimètre

et al. : et collaborateurs

FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations

GN :gélose nutritif

G : Gramme

H : Heure

Min : minute

ml : millilitre

mm : Millimètre

P.D.A : Potato-Dextrose-Agar

pH : Potentiel Hydrogène

% : pourcent

Abstract

ملخص

Liste des abréviations

Listes des figures

Liste des tableaux

Introduction.....01

Partie bibliographique

Chapitre I : Généralité sur les entomopathogènes

I. la lutte biologique par les entomopathogènes	03
I.1. Les champignons entomopathogènes	03
I.1.1. Définition.....	03
I.1.2. Position systématiques des champignons entomopathogènes.....	03
I.1.3 modes d'action.....	04
I.1.4. Cycle biologique	04
I.2. Les bactéries entomopathogènes	06
I.2.1. Définition	06
I.2.2. Mode d'action des bactéries entomopathogènes	06
I.3. Les virus entomopathogènes	06
I.3.1. Mode d'action des virus entomopathogènes	07
I.4. Les protozoaires entomopathogènes.....	07
I.4.1. Mode d'action des protozoaires entomopathogènes.....	07

Chapitre II : Utilisation des entomopathogènes dans le contrôle biologique de l'entomofaune nuisible

Introduction.....	08
II.1. Utilisation des champignons entomopathogènes.....	08
II.1.1. Exemple des champignons entomopathogènes.....	08
II.1.2.1. <i>Beauveria bassiana</i>	08
II.1.2.2. <i>Metharizium anisopliae</i>	10
II.2. utilisation des bactéries entomopathogènes.....	10
II.2.1. Exemple de bactérie entomopathogène, genre <i>Bacillus</i>	11
II.3. utilisation des virus entomopathogènes	11
II.4. utilisation des protozoaires entomopathogènes	12

Chapitre III : Les biopesticides à base d'entomopathogènes

III.1. Utilisation des biopesticides en plein champ.....	13
III.2. Utilisation des biopesticides sous serre.....	13
III.3. Les avantages d'utilisation des biopesticides microbiens.....	14
III.4. Les inconvénients d'utilisation des biopesticides microbiens.....	14

III.5. Préparation commerciales les plus utilisées dans les agroceuses et les systèmes forestiers	14
III.5.1. L'utilisation dans les agroceuses.....	14
III.5.2. L'utilisation dans les systèmes forestiers.....	15
III.5.2.1. Cas de l'utilisation du green muscle (<i>Metarhizium anisopliae</i> var <i>acridum</i>) en Algérie.....	16
III.5.2.2. Cas de l'utilisation de <i>Bacillus thuringiensis</i> en Algérie	16

Partie expérimentale :

Chapitre I : matériel et méthode

I. Matériel.....	17
I.1. matériel biologique	17
I.2. Matériel non biologique	18
II. Méthode	18
II.1. l'isolement et purification, et identification des bactéries	18
II.1.1. Echantillonnage.....	18
II.1.2. Préparation des dilutions	19
II.1.3. Purification et identification des souches isolées.....	21
II.1.3.1. Purification	21
II.1.3.2. Identification.....	21
A) Identification macroscopique	21
B) Identification microscopique par coloration simple : de bleu de méthylène	21
c) Tests d'orientation	22
II.2. méthode d'isolement, purification et identification des champignons....	25
II.2.1. L'isolement	25
II.2.2. Purification	25
II.2.3. Identification	27
A) Identification macroscopique.....	27
B) Identification microscopique.....	28
III.1. Test d'entomopathogénicité des bactérie isolée sur les aleurodes.....	28
III.1.1. Echantillonnage des larves d'aleurodes.....	28
III.1.2. Préparations de l'inoculum bactériens.....	28
III.1.3. Applications des traitements à base de la solution bactérienne	29
III.2. Test d'entomopathogénicité des champignons sélectionnés sur les Pucerons.....	29
III.2.1. Préparations de l'inoculum fongique	30
III.2.2. Application des traitements, observation et lecture.....	30

Chapitre II : Résultats et Discussion

II.1. Résultats de l'identification des souches de <i>Bacillus</i> isolées des échantillons de sol étudié	32
II.1.1. Identification macroscopique et microscopique	32
II.1.2. Résultats des tests d'orientation	32
II.2. résultats de l'identification des champignons non phytopathogènes.....	34
II.2.1. La sélection des isolats purifiés.....	34
II.2.2. Identification des isolats fongique	35
II.3. Résultats de test d'entomopathogène	36
II.3.1. Les bactéries isolée sur les larve d'aleurode	36
II.3.2. Les champignons isolée sur les pucerons	39
II.4. Discussion.....	42
Conclusion.....	46
Les références bibliographiques	48

Annexes

Liste des figures :

Numéro de la figure	Titre	Page
01	Mode de pénétration des champignons entomopathogènes dans la cuticule des insectes (Clarkson et Charnley, 1996)	05
02	Aspect macroscopique (A) et microscopique (B1 conidies, B2 hyphes) (X40) de <i>Beauveria bassiana</i> . (X40) (Saiah F.2010)	09
03	Individus de <i>Schistocerca gregaria</i> infectés par <i>B. bassiana</i> (haddadj et al., 2014)	09
04	Aspect macroscopique (A) et microscopique (B) (X40) de <i>Metarhizium anisopliae</i> var <i>anisopliae</i> (Saiah F. 2009).	10
05	Aspect macroscopique des colonies de <i>Bacillus thuringiensis</i> isolées (Majdoub N., 2010)	11
06	Cadavre d'Aleurode infecté (Original, 2020)	17
07	Insectes cibles utilisés pour les tests de pathogénéicité (à gauche :puceron aptère <i>Aphis spiraecola</i> , à droite : pupe d'Aleurode) (Original, 2020)	20
08	Les colonies suspectes de <i>Bacillus</i> observé après l'incubation (original, 2020)	19
09	Etapes explicatives de l'isolement des bactéries à partir du sol (original, 2020)	20
10	Colonies suspecte de la bactérie <i>Bacillus</i> et ensemencement (Original, 2020)	21
11	Réalisation de la coloration de gram (Original, 2020)	22
12	Test de catalase (gauche) et de l'oxydase (droite)	23
13	Mise en évidence de la bactérie du genre <i>Bacillus</i> à travers les milieux TSI et citrate de Simmons	24
14	Apparition de mycélium sur un cadavre d'insecte à partir de la mise en chambre humide (Original, 2020)	25
15	Etape considéré pour l'étude du test de pathogénéicité des isolats fongique sélectionnée sur les feuilles de Géranium (original, 2020)	26
16	Trempage des feuilles d'agrumes infesté par les larves de l'aleurode (stade L4) dans la solution bactérienne (Original, 2020)	28
17	Test de pathogénéicité à base de la solution bactérienne sur les larves d'aleurode des agrumes (Original, 2020)	29
18	Observation macroscopique (à gauche) et microscopique (à droite) d'une colonie bactérienne purifiée (Original, 2020)	32
19	Effet d'une souche pathogène fongique sur une feuille de géranium (Original, 2020)	34
20	Larves mortes inoculées par <i>Bacillus</i> sp (original, 2020)	36
21	Les adultes morts après l'émergence (original, 2020)	36
22	Les larves vivantes après le test (original, 2020)	37
23	Les adultes vivants après le test (original, 2020)	37
24	Taux de mortalité des aleurodes sous l'effet de la souche bactérienne	37
25	Ré-isolement des larves traitées morts sur milieu GN (original, 2020)	38
26	Résultat du repicage après incubation des larves testées (original, 2020)	38

27	Puceron traité par une souche fongique observé à la loupe binoculaire (original, 2020)	39
28	Résultats de la variation des taux de mortalité des pucerons (<i>Aphis spiraecola</i>) sous l'effet des souches fongiques (S1, S2, S3) isolées.	40
29	Apparition de mycélium sur l'insecte traité et ré-isolement sur milieu PDA (originale, 2020)	41

Liste des tableaux

Numéro de tableau	Titre	Page
01	Les résultats des tests d'orientation de la bactérie de genre <i>Bacillus</i> isolée au sol (original, 2020)	33
02	l'aspect macroscopique et microscopique des isolats fongiques non phytopathogènes (original, 2020)	35

Introduction générale

L'utilisation des insecticides chimiques contre les insectes ravageurs, présente des effets négatifs pour l'environnement et la santé humaine. Aujourd'hui, il est devenu nécessaire d'accorder une priorité aux insecticides biologiques contre les insectes nuisibles.

Les biopesticides, « organismes vivants ou produits issus de ces organismes ayant la particularité de supprimer ou limiter les ennemis des cultures » sont utilisés depuis des siècles par les fermiers et paysans. Les biopesticides biologiques ont été classés selon leur origine végétale, animale ou microbienne.

Les biopesticides microbiens comprennent les bactéries, champignon, oomycètes, virus et les protozoaires. L'efficacité d'un nombre important d'entre eux repose sur des substances actives dérivées de ces microorganismes. Ce sont, en principe, ces substances actives qui agissent plutôt que le microorganisme lui-même (Meksem, 2018).

Approximativement, 750 espèces de champignon décrites sont des pathogènes obligatoires ou facultatifs sur un ou plusieurs stades de développement des insectes dans différents habitats (McCoy et al., 1988). En effet, en conditions naturelles, le développement des colonies des insectes est fréquemment menacé par l'infection des champignons entomopathogènes qui sont l'une des causes majeure de mortalités (Remaudière et al., 1981).

Les biopesticides, à base de bactéries représentent la majorité des biopesticides microbiens (Shoresh et al., 2010). Le genre *Bacillus* est le genre bactérien le plus étudié dans la recherche scientifique et le plus utilisé en agriculture. En effet, le genre *Bacillus* possède la possibilité de sporuler dans des conditions défavorables ce qui facilite sa production industrielle et sa formulation en un produit stable (Harwood et Wipat, 1996; Lolloo et al., 2010).

L'agrumiculture présente un intérêt vital pour un grand nombre de pays de par son importance économique, notamment les revenus appréciables qu'elles génèrent et les emplois qu'elle engendre.

De tous les insectes ravageurs des agrumes, les pucerons et les aleurodes constituent le groupe qui pose le plus de problèmes. D'après Fouarge (1990), les particularités biologiques et éthologiques de ces insectes, notamment leur potentiel biotique prodigieux et leur

extraordinaire adaptation à l'exploitation maximale du milieu par leur polymorphisme, en font des déprédateurs majeurs des cultures.

Dans ce contexte, et dans le but de mettre en évidence des souches de microorganismes potentiellement entomopathogènes (bactérie-champignon), nous nous sommes intéressés dans ce travail aux objectifs suivants :

L'isolement et identification des souches bactériennes à partir du sol de verger d'agrumes.

L'isolement et identification des souches fongiques à partir des cadavres d'insectes.

Quelles souches isolées pourraient présenter une pathogénicité sur les ravageurs modèles : pucerons et aleurodes ?

Chapitre I: Généralités sur les entomopathogènes

I. La lutte biologique par les entomopathogènes :

On entend par lutte biologique toute forme d'utilisation d'organismes vivants ayant pour but de juguler la pullulation et/ou la nocivité de divers ennemis de cultures (Jourdeuil et *al.*, 1991). La lutte biologique, précisément par l'utilisation de micro-organismes entomopathogènes est une alternative très prometteuse pour assurer une protection phytosanitaire performante de l'ubiquité naturelle des agents microbiologiques dans les écosystèmes. Leur grande variété, leur dissémination facile, leur spécificité d'action et aussi leur persistance dans l'environnement (DeKouassi, 2001), en font des agents biologiques efficaces.

Ces microorganismes appartiennent à plusieurs taxons à savoir les bactéries, les virus, les protozoaires et les champignons.

I.1. Les champignons entomopathogènes :

I.1.1 Définition :

Les champignons (fungi ou mycètes) constituent un groupe d'organismes hétérotrophes ubiquistes, riche de quelques 12 000 espèces, présentant des structures et des caractéristiques biologiques extrêmement diversifiées, adaptées au mode de vie saprophyte, parasitaire ou symbiotique (Senal et *al.*, 1993 ; Anonyme a, 2000 ; Anonyme b, 2000 ; Kirk et *al.*, 2001). 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).

I.1.2. Position systématique des champignons entomopathogènes :

La taxonomie des champignons entomopathogènes a connu un grand intérêt à partir des années 70 (Feng et *al.*, 1994). Selon la classification d'Ainsworth et Bisby (1971) in Hawksworth et *al.*, (1983), ces entomopathogènes appartiennent à quatre groupes : les champignons imparfaits, les *Entomophthorales*, les *Coelomomyces* et les *Ascomycètes*.

- la systématique ou l'étude de la diversité biologique en vue de sa classification, se concentre, à la lumière des découvertes récentes, sur une classification phylogénétique remplaçant la classification classique (Saiah, 2014).

- les champignons entomopathogènes appartiennent à quatre divisions différentes : Chytridiomycota, Zygomycota, Basidimycota et Ascomycota. Il existe plusieurs espèces de champignons appartenant à différents phylum et reconnus comme étant entomopathogènes (AnnexeI).

I.1.3. Mode d'action :

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, ils sont généralement très efficaces lorsque la densité des populations d'insectes ciblés est très élevée. Quoi qu'il en soit, le système immunitaire des insectes peut fortement influencer la pathogénicité de ces ennemis naturels, (Clarkson et Charnley, 1996).

Les champignons entomopathogènes doivent coloniser leur hôte pour l'utiliser comme source nutritive, par deux modes selon le type de pathogénicité du champignon (endoparasite et ectoparasite) :

Les champignons ectoparasites se développent superficiellement sur le corps des insectes sous forme de thalles. Ils obtiennent leur nourriture à la surface de leur hôte ou en pénétrant légèrement dans le tégument (Kuno, 1973).

Les champignons entomopathogènes possédant un mode d'action endoparasitique, incluent toutes les espèces qui pénètrent dans le corps et tuent habituellement leur hôte, en envahissant et ou digérant les tissus. La sécrétion de toxine a généralement été identifiée comme activité complémentaire pour ces mycètes. Quelques espèces d'endoparasites, tel que *penicillium* sp, sont capable d'infecter leur hôte via une blessure au niveau de la cuticule (Vey et Ouait, 1989).

I.1.4. Cycle biologique :

Le cycle de vie des champignons entomopathogènes comprend une phase parasite (de l'infection à la mort) et une phase saprophyte (après la mort). Le processus d'infection passe par plusieurs étapes :

- Adhésion des spores fongiques à la cuticule de l'insecte,
- Pénétration de la cuticule par le tube germinatif,
- Développement du champignon au sein de l'hôte,

Chapitre I Généralités sur les entomopathogènes

- Colonisation de l'hémocoèle par les hyphes.

Les spores des champignons entomopathogènes sont habituellement couvertes de mucus composé de protéines et de glucanes, ce qui facilite leur attachement à la cuticule de l'insecte. Chez plusieurs champignons entomopathogènes, les spores en germination produisent des structures spécialisées appelées appressoria.

L'appressorium est responsable de la liaison des spores à la cuticule. (Augustyniuk-Kram et Kram, 2012) Dans des conditions favorables de température et d'humidité (généralement élevée), ces spores germent, se développent sous forme d'hyphes et colonisent la cuticule de l'insecte. Finalement ils traversent la cuticule et atteignent la cavité du corps de l'insecte (hémocèle) (Clarkson et Charnley, 1996).

Le processus de pénétration de la cuticule est le résultat de la pression mécanique et de l'activité enzymatique du tube germinatif. L'étape de pénétration s'accompagne de la sécrétion de lipases, protéases et chitinases. La mort de l'insecte provient habituellement des dommages mécaniques causés par la croissance du mycélium à l'intérieur, et/ou des toxines produites et libérées par les agents pathogènes. Après la mort de l'hôte, le champignon colonise le cadavre et produit des spores durant 2 à 3 jours, (Augustyniuk-Kram et Kram, 2012)

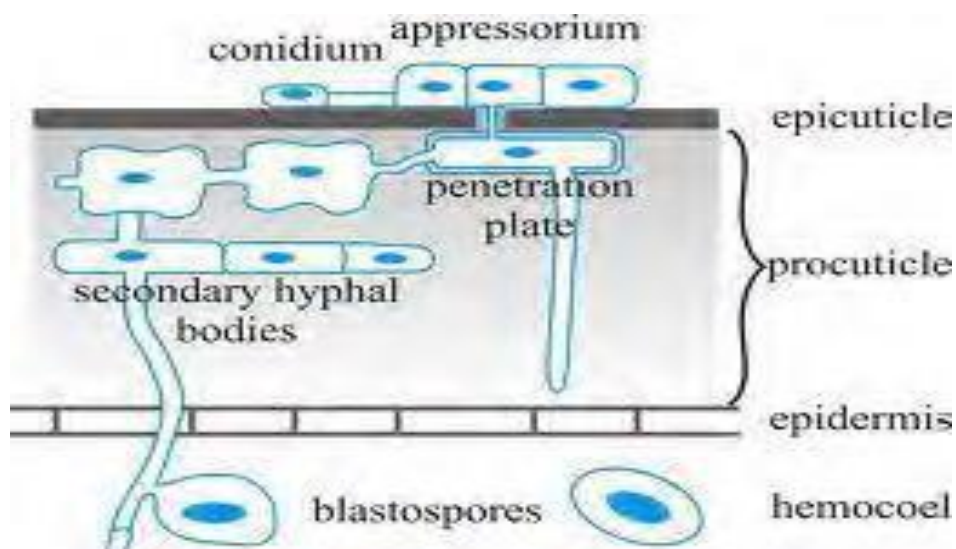


Figure 01 : Mode de pénétration des champignons entomopathogènes dans la cuticule des insectes (Clarkson et Charnley, 1996)

I.2. Les bactéries entomopathogènes :

I.2.1. Définition :

Les bactéries entomopathogènes sont des procaryotes microscopiques. Elles n'ont pas de vrai noyau, ni d'organites bien définis, elles ont une paroi cellulaire structurellement distincte. Selon Starnes et *al.*, (1993), plus d'une centaine de bactéries ont été identifiées comme ayant un potentiel d'utilisation en lutte biologique. Ces bactéries entomopathogènes appartiennent surtout, à trois grandes familles qui sont les Bacillaceae, (*Bacillus*) les Enterobacteriaceae (*Serratia* et *Xenorhabdus*) et les Pseudomonaceae (*Pseudomonas*) (Greathead et *al.*, 1994).

I.2.2. Mode d'action des bactéries entomopathogènes :

Pour être pathogène, une bactérie doit pouvoir pénétrer à l'intérieur de son hôte et échapper à son système immunitaire. Afin de s'établir de manière durable et coloniser l'insecte, elle doit altérer sa physiologie, notamment par la production de toxines. (Vallet-Gely et *al.*, 2008).

Des barrières physiques et chimiques empêchent les agents pathogènes d'envahir ou d'endommager le corps de l'insecte. La cuticule externe, le péristaltisme intestinal et la membrane péritrophique (couche interne de l'intestin moyen de l'insecte) sont des exemples de barrières physiques. A cela s'ajoute les principales défenses chimiques que sont le pH de l'appareil gastro-intestinal, les protéases, les peptides antimicrobiens, les récepteurs cellulaires du système immunitaire et le microbiote intestinal. (Vallet-Gely et *al.*, 2008).

I.3. Les virus entomopathogènes :

On distingue deux groupes de virus entomopathogènes : les virus possédant des corps d'inclusion paracrystallins et les virus sans corps inclusion. Ces deux groupes sont divisés en sept familles : les Baculoviridae, les Reoviridae, les Poxviridae (à corps d'inclusion); les Iridoviridae, les Parvoviridae, les Picornoviridae et les Rhabdoviridae (sans corps d'inclusion), (Faulkner et Boucias, 1985).

Les Baculoviridae, les Reoviridae et les Poxviridae sont les virus les plus utilisés en lutte biologique parmi les 650 espèces de virus entomopathogènes connus car ils sont bénins pour les vertébrés du fait que les corps d'inclusion ne pouvant se développer que chez les insectes.

I.3.1. Mode d'action des virus entomopathogènes :

Les baculovirus infectent le noyau des cellules. Ils forment des corps d'inclusion appelés les polyédres, qui sont riches en particules virales. Une fois ingérés, les polyédres sont dissous dans le suc intestinal de l'insecte libérant les virions qui traversent les cellules de l'épithélium intestinal par fusion membranaire ou par endocytose pour infecter par la suite les tissus de l'hôte. Les bioinsecticides viraux présentent plusieurs caractéristiques parmi lesquelles la spécificité, la haute virulence, la rapidité d'action et le niveau raisonnable de persistance dans l'environnement (Dent et *al.*, 1991).

I.4. Les protozoaires entomopathogènes :

Les protozoaires appartiennent à sept phyla, dont quatre, les Ciliophora, Sarcomastigophora, Apicomplexa et Microspora sont pathogènes des insectes (Dent, 1991). Les familles les plus utilisées en lutte biologique sont les Amoebidae et les Nosematidae (Greathead et *al.*, 1994). Par exemple *Bralamoeba locustae* (Amoeba appartenant au phylum des Sarcomastigophora) est très efficace pour le contrôle des locustes (Canning, 1982).

I.4.1. Modes d'action des protozoaires entomopathogènes :

Parmi les néogregarines, ce sont les microsporidies qui offrent le plus de potentiel en lutte microbiologique en tant qu'organismes unicellulaires eucaryotes (Canning, 1982). Ce sont des parasites intra-cellulaires obligatoires qui forment des spores caractéristiques. Chez les microsporidies du genre *Nosema*, l'infection se réalise par ingestion des spores, celles-ci germent dans le tube digestif et traversent les tissus épithéliaux (Maddox, 1987).

Dans le cytoplasme, l'agent infectieux se multiplie en produisant d'autres spores qui vont envahir l'insecte et peuvent par transmission verticale infecter la génération suivante. Les protozoaires provoquent des maladies chroniques à évolution lente ou des enzooties, qui affaiblissent et affectent la croissance ou la fécondité de leur hôte plutôt que d'entraîner une mort rapide (Poinar et *al.*, 1985 ; Cloutier et Cloutier, 1992). Cependant, l'hôte infecté devient souvent plus sensible à d'autres infections d'origines virales, bactériennes ou mycoses (Khachatourians, 1986).

Chapitre II : Utilisation des entomopathogènes dans le contrôle biologique de l'entomofaune nuisible

Introduction :

La lutte biologique microbienne a été définie par Wraight et *al.* (2016) comme étant l'utilisation des microorganismes vivants, capables de causer des maladies aux organismes pathogènes des cultures, comme des agents de lutte contre ces derniers. En ce qui concerne les insectes ravageurs, de nombreux agents microbiens ont été démontrés comme des moyens entomopathogènes efficaces, notamment les bactéries, les champignons et les virus (Lacey et Shapiro-Ilan, 2008 ; Mazid et *al.*, 2011). En effet, il y a 150 ans, l'idée d'utilisation de ces derniers a été établie (Ravensberg, 2011). Depuis, il y a plus de 50 microorganismes entomopathogènes qui sont actuellement commercialisés pour être employés surtout dans la lutte biologique augmentative (Lacey et *al.*, 2015).

II.1.Utilisation des champignons entomopathogènes :

Ces microorganismes sont des agents de lutte de grand intérêt puisqu'ils ont l'avantage d'affecter tous les stades de développement de l'insecte, y compris les oeufs (Samuels et *al.*, 2002; Ferreira et *al.*, 2005). Les espèces de champignons entomopathogènes les plus utilisées en lutte biologique appartiennent aux genres *Beauveria*, *Metharizium*, *Verticillium*, *Erynia*, *Hirsutella* et *Entomophthora* (De Kouassi, 2001).

L'utilisation des champignons entomopathogènes comme agents de lutte biologique génère un engouement mondial. En 1994, Feng et *al.* ont prévu un avancement significatif dans l'industrialisation et la production de ces champignons.

Actuellement, avec les nouvelles innovations biotechnologiques, on compte plus de 170 bioinsecticides à base de champignons entomopathogènes destinés à la gestion d'au moins cinq ordres d'insectes et d'acariens ravageurs (Chandler et *al.*, 2011; Wraight et *al.*, 2016b).

II.1.2. Exemples de champignons entomopathogènes :

II.1.2.1. *Beauveria bassiana* :

L'entomopathogène *Beauveria bassiana* (Hypocreales: Clavicipitaceae) très utilisé en lutte biologique, est l'agent responsable de la maladie appelée la muscardine blanche chez

les insectes. L'individu infecté est recouvert d'une importante couche de mycélium blanc, évoquant la neige. Cette espèce à un large spectre d'action et une grande virulence peut infecter l'hôte par simple contact (Meyling et al., 2009).

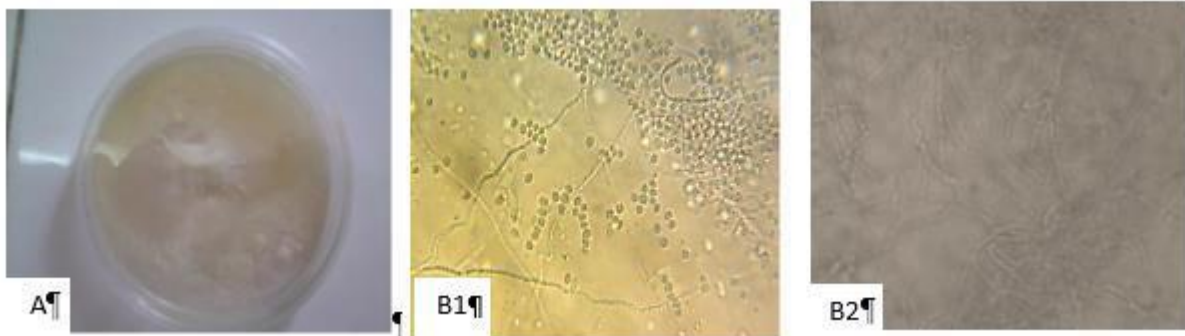


Figure 02 : Aspect macroscopique (A) et microscopique (B1 conidies, B2 hyphes) (X40) de *Beauveria bassiana*. (X40) (Saiah , 2010)



Figure 03 : Individu de *Schistocerca gregaria* infecté par *B. bassiana* (Haddadj et al., 2014)

Plusieurs études ont montré que *B. bassiana* peut infecter une large gamme d'insectes. Chez l'ordre des lépidoptères, 23 isolats de *B. bassiana* ont prouvé leur efficacité contre les larves du troisième stade de la tordeuse à bandes obliques, *Choristoneura rosaceana* (Tortricidae) (Todorova et al., 2002). Des travaux effectués sur des espèces appartenant à l'ordre des coléoptères ont démontré que *B. bassiana* peut entraîner une mortalité élevée contre la coccinelle maculée, *Coleomegilla maculata* (Coccinellidae), le scarabée argentin, *Cyclocephala signaticollis* (Scarabaeidae) et le doryphore de la pomme de terre (*Leptinotarsa decemlineata*) (Chrysomelidae) (Todorova et al., 1994 ; Cornia et Beatriz, 2004). Chez les homoptères, l'effet pathogène de *B. bassiana* a été évalué au champ contre le puceron russe du blé *Diuraphis noxia* (Aphidae) (Halling et al., 2004).

II.1.2.2. *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. 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.

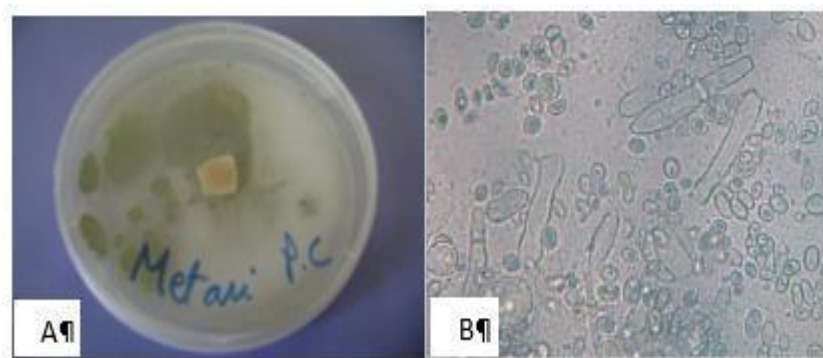


Figure 04 : Aspect macroscopique (A) et microscopique (B) (X40) de *Metarhizium anisopliae* var *anisopliae* (Saiah, 2009).

II.2. Utilisation des bactéries entomopathogènes :

L'utilisation des bactéries entomopathogènes dans la lutte biologique contre les insectes est très ancienne (Oulebsir-Mohand kaci, 2012). La plupart des bactéries utilisées en lutte biologique sont des bactéries qui forment des spores, ce qui facilite leur stockage et leur utilisation. De plus, il est possible de les produire. Les bactéries pénètrent dans l'hôte par une ouverture ou une blessure. Elle tue l'hôte, soit par sécrétion de toxines, soit par septicémie (Lydie, 2010).

Le genre *Bacillus* fait l'objet d'une utilisation pour combattre les insectes (Lereclus et Chauvaux, 1986). Ce genre regroupe un grand nombre d'espèces très répandues dans la nature, la majorité se développe mieux à 30°C jusqu'à 37°C (Brossard et Terry, 1984). Selon Larpent et Gourgaud (1997), le genre *Bacillus* produit une gamme assez variée de molécules qui peuvent être groupées en trois classes ; les antibiotiques, les enzymes et les toxines.

L'utilisation répétée des bactéries peut toutefois, comme les pesticides chimiques, entraîner une résistance chez certaines espèces (Dunphy et Tibelius, 1992).

II.2.1. Exemple de bactéries entomopathogènes, le genre *Bacillus* :

C'est en France, en 1938 que le premier bioinsecticide a été produit et commercialisé sous le nom commercial "Sporeine". Il a été élaboré avec des spores de la bactérie *B. thuringiensis* (Ravensberg, 2011).

Cette bactérie est la plus utilisée en lutte biologique microbienne (Bravo et *al.*, 2011; Lacey et Goettel, 1995; Mazid et *al.*, 2011; Tanada, 1959). En outre, en raison de leurs larges gammes d'hôtes (Lépidoptères, Diptères, Coléoptères et acariens), les produits formés des sous espèces de *B. thuringiensis* représentent 98% des pesticides microbiens bactériens (Lacey et *al.*, 2015).



Figure 05: Aspect macroscopique des colonies de *Bacillus thuringiensis* isolées (Majdoub, 2010)

II.3. Utilisation des virus entomopathogènes

Parmi les sept famille des virus, ce sont les *Baculoviridae*, les *Reoviridae* (Miller et *al.*, 1983) et le virus entomopox (*Poxviridae*) qui sont les plus utilisés en lutte biologique (Payne, 1982). Il est rapporté par Meynadier et *al.*, (1992) que dans certains cas, les virus liquéfient les corps gras entraînant une turgescence de l'insecte suivi de sa mort.

Plusieurs virus sont également disponibles comme agents de lutte biologique microbienne surtout contre les Lépidoptères (Lasa et *al.*, 2007; Wraight et *al.*, 2016b). L'étroite gamme d'hôtes et la résistance extrême aux radiations solaires de ces virus, surtout des baculovirus, favorisent leur utilisation en synergie avec d'autres agents de lutte sensibles à ces radiations,

notamment avec *B. thuringiensis*, pour les protéger et améliorer leur persistance sur les cultures (Wraight et al., 2016b). Pourtant, ces virus pathogènes d'insectes n'ont joué qu'un rôle mineur dans la gestion des ravageurs des cultures en serre puisque seule une minorité de ces ravageurs représentent des cibles potentielles pour ces virus entomopathogènes (Wraight et al., 2016b).

II.4. Utilisation des protozoaires entomopathogènes :

Parmi les protozoaires, *Nosema locustae* est surtout connu pour réduire la fécondité et la longévité des acridiens (Launois-luong et al., 1994). Selon Greathed et al., (1994), *Nosema acridophagus* et *N. cuneatum* semblent avoir un effet plus néfaste sur leurs hôtes que *N. locustae* car ils sont capables de les tuer.

Les Amoebidae, *Melameba locustae* semble être les protozoaires amiboïdes entomophiles qui présentent le plus d'intérêt en lutte microbiologique (Mclaughlin, 1971).

Chapitre III : Les biopesticides à base d'entomopathogènes

Les biopesticides pourraient être définis de la manière suivante : « Organismes vivants ou produits issus de ces organismes ayant la particularité de limiter ou de supprimer les ennemis des cultures. » (Thakore, 2006). Les produits considérés comme des biopesticides par les agences de réglementation européennes et mondiales sont d'origines diverses. Ils peuvent être classés en trois grandes catégories, selon leur nature : les biopesticides microbiens, les biopesticides végétaux et les biopesticides des animaux (Chandler et al., 2011 ; Leng et al., 2011).

III.1. Utilisation des biopesticides en plein champs :

Les champignons et les bactéries entomopathogènes sont les microorganismes les plus connus et les plus utilisés en lutte biologique contre les insectes ravageurs, (Yaroslavtseva et al., 2017).

Plus de 200 espèces d'insectes sont susceptibles au mycète *Beauveria bassiana* (Saranraj et Jayaparakash, 2017). Par exemple, depuis 1936 en Afrique de Sud, le potentiel insecticide de ce champignon contre les criquets a été reconnu et même certaines de ses souches ont été enregistrées aux États-Unis pour lutter contre ce ravageur au champ (Bitsadze et al., 2013; Halouane et al., 2001; Jaronski et Goettel, 1997; Lednev et al., 2008).

III.2. Utilisation des biopesticides sous serre :

Il y a 10 ans, 171 mycoinsecticides et mycoacaricides étaient disponibles sur le marché, dont 52 (environ 30%) destinés à la lutte contre les insectes les plus problématiques en serre, particulièrement les pucerons, les thrips et les aleurodes (Faria et Wraight, 2007). Cependant, d'après Wraight et al. (2016a), seulement 28 mycoinsecticides sont disponibles et les 24 autres produits ne sont plus disponibles ou sont utilisés pour la gestion de ces insectes dans les cultures en champs.

Ziani (2008) et Sabbahi (2008) ont démontré la susceptibilité des larves et des adultes de la punaise terne *Lygus lineolaris*, Insecte, Hemiptera au *Beauveria bassiana*, respectivement, dans les vignobles et les fraisières. Son efficacité contre la mouche blanche, *Trialeurodes vaporarium* en serre a été également établi par Labbé (2005).

III.3. Les avantages d'utilisation des biopesticides microbiens :

Les bio pesticides microbiens montrent plusieurs avantages en comparaison avec les produits phytosanitaires de synthèse :

- Ils ont une action spécifique vis-à-vis des ravageurs, ils ne sont pas toxiques et se dégradent plus rapidement dans l'environnement (Thakore, 2006).
- Ils protègent la plante par plusieurs mécanismes directs et indirects, à savoir: la compétition, l'antagonisme direct et la stimulation du système immunitaire de la plante, ils peuvent également promouvoir la croissance des plantes (biofertilisation et phytostimulation) et/ou stimuler les interactions entre les plantes et d'autres microorganismes bénéfiques (Antoun et Prevost, 2006).
- Ils peuvent avoir un rôle de biofertilisant. La biofertilisation se manifeste dans la solubilisation des nutriments insolubles dans le sol. Par exemple, beaucoup de microbes bénéfiques du sol produisent des enzymes (phytase et phosphatases non spécifiques) et des acides organiques, pour solubiliser les formes insolubles du phosphate organique et inorganique.

III.4. Les inconvénients d'utilisation des biopesticides microbiens :

La plupart des biopesticides sont composés d'organismes vivants et leur efficacité est déterminée par les conditions biotiques et abiotiques du champ (Cawoy et *al.*, 2012).

Leur production, basée principalement sur le processus de fermentation dans des bioréacteurs industriels est très complexe et comporte beaucoup de problèmes dont le plus sévère est celui de la contamination. Par ailleurs, la formulation des biopesticides microbiens en un produit stable et leur stockage affecte le taux de viabilité des cellules qui les constituent. Enfin, le processus d'homologation des biopesticides est complexe, cher et dure longtemps (Rocheffort et *al.*, 2006).

III.5. Préparations commerciales les plus utilisées dans les agrocénoses et les systèmes forestiers :

III.5.1. L'utilisation dans les agrocénoses :

Les mycoinsecticides comprennent plusieurs espèces dont les plus importantes sont *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* et *Verticillium lecanii*. Cette dernière espèce est commercialisée aux Pays-Bas pour la lutte contre les pucerons (Vertalec) et contre les

aleurodes (Mycotal) en cultures sous serres. Les cultures abritées constituent un domaine de prédilection pour ces biopesticides en raison des possibilités qui existent, dans ces milieux fermés, de contrôler le climat (rôle essentiel de la température et de l'humidité sur la survie et l'efficacité des préparations entomopathogènes).

L'espèce *Metarhizium anisopliae* a déjà été décrite du point de vue de ses propriétés insecticides en 1878 par le prix Nobel russe Elias Metschnikoff. En fait le genre *Metarhizium* est un des plus répandus de par le monde ; il est retrouvé dans le sol en de nombreux endroits. Beaucoup d'espèces y sont sensibles ; ce sont principalement des coléoptères, dont l'othiorhynque de la vigne, mais cet entomopathogène, ainsi que d'autres espèces apparentées comme *M. flavoride*, est également prometteur pour la lutte contre les criquets et certains homoptères. Il existe également une préparation expérimentale dénommée « BIO 1020 » en cours de développement chez Bayer. (FAO, 2012)

Parmi les autres espèces entomopathogènes, *Beauveria bassiana* présente également des perspectives intéressantes notamment dans la lutte contre la Pyrale du maïs (*Ostrinia nubilalis*).

Les préparations commerciales de *Bacillus thuringiensis* disponibles permettent de lutter contre des larves de lépidoptères, de diptères (moustiques et simules) et de coléoptères (doryphore). En lutte intégrée sur cultures légumières, la firme NovoNordisk, précise explicitement que *B. thuringiensis* sp *aizawai* convient pour lutter contre la teigne du chou dans le Sud-Est Asiatique, alors que les produits à base de la sous espèce *kurstaki* sont recommandés pour lutter contre *Spodoptera* sp, (FAO, 2012)

III.5.2. L'utilisation dans les systèmes forestiers :

L'utilisation des champignons entomopathogènes contre les scolytes est une stratégie intéressante dans le domaine de la lutte biologique en foresterie. Cependant, les méthodes d'inoculation fongique restent un défi majeur en raison du comportement cryptique de ces insectes. Plusieurs expériences ont été effectuées afin de sélectionner un isolat fongique performant contre les adultes de *Dendroctonus simplex* et d'évaluer l'efficacité de son inoculation à l'aide d'un dispositif d'autodissémination (Srei, 2017).

En forêts, *Bacillus thuringiensis* est utilisé pour contrôler la processionnaire du pin (*Thaumetopoea pityocampa*), la tordeuse grise du mélèze (*Zeiraphera diniana*), la chenille

processionnaire du chêne (*Thaumetopoea processionea*) ou le Bombyx cul brun (*Euproctis chrysorrhoea*), un ravageur des forêts de chênes.

III.5.2.1. Cas de l'utilisation du green muscle (*Metarhizium anisopliae var acridum*) en Algérie :

Les premières tentatives d'utilisation des biopesticides à base de champignons entomopathogènes ont commencé durant les années 90 suite à l'isolation de la souche *Metarhizium* à partir d'un criquet mort récolté dans la zone agricole de la région d'Adrar dans le sud algérien. Plusieurs travaux de recherche ont été conduits notamment par des étudiants en thèse pour tester l'efficacité de ce champignon contre le Criquet pèlerin et autres acridiens au niveau du laboratoire de la Direction de la lutte antiacridienne à l'INPV (Institut National de la Protection des Végétaux), et de plusieurs universités.

La première expérimentation d'un biopesticide sur le terrain en conditions naturelles contre des populations larvaires du Criquet pèlerin a été réalisée dans la Wilaya d'El Oued dans le sud-est de l'Algérie à la fin de l'invasion acridienne 2004-2005. Ce test a permis de confirmer l'efficacité du produit biologique sur les larves, résultats déjà constatés dans d'autres pays de la région occidentale.

Par la suite, et en raison de l'absence des populations larvaires du criquet pèlerin, d'autres tests ont été réalisés durant les années 2012, 2013 et 2016 contre les larves du criquet marocain dans le nord algérien dont le dernier a été réalisé dans la wilaya céréalière de Sidi Bel Abbas. Le bio-pesticide utilisé « NOVACRID » est composé des spores d'un champignon pathogène appartenant au groupe des champignons mitosporiques, qui sont des anamorphes (stades asexués) de champignons. Afin de mesurer l'effet des conditions météorologiques sur l'efficacité du produit biologique, l'essai a été effectué en deux périodes (Anonyme, 2019).

III.5.2.2. Cas de l'utilisation de *Bacillus thuringiensis* en Algérie

La bactérie *Bacillus thuringiensis* (Thuricide HP) a été utilisée un autre ravageur en Algérie, *Thaumetopoea pityocampa* (Lépidoptera, Thaumetopoeidae). Ce biopesticide provoque de fortes mortalités au niveau de tous les stades larvaires et des nymphes, cette mortalité est due surtout à des altérations de la structure de l'intestin et de l'hémogramme (Habes et Soltani, 1991).

Objectif :

Notre travail a été réalisé au niveau du Laboratoire de Recherche des Plantes Médicinales et Aromatiques de la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Saad Dahleb, Blida -1- . Les principaux objectifs de ce travail ont été d'isoler et d'identifier des souches de champignons et bactéries à partir des cadavres d'insectes (pour les champignons) et du sol (pour les bactéries), afin d'étudier leurs activités entomologiques sur des espèces de ravageurs de l'ordre des Homoptera, entre autre les pucerons et les aleurodes qui complètent parmi les plus importants des ravageurs sur les citrus.

I. Matériel :**I.1. Matériel biologique :**

Les isolats fongiques utilisés lors de cette expérimentation ont été isolés à partir des cadavres d'insectes ravageurs appartenant à différents ordres (Hemiptera et Hymenoptera notamment), provenant de différents vergers de la wilaya de Blida, et qui ont présenté des symptômes d'infection fongique, (**Figure 06**).



Figure 06 : Cadavre d'Aleurode infecté (**Original, 2020**)

Les bactéries utilisées dans notre étude ont été isolées à partir de 3 sols de vergers de la wilaya de Blida.

Le matériel animal est représenté par des pucerons (**Figure 07**) qui ont été récoltés au niveau de la station expérimentale de l'université de Saad Dahleb Blida -1- pour être utilisés en tant que cibles testées dans les tests de pathogénicité à base d'isolats fongiques purifiés pour les besoins de l'étude.

Par ailleurs, nous avons prélevé des feuilles de citrus infestées par des stades biologiques âgés de l'aleurode des agrumes, prélevées d'un verger d'agrumes situé de la région de Beni Mered (wilaya de Blida), (**Figure 07**), pour le test de pathogénicité avec la souche bactérienne isolée.

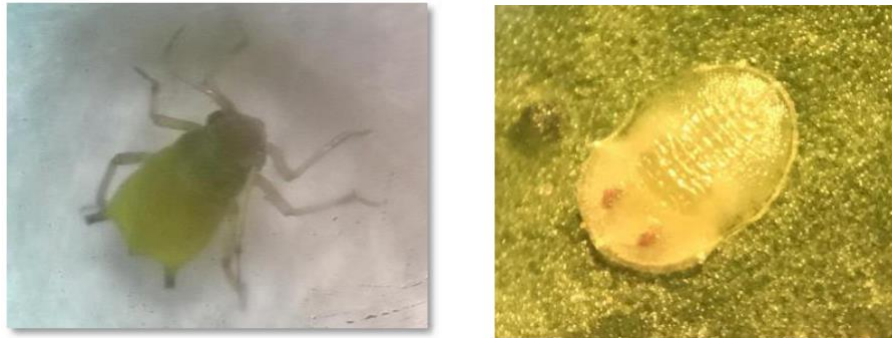


Figure 07 : Insectes cibles utilisés pour les tests de pathogénicité (à gauche : puceron aptère *Aphis spiraecola*, à droite : pupa d'Aleurode (**Original, 2020**))

I.2. Matériel non biologique :

Nous avons utilisé un ensemble de matériels et milieux de culture, ainsi que des produits et réactifs qui nous ont permis de réaliser l'isolement, la purification des souches fongiques et bactériennes en vue de les isoler des cadavres et du sol et les tester sur les insectes ravageurs ciblés. (**Annexe II**).

II. Méthode :

II.1. L'isolement, purification et identification des bactéries

II.1.1. L'échantillonnage :

Les échantillons, ont été prélevés après avoir écarté légèrement les cinq premiers centimètres du sol. Une quantité suffisante de terre a été ensuite prélevée entre de 15 et 20 cm de profondeur, et répartie dans des sacs en papier. Les différents échantillons sont après transportés au laboratoire puis déposés à l'aide d'une spatule sur une feuille en aluminium. Nous avons tamisé le sol avec des tamis de différents diamètres afin d'éliminer les pierres et les débris végétaux, pour obtenir une poudre fine.

II.1.2. La préparation des dilutions :

Après avoir été tamisés, les différents échantillons du sol, sont finement broyés. Après cela, nous effectuons une série de dilutions selon les étapes suivantes :

- 10 g de sol sont mis dans un erlenmeyer contenant 90 ml d'eau distillée stérile puis on homogénéise pendant 10 minutes à l'aide d'un agitateur magnétique. Cette dilution représente la solution mère à partir de laquelle d'autres dilutions sont préparées jusqu'à la dilution 10^{-5} . Pour cela on procède de la façon suivante :
- On prend 1ml de la solution mère (10g sol+ 90ml d'eau distillée stérile) puis on l'introduit dans un tube à essai contenant 9ml d'eau distillée stérile pour l'obtention de la dilution 10^{-1} . Par cette méthode, on réalise la suite des dilutions jusqu'à la dilution 10^{-5} .
- Pour sélectionner seulement les bactéries du genre *Bacillus*, les échantillons des solutions de suspensions de sol diluées, sont chauffés à 60°C pendant 60min dans un bain marie (Chilcott et Wigley, 1993).
- Après chauffage, nous prélevons 0.1ml de chaque dilution que nous déposons à la surface de boîtes de pétri contenant de la gélose nutritive (GN). Les boîtes ont été incubées à 30°C puis observées après 24h. On procède ensuite à la lecture afin de rechercher des colonies suspectes de *Bacillus* qui présentent les caractères morphologiques suivants : (très grandes, sèches, irrégulières), Ces colonies sont alors purifiées sur le milieu GN (**Figure 08**).

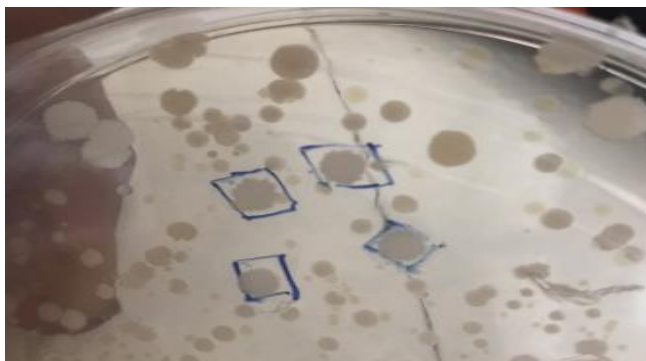


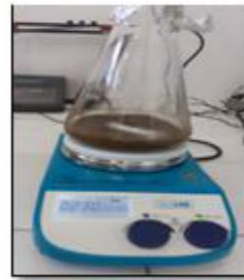
Figure 08 : Les colonies suspectes de *Bacillus* observées après l'incubation (**Original, 2020**)



1) On a pesé 10 g du sol



2) mise dans un erlenmeyer qui contient 90ml d'eau distillée stérile



3) Homogénéisé pendant 10 minutes



4) Solution mère



5) préparation des dilutions décimale



6) A l'aide d'une micropipette, On prend 1ml de la solution mère



7) On l'introduit dans un tube à essai qui contient 9ml d'eau distillé stérile pour l'obtention la dilution 10^{-1} (jusqu'à 10^{-5})



8) Les échantillons sont mis à un choc thermique à 60°C pendant 60min dans un bain marie



9) On a déposé 0.1ml de chaque dilution à la surface de milieux GN suivi d'un étalement. Les boites ont été incubées à 30°C et observées quotidiennement pendant 24h



Figure 09 : Etapes explicatives de l'isolement des bactéries à partir du sol (Original, 2020)

II.1.3. Purification et identification des souches isolées :

II.1.3.1. Purification

La purification des souches consiste à prendre les colonies suspectes de *Bacillus* et à les ensemercer en stries sur des boîtes de Pétri contenant de la gélose nutritive, puis à les incuber à 30°C pendant 24h (**Figure 10**).



Figure 10 : Colonies suspectes de la bactérie *Bacillus* et ensemencement (**Original, 2020**)

II.1.3.2.L'identification

L'identification des isolats bactériens purifiés est basée sur, microscopique et par les tests d'orientations (coloration de Gram, test de Catalase, test d'oxydase, aspect sur milieu TSI, milieu citrate de Simmons et coloration de Spores).

a) Identification macroscopique

L'étude macroscopique nous a permis de déterminer le diamètre, la morphologie, la forme et l'aspect des colonies.

b) Identification microscopique par coloration simple : bleu de méthylène.

▪ Principe et technique

Ce test permet de déterminer la forme, l'arrangement des bactéries. Il consiste en l'observation d'une goutte de suspension bactérienne fixée, et colorée par le bleu de méthylène. L'observation se fait sur microscope optique.

On réalise un frottis des bactéries sur une lame propre et sèche. Avec une anse on étale doucement un peu de suspension bactérienne sur le milieu de la lame. On laisse sécher puis on fixe à la flamme en passant la lame trois fois dans la flamme du bec Bunsen réglé en flamme éclairante (virole fermée). On recouvre d'une solution de bleu de méthylène pendant une minute. Puis on rince et on sèche entre deux papiers filtres. Enfin on élimine l'humidité résiduelle au-dessus de la veilleuse du bec Bunsen.

c) Tests d'orientations

C.1. Coloration de Gram :

▪ Principe et technique

La coloration de Gram est la plus utilisée en histologie pour étudier la classification des bactéries. Le processus permet de séparer la plupart des bactéries en 2 groupes par rapport à la proportion de peptidoglycanes contenue dans les membranes.

On prépare un frottis. A partir de la suspension bactérienne, on prend une goutte et on l'étale sur une lame par des mouvements circulaires du centre à la périphérie, puis on laisse sécher à la température du laboratoire où à 37°C.

- **Réalisation de la coloration :** Nous procédons aux étapes suivantes.
 - Coloration par le violet de gentiane ou cristal violet. Laisser agir durant une minute, Rincer à l'eau distillée,
 - Recouvrir la lame par le lugol et laisser agir 30 secondes
 - puis rincer à l'eau distillée,
 - Verser goutte à goutte l'alcool sur la lame inclinée jusqu'à la décoloration (5 à 10 secondes), puis rincer l'eau distillée,
 - Contre-coloration à la fuchsine. Laisser agir de 30 secondes à 1 minute. Laver immédiatement à l'eau distillée. Sécher la lame. **(Figure 11)**



Figure 11 : Réalisation de la coloration de gram (Original, 2020)

C.2. Test de la catalase et de l'oxydase

■ Principe et technique

La catalase est une enzyme de la chaîne respiratoire qui a la propriété de décomposer l'eau oxygénée en eau et en oxygène gazeux ($2\text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$). Sur une lame propre et sèche, on dépose une goutte d'eau oxygénée. A l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée, on ajoute l'inoculum et on observe immédiatement l'apparition de bulles.

L'oxydase est une enzyme du cytochrome qui intervient dans les divers couples d'oxydoréduction et qui assure la fixation de l'oxygène moléculaire sur le cytochrome réduit. A l'aide de la pipette Pasteur, prélever un fragment de la colonie et le déposer sur un papier filtre imprégné du réactif.

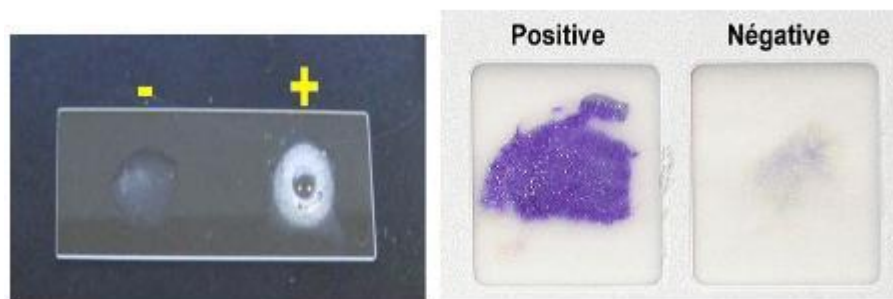


Figure 12 : Test de catalase (gauche) et de l'oxydase (droite)

C.3. Milieu TSI (Triple Sugar Iron) et citrate de Simmons :

■ Principe et technique (Milieu TSI)

La gélose TSI (Triple Sugar Iron) permet la mise en évidence rapide de la fermentation du lactose, du glucose (avec ou sans production de gaz), du saccharose et de la production de sulfure d'hydrogène (H_2S). Nous avons utilisé ce test pour mettre en évidence la fermentation seulement du Glucose et la production de gaz pour les Bacillus.

On prélève une colonie à l'aide d'une pipette Pasteur à partir de la boîte de gélose nutritive. On ensemence la pente par des stries, puis on effectue une pique centrale dans le culot, et enfin, on incube à 37°C pendant 24h.

- **Principe et technique (Milieu citrate de Simmons)**

Ce milieu ne contient qu'une seule source de carbone qui est le citrate. Une bactérie citrate positive utilise le citrate en provoquant de l'alcalinisation du milieu (virage au bleu de l'indicateur de pH). On ensemence le milieu par des stries sur la pente à partir d'une suspension bactérienne

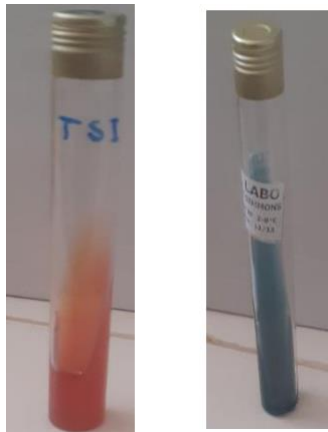


Figure 13 : Mise en évidence de la bactérie du genre *Bacillus* à travers les milieux TSI et citrate de Simmons

C.4. Coloration de spores :

- **Principe et technique :**

La solution aqueuse de vert de malachite a la propriété de traverser avec facilité après chauffage la paroi de la spore et de colorer essentiellement et sélectivement ces substances propres. Nous préparons d'abord un frottis bactérien à partir d'une culture bactérienne âgée de 48h, le frottis est recouvert d'un papier filtre sur lequel la solution de vert de malachite est appliquée. La coloration se fait par chauffage par le Bec Bunsen pendant 10minutes.

Nous rinçons à l'eau de robinet après retrait du papier filtre, suivi d'une coloration à la Fuschine pendant 5 minutes. L'observation se fait après séchage, à l'objectif G× 100. Les spores apparaissent colorées en vert, les corps bactériens en rose.

II.2. Méthodes d'isolement, purification et identification des champignons :

II.2.1. Isolement

L'isolement des microorganismes entomopathogènes est réalisé dans des conditions stériles, toutes les manipulations se sont déroulées à proximité de la flamme du bec Bunsen. Les cadavres d'insectes ont été récoltés à partir de différents vergers agricoles de la wilaya de Blida. Ces cadavres ont été désinfectés dans 2° d'eau de javel pendant 2 minutes, rincés 3 fois dans l'eau distillée stérile, puis séchés avec du papier absorbant stérile.

Après le séchage, ils sont mis dans des boites de Pétri en verre contenant des coton humides et placés dans une étuve à une température de 28°C pendant 4 à 5 jours, pour créer un environnement humide qui favorisera le développement et l'apparition du champignon. Après l'apparition du mycélium sur les cadavres des insectes (**Figure 14**), ils sont placés directement dans des boites de pétri contenant le milieu P.D.A (Potato-Dextrose-Agar). Les boites ont été incubées dans l'étuve à 28°C et observées quotidiennement pendant 5 jours.



Figure 14 : Apparition de mycélium sur un cadavre d'insecte à partir de la mise en chambre humide (**Original, 2020**)

II.2.2. Purification

Les colonies fongiques obtenues ont subi une purification, par la réalisation de repiquages successifs nécessaires jusqu'à l'obtention d'une souche pure, confirmée par l'observation macroscopique et microscopique. Les boites ont été incubées à 28°C. La lecture est faite chaque 48h, jusqu'à l'obtention d'une souche pure et bien développée.

Après l'isolement et la purification des souches fongiques à partir des cadavres d'insecte, nous avons réalisé une sélection de ces isolats à travers un test de pathogénicité des feuilles de géranium (plante sensible aux phytopathogènes), dans le but d'éliminer les souches pathogènes aux plantes, et de garder celles non phytopathogènes aux plantes

(souches d'intérêt pour notre travail). Le test de pathogénicité a été réalisé sur les feuilles de géranium *Pelargonium* sp selon les étapes suivantes :

Nous Choisissons de jeunes feuilles saines et de même taille. Les feuilles ont été prélevées au mois de février au niveau d'un espace vert signifie jardin, endroit où il ya de la végétation. Ces feuilles sont par la suite désinfectées à l'eau de javel 2° pendant 2 minutes puis rincées 3 fois dans l'eau distillée stérile, (**Figure 15 -1-**) et enfin séchées sur un papier absorbant stérile.



Désinfection des feuilles de Géranium



Dépôt des disques de l'isolat sur feuille de Géranium



Incubation des feuilles de Géranium en chambre humide

Figure 15 : Etapes considérées pour l'étude du test de pathogénicité des isolats fongiques sélectionnés sur les feuilles de Géranium. (**Original, 2020**)

Nous prenons des disques à partir des isolats purifiés, à l'aide de l'embout circulaire de la pipette Pasteur nous déposons directement sur les feuilles de Géranium. (**Figure 15 -2-**). Ces feuilles de Géranium ainsiensemencées sont mises dans une boîte fermée contenant du coton humidifié et recouvertes par un sachet transparent pour créer un environnement humide (chambre humide) et favoriser le développement de mycélium. L'incubation est faite à 28°C dans l'étuve, (**Figure 15 -3-**). Les observations sont réalisées après 3 jours.

II.2.3. Identification

L'identification des isolats fongiques purifiés et déjà sélectionnées est basée sur l'observation macroscopique et microscopique des souches isolées et identifiées.

a) Identification macroscopique

L'examen des boîtes s'effectue à l'œil nu et avec la loupe binoculaire. On observe attentivement, dans un endroit bien éclairé la forme, la taille et la couleur du champignon purifié.

b) Identification microscopique

L'observation de la morphologie des chaînes de spores et celle du mycélium s'est faite en utilisant le ruban adhésif, en appuyant légèrement avec un morceau de ruban sur la souche. La manipulation a été réalisée devant le bec bunsen afin d'éviter la contamination des souches pures. Nous avons collé le scotch contenant la souche sur une lame stérile et examiné au microscope optique à l'objectif *10 et * 40.

III.1. Test d'entomopathogénicité des bactéries isolées sur les aleurodes

Après l'isolement et la purification de les colonies bactériennes porteuse des caractères généraux d genre *Bacillus*, la souche a été subi un test de pathogénicité sur les larves d'aleurode pour étudier son potentiel insecticide.

III.1.1 Echantillonnage des larves d'aleurodes

Les feuilles d'agrumes infestées par l'aleurode des citrus sont observées au laboratoire sous la loupe binoculaire, en vue de sélectionner les nymphes âgées (larves de stade L4). Les différents individus de l'aleurode sont mentionnés par un carré à l'aide d'un feutre indélébile sur la feuille d'agrumes infestée considérée.

III.1.2. Préparations de l'inoculum

La solution bactérienne a été préparée à partir de cultures jeune âgées de 24h à 48h, à l'aide d'une anse de platine désinfectée à la flamme du bec Bunsen. Après refroidissement, nous avons raclé environ 10 colonies qu'on introduit dans des tubes contenant 10ml d'eau distillée stérile (volume jugé suffisant pour le trempage des feuilles). Les solutions bactériennes ont été agitées manuellement jusqu'à l'homogénéisation de la suspension, (**Figure 16**).



Figure 16 : Trempage des feuilles d'agrumes infestés par les larves de l'aleurode (stade L4) dans la solution bactérienne (**Original, 2020**)

III.1.3. Application des traitements à base de la solution bactérienne

L'inoculation a été effectuée par trempage des fragments de feuilles d'agrumes qui portent les larves d'aleurode (L4) à raison de 3 répétitions (fragments de feuilles) portant 5 larves, en plus du témoin (fragments des feuilles d'agrumes portant 5 larves) traité à l'eau distillée stérile. Les différents fragments sont disposés dans des boîtes que l'on a fermé avec du para film et mis dans l'étuve à une température de 30°C, (**Figure 17**). Les observations sont faites après 24 à 48h heures pour évaluer le taux de mortalité des larves d'aleurodes.

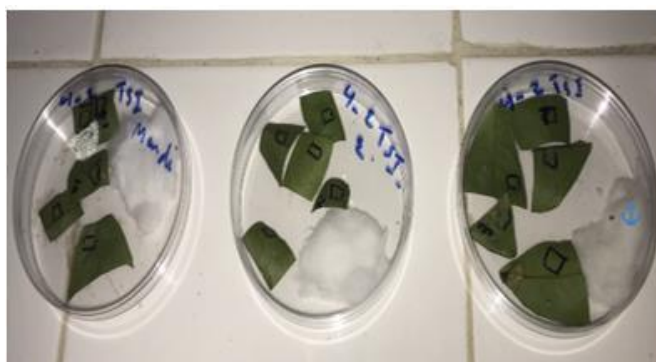


Figure 17 : Test de pathogénicité à base de la solution bactérienne sur les larves de l'aleurode des agrumes (**Original, 2020**)

A la fin de leur développement larvaire, les larves de stade 4 de l'aleurode se transforment en pré-pupes, pupes puis en adultes.

Après observation à la loupe binoculaire, les larves (L4) et les adultes morts ont été écrasés et mis directement sur la surface d'un milieu GN à 30°C pendant 24h. Les colonies qui ont poussé à côté des larves et adultes morts après l'incubation, ont été repiquées sur gélose nutritive et incubées de nouveau à 30°C pendant 24h. En se basant sur les caractères morphologiques des colonies bactériennes du genre *Bacillus*, nous vérifions si la mortalité est réellement due à l'infestation par ce bacille.

III. 2. Test d'entomopathogénicité des champignons sélectionnés sur les pucerons :

L'objectif de cette partie consiste à étudier le potentiel insecticide de souches fongiques non phytopathogènes, isolées et purifiées à partir des cadavres d'insectes. Les pucerons soumis aux tests, ont été récoltés à partir de plantes spontanées infestées, au niveau de la station expérimentale de l'Université Saad Dahleb Blida 1.

Nous avons choisi des feuilles d'agrumes saines prélevées dans le verger d'agrumes multivariétal de la station expérimentale. Nous avons désinfecté ces feuilles dans de l'eau de javel à 2° pendant 2 minutes puis nous les avons rincées à l'eau distillée stérile 3 fois. Après cette étape, nous avons séché ces feuilles à l'aide de papier absorbant stérile, et nous les avons mises dans des boîtes de pétri stériles avec un coton humide. Un nombre de dix (10) pucerons aptères de même taille a été déposé sur chaque feuille à l'aide d'une épingle fine.

III.2.1. Préparations de l'inoculum fongique :

Les solutions fongiques ont été préparées à partir de cultures âgées de 10 à 15 jours et ayant bien sporulé. Les colonies prélevées des trois isolats fongiques ont été introduites dans des tubes contenant 5 ml d'eau distillée stérile. Puis, les solutions obtenues ont été agitées manuellement jusqu'à l'homogénéisation des suspensions. Par la suite, une goutte de tween 80 a été ajoutée dans chaque tube pour la libération maximale des spores.

III.2.2. Application des traitements, observations et lecture

Nous avons choisi deux modes d'application des suspensions fongiques. Les traitements des pucerons, respectivement par pulvérisation et par trempage de la suspension conidienne des isolats retenus ont été réalisés dans des boîtes de pétri en verre stériles à raison de 3 répétitions pour chaque méthode, et de 10 individus par répétition. Les témoins ont été traités par de l'eau distillée stérile.

Enfin les boîtes ont été fermées avec du parafilm et mises dans l'étuve à une température de 28 °C. Les observations sont faites après 24 heures en calculant le taux de mortalité des pucerons. La lecture du test est effectuée par dénombrement sous la loupe binoculaire des larves vivantes et mortes dans chaque modalité. Lors de la lecture, nous avons distingué les individus vivants ; les individus qui répondent à la stimulation d'une fine épingle mais sont incapables de se déplacer et sont comptés comme morts ; les individus morts, qui sont immobiles et ne répondent pas à deux stimulations avec l'épingle.

Le pourcentage de mortalité observée chez les individus traité et témoins a été calculé par la formule suivante :

Mortalité observée % = Nombre d'individu morts/Nombre total des individus 100
(N=30 individus par isolat et par modalité de traitement)

À chaque observation, les insectes morts sont incubés dans des chambres humides, puis repiqués sur milieu PDA afin de ré-isoler le pathogène et vérifier si la mortalité est réellement due à l'infestation par le testé.

II.1. Résultats de l'identification des souches de *Bacillus* isolées des échantillons de sol étudiés

II.1.1. Identifications macroscopique et microscopique

Les isolements effectués à partir du sol ont permis d'obtenir des colonies bactériennes différentes. Nous nous sommes intéressés aux souches appartenant au genre *Bacillus*, en nous basant sur les caractères généraux et culturaux des bactéries de ce genre.

Après la purification des colonies suspectes (24h d'incubation à 30°C sur milieu GN), les *Bacillus* apparaissent sous forme de grandes colonies de 2 à 4 mm, de forme irrégulière, de consistance et crémeuse, (**Figure 18**).

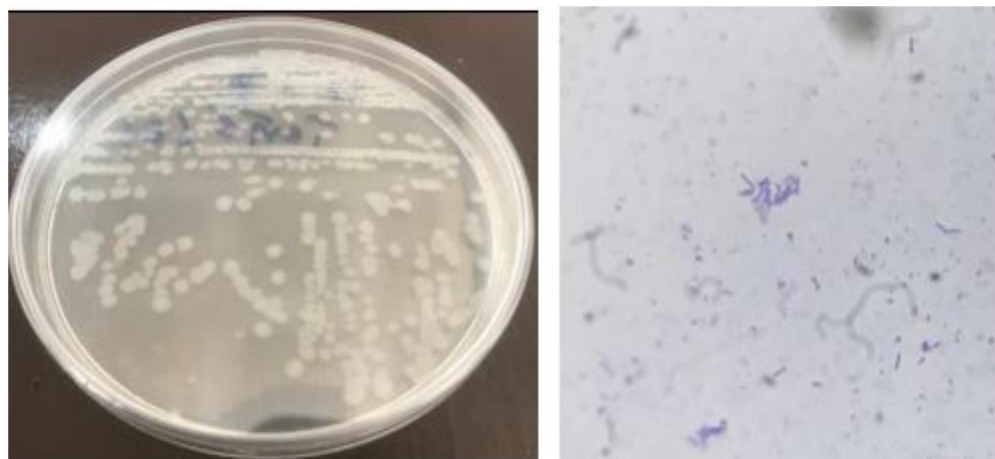


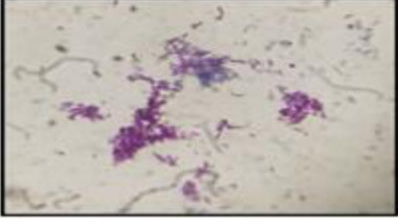

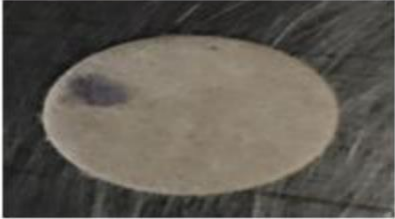



Figure 18 : Observations macroscopique (à gauche) et microscopique (à droite) d'une colonie bactérienne purifiée (**Original, 2020**)

L'étude microscopique de la colonie suspecte par la coloration simple au bleu de méthylène, a mis en évidence des bactéries de forme longues, avec l'aspect de bacilles, (**Figure 18**).

II.1.2. Résultats des tests d'orientations

D'après l'identification par les tests d'orientations (coloration de Gram, catalase, oxydase, gélose TIS, citrate de Simmons et coloration de spores) la souche bactérienne possède les caractères biochimiques suivantes : Gram +, Catalase +, oxydase +, TSI : Glucose + citrate de Simmons + et spores + (Tableau 01).

Tableau 01 : Résultats des tests d'orientations de la bactérie du genre *Bacillus* isolée du sol (Original, 2020).

Tests et lecture	observation
<p>Coloration de Gram Couleur : violet Gram : positive</p>	
<p>Test de la Catalase Apparition de bulles, dégagement gazeux de dioxygène : catalase +</p>	
<p>Test de l'oxydase Une réaction positive se traduit par un virage du réactif de l'incolore au violet : oxydase +</p>	
	<p>Test TSI Bactérie de type fermentatif du glucose (+) : culot jaune</p>
	<p>Test du Citrate de Simmons Couleur : bleue La réaction : positive, il existe l'enzyme du catabolisme du citrate chez la bactérieensemencée. La souche est citrate de Simmons (+).</p>
<p>Coloration de spores L'observation par microscope optique montre la coloration verte pour les spores et rose pour les cristaux.</p>	

II.2. Résultats de l'identification des champignons non phytopathogènes :

L'isolement des champignons à partir des cadavres d'insectes a mis en évidence 07 souches fongiques, ils ont été repérés d'après leurs aspects macroscopiques et purifiés afin d'obtenir des cultures pures.

II.2.1. Sélection des isolats purifiés :

Après une incubation de 3 jours à 28°C, nous avons observé sur 04 feuilles de géranium testées par nos isolats, la présence d'une nécrose et un développement mycélien au niveau du dépôt de disques des isolats, donc ces souches sont pathogènes aux plantes (souches éliminées), (**Figure 19**). Des taches nécrotiques ont été observées dues peut-être à des symptômes d'infection sous l'effet des souches fongiques phytopathogènes car ces dernières sont capables d'infecter n'importe quelle partie de la plante à n'importe quel stade de sa croissance.

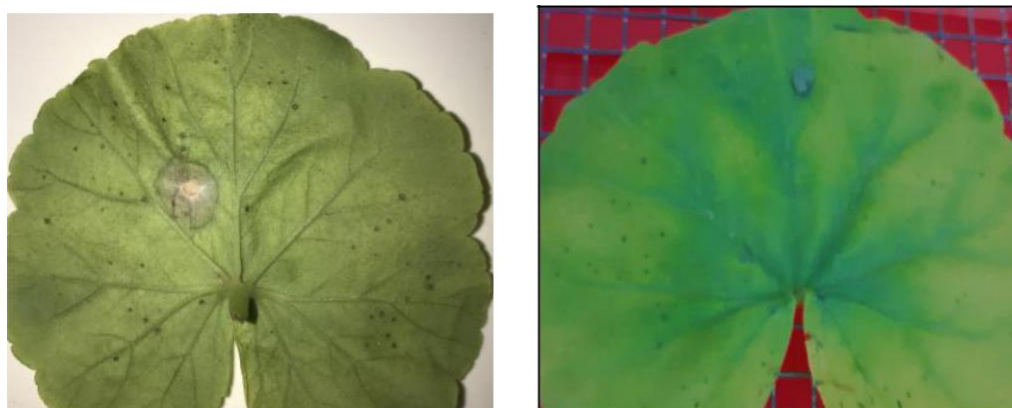








Figure 19 : Effet d'une souche pathogène fongique sur une feuille de géranium (**Original, 2020**)

En parallèle, d'autres feuilles géranium ont manifesté une réaction négative au test de pathogénicité des isolats fongiques testés par l'absence de nécrose au niveau du pourtour des disques, (souches d'intérêt), (**Figure 19**).

II.2.2. Identification des isolats fongiques :

Les souches fongiques isolées, purifiées et sélectionnées ont été identifiées à travers la détermination de l'aspect macroscopique et microscopique, les résultats de l'identification sont classés au niveau du tableau 02.

Tableau 02 : Aspect macroscopique et microscopique des isolats fongiques non phytopathogènes. (Original, 2020)

Souches fongiques	SOUCHE 1	SOUCHE 2	SOUCHE 3
Aspect macroscopique			
Aspect microscopique			

II.3. Résultats de test d'entomopathogène :

II.3.1. Les bactéries isolées sur les larves d'aleurodes

Après 24h nous avons observés une mortalité au niveau des larves d'aleurodes testés (Figure 20) et même après leur émergence au stade adulte des aleurodes morts. (Figure 21).

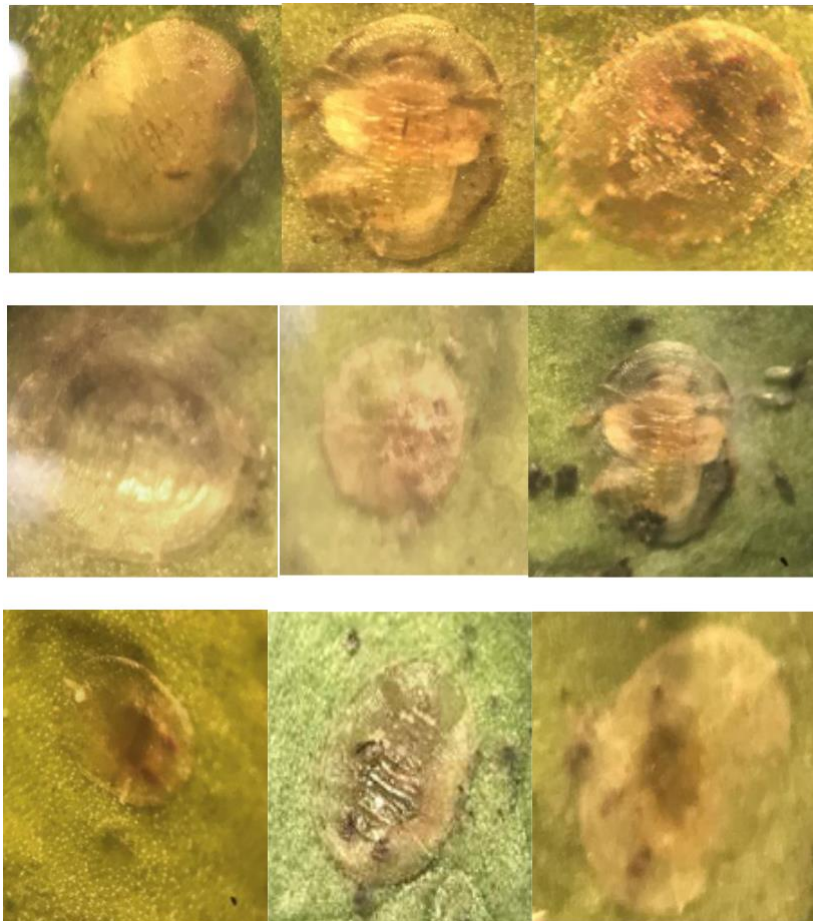


Figure 20: Larves mortes inoculées par *Bacillus* sp. (Original, 2020)



Figure 21 : Les adultes morts après l'émergence (Original, 2020)

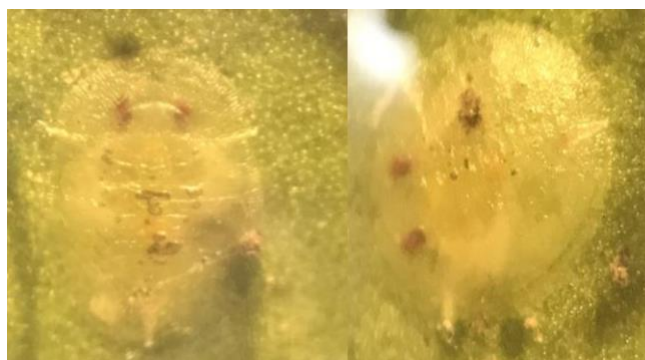


Figure 22 : Les larves vivantes après le test (Original, 2020)



Figure 23 : Les adultes vivants après le test (Original, 2020)

Nous avons noté le nombre d'aleurodes morts sous l'effet de traitement bactérien par trempage et en comparaison avec les témoins traités par l'eau distillé stérile. Les résultats des taux de mortalité obtenus sont indiqués dans la figure 24.

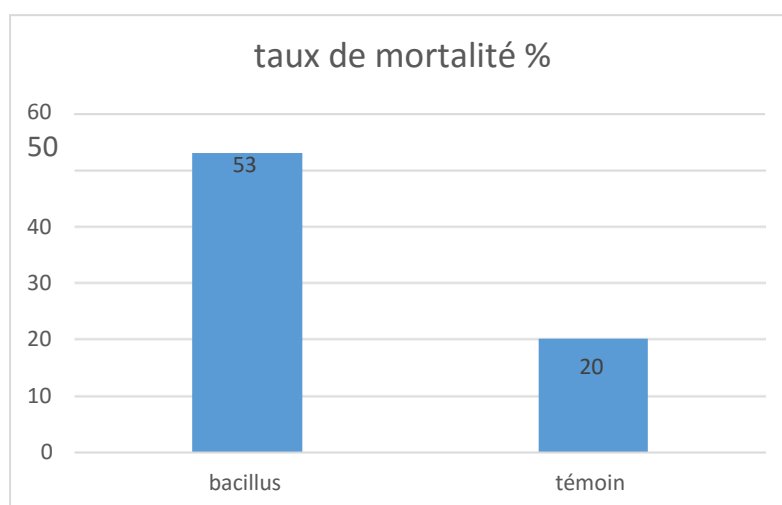


Figure 24 : Taux de mortalité des aleurodes sous l'effet de la souche bactérienne

Les figures (20 ; 21) montrent la mortalité des larves et des adultes d'aleurodes après 24h, cette mortalité est capable due à l'effet entomopathogène de la bactérie de genre *Bacillus*, Par ailleurs, nous avons remarqué que les larves mortes, suite aux infections, présentent des tâches pathologiques de couleur noire par rapport a les larves vivante (**Figure 22**).

Les larves et les adultes morts à cause du test de pathogénicité ont été entourés par des colonies bactériennes (**Figure25**), après l'incubation de ces derniers sur milieu GN.

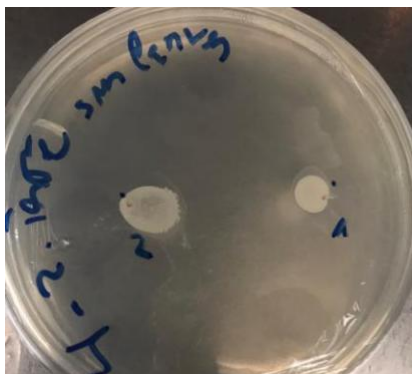


Figure 25: Ré-isolement des larves traitées morts sur milieu GN (**Original, 2020**)

Le repiquage sur gélose nutritive de colonies qui ont été développées autour des cadavres testées et après l'incubation, apparaitre sous forme de colonies (très grandes, sèche, irrégulier) ce sont les mêmes caractères morphologiques des souches bactériennes testées vis-à-vis les larves et les adultes d'aleurodes (bactéries de genre *Bacillus*), pour cela la mortalité est due de l'effet entomopathogène de cette souche bactérienne.



Figure 26 : Résultat du repiquage après l'incubation les larves testées (**Original, 2020**)

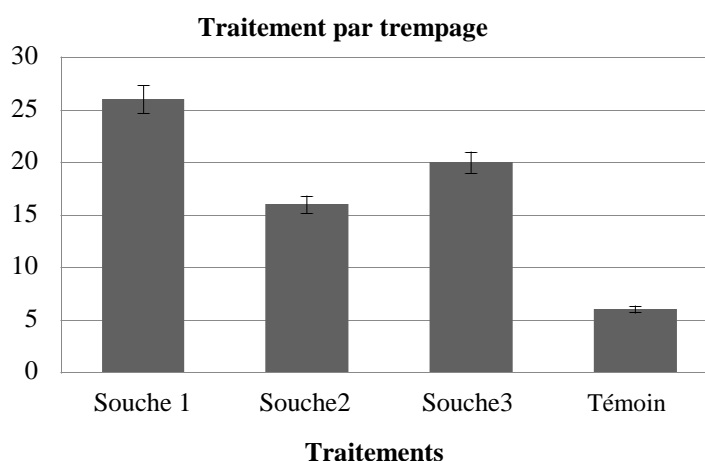
II.3.2. les champignons isolés sur les pucerons :

Après 24 h, nous observé chez les adultes de pucerons traité par les trois champignons sélectionnés une diminution des mouvements puis une mortalité (**figure 27**). La mortalité des pucerons après le test par les souches isolées, semble être due à un effet insecticide de ces souches fongiques isolées vis-à-vis les pucerons.



Figure 27: Puceron traité par une souche fongique observé à la loupe binoculaire (Original, 2020)

Nous avons noté le nombre de pucerons morts sous l’effet des traitements fongiques par trempage et pulvérisation, en comparaison avec les pucerons témoins traités avec l’eau distillé stérile. Les résultats des taux de mortalité obtenus après 24 h sont indiqués dans les figures (28 a et b).



(A)

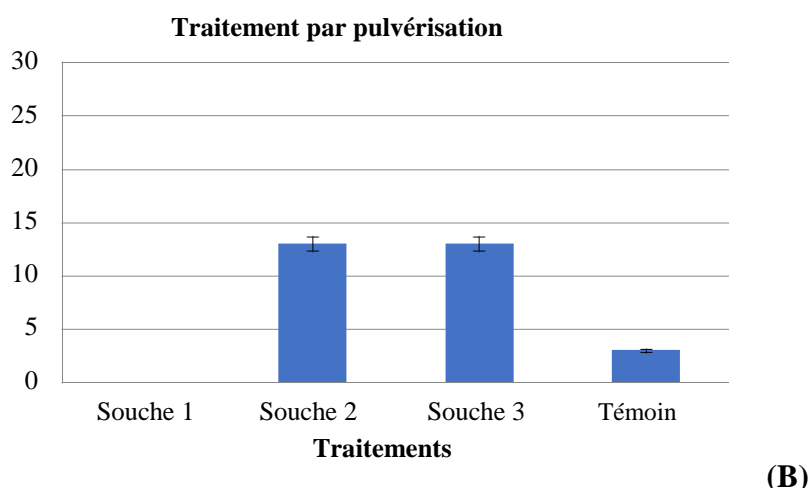


Figure 28 : Résultats de la variation des taux de mortalité des pucerons (*Aphis spiraecola*) sous l'effet des souches fongiques (S1, S2, S3) isolées.

D'après les résultats obtenus, nous avons remarqué la différence entre les deux méthodes (trempage, pulvérisation). La plus forte mortalité est signalée au niveau de la première méthode (trempage) par rapport à celle constatée avec l'utilisation de la méthode par pulvérisation, où nous avons enregistré une faible mortalité dues aux trois souches. Ainsi, la méthode de traitement par trempage pourrait être une meilleure méthode d'application des tests de pathogénicité à cause de la différence par rapport la quantité de solution sporale fourni par chaque méthode.

La souche 1 (S1) semble avoir un effet sur la mortalité des pucerons selon la méthode de traitement par trempage) avec un total de 8 individus par rapport à la deuxième méthode de traitement par pulvérisation où nous n'avons observé aucune mortalité. Ce résultat est probablement dû au mode d'action de cette souche fongique à travers la pénétration du mycélium au niveau du système digestif, puisque les pucerons sont des insectes piqueur suceur, l'ingestion de champignons est relie par le contact direct de ce dernier avec les feuilles qui sont la seule source nutritionnel du puceron testé.

Dans la deuxième méthode pulvérisation, nous avons observé des mortalités au niveau de la 2^{ème} et la 3^{ème} souche, on peut expliquer cela par le mode d'action de ces souches par la pénétration à travers la cuticule de l'insecte, qui est la première barrière contre l'attaque des micro-organismes.

Les insectes morts semblent recouverts par un mycélium (**Figure 29**), après avoir incubé les individus traités en chambre humide qui a favorisé le développement de champignons au niveau des cadavres d'insecte.

Après le ré-isolément sur PDA, nous avons remarqué le développement d'un champignon qui avait le même aspect que nos isolats testés (**Figure 29**).



Figure 29 : Apparition de mycélium sur l'insecte traité et ré-isolément sur milieu PDA (Original,2020)

II.4. Discussion

L'exploration de la diversité bactérienne, notamment du sol, dans le contrôle biologique des insectes ravageurs reste une alternative attrayante. Selon Starnes et *al.* (1993), plus d'une centaine de bactéries ont été identifiées comme ayant un potentiel d'utilisation en lutte biologique. L'utilisation des bactéries entomopathogènes dans la lutte biologique contre les insectes est très ancienne (Oulebsir-Mohand kaci 2012). Les *Bacillus* sp sont les microorganismes les plus utilisés à travers le monde, (Choudhary et Johri., 2009).

Dans notre travail, les bactéries ont été isolées à partir du sol. Brossard et Terry (1984) annoncent que la majorité des bactéries du genre *Bacillus* vivent dans le sol où elles persistent grâce à leurs spores.

L'appartenance des bactéries isolées par traitement thermique au genre *Bacillus* est confirmée par des tests préliminaires, en l'occurrence : l'aspect microscopique, la coloration de Gram, le test oxydase, le test catalase (Madigan et Martinko, 2007) et la coloration des spores au vert de Malachite (Prescott et *al.*, 2007).

D'après nos résultats, la souche bactérienne possède tous les caractères culturels du genre *Bacillus* décrits par (Euzéby, 2007), la bactérie se développe bien sur la surface de la gélose, les colonies sont larges, lisses, plates, avec des bords irréguliers, de couleur crème ou blanc ou encore beige. L'étude microscopique réalisée aussi bien à l'état frais qu'après la coloration de Gram, a permis de constater que la souche se présente sous forme de bacille long à extrémités arrondies et arrangés, à Gram positif et sporulés. Brossard et Terry (1984) annoncent que toutes les souches du genre *Bacillus* présentent les caractères précédents. Selon Guiraud (2003), les *Bacillus* présentent une catalase positive et de réponse variable au test de l'oxydase. Ces résultats sont en accord avec ceux que nous avons trouvés.

Lacey et *al.* (2015) annoncent que les produits formés des sous espèces de *Bacillus thuringiensis* représentent 98% des pesticides microbiens bactériens en raison de leurs larges gammes d'hôtes (Lépidoptères, Diptères, Coléoptères et acariens) .

Bacillus pumilus et *Bacillus subtilis* sont parmi les bactéries les plus utilisées, les plus adéquates pour l'industrialisation et les plus productrices d'enzymes, et des métabolites secondaires, ont démontré un effet insecticide (Weber et Marahiel, 2002; Molina et *al.*, 2010). Selon Weber et Marahiel, (2002), *Bacillus subtilis* a diminué le nombre de stades larvaires de l'aleurode de tabac *Bemisia argentifolii*.

Les champignons entomopathogènes étant considérés comme des agents de mortalité des insectes naturels, on s'intéresse dans le monde entier à leur utilisation et leur manipulation pour la lutte biologique contre les insectes (Amiri et al, 1999 ; Eskesi et al, 2001). Nous avons pu isoler trois souches fongiques à partir des cadavres d'insecte. Avant l'isolement des champignons, nous les avons placés dans des boîtes de pétri en verre (chambre humide) pour favoriser leur sporulation. D'après Hurpin et Vago (1958), la sporulation des champignons entomopathogènes s'effectue sur l'extérieur de l'insecte hôte dans des conditions humides et à l'intérieur de l'hôte si le milieu environnant est trop sec. D'après le test de pathogénicité sur le puceron nous avons remarqué que ces trois champignons ont un effet sur la mortalité de l'insecte. Selon Scholte et al.2004 le puceron est comme la majorité des insectes, sensible aux microorganismes tels que, les champignons, les bactéries et les virus.

Lorsqu'on a comparé l'application du test par les deux méthodes (trempage et pulvérisation), le test par trempage est plus efficace par rapport à la pulvérisation, selon Butt et Goettel, (2000), la méthode d'inoculation directe par trempage est une technique recommandée par la FAO comme méthode standard de la détection et de mesure de la résistance des pucerons aux insecticides. D'après Siah., (2014), le test de pathogénicité par trempage des feuilles contaminées, dans une solution conidienne des champignons, peuvent infecter et causer la mortalité jusqu'à 100 %.

La sensibilité des larves de la mineuse de la tomate, *Tuta absoluta* Meyrick 1917 (Lepidoptera: Gelechiidae) à *Beauveria* sp. a été examinée dans des conditions de laboratoire. Trois doses ont été utilisées: D1=4,75 x 10⁷ spores/ml, D2= 4,75 x 10⁶ spores/ml et D3=4,75 x 10⁵ spores/ml. Les témoins ont été traités à l'eau distillée. A forte dose tous les individus traités sont morts (100 %) au troisième jour, tandis qu'à faible dose le taux de mortalité a atteint 87 % au quatrième jour. Pour le témoin plus de 80 % des larves ont évolué au stade chrysalide, conséquence d'une faible mortalité, d'après Badaoui et al., (2010).

En Tunisie, dans des parcelles d'artichaut, deux types de colonies mycéliennes de couleur crème ont été isolées à partir des cadavres de *Capitophorus elaeagni* (Del Guercio) (Hemiptera: Aphididae) (Guesmi-Jouini et al., 2010) . Le repiquage sur milieux spécifiques a permis l'identification de deux espèces de *Fusarium*. Les tests de pathogénicité in vitro ont montré que les traitements à base des espèces *Fusarium sacchari* (Butler and Hafiz Khan) Gams (1971) et *F. semitectum* (Berkeley and Ravenel, 1875) ont été mortels pour *Aphis*

fabae (Scopoli), *Brachycaudus cardui* L., *Capitophorus elaeagni* (Del Guercio) et *Dysaphis cynarae* (Theobald) (Hemiptera: Aphididae) et ont reproduit les symptômes rencontrés au champ. Les tests de virulence ont montré que *F. semitectum* est l'espèce entomopathogène la plus virulente avec un taux de mortalité dépassant 90 % et que *C. elaeagni* est l'espèce aphidienne la plus sensible alors que *A. fabae* est la plus résistante aux différents traitements. D'après nos résultats, la différence de l'efficacité entre les trois souches fongiques est due au mode d'action de chaque champignon et sa spécificité à l'insecte cible. Selon Ferroun et al., (1993), la colonisation de l'hôte se fait lorsque le champignon parvient à surmonter les mécanismes immunitaires de défense de l'insecte et envahit l'hémolymphe .

Boukhalfa (2018) a réalisé le test de pathogénicité de 4 espèces fongiques entomopathogènes : *Beauveria bassiana*, *Cladosporium* sp, *Aspergillus flavus* et *Verticillium lecanii* isolées de différents sols vis-à-vis les larves de *Culex pipiens*. Cet auteur a remarqué une différence dans la pathogénicité de ces champignons entomopathogènes selon le taux de mortalité des larves traitées. L'espèce *Verticillium lecanii* s'est avérée plus efficace et plus rapide que *Cladosporium* sp.

Pour Bakelli et Habibi (2019), les résultats des tests de pathogénicité ont mis en exergue la présence de deux entomopathogènes autochtones ; il s'agit de *Beauveria* sp. et *Fusarium* sp1 qui ont prouvé leur efficacité vis-à-vis les différents stades de la mineuse de la tomate *Tuta absoluta* et le ver blanc. La comparaison de l'effet de ces deux champignons entomopathogènes sur la mortalité des larves de ver blanc a démontré que *Beauveria* sp est le plus actif et le plus rapide à éliminer ce ravageur avec un taux de mortalité supérieure à 50% à partir du 4ième jour.

La mortalité des insectes peut être causée par l'une ou toutes les actions suivantes :

1. L'action des toxines libérées, l'obstruction physique de la circulation,
2. Invasion des organes et la destruction des tissus de l'insecte,
3. Déficiences nutritionnelles (Ramoska, 1984 ; Riba et Marcandier, 1984 ; Khachatourians, 1986 ; Poinar et Thomas, 1985 ; Cloutier, 1992).

George et al. (1984) ; Wright et Roberts (1987) ; Gottel (1992) ; Vincent et Coderre (1992), attestent que les espèces de *Metarhizium* sp. et *Beauveria* sp., sont connus pour leur grande pathogénicité, et leurs capacités étonnantes à contrôler les populations d'insectes d'ordres différents. Ils ont même étaient formulés sous forme d'insecticides biologiques.

Selon Haddadj et al., (2014), *Beauveria bassiana* a un effet sur la mortalité des larves de 5^{ème} stade du criquet pèlerin *Schistocerca gregaria*.

D'après (Mikuntham et Manjunatha, 2005), *Fusarium semitectum* a été rapporté comme entomopathogène sur les pucerons, les thrips, et sur les aleurodes *Aleurodicus dispersus* Russel (Parker et al., 1996; Aiswary et al., 2007).

Guesmi et al., (2011) assurent que le ré-isolément de champignons à partir des insectes morts après chaque contrôle et incubés dans des chambre humide, étai la meilleure technique d'assurer que les pucerons étaient morts à cause du champignon qui s'est développé autour des cadavres testés.

Conclusion générale et perspectives

Afin d'assurer une protection phytosanitaire contre les insectes ravageurs, il est important d'éviter l'utilisation des insecticides chimiques qui sont généralement efficaces, mais affectent négativement notre environnement, ce qui nécessite la recherche de moyens de bio-contrôle. C'est dans ce cadre que notre travail a été initié dans le but de contribuer à la recherche d'isolats fongiques et bactériens pathogènes envers des insectes ravageurs.

Il a pour but d'isoler des bactéries et des champignons à partir des cadavres d'insectes (pour les champignons) et le sol (pour les bactéries) ; et de déterminer ensuite la capacité de ces derniers à provoquer des mortalités sur les pucerons.

L'isolement des bactéries à partir du sol a mis en évidence l'existence des bactéries de genre *Bacillus*, confirmée par l'identification microscopique, macroscopique et les tests biochimiques.

Les résultats de l'isolement des champignons à partir des cadavres d'insectes a permis de mettre en évidence la présence de 7 souches fongiques, parmi ces souches 4 sont éliminés à cause de leur pouvoir pathogène aux plantes.

L'étude de l'effet des souches (S1, S2 et S3) par les deux méthodes trempage et pulvérisation montre que le mode d'action et la variation de concentration des doses de ces champignons ont une influence sur l'efficacité de ces derniers sur les insectes.

Ces résultats doivent être reconduits par des expérimentations en plein champ afin de confirmer l'efficacité de ces microorganismes et valider leur efficacité dans les conditions environnementale du champ.

Enfin on souhaite que l'ensemble de ces résultats servent de base au développement d'un outil de lutte biologique respectueux de l'environnement et efficace pour le contrôle des populations d'insectes ravageurs. En d'autres termes, le développement d'un insecticide biologique à base de l'un de ces entomopathogènes, que nous utiliserons pour la mise en place d'un programme de lutte biologique comme cela a été déjà entrepris contre d'autres insectes notamment les criquets, et de contribuer ainsi dans la lutte vis à vis de *Phyllocnistis citrella* en Algérie. Ceci, dans le but d'accroître la productivité des agrumes et favoriser par conséquent la lutte intégrée contre ce ravageur, tout en réduisant les impacts négatifs liés à l'usage des insecticides chimiques.

De nombreux facteurs affectent ainsi l'efficacité des champignons entomopathogènes. Leur potentiel comme agents de lutte biologique résulte des propriétés des populations de l'hôte et du pathogène ainsi que des conditions du milieu. Certains de ces facteurs sont liés d'une part au pathogène : « virulence et spécificité de l'hôte (qui sont deux éléments essentiels dans le choix d'un bon candidat à la lutte microbiologique), potentiel épizootiques, capacité de survie et polymorphisme génétique des populations fongique », d'autre part ils dépendent de l'hôte : « variabilité de la sensibilité des populations hôte, facteurs des populations d'hôtes (densité de populations), comportement et nutrition, enfin, la sensibilité extrême aux conditions environnementales (rayonnement solaires, température, humidité) est le principal inconvénient des champignons entomopathogènes ». Ces facteurs influencent la persistance de l'activité insecticide des champignons, la viabilité des conidies sur le feuillage traité et la sporulation sur le cadavre de l'insecte (Sabbahi, 2008).

En perspectives, pour une meilleure poursuite de cette étude, il serait souhaitable :

D'étudier d'une façon approfondie l'identification des bactéries isolées à partir du sol et leur effet entomologiques sur les insectes. Cette étude va permettre de produire des insecticides spécifiques, efficaces et sans effets néfastes pour la nature.

Relancer ces tests sur l'insecte avec des concentrations afin de choisir la dose optimale qui contrôle ce ravageur. Dans le but d'instaurer un programme de lutte biologique acceptable du point de vue environnemental et efficace pour le contrôle des populations aphidiens des agrumes.

A

- 1. Amiri B., Ibrahim L., et Butt T., 1999-**Antifeedant properties of destruxins and their potential use with the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae* for improves control of crucifer pest. *Biocontrol Science and Technology* 9 p. 487-498.
- 2. Anonyme, 2016-Paroles d'experts - Jardins de France 639 - Janvier-février 2016** La lutte biologique avec *Bacillus thuringiensis* Par Vincent Sanchis.
- 3. Anonyme, 2019-Atelier sur l'Utilisation du Metarhizium dans la lutte contre le** Criquet pèlerin dans la Région Occidentale : Etat des lieux et perspectives, Rabat, Maroc 26–28 novembre.
- 4. Anonyme, a., 2004-Clearing the air : Asthma and indoor air exposure.** Comite on the assessment of Asthma and indoor air. Division of health and disease. Institute of Medecine (IOM). National Academy Press – Washington.
- 5. Anonyme, b., 2000-Lignes directrices applicables à l'évaluation et l'élimination de** la contamination fongiques en milieu intérieur. NewYork City Departement of Health (NYC) service d'hygiène de la ville NewYork.+
- 6. Antoun H., Prevost, D. 2006-Ecology of plant growth promoting rhizobacteria.** *PGPR: Biocontrol and Biofertilization*. Siddiqui, Z.A. (eds). pp. 1-38.
- 7. Augustyniuk-Kram A, Kram KJ., 2012-** Entomopathogenic fungi as an important natural regulator of insect outbreaks in forests (Review). In: *Forest Ecosystems – More than Just Trees*. Ed. Juan A. Blanco. P.265–294.

B

- 8. Badaoui M.I., 2017-**Contribution à l'étude de la dynamique des populations de *Tuta absoluta* Meyrick (Lepidoptera ; Gelechiidae) et essais de contrôle biologique sur la culture de tomate. Thèse de doctorat ; université de Mostaganem, Algérie, 151p.
- 9. Badaoui M.I, Berkani A., Lotmani B., 2010-**Les entomopathogènes autochtones, nouvel espoir dans le contrôle biologique de *Tuta absoluta* Meyrick 1917 (Lepidoptera: Gelechiidae) en Algérie. *Faunistic Entomology* 2011 (2010) 63 (3), 165-169.
- 10. Bakelli M. et Habibi A., 2019 -** Evaluation préliminaire de l'effet *in vitro* de deux entomopathogènes autochtones *Beauveria* sp. (*Clavicipitaceae*) et *Fusarium* sp. (*Nectriaceae*) sur les larves du ver blanc. Mémoire de Master en Sciences Agronomiques. Université Abdelhamid Ibn Badis-Mostaganem, 76p
- 11. Boukhalfa S., 2018 -** Isolement et identification des souches fongiques entomopathogènes locales et application sur le moustique domestique *Culex pipiens*. Mémoire de Master en Sciences biologiques, Université Akli Mohand Oulhadj , Bouira, 85p.

12. Bitsadze N., Jaronski S., Khasdan V., Abashidze E., Abashidze M., Latchininsky A., Samadashvili D., Sokhadze I., Rippa M., Ishaaya I., et Horowitz A. R., 2013-Joint action of *Beauveria bassiana* and the insect growth regulators diflubenzuron and novaluron , on the migratory locust , *Locusta migratoria*, J. Pest Sci, 86, 293–300. <https://doi.org/10.1007/s10340-012-0476-4>

13. Brossard et Terry., 1984- Bactériologie systématique. C.R.D.P, Lyon, 220p.

14. Butt T.M. et Goettel M.S., 2000-Bioassays of entomopathogenic microbes and nematodes. K.R.S.CABI Publishing, New York,320p.

C

15. Cawoy, H., Bettiol, W., Fickers, P., Ongena, M., 2012- *Bacillus*-Based Biological Control of Plant. Thèse disponible sur: www.intechopen.com/download/pdf/219891.

16. Chandler, D., Bailey, A. S., Tatchell, G. M., Davidson, G., Greaves, J., & Grant, W. P. 2011-The development, regulation and use of biopesticides for integrated pest management. Philosophical Transactions of the Royal Society

17. Chilcott, C.N., Wigley, P.J., 1993-Isolation and toxicity of *Bacillus thuringiensis* from soil and insects habitats in New Zealand. *J. Invert. Pathol.*, 61, p.244-247.

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

19. Cloutier, C., 1992-Les solutions biologiques de lutte pour la répression des insectes et acariens ravageurs des cultures. In: La lutte biologique, sous la direction de C. Vincent et D.Coderre, pp 19-88. Chicoutimi, Québec, Canada: Gaëtan MORIN éditeur ltée.

20. Cloutier, C., Cloutier, C., 1992-Les solutions biologiques de lutte pour la répression des insectes et acariens ravageurs des cultures. In C. Vincent & D. Coderre : La lutte biologique. Gaëtan Morin, Québec, pp 19-88.

21. Cornia M.B. Et Beatriz M.D., 2004- Pathogenicity of hyphomycètes fungi against *Cyclocephala signaticollis*. Bio-Control 00 : 1-8, 2004. Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands.

D

22. DeKouassi, M., 2001- Les possibilités de la lutte microbiologique. Emphase sur le champignon entomopathogène *B. bassiana*. Vertigo : volume2 ; numero2

23. Dent, D. R. 1991-Insect pest management, ed. CAB International, UK.v Debach, P. et B. Barlett 1951. Effects of insecticides on biological control of insect pest of citrus. J. Econ. Entomol. 44: 372-383

E

24. Euzeby J.P., 2007-Dictionnaire de Bactériologie Vétérinaire. www.bacdico.net.

F

- 25. FAO, 2012-**La Production et Protection Intégrées appliquée aux cultures maraîchères en Afrique soudano-sahélienne. Radhort – Publications.p158.
- 26. Faria, M. R. d., & Wraight, S. P., 2007-**Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biological Control*, 43(3), 237–256.
<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2007.08.001>
- 26. Faulkner, P. et Boucias, D. G., 1985-** Genetic improvement of insect pathogens: emphasis on the use of baculoviruses. In: Hoy, M. A. and Herzog, D. C. (eds), *Biological Control in Agricultural*.
- 27. Ferreira J.F., Marques e.J., Marquês I.M.R., Oliveira J.V. et Santos Junior, H.J.G., 2005-** Efeito de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin sobre ovos d'*Alabama argillacea* (Huebner.) (*Lepidoptera: Noctuidae*). *Magistra* 17 (3), 19–123.
- 28. Ferron P, Fargues J, Riba G., 1991-**Fungi as microbial insecticides against pests. In: *Handbook of applied mycology. Humans, animals and insects* (Arora DK, Mukerji KG, Eds). Marcel Dekker, New York, vol 2, 665-706
- 29. Ferron P., Fargues,J. et Riba, G., 1993-**les possibilités de lutte microbiologique contre les ravageurs In : *La lutte biologique .* Fraval A.(ed).dossier de la cellule environnement de Linra 5 :65-93.
- 30. Feng, M.G., Poprawski, T.J. and Khachatourians, G.G., 1994-**Production, formulation and application of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for insect control: current status. *Biocont. Sci. Tech.* 4: 3-34.
- 31. Fourage C., 1990 –** les pucerons sont – ils si dangereux ?. *Revue agronomie Belge*, Vol.47 :46
- 32. Francis, I., Holsters, M., Vereecke, D., 2010-**The Gram-positive side of plant-microbe interactions. *Environmental Microbiology*. 12: 1-12.

J

- 33. Jaronski, S. T., & Goettel, M. S., 1997-** Development of *Beauveria bassiana* for control of Grasshoppers and Locusts. *Memoirs of the Entomological Society of Canada*, 171, 225– 237.

H

- 34. Habes D & Soltani, N., 1991-**Perturbations de la structure de l'intestin et de l'hémogramme par le Thuricide HP chez *Thaumetopoea pityocampa* Schiff. *Mem. Soc. Roy. Belg. Entomol.* 35: 721-726.
- 35. Halling J.L., Wraight S.P et Miller R.M., 2004-**Efficacy of *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes) for Control of russian wheat aphid (Homoptera: Aphidae) on resistant wheat under field condition. *Biol, Sc, Technol.* 14: 459-473.

- 36. Halouane, F., Benzara, A., Doumandji-Mitiche, B., & Bouhacein, M., 2001-** Effet de deux entomopathogènes, *Beauveria bassiana* et *Metarhizium flavoviride* (**Hyphomycètes : Deuteromycotina**) sur l'hémogramme des larves de 5ème stade et des adultes de *Locusta migratoria migratorioides* (Orthoptera : Acrididae), Journal of Orthoptera Research, 10(2), 331–334.
- 37. Harwood, C.R., Wipat, A., 1996-** Sequencing and functional analysis of the genome of *Bacillus subtilis* strain 168. FEBS Letters.389:84-87.
- 38. Hawksworth, D.L., Sutton B.C., Ainsworth, G.C., et James, P.W., 1983-** Dictionnaire de Ainsworth et Bisby des champignons, 7th ed., Commonwealth Mycol.inst., Kew, United kingdom. 445p.
- 39. Hurpin et Vago, 1958-** les maladies du hanneton commun melolontha L. (col. Scarabeidal). Entomophaga, 3(1958), pp.285-330.

G

- 40. George O., Poinar J., & Gerard M.T., 1984-** Laboratory Guide to insect Pathogens and Parasites. Plenum Presses. New York., p.392.
- 41. Goettel M.S., 1992-**Des champignons comme agent de lutte biologique. In: PIBadam, CAB International, IITA, La lutte biologique contre les acridiens, Nigeria, p.122-131.
- 42. Greathead, D.J., Kooyman, C., Launois-Luong, M.H., Popov, G.B, 1994.** Les ennemis naturels des criquets du Sahel. Ed. Cirad/Prifas, Collection Acridologie Opérationnelle, Montpellier, p.147.
- 43. Greathead, D. J., Kooyman, C., Launois-Luong, M. H., et Popov, G. B. 1994-** Les ennemis naturels des 8 criquets du Sahel. Collection acridologie opérationnelle N CILSS/DFPV, Niamey, Bp 12625. Niger.
- 44. Guesmi-Jouini J., Boughalleb-M'hamdi N., Ben Halima-Kamel M. 2011 –** Etudes préliminaires sur les champignons entomopathogènes des pucerons de l'artichaut en Tunisie. Faunistic Entomology 2011 (2010) 63 (3), 171-181.
- 45. Guiraud J.P., 2003-**Microbiologie alimentaire; **Application à l'étude des** principaux groupes microbiens. Ed. Dunod, p.651.

K

- 46. Khachatourians, G.K., 1986-** Production and use of biological pest control agents. Trends Bio. Tech. 4: 120 - 124.
- 47. Kirk P.M., Cannon P.F., David J.C., Egham U.K. and Stophes J.A., 2001-** Ainsworth and Bysby's Dictionary of fungi, 9 thedn .CABI. Bioscience.UK. Center and central Bureau Voie. Utrecht. The Net.

48. Kuno G., 1973-Biological notes of *Amoebidiurn parasiticm* found in Puerto Rico. *Journal of Invertebrate Pathology* 21: 1-8.

L

49. Labbé, R. M. 2005-Intraguild interactions of the greenhouse whitefly natural enemies, predator *Dicyphus hesperus*, pathogen *Beauveria bassiana* and parasitoid *Encarsia formosa*, mémoire de maîtrise (M. Sc.), Université Laval, Québec, Canada, p.75.

50. Lacey, L., & Goettel, M., 1995-Current Development in Microbial Control of Insect Pests and Prospects for Early 21st Century. *Entomophaga*, 40(I), 3–27.

51. Lacey, L. A., & Shapiro-Ilan, D. I., 2008- Microbial Control of Insect Pests in Temperate Orchard Systems: Potential for Incorporation into IPM. *Annual Review of Entomology*, 53(1), 121–144. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.53.103106.093419>

51. Lacey, L. A., Grzywacz, D., Shapiro-Ilan, D. I., Frutos, R., Brownbridge, M., & Goettel, M. S., 2015a- Insect pathogens as biological control agents: Back to the future. *Journal of Invertebrate Pathology*, 132, 1–41.
<https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.07.009>

52. Larpent P.J. et Gaurgaud L.M., 1997- Mémento technique de microbiologie. ED. Lavoisier, Paris, p.934.

53. Lasa, R., Ruiz-Portero, C., Alcázar, M. D., Belda, J. E., Caballero, P., & Williams, T., 2007- Efficacy of optical brightener formulations of *Spodoptera exigua* multiple nucleopolyhedrovirus (SeMNPV) as a biological insecticide in greenhouses in southern Spain. *Biological Control*, 40(1), 89–96.
<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2006.06.015>

54. Launois-luong M.H., Rachadi T. et Deuse. J., 1994- Les biopesticides en lutte antiacridienne. *Insectes*, 29.

55. Lednev, G. R., Kryukov, V. Y., Khodyrev, V. P., Levchenko, M. A., Duisembekov, B. A., Sagitov, A. O., & Glupov, V. V., 2008-Dynamics of mortality of the migratory locust 75 under synchronous infection with entomopathogenic fungi (*Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*) and bacteria *Pseudomonas* sp. *Contemporary Problems of Ecology*, 1(2), 210–213.
<https://doi.org/10.1134/S1995425508020069>

56. Leng P., Zhiming Z., Guangtang P. & Maojun Z., 2011- Applications and development trends in biopesticides. *Afr. J. Biotechnol.*, 10(86), 19864-19873.

57. Lolloo, R., Maharaih, D., Görgens, J., Gardiner, N., 2010-A downstream process for production of a viable and stable *Bacillus cereus* aquaculture biological agent. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 86: 499-508.

58. Lugtenberg, B., Kamilova, F., 2009- Plant-growth-promoting-rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology*. 63: 541-556.

M

- 59. Maddox, J. V. 1987**-Protozoan diseases. In: Fuxa, J. R. and Tanada, Y. (eds), Epizootiology of Insect Disease. John Wiley & Sons, Chichester, pp. 417-52.
- 60. Madigan M., Martinco J., 2007**- Biologie des micro-organismes. 11ème éd. Paris : Pearson éducation France.1047p.
- 61. Mazid, S., Kalita, J. C., & Rajkhowa, R. C., 2011**-A review on the use of biopesticides in insect pest management. International Journal of Science and Advanced Technology, 1(7), 169–178. <https://doi.org/10.1007/s10886-005-4244-2>
- 62. McCoy C.W., Samson R.A. & Boucias D.G. 1988**- Entomogenous fungi. In Ignoffo C.M. & Mandava N.B. (éd.), Handbook of Natural Pesticides Microbial Pesticides. Entomogenous.
- 63. McLaughlin, R. E. 1971**-Use of Protozoa for microbial control of insects, p. 151-172 in H. D. Burges et N. W. Hussey, Microbial control of insects and mites. Academic Press. New York, p.861.
- 64. Meddas S. A., Oulbsir-Mohankaci H, Hajouti R., Reghmit N, Houas Y., Amira T D., NAITBOUDA L.et DOUMANDJI-MITICHE B., 2020**-Caractérisation des *Bacillus* spp. Isolée du sol d'olivier et étude de leurs potentialités de biocontrôle contre la mouche de l'olive *Dacus oleae* (GMEL) au nord de l'algérie. *Revue Agrobiologia*. Reçu le 24/12/2019, Révisé le 22/06/2020, Accepté le 28/06/2020
- 65. Mekasem N., 2018**-Etude l'effet biopesticide des extraits naturels de deux plantes de la famille des Myrtacées : *Eucalyptus globulus*, *Eucalyptus camaldulensis*.mem. doct.toxi.fond.uni.Annaba, Algérie, p.138.
- 66. Meyling N.V., Lübeck M., Buckley E.P. Eilenberg J. Et Rehner S.A., 2009**-Community composition, host range and genetic structure of the fungal Entomopathogen *Beauveria* in adjoining agricultural and seminatural habitats. *Mol ecol* 18:1282–1293.
- 67. Meynadier, G., Margier, A. A., Girardie, J. et Vago, C., 1992**-Une entomopoxvirose chez l'orthoptère *Anacridium aegyptium*. *Entomophag.* 37: 453-464.
- 68. Mikuntham G. & Manjunatha M., 2005**-Isolation and pathogenicity of entomopathogenic fungi against chili thrips, *Scirtothrips dorsalis* Hood. In *Journal of Insect Science* (ed.), Proceeding of the VIIIth International Symposium on Thysanoptera and Tospoviruses Asilomar, Pacific Grove, California, September 11-15, 2005, available online: insectscience.org/7.28.
- 69. Miller, L.K., Lingg A.J. and Bulla L.A. Jr., 1983**-Bacterial, viral and fungal insecticides. *Science* 219:715-721.
- N**
- 70. Narin S., 2017**-Impact de la transmission horizontale d'un champignon entomopathogène chez le dendroctone du Mélèze, *dendroctonus simplex* Leconte

(coleoptera : scolytinae). Thèse du garde de Ph.D. en bio. Univ. du Québec, INRS-Institut Armand-Frappier Mars, p.130.

71. Nicolai V. M. et Jorgen E., 2007- Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystem: Potential for conservation biological control. *Metarhizium anisopliae* reveal that it is rhizosphere competent. *Appl. environ.* 68, 6383-6387

O

72. OUAKID M.L., Touati L., Adjami Y., Farine J.P., Everaerts C. & Soltani N., 2008- Evaluation de l'activité insecticide du Thuricide HP (*Bacillus thuringiensis* var. Berliner) sur les larves de *Lymantria dispar* (Lepidoptera, Lymantriidae) ravageur des forêts du chêne liège en Algérie. *Annales de l'INRGREF NS 12* : 346-359

73. Oulebsir-Mohand Kaci H., 2012- Evaluation de l'impact biologique de quelques souches locales de *Bacillus* sp. Et *Pseudomonas* spp. fluorescens vis-à-vis du criquet migrateur *Locusta migratoria cinerascens* (Oedopodinaen : Acrididae). Thèse de Doctorat, Ecole. Nat. Agro. El Harrach, Alger, p.172.

P

74. Payne C.C., 1982-Insect viruses as control agents. *Parasitology* 84, 35-77. DOI : 10.1017/S0031182000053609

75. Pierre J., Pierreç G., Alain F., 1991-La lutte biologique : un aperçu historique. *COURRIER DE LA CELLULE ENVIRONNEMENT INRA, INRA, 1991,*

15 (15), pp.37-60. [hal-01207929](https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-01207929) .

76. Poinar G. O., et Thomas G. M., 1985-Laboratory guide to insect pathogens and parasites, Plenum Press, New York, p.329.

R

77. Ramoska, W.A., 1984-The influence of relative humidity on *Beauveria bassiana* infectivity and replication in the ching bug, *Blissus leucopterus*. *J. Invertebr Patho.* 43:389-394.

78. Ravensberg, W. J., 2011- A roadmap to the successful development and commercialization of microbial pest control products for control of arthropods. (Springer, Ed.). New York, Etats Unis, p.400.

79. Remaudière, G., Latge J.P., Michel M.F., 1981-Ecologie comparée des Entomophthoracées pathogènes de Pucerons en France littorale et continentale. *Entomophaga*, 26,p. 157-178.

80. Riba, G. et Marcandier.S, 1984-Influence de l'humidité relative sur l'agressivité des souches de *beauveria bassiana* (Bals) Vuillemin et de *metarhizium anisoplaie* (metsh.) Sorokin Hyphomycetes pathogenes de la pyrale du maïs *Ostrinia nubilalis* Hubn. *Agronomie* 4: 189-194.

81. Rochefort, S., Lalancette, R., Labbe, R., Brodeur, J., 2006-Recherche et développement de biopesticides et pesticides naturels à faible toxicité pour les

organismes non ciblés et respectueux de l'environnement. Rapport final, Projet PARDE, Volet Entomologie, Université Laval, pp.10- 28.

S

82. Sabbahi, R., 2008-Utilisation du champignon entomopathogène *Beauveria bassiana* dans une stratégie de gestion phytosanitaire des principaux insectes ravageurs en fraiseraies. Thèse de doctorat (Ph. D.). Institut nationale de la recherche scientifique, Université du Québec, p.181.

83. Saiah F., 2014-Contribution à L'étude sur la lutte biologique à l'égard de *Phyllocnistis citrella* Stainton (Lépidoptera ; Gracillariidae), mineuse des Citrus. Thèse de doctorat ; Université de Mostaganem, Algérie, p.119.

84. Samuels R.I., Coracini D.L.A., Santos C.A.M. et Gava C.A.T., 2002-Infection of *Blissus antillus* (Hemiptera: Lygaeidae) eggs by the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*. *Biol. Control* 23 (3), 269–273.

85. 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.

86. Saranraj, P., & Jayaparakash, A., 2017- Agrobenevolent entomopathogenic fungi– *Beauveria bassiana* : à review. *Asian Journal of Multidisciplinary Research (IAJMR)*, 3(2), 1051– 1087. <https://doi.org/10.22192/iajmr.2017.3.2.4>

87. Scholte F.J, Knols B.G et Takken W., 2004-Auto dissemination of the entomologenic fungus *Metarhizium anisopliae* amongst adults of the malaria vector *Anopheles gambiae* sensu strico. *Mala .J.3* :45.

88. Shoresh, M., Harman, G., Mastouri, F., 2010- Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. *Annual Review of Phytopathology*. 48:21-43.

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

T

90. Tanada, Y., 1959- Microbial Control of Insect Pests. *Annual Review of Entomology*, 4, 277–302. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.04.010159.001425>

91. Thakore Y., 2006-The biopesticide market for global agriculture use. *Ind. Biotechnol.*, 2, p.194-208.

92. Todorova S.I., Coderre D., Côté I.C. et Vincent E., 2002-Screening of *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes) isolates against *Choristoneura rosaceana* (Lepidoptera : Tortricidae). *Cand. Entomol. 134* : 77-84.

93. Todorova S.J., Côté I.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.

94. Tikarrouchine, R. 2009-caractérisation agronomique et technologique de 17 hybrides F1 de tomate « *Lycopersicon esculentum Mill.* » obtenus par croisement. Mem. Magister. Ecole Nationale Supérieure Agro. El Harrach. Alger. p.26.

V

95. Vallet-Gely I, Lemaitre B. Bocard f., 2008-Bacterial strategies to overcome insect defences. Nat. Rev. Microbiol. 2008 Apr;6(4):302-13.
doi: 10.1038/nrmicro1870. Epub 2008 Mar 10.

96. Vey A., Ouiot J.M., 1989-Effet cytotoxique .in vitro et chez l'insecte hôte des destruxines, toxines cyclodepsipeptidiques produites par le champignon entomopathogène *Metarhizium anisopliae*. *Can. J. Microbiol.* **35** :1000-1008 .

97. Vincent C. & Coderre D., 1992-La lutte biologique. Gaston Morin, Québec, p.671.

W

98. Wraight, S. P., Filotas, M. J., & Sanderson, J. P., 2016a- Comparative efficacy of emulsifiable oil wettable powder and unformulated powder preparations of *Beauveria bassiana* against the melon aphid *Aphis gossypii*. *Biocontrol Science and Technology*, 26(7), 894–914.
<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1080/09583157.2016.1157851>

99. Wraight S. P., Lopes, R. B., & Faria, M., 2016b- Microbial Control of Mite and Insect Pests of Greenhouse Crops. Microbial Control of Insect and Mite Pests: From Theory to Practice. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803527-6.00016-0>

100. Wright R.J. & Roberts, D., 1987-Insect control effort with fungi. Developments in industrial microbiology 28, p. 77-87

Y

101. Yaroslavtseva, O. N., Dubovskiy, I. M., Khodyrev, V. P., Duisembekov, B. A., Kryukov, V. Y., & Glupov, V. V., 2017-Immunological mechanisms of synergy between fungus *Metarhizium robertsii* and bacteria *Bacillus thuringiensis* ssp. morrisoni on Colorado potato beetle larvae. *Journal of Insect Physiology*, 96, 14–20.
<https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2016.10.004>

Z

102. Ziani, J., 2008- Application De *Beauveria bassiana* Contre La Punaise Terne *Lygus Lineolaris* (Palisot De Beauvois) (Hémiptères: Miridés) Dans Les Vignobles. Mémoire de maîtrise (M. Sc.), Université du Québec à Montréal. 101 p

Annexe I :

Champignons entomopathogènes appartenant à différent phylums (Saiah,2014 in Badaoui,2017).

Phyllum	Genre	Espèce	Auteur
Zygomycota	<i>Batkoa</i> Humber	<i>B. apiculata</i> et <i>B. major</i>	Balazy, 1993
	<i>Conidiobolus</i> Brefeld	<i>C. coronatus</i>	Soper et al., 1988
		<i>C. obscurus</i> et <i>C. thromboides</i>	
	<i>Entomophaga</i> Batko	<i>E. aulicae</i> , <i>E. maimaiga</i> et <i>E. grylli</i>	Humber, 2012
		<i>E. calopteni</i>	Humber, 1989
	<i>Entomophthora</i> Fresenius	<i>E. culicis</i> et <i>E. muscae</i>	Keller, 2002
		<i>E. planchoniana</i>	Humber, 2012
	<i>Erynia</i> Nowakowski	<i>E. aquatica</i> et <i>E. rhizospora</i>	Keller, 1991
		<i>E. conica</i>	Balazy, 1993
		<i>E. ovispora</i>	Humber, 2012
	<i>Furia</i> Batko	<i>F. americana</i>	Keller, 1991
		<i>F. F. virescens</i>	Balazy, 1993
<i>Massospora</i> Peck	<i>M. cicadina</i>	Humber, 2012	
<i>Neozygites</i> Witlaczil	<i>N. fresenii</i> , <i>N. parvispora</i> et <i>N. floridana</i>		
<i>Pandora</i> Humber	<i>P. blunckii</i> et <i>P. neoaphidis</i>		
<i>Zoophthora</i> Batko	<i>Z. phalloides</i> et <i>Z. phytonomi</i>		
	<i>Z. radicans</i>	Balazy, 1993	
Basidiomycota	<i>Septobasidium</i>	<i>Septobasidium</i> sp	Henk et vilgalys, 2007
	<i>Auriculoscypha</i>	<i>Auriculoscypha</i> sp	
	<i>Uredinella</i>	<i>Uredinella</i> ,sp	
	<i>Coccidioidictyon</i>	<i>Coccidioidictyon</i> sp	Sung et al., 2007
	<i>Ordonia</i>	<i>Ordonia</i> sp	
Ascomycota	<i>Aschersonia</i>	<i>A. aleyrodis</i>	Chaverri et al., 2008.
		<i>A. Montagne</i>	Liu et al., 2006;
	<i>Ascospaera</i> Spiltoir	<i>A. aggregata</i>	Anderson et al. 1998.
	<i>Beauveria</i> Vuillemin	<i>B. bassiana</i> (Balsamo)	Rehner et al., 2011
		<i>B. brongniartii</i> (Saccardo)	
	<i>Cordyceps</i>	<i>C. militaris</i> et <i>C. tuberculata</i>	Kepler et al., 2012
	<i>Fusarium</i> Link	<i>Fusarium</i> sp	O'donnell et al., 1998
	<i>Gibellula</i> Cavara	<i>G. pulchra</i> et <i>G. leiopus</i>	Tzean et al., 1997
	<i>Hirsutella</i> Patouillard	<i>H. saussurei</i>	Rombach et Roberts, 1989
		<i>H. thompsonii</i>	Hodge et al., 1996
	<i>Hymenostilbe</i> Petch Emend.	<i>H. citrifomis</i>	Humber, 2012
		<i>H. rhossiliensis</i> et <i>H. saussurei</i>	Hodge et al., 1996
		<i>H. thompsonii</i>	Rombach et Roberts, 1989
	<i>Isaria</i> Persoon	<i>I. farinosa</i> et <i>I. fumosorosea</i>	Humber, 2012
	<i>Paecilomyces</i> Bainier	<i>P. lilacinus</i>	
	<i>Lecanicillium</i> Gams et Zare	<i>L. lecanii</i>	Zare et al., 2001.
	<i>Metarhizium</i> Sorokin	<i>M. anisopliae</i>	Bischoff et al., 2009
		<i>M. flavoviride</i>	Driver et al., 2000
		<i>M. majus</i> et <i>M. acridum</i>	Kepler et al., 2012.
	<i>Nomuraea</i> Maublanc	<i>N. rileyi</i>	Kepler et al., 2012
	<i>Tolypocladium</i>	<i>T. niveum</i>	Humber, 2012
		<i>T. cylindrosporum</i>	Hodge et al., 1996
<i>Torrubiella</i> Boudier	<i>T. ratticaudata</i>	Sato et al., 2010	
	<i>T. aranicida</i>	Sung et al., 2007	

Annexe II :

Matériel non biologique :



Microscope optique



Loupe binoculaire



Agitateur a plaque



Vortex



Autoclave



Etuve



Balance de précision



Bec bunsen



Bain marie



Portoire



Boites de Pétri



Pipette Pasteur



Lames et lamelles



Pince



Micropipette



Tubes à essai vide



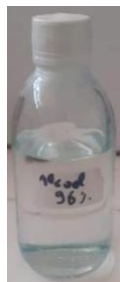
Pissette



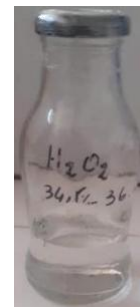
PDA (Potato-Dextrose-Agar)










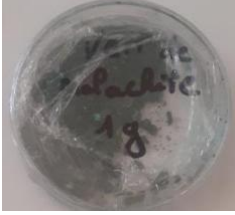
GN (Gélose nutritif)



Alcool



H₂O₂ (Peroxyde d'hydrogène)

					
<p>Violet de gentiane</p>	<p>Lugol</p>	<p>Fuschine</p>	<p>Bleu de méthylène</p>	<p>Milieu Citrate de Simmons</p>	<p>Milieu TSI (Triple Sugar Iron)</p>
					
<p>Test oxydase</p>			<p>Vert de Malachite</p>		