

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
UNIVERSITÉ -SAAD DAHLAB- BLIDA1



FACULTÉ DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE  
DÉPARTEMENT D'AGRONOMIE

Mémoire en vue de l'obtention du  
Diplôme de Master en Sciences de la Nature et de la Vie  
Option : Biotechnologie des Plantes Aromatiques et Médicinales et des Produits Naturels

**Thème :**

**Etude de l'effet des extraits de plantes sur la production en masse des champignons utiles pour l'agriculture du genre *Trichoderma*, *Beauveria* et *Metarhizium*.**

Présenté par : M<sup>elle</sup> ADEL Nacira

Soutenu le : 19/12/2013

Devant le jury composé de :

M. REGUIEG L.	MCA	ENSAA	Président
Mme HOUMANI Z.	Pr	USDB	Promotrice
Mme MOUMENE S.	MAA	USDB	Co-promotrice
Mme SAHRAOUI F.	MAA	USDB	Examinatrice

ANNEE UNIVERSITAIRE : 2012/2013

## *Remerciements :*

*Merci Allah (Mon dieu) de m'avoir donné la capacité d'écrire et de réfléchir, la force d'y croire, la patience d'aller jusqu'au bout du rêve et la volonté d'entamer et de terminer ce mémoire.*

*Le travail présenté dans ce mémoire de master a été effectué au sein du laboratoire de l'institut national de protection des végétaux (INPV) à Boufariq-Blida.*

*Tout d'abord, je remercie Mme HOUMANI Z., ma promotrice, Professeur au département des sciences agronomiques, qui a bien voulu accepter la charge de diriger ce mémoire; sa rigueur, son aide et son soutien moral et ses encouragements. Qu'elle trouve ici l'expression de mes remerciements les plus sincères.*

*Ce travail ne serait pas aussi riche et n'aurait pas pu avoir le jour sans l'aide et l'encadrement de Mme MOUMENE S., je la remercie pour la qualité de son encadrement exceptionnel, pour sa patience, sa rigueur et sa disponibilité durant notre préparation de ce mémoire.*

*Je remercie également Mr BELLAÏRECHE M., pour sa gentillesse et son aide à l'étude statistique.*

*J'exprime mes profonds remerciements et ma vive reconnaissance à Mr REGUIEG L., d'avoir accepté d'assurer la présidence du jury de mon mémoire de master. Qu'il trouve ici mes sentiments de gratitude et de déférence.*

*Mes vifs remerciements vont à Mme SAHRAOUI F., pour avoir accepté d'examiner ce travail.*

*Je remercie également notre cher délégué MERZOUK Djamel Eddine pour son aide, ses conseils et encouragements.*

*J'adresse également mes sincères remerciements aux personnels de station de l'INPV à Boufariq; Dounia, Khadidja et Sabrina pour leurs aides pratique et ses conseils.*

*Je tiens également à témoigner ma reconnaissance à mes amis et collègues de la 3ème promotion de l'option "BPM"; pour l'encouragement et l'ambiance chaleureuse du groupe.*

*Merci.*

# Dédicace

✿ *Je dédie cette thèse à ...* ✍

*A mes très chères parents "ADEL Mohamed" et "BELKHIRI Fatma ":*

*Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime et le respect que j'ai toujours eu pour vous.  
Que dieu leur procure bonne santé et longue vie.*

*"Ma mère" Tu représentes pour moi lesymbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi.*

*"Mon père", l'école de mon enfance, qui a été mon ombre durant toutes les années des études, et qui a veillé tout au long de ma vie à m'encourager, à me donner l'aide et à me protéger.*

*A mon très cher mari "Abdelghani ":*

*Quand je t'ai connu, j'ai trouvé l'homme de ma vie. Tes sacrifices, ton soutien moral et matériel, ta gentillesse sans égal, ton profond attachement m'ont permis de réussir mes études.  
Que dieu réunisse nos chemins pour un long commun serein et que ce travail soit témoignage de ma reconnaissance et de mon amour sincère et fidèle.  
Je dédie ce travail à toi et à toute ta famille en Boumerdes.*

*A mon très cher frère "Amine ":*

*Mon cher petit frère, les mots ne suffisent pour exprimer l'attachement, l'amour et l'affection que je porte pour toi, Je te souhaite tout le bonheur.*

*A ma sœur "Samira " et mon frère "Alilou ":*

*Je vous exprime à travers ce travail mes sentiments de fraternité et d'amour.*

*A toute ma famille*

*Spécialement à ma très chère tante "Ghania ".*

*A ma chère copine de chambre :*

*"DIR Fatima " et toute sa famille en Ain boussif.*

*Aux personnes qui m'ont toujours aidé et encouragé, qui étaient toujours à mes côtés, et qui m'ont accompagnaient durant mon chemin d'études supérieures, mes aimables amies, collègues d'étude : "BENALOUANE Razika " et "BENLAKHDAR Fatima "*

*A tous ceux qui me sont chères.*

*A tous ceux qui m'aiment.*

*A tous ceux que j'aime.*

*Je dédie ce travail.*

## Résumé

**Etude de l'effet des extraits de plantes sur la production en masse des champignons utiles pour l'agriculture du genre *Trichoderma*, *Beauveria* et *Metarhizium*.**

Ce travail est consacré à l'étude de l'effet *in vitro* de huit extraits de plantes ; *Malva sylvestris*, *Ceratonia siliqua*, *Citrus limon*, *Daucus carota*, *Beta vulgaris*, *Pisum sativum*, *Trigonella foenum-graecum* et *Ulva*, sur la production en masse de trois genre fongique ; *Trichoderma* (T4 et T8), *Beauveria* et *Metarhizium*. En considérant le milieu PDA comme témoin.

Nous avons testés l'effet de ces extraits sur la croissance mycélienne, sur la sporulation et sur la germination des champignons étudiés. Cette étude a révélé que les milieux de tous les extraits des plantes utilisés permettent le développement des souches fongiques testés selon leurs concentrations successivement; 100%, 50% et 20% à 25°C mais à divers taux.

Le meilleur extrait pour la croissance mycélienne chez T4 et T8 a été l'extrait de la mauve et l'extrait de betterave. Par ailleurs, chez *Beauveria sp.* la meilleure croissance a été obtenue par l'extrait de la mauve, l'extrait de petit pois et l'extrait de betterave. Alors que chez *Metarhizium sp.* le meilleur extrait pour la croissance a été obtenue par l'extrait de fenugrec. Par la suite le meilleur extrait pour la sporulation et pour la germination chez T4, T8 et *Beauveria sp.* a été l'extrait de la mauve et chez *Metarhizium sp.* a été l'extrait de fenugrec.

**Mots clés :** extraits des plantes, *Trichoderma*, *Beauveria*, *Metarhizium*, production en masse, croissance mycélienne, sporulation, germination.

## Abstract

**Study of the effect of plant extracts on the mass production of beneficial fungi for agriculture of the genus *Trichoderma*, *Beauveria* and *Metarhizium*.**

This work is devoted to the study of the effect *in vitro* of eight plant extracts; *Malva sylvestris*, *Ceratonia siliqua*, *Citrus limon*, *Daucus carota*, *Beta vulgaris*, *Pisum sativum*, *Trigonella foenum-graecum* and *Ulva* on mass production three fungal genus, *Trichoderma* (*T4* and *T8*), *Beauveria* and *Metarhizium*. Considering the PDA medium as a control.

We tested the effect of these extracts on mycelial growth, sporulation and germination of fungi studied. This study revealed that the environments of all plant extracts used allow development according to their concentrations tested successively fungal strains, 100 %, 50 % and 20 % at 25 ° C but at different rates.

Best quote for mycelial growth in *T4* and *T8* was the extract of the purple and beet extract. By aillor among *Beauveria sp.* the best growth was obtained with the extract of purple, pea extract and beet extract. While in *Metarhizium sp.* to extract the best growth was obtained with the extract of fenugreek. Subsequently extract the best for sporulation and germination in *T4*, *T8* and *Beauveria sp.* Was the extract of the purple and in *Metarhizium sp.* was fenugreek extract.

**Keywords:** plant extracts, *Trichoderma*, *Beauveria*, *Metarhizium*, mass production, mycelial growth, sporulation, germination.

تأثير النباتات كميات كبيرة الفطريات

*Trichoderma, Beauveria Metarhizium.*

يخصص هذا العمل إلى دراسة مخبرية لتأثير ثمانية مستخلصات نباتية: *Malva sylvestris*, *Pisum satioum*, *Beta vulgaris*, *Daucus carota*, *Citrus limon*, *Ceratonia siliqua*, *Ulva*, *Trigonella foenum – graecum*, كميات كبيرة ثلاثة أجناس فطرية:

PDA كشاهد للمقارنة. *Metarhizium*, *Beauveria*, *Trichoderma* (T4 T8)

لتحقيق هذا الهدف, اخترنا تأثير هذه المستخلصات على نمو فطر, تبوغ و إنبات الفطريات المدروسة, حيث كشفت هذه الدراسة أن جميع المستخلصات المدروسة لها دور فعال في تنمية الأصناف الفطرية الثلاثة, هذه الفعالية تمت ملاحظتها حسب تراكيز المستخلصات المجربة على 20 50 100, غير أننا لاحظنا أن أهمية هذه المستخلصات النباتية في تنمية الفطريات المدروسة متفاوتة فيما بينها من حيث الفعالية.

أنجع مستخلص لتنمية فطر (*Trichoderma* (T4,T8) هو مستخلص الخبز mauve , betterave , petit pois mauve *Beauveria* mauve betterave fenugrec أحسن فعالية بالنسبة لصنف *Metarhizium sp*.

فيما يخص تأثير هذه المستخلصات على تبوغ و إنبات الفطريات المدروسة وجدنا ان مستخلص mauve يكون أكثر أهمية للعمليات المذكورتين بالنسبة للفظ (*Trichoderma* (T4 , T8) *Beauveria*

fenugrec هو أحسن المستخلصات المدروسة *Metarhizium sp* نفعا لتنمية هامة لهذا الأخير.

الكلمات المفتاحية: المستخلصات النباتية, *Metarhizium, Beauveria, Trichoderma*, كميات كبيرة

## Table des matières

Remerciements

Dédicace

Résumé

Abstract

Introduction..... 1

### Chapitre 1 : Etude bibliographique

1.1 Données bibliographiques sur les champignons étudiés.....3

1.1.1 *Trichoderma sp*

1.1.1.1 Historique.....3

1.1.1.2 Taxonomie et classification.....4

1.1.1.3 Aspect cultural et morphologie.....6

1.1.1.4 Mécanismes d'action.....7

1.1.1.5 Utilisation en agriculture.....8

1.1.2 *Beauveria bassiana*

1.1.2.1 Historique.....9

1.1.2.2 Taxonomie et classification.....9

1.1.2.3 Aspect cultural et morphologie.....11

1.1.2.4 Mécanismes d'action..... 12

1.1.2.5 Utilisation en agriculture.....12

1.1.3 *Metarhizium anisopali*

1.1.3.1 Historique.....14

1.1.3.2 Taxonomie et classification.....15

1.1.3.3 Aspect cultural et morphologie.....16

1.1.3.4 Mécanismes d'action.....16

1.1.3.5 Utilisation en agriculture.....17

1.2 Données bibliographiques sur les plantes étudiées.....18

1.2.1 Mauve (*Malva sylvestris*).

1.2.1.1. Description botanique.....19

1.2.1.2 Composition chimique.....20

1.2.2 Le caroubier (*Ceratonia siliqua*)

1.2.2.1 Description botanique .....20

1.2.2.2 Composition chimique.....	21
1.2.3 Le citron ( <i>Citrus limon</i> )	
1.2.3.1 Description botanique.....	21
1.2.3.2 Composition chimique.....	22
1.2.4 La Carotte ( <i>Daucus carota</i> )	
1.2.4.1. Description botanique.....	23
1.2.4.2 Composition chimique.....	23
1.2.5 La betterave ( <i>Beta vulgaris</i> )	
1.2.5.1 Description botanique.....	24
1.2.5.2 Composition chimique.....	25
1.2.6 Les petits pois ( <i>Pisum sativum L.</i> )	
1.2.6.1 Description botanique.....	25
1.2.6.2 Composition chimique.....	26
1.2.7 Fenugrec ( <i>Trigonella foenum-graecum</i> )	
1.2.7.1 Description botanique.....	26
1.2.7.2 Composition chimique.....	27
1.2.8 La laitue de mer ( <i>Ulva sp.</i> )	
1.2.8.1 Description botanique.....	27
1.2.8.2 Composition chimique.....	28

## Chapitre 2. Matériels et Méthodes

### 2.1

Introduction.....	29
-------------------	----

### 2.2 Matériel biologique

2.2.1 Matériel végétal .....	29
2.2.1 Matériel fongique.....	32
2.3 Séchage et broyage du matériel végétal.....	34
2.4 Préparation des extraits aqueux.....	34
2.5 Effet des extraits de plantes et de l'algue marine sur la production en masse des champignons.....	34
2.5.1 Evaluation de la croissance mycélienne.....	35
2.5.2 Caractérisation culturelle des champignons étudiés.....	36
2.5.3 Evaluation de la sporulation et de germination. ....	36

2.6 Analyse statistique.....	37
------------------------------	----

## Chapitre 3. Résultats et discussion

3.1 Effet des extraits de plantes et de l'algue marine sur la production en masse des champignons.....	38
---	----

3.1.1	Effet sur la croissance mycélienne.....	38
3.1.2	Caractérisation culturelle des champignons étudiés.....	46
3.1.2.1	Aspect et couleur de la colonie.....	46
3.1.2.2	La couleur des extraits.....	46
3.1.2.3	La vitesse de la croissance.....	48
3.1.2.4	Les exsudats.....	48
3.1.3	Effet sur la sporulation.....	49
3.1.4	Effet sur la germination.....	54
3.2	Discussion.....	57
<b>Conclusion.....</b>		<b>59</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>		<b>61</b>
<b>Annexe</b>		

## Liste des abréviations :

- **ACP** Analyse en composante principale.
- ***B. bassiana*** *Beauveria bassiana*.
- **D** dilution (dose).
- **GLM** General Linear Model.
- **PDA** Potato- Dextrose- Agar.
- **PEG** polyéthylène glycol.
- **T4** isolats fongique du genre *Trichoderma* (Région1)
- **T8** isolats fongique du genre *Trichoderma* (Région2)

## Liste des figures

<b>Figure 1.</b> Systématiques de <i>Trichoderma spp.</i> (Rifai, 1969).....	06
<b>Figure 2.</b> Aspect morphologique d'un conidiophore de <i>Trichoderma sp.</i> (Samuels et al., 1994).....	07
<b>Figure 3.</b> Morphologie de <i>Beauveria bassiana</i> : <b>A</b> -structures conidiales; <b>B</b> -cellules conidiennes ; <b>C</b> -spores ( <b>Vuillemin, P., 1912</b> ).....	11
<b>Figure. 4 :</b> Différents aspects du <i>Metarhizium anisopali</i> , A.B.C- Conidiophores ; D- Conidies ( <b>Hoog, 2000</b> ) .....	16
<b>Figure 5.</b> La morphologie des feuilles et des fleurs de <i>Malva sylvestris</i> dans son milieu naturel ( <b>Fournier, 1934-1940 ; Blamey &amp; Grey-Wilson, 1991</b> ).....	19
<b>Figure 6.</b> La morphologie des feuilles de <i>Ceratonia siliqua</i> dans son milieu naturel ( <b>Diamantoglou et Mitrakos, 1981; Rejeb, 1995</b> ).....	21
<b>Figure7.</b> La morphologie des feuilles et du fruit de <i>Citrus limon</i> dans son milieu naturel ( <b>Blancke, 2001</b> ).....	22
<b>Figure 8.</b> La morphologie de <i>Daucus carota</i> (A) et Coupe longitudinale d'une carotte(B) (Villeneuve et Leteinturier ,1992 cités par Villeneuve ,1999).....	23
<b>Figure 9.</b> Présentation de la morphologie de betterave ; <b>A-</b> feuilles ; <b>B-</b> a : racine rugueuse à forme conique, b : collet (tige), c : feuilles ( <b>d'après Boiffin et Choppin de Janvry, 1994</b> ).....	24
<b>Figure 10.</b> <i>Pisum sativum</i> dans son milieu naturel ( <b>Free 1993 ; Pouvreau 2004</b> ).....	25
<b>Figure 11.</b> <i>Trigonella foenum-graecum</i> : Feuilles (A) et grains(B)( <b>Maletic et Jevdjovic, 2007</b> ).....	26
<b>Figure 12.</b> La morphologie d'un thalle <i>Ulva</i> dans son milieu naturel( <b>Hayden et al., 2003</b> ).....	28
<b>Figure 13.</b> Aspect cultural des deux isolats de <i>Trichoderma</i> T4 et T8 respectivement cultivées sur milieu PDA à 25°C après 6 <sup>ème</sup> jour ( <b>originale</b> ).....	32
<b>Figure 14.</b> Aspect cultural de <i>Beauveria sp.</i> Cultivé sur milieu PDA à 25°C après 6 <sup>ème</sup> jour ( <b>originale</b> ).....	33
<b>Figure 15.</b> Aspect cultural de <i>Metarhizium sp.</i> Cultivé sur milieu PDA à 25°C après 6 <sup>ème</sup> jour ( <b>originale</b> ).....	33

<b>Figure 16.</b> Préparation des poudres du matériel végétal et algal.....	34
<b>Figure 17.</b> Préparations des suspensions conidiennes.....	36
<b>Figure 18.</b> Aspect cultural de <i>T4</i> sur l'extrait de la mauve après le 6 <sup>ème</sup> jour à 25°C...38	
<b>Figure 19.</b> Aspect cultural de <i>T4</i> sur l'extrait de betterave après le 6 <sup>ème</sup> jour à 25°C...39	
<b>Figure 20.</b> Aspect cultural de <i>T8</i> sur l'extrait de la mauve après le 6 <sup>ème</sup> jour à 25°C...39	
<b>Figure 21.</b> Aspect cultural de <i>T8</i> sur l'extrait de betterave après le 6 <sup>ème</sup> jour à 25°C...40	
<b>Figure 22.</b> Aspect cultural de <i>Beauveria sp.</i> sur l'extrait de la mauve après le 6 <sup>ème</sup> jour à 25°C. ....	40
<b>Figure 23.</b> Aspect cultural de <i>Beauveria sp.</i> sur l'extrait de petit pois à concentration de 100% après le 6 <sup>ème</sup> jour à 25°C.....	41
<b>Figure 24.</b> Aspect cultural de <i>Beauveria sp.</i> sur l'extrait de betterave après le 6 <sup>ème</sup> jour à 25°C.....	41
<b>Figure 25.</b> Aspect cultural de <i>Metarhizium sp.</i> sur l'extrait de la mauve à concentration de 100% après le 6 <sup>ème</sup> jour à 25°C.....	42
<b>Figure 26.</b> Aspect cultural de <i>Metarhizium sp.</i> sur l'extrait de fenugrec après le 6 <sup>ème</sup> jour à 25°C.....	42
<b>Figure 27.</b> L'analyse de la variance des taux de croissance mycélienne des champignons testés en GLM selon les extraits des plantes.....	44
<b>Figure 28.</b> Classification hiérarchique des extraits de plantes testés bruts et à différentes concentrations (a) et Analyse en composante principale (ACP) des taux de croissance mycélienne des champignons étudiés (b) selon les extraits de plantes et leurs concentrations 20%, 50% et 100%.....	45
<b>Figure 29.</b> Disparition graduelle de la couleur rouge de l'extrait de betterave chez <i>T4</i> à 20%.....	47
<b>Figure 30.</b> Changement de la couleur de l'extrait de fenugrec chez <i>T4</i> .....	47
<b>Figure 31.</b> Changement de la couleur de l'extrait de caroubier chez <i>T4</i> .....	47
<b>Figure 32.</b> Présence des exsudats chez <i>Beauveria sp.</i> (a) et chez <i>T8</i> (b) sur l'extrait de la mauve à 100% après le 6 <sup>ème</sup> jour.....	48
<b>Figure 33.</b> Aspect cultural de <i>T4</i> sur l'extrait de la mauve à concentration de 100% après le 6 <sup>ème</sup> jours à 25°C.....	49

<b>Figure 34.</b> Aspect cultural de <i>T8</i> sur l'extrait de la mauve à concentration de 100% après le 6 <sup>ème</sup> jour à 25°C.....	49
<b>Figure 35.</b> Aspect cultural de <i>Beauveria sp.</i> sur l'extrait de la mauve à concentration de 100% après le 6 <sup>ème</sup> jour à 25°C.....	50
<b>Figure 36.</b> Aspect cultural de <i>Beauveria sp.</i> sur l'extrait de fenugrec à concentration de 100% après le 6 <sup>ème</sup> jour à 25°C.....	50
<b>Figure 37.</b> L'analyse de la variance des taux de sporulation des champignons testés en GLM selon les extraits des plantes.....	52
<b>Figure 38.</b> Classification hiérarchique des extraits de plantes (a) et Analyse en composante principale (ACP) des taux de sporulation de champignons étudiés (b) selon les extraits de plantes et leurs concentrations 20%, 50% et 100%.....	53
<b>Figure 39.</b> Analyse de la variance des taux de germination des champignons testés en GLM selon les extraits des plantes.....	55
<b>Figure 40.</b> Classification hiérarchique des extraits de plantes (a) et Analyse en composante principale (ACP) des taux de germination des champignons étudiés (b) selon les extraits de plantes et leurs concentrations 20%, 50% et 100%.....	56

## Liste des tableaux

**Tableau 1.** Données sur les espèces végétales et l'algue macroscopique marine testées

**Tableau 2.** Analyse de la variance des taux de croissance mycélienne des champignons étudiés en fonction des extraits des plantes et de leurs concentrations.

**Tableau 3.** Analyse de la variance des taux de sporulation des champignons étudiés en fonction des extraits des plantes et de leurs concentrations.

**Tableau 4.** Analyse de la variance des taux de germination des champignons étudiés en fonction des extraits des plantes et de leurs concentrations.

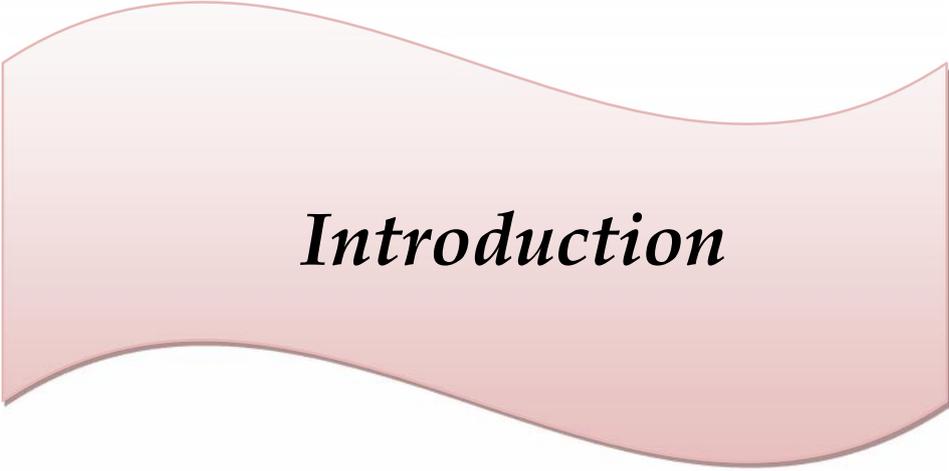
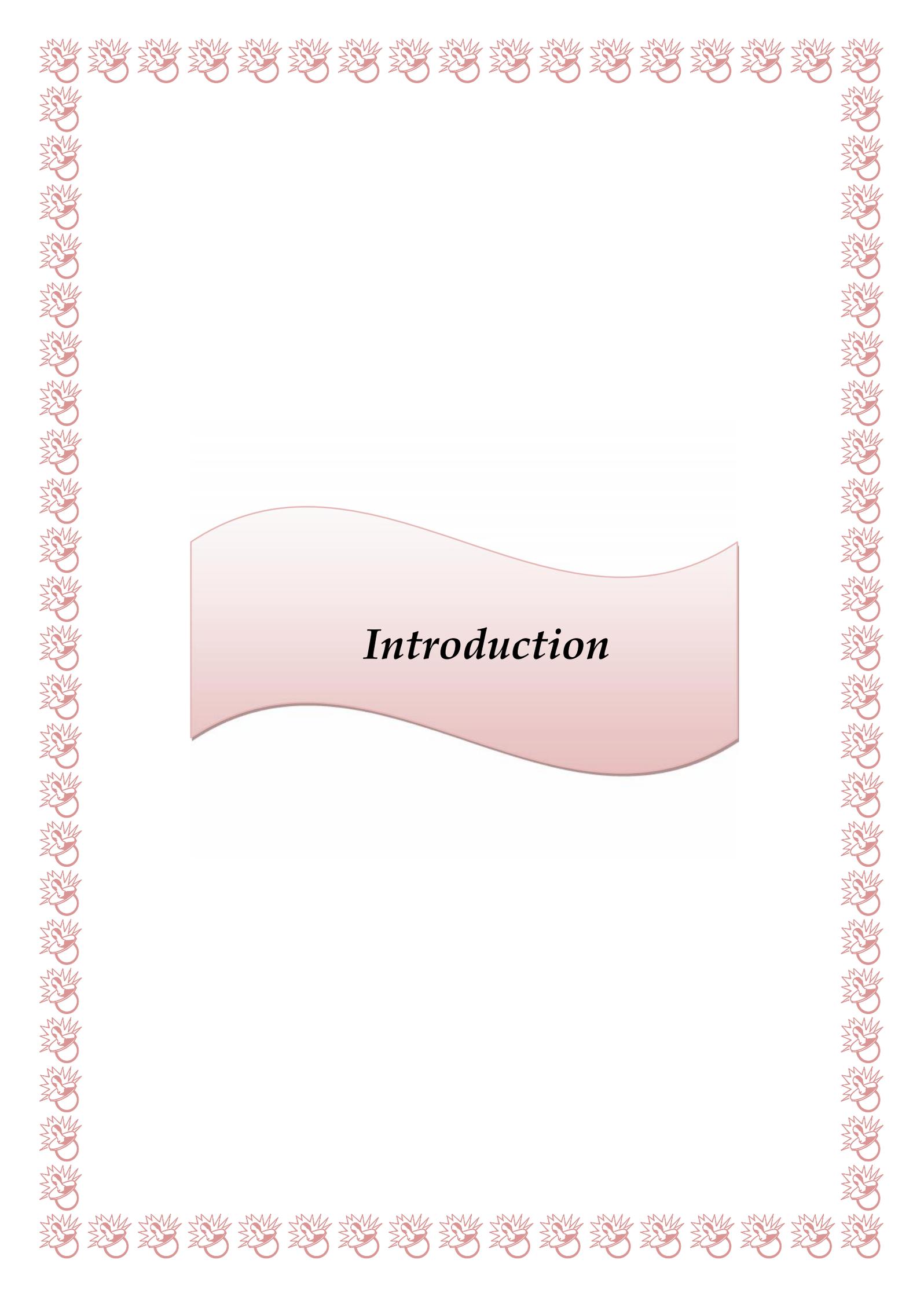
**Tableau 5.** Etude macroscopique de *Trichoderma (T4)* sur différents milieux à 25°C après le 6<sup>ème</sup> jours.

**Tableau 6.** Etude macroscopique de *Trichoderma (T8)* sur différents milieux à 25°C après le 6<sup>ème</sup> jours.

**Tableau 7.** Etude macroscopique de *Beauveria sp.* sur différents milieux à 25°C après le 6<sup>ème</sup> jours.

**Tableau 8.** Etude macroscopique de *Metarhizium sp.* sur différents milieux à 25°C après le 6<sup>ème</sup> jours.

**Tableau 9.** Résultats obtenus après 6ème jours sur différents milieux à 25°C.



*Introduction*

## 1. Introduction

Depuis la naissance du monde, certains organismes ravageurs (insectes, acariens, bactéries, champignons...) minent la vie de l'Homme, qui à son tour tente souvent de les combattre. Néanmoins, dans les environnements non-perturbés, la densité de ces organismes est normalement contrôlée par l'intervention de leurs ennemis naturels, chacun variant selon l'abondance de l'autre. Cependant, la biodiversité permet de maintenir ces conditions d'équilibre.

Avec l'avènement de l'agriculture intensive des monocultures, les agro-écosystèmes sont de plus en plus perturbés et simplifiés à leur maximum. La diversité des organismes présents, dont celle des ennemis naturels de ravageurs, est très faible. Pour cette raison, ces monocultures sont plus sensibles aux maladies et font parfois face à d'importantes attaques de ravageurs (Coderre et Vincent, 1992, Plant et Freudenberger, 2005). Aussi, l'introduction accidentelle de ravageurs exotiques, dans un contexte de mondialisation des échanges commerciaux, cause divers problèmes. En réponse à ces problèmes, l'Homme élabore certains produits pesticides, à l'époque souvent utilisés avec modération, conjointement à certaines pratiques culturales comme la rotation des cultures. Cependant, le développement de pesticides organiques comme le DDT (dichloro diphenyl trichloroéthane) pendant la seconde guerre mondiale et les années suivantes mène à une révolution dans les méthodes de contrôle des ravageurs. Par exemple, dans les cultures de coton, de blé et de maïs, l'utilisation de pesticides passe de 10 % des superficies en 1952 jusqu'à 95 % en 1980 (U.S. Congress, Office of Technology Assessment, 1995).

Par la suite, la découverte de la résistance chez les ravageurs visés par les pesticides et des effets nocifs sur la santé humaine et les écosystèmes porte à réflexion sur ce qui semblait être une solution miracle. Existe-t-il des méthodes alternatives de lutttes, plus écologiques? Revient alors à l'avant-scène un concept qui avait été éclipsé par les pesticides : la lutte biologique. Présente naturellement dans la plupart des écosystèmes, elle peut être résumée par le contrôle d'un organisme problématique par un de ses ennemis naturels. La lutte biologique est ainsi définie : c'est l'utilisation d'organismes vivants pour contrôler ou combattre un ravageur.

Plusieurs groupes d'organismes peuvent être utilisés en lutte biologique. Les principaux sont les micro-organismes, les nématodes, les insectes et les arachnides. Les organismes bénéfiques utilisés en lutte biologique doivent avoir un bon taux de reproduction, être spécifiques, avoir une bonne capacité d'adaptation et leur cycle de vie doit être synchronisé à celui du ravageur ou du phytopathogène (Weeden et *al.*, 2007).

## Introduction générale

---

Nous distinguons les entomopathogènes et les antagonistes causant respectivement des maladies mortelles chez les insectes et la destruction ou l'inhibition de l'agent causal de la maladie. Parmi ces micro-organismes nous avons des champignons entomopathogènes tels que; *Beauveria bassiana* et *Metarhizium anisopali* et l'antagoniste *Trichoderma sp.*

Face au bio agresseur, les plantes peuvent développer des mécanismes de défense naturelle pour se protéger, bien longtemps avant que l'homme ne joue un rôle actif pour leur protection. Elles peuvent synthétiser dans leurs tissus une variété de groupes de composés bioactifs tels que les métabolites secondaires (Castillo *et al.*, 2010).

Certains de ces métabolites sont utilisés dans les industries agroalimentaire, le cosmétique et pharmaceutiques (Stammati *et al.*, 1999). D'autres possèdent des activités biologiques diverses comme antibactériens, antifongiques, antivirales, insecticides et anti oxydantes (Sattar *et al.* 1995; Marinkovic *et al.* 2002 ; Oplache - Nova et Obreshkova, 2003 ).

Certains métabolites permettraient l'amélioration de la production en masse de plusieurs champignons. Dans ce sens, notre présent travail repose sur la recherche des extraits de plantes stimulateurs de la croissance, la sporulation et la germination des champignons utiles pour l'agriculture tels que : *Beauveria sp.*, *Metarhizium sp.* et *Trichoderma sp.* par l'utilisation des extraits de plantes en milieu de culture.



*Etude bibliographique*

## 1.1 Données bibliographiques sur les champignons étudiés

Parmi les micro-organismes utilisés en lutte biologique, on distingue plus de 700 espèces de microchampignons (Starnes *et al.*, 1993). Ils auraient un intérêt agronomique considérable dans la lutte biologique contre les ravageurs de cultures et feraient l'objet d'études de plus en plus poussées. La pathogénécité de l'inoculum sporal et la spécificité de l'hôte sont deux paramètres importants dans le choix de l'isolat fongique.

Les microchampignons sont des agents de lutte très intéressants du fait de leur aptitude à infester l'hôte par ingestion ou par simple contact rendant tous les stades (œuf, larve, adulte) sensibles ainsi que les suceurs-piqueurs (Carruthers and Soper, 1987).

Ils peuvent être produits en masse à moindre coût et peuvent être appliqués avec les méthodes conventionnelles. Les principaux facteurs limitant l'utilisation en champ des microchampignons sont abiotiques et vont entraîner la perte d'efficacité de l'inoculum fongique sur le couvert végétal. On distingue trois genres de microchampignons utiles pour l'agriculture : *Trichoderma*, *Beauveria* et *Metarhizium*.

### 1.1.1 *Trichoderma sp.*

#### 1.1.1.1 Historique

Le terme *Trichoderma* a été introduit en mycologie en 1794 par Persoon qui a distingué des champignons microscopiques, considérés durant près de 200 ans comme «Gastéromycètes». Ces organismes sont cosmopolites, ils appartiennent à un grand ensemble de champignons sans reproduction sexuée (in Mohamed-Benkada, 2006). Selon Kullning-Gradinger *et al.* (2002) in Legrand *et al.* (2005), il s'agit d'un genre de champignon *imparfait* regroupant des espèces qui sont les anamorphes d'ascomycètes de la famille des *Hypocreaceae* (*Hypocrea* et genre voisins). En 1902, Oudemans et Koning (in Legrand *et al.*, 2005) ont identifié des *Trichoderma* de la microflore des sols.

Pendant les trente années suivantes, des relevés effectués à travers le monde ont montré qu'il s'agit de l'un des genres le plus communément répandu à la fois dans le sol et le bois mort en décomposition. En effet, les *Trichoderma* sont des hôtes habituels du sol où leur abondance dépend entre autre du taux de matière organique. Ils pénètrent aussi, grâce à leur activité cellulolytiques, à l'intérieur du bois mort. Rayner (1977) a montré que le groupe *Trichoderma spp.* est le groupe de champignons basidiomycètes le plus fréquemment isolé de souches de chêne et de hêtre âgés de 30 à 50 ans (Legrand *et al.*, 2005).

Dans ce groupe, près de 35 espèces sont établies à ce jour sont d'intérêt économique, pour leur production d'enzymes cellulolytiques ; elles sont utilisées comme agent de lutte biologique en raison de leur antagonisme par antibioses, mycoparasitisme, compétition, lyse, et promotion de la plante hôte vis-à-vis d'autres espèces fongiques (Mohamed-Benkada, 2006). Dès 1897, Vuillemin avait signalé l'antagonisme des *Trichoderma* vis-à-vis de divers autres champignons (in Legrand et al., 2005). Weindling (1932) a montré que l'espèce *Trichoderma lignorum* se comportait en parasite vis-à-vis de deux Basidiomycètes phytopathogènes : *Rhizoctonia solani* et *Sclerotium rolfsii*. L'auteur a démontré également des effets d'antibiose dans les mêmes associations. Quant à l'antagonisme par compétition, il interviendrait en cas où la vitesse de croissance est élevée de nombreuses espèces de *Trichoderma* est élevée (Legrand et al., 2005). Selon ces auteurs, l'efficacité de leurs complexes enzymatiques cellulolytiques est exploitée dans le domaine industriel.

### 1.1.1.2 Taxonomie et classification

La division du genre *Trichoderma* en espèces a fait l'objet de nombreuses études. Dans le règne vivant les limites de «l'espèce» reposent sur la possibilité de croisement entre individus. Or, les champignons anamorphes du genre *Trichoderma* n'ont pas de reproduction sexuée connue, et ce caractère ne peut être pris en compte dans leur classification systématique. Ce sont donc, les aspects culturels et la morphologie des appareils sporogènes qui sont considérés (Roquebert., 1996) ainsi que le matériel génétique (Gams et Bissett., 1998). Ainsi, le positionnement taxonomique des *Trichoderma sp* n'a pas été facilement établi. Ce n'est qu'en 1794 que Persoon décrit le genre *Trichoderma sp*. avec 4 espèces. Fries (1821), classa les *Trichoderma sp*, parmi les Gastéromycètes. Cependant, des controverses sur la systématique de ce genre débutent à partir de 1860 à cause de l'absence de forme sexuée. En 1871, devant le nombre croissant d'espèces rencontrées, Harz insista sur l'importance des caractères morphologiques particulièrement la présence des phialides observées au microscope optique.

En 1916, Waksman décrit 6 nouvelles souches de *Trichoderma sp*. en utilisant des critères macroscopiques différents de ceux préconisés par Harz.

En 1926, Abbot identifia 4 espèces de *Trichoderma* selon des critères différents des précédents. Jusqu'à 1939 le raisonnement d'Abbot reste en vigueur.

En 1939, Bisby tente de mettre de l'ordre dans ces systèmes en proposant une unique espèce : *Trichoderma viridae*. Durant 24 ans, toute espèce fongique à spores vertes était considérée comme étant un *Trichoderma sp*.

En 1963, les travaux de Gutter et Monbasher mettent fin au système précédant, en démontrant la variabilité des espèces de *Trichoderma* en fonction des conditions environnementales.

En 1969, Rifai mettra fin à toute la polémique autour de la classification du *Trichoderma*. Il proposera une classification ayant le concept d'« espèces agrégées », basée sur les caractères microscopiques. Selon l'auteur, « une espèce agrégée est une entité composée de groupement d'individus très similaires, difficiles à séparer ». Ainsi, neuf espèces agrégées sont créées (*T.aureoviridae* Rifai, *T. hamatum* Bain, *T. harzianum* Rifai, *T. koningii* Oudemans, *T. longibrachiatum* Rifai, *T. piluliferum* Webster et Rifai, *T. polysporum* Rifai, *T. pseudokoningii* Rifai et *T. viridae* Gray), tout en tolérant une certaine variabilité au sein de chaque espèce agrégée (Rifai., 1969). Ce système semble le plus facilement utilisable pour la communauté scientifique, d'autant plus qu'il a été amélioré récemment par Bissett (1984, 1991).

En 1991, Bissett propose la notion de « section » pour faire face au nombre croissant d'espèces nouvelles de *Trichoderma sp.*, sans rapport avec les espèces agrégées. En se basant sur la morphologie des conidiophores et des phialides, il regroupe les espèces agrégées dans 5 sections (Fig. 1) : *Trichoderma*, *Pachybasium*, *Hypocreanum*, *Longibrachiatum* et *Saturnisporum* (Leuchtmann., 1996). Le système taxonomique de Bissett sur le *Trichoderma* est appuyé par des approches de biologie moléculaire (PCR) et reste le plus fiable actuellement (Lillard-Roberts, 2004).

Les espèces de *Trichoderma* ainsi que leurs rares formes téléomorphes observées sont positionnées dans la classe des *Ascomycètes*. D'autre part, plus de 200 espèces du genre *Hypocrea* ont été identifiées, mais sont rarement cultivables, et de ce fait peu décrites en termes modernes ; Sous certaines conditions, les *Hypocrea sp.* (téléomorphes) se transforment définitivement en *Trichoderma sp.* (anamorphes) (Gams et Bisset, 1998). On pense alors, que l'évolution a conduit à la disparition du mode sexué pour l'établissement d'un genre à reproduction exclusivement asexuée (Roquebert., 1996).

La biologie moléculaire révèle aujourd'hui que des espèces de *Trichoderma* génétiquement différentes, présentent des similitudes morphologiques spectaculaires et leurs caractéristiques se chevauchent ce qui, d'une part explique la longue controverse connue par ce genre auparavant et d'une autre part, montre que les seuls critères morphologiques ne suffisent plus pour une classification incontestable et rigoureuse des formes anamorphes de *Trichoderma sp.* ce qui explique leur positionnement taxonomique actuel (Cournut., 1984 ; Sugiyama, 1987).

Ainsi, la classification du *Trichoderma* se présente comme suit selon Bissett (2004) :

**Embranchement**.....*Amastigomycota et/ou Eumycète*

**Sous embranchement**.....*Ascomycotina*

**Classe** .....*Sordariomycètes*

**Ordre**.....*Hypocréales*

**Famille**.....*Hypocraceae*

**Genre** .....*Trichoderma*

Le genre *Trichoderma* se divise en cinq sections :

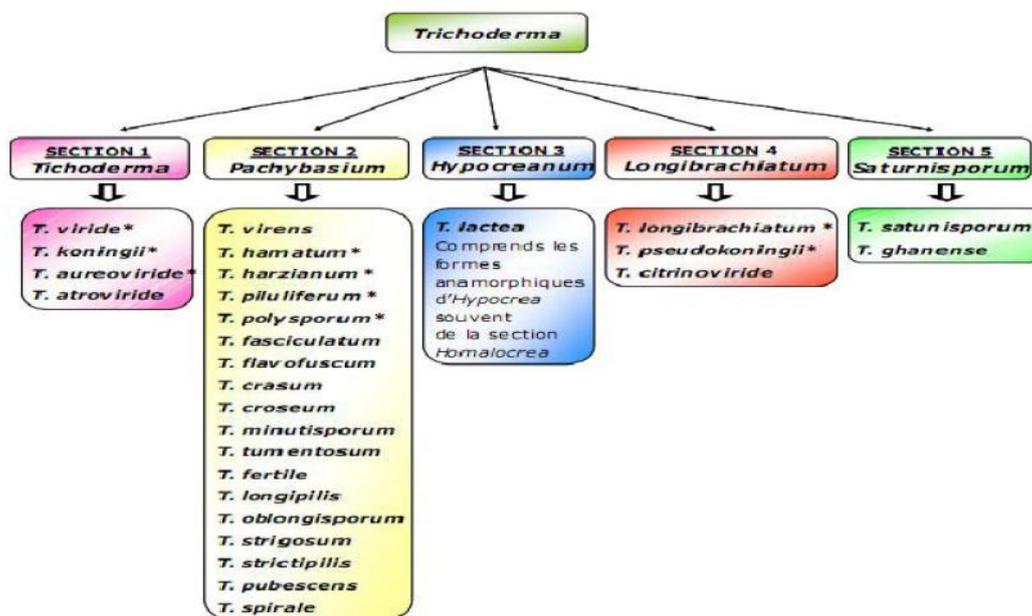


Figure 1. Systématiques de *Trichoderma* spp. (Rifai, 1969).

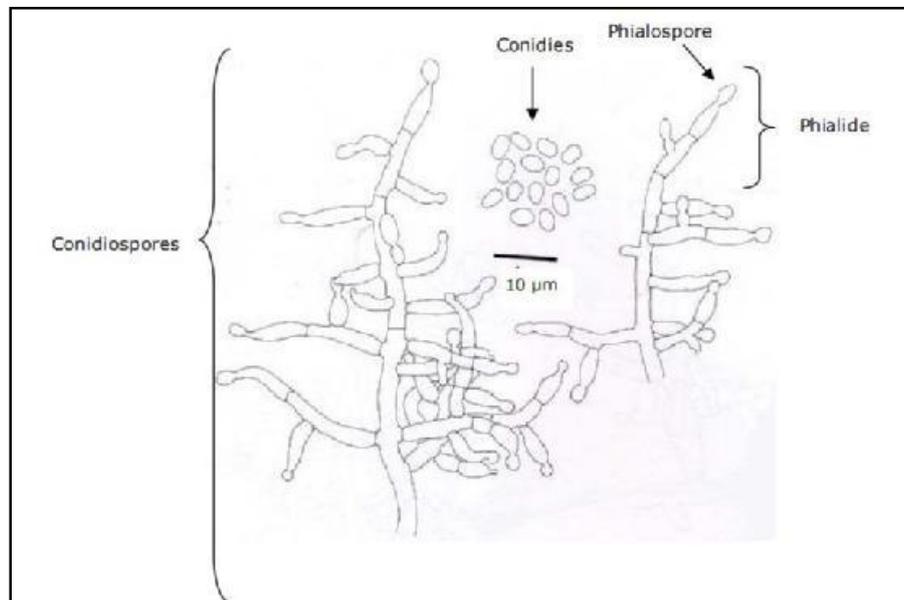
### 1.1.1.3 Aspect cultural et Morphologie

Selon Domsch et al. (1980) in Djafer (2011), les *Trichoderma* peuvent se développer à des températures allant de 15 à 35 °C. Cependant, la température optimale de croissance est variable selon les espèces. Elle est de 28°C à 30°C pour *T. harzianum*, et de 22°C à 25°C pour *T. viride* (Danielson et Davey, 1973 in Djafer, 2011).

L'aspect macroscopique de *Trichoderma* sp, est apprécié à partir de cultures sur géloses nutritives appropriées dans des boîtes de Pétri. Les colonies fongiques peuvent être légèrement floconneuses ou bien compactées en touffes.

Entre ces deux extrêmes, existent des aspects intermédiaires. Les colonies sont colorées en fonction de la pigmentation des phialides. Cinq jours après sa germination, la conidie donne naissance à un mycélium d'abord blanc et stérile en forme de cercle. Deux jours plus tard, une couleur verte est visible sur les parties aériennes du mycélium, correspondant à la conidiogénèse. D'autres cercles concentriques réguliers se forment par la suite, et entre le 16ème et le 20ème jour un feutrage épais se superpose à la culture.

Au microscope optique on peut observer un mycélium composé d'hyphes jaunes, septés, ramifiés à parois lisses. Les conidiophores ont une forme conique ou pyramidale. Très ramifiés, ils portent des phialides en forme de flasques ou de quilles. A leur tour, les phialides portent les spores (phialospores ou bien conidies) (Mohamed-Benkada, 2006) (Figure. 2).



**Figure 2.** Aspect morphologique d'un conidiophore de *Trichoderma sp.* (Samuels et *al.*, 1994).

#### 1.1.1.4 Mécanismes d'action

*Trichoderma* possède des mécanismes d'attaque potentiellement utilisables mais qui demeurent toutefois complexes. Il peut employer un ou plusieurs modes d'action en même temps pour maîtriser un agent pathogène. Le déploiement des modes d'action varie également selon les partenaires en présence et les conditions physico-chimiques du milieu (températures, humidité, etc.).

*Trichoderma* est efficace lorsqu'il s'installe avant l'arrivée des champignons pathogènes, son action est donc préventive. Il permet, au niveau des racines, de créer un manchon protecteur autour de celles-ci et ainsi contrer l'entrée des agents pathogènes à l'intérieur des racines.

Le même effet est observé lorsqu'il est utilisé en pulvérisation aérienne. Une fois installé, *Trichoderma* peut avoir un effet stimulant pour la plante en absence de champignons pathogènes (Caron, 2002).

Le *Trichoderma* a la capacité d'attaquer les agents pathogènes via différents modes d'action :

- **Antibiose** qui résulte de la production de substances agissant comme des antibiotiques et qui inhibent la croissance de l'agent pathogène;
- **Compétition** qui se manifeste par l'aptitude de *Trichoderma* à utiliser les mêmes ressources du milieu (aires d'alimentation, sites de développement) que les champignons pathogènes. Le *Trichoderma* emploie ce mode d'action surtout pour occuper les lieux avant l'arrivée des indésirables;
- **Parasitisme** qui se manifeste par la destruction de l'agent pathogène lorsque *Trichoderma* s'enroule autour de celui-ci soit en l'étranglant, en pénétrant à l'intérieur et/ou en lui injectant des substances (enzymes) qui le détruisent.

#### 1.1.1.5. Utilisation en agriculture

Les *Trichoderma* sont des champignons bénéfiques qui colonisent naturellement les sols. En colonisant les racines des plantes avant les mauvais champignons, ils protègent et donnent même un surplus de vigueur aux plantes. Dans les plantations, ils peuvent jouer un rôle prédominant dans la santé des plantes.; aussi, ils présentent non seulement un potentiel dans les cultures en serres, mais un avantage incontestable dans la protection des maladies racinaires (*Pythium*, *Fusarium*, *Rhizoctonia* ; *Phytophthora*,...) et des parties aériennes (*Botrytis cinerea*) (Liette, 2002).

Par ailleurs, la capacité des *Trichoderma* à contrôler les agents phytopathologiques du sol est connue depuis la fin des années 1920 (Mohamed-Benkada, 2006). Ils ont été utilisés comme agent de lutte biologique contre un large spectre de phytopathogène. Leurs antagonisme est produit par compétition, mycoparasitisme ou par antibiose. Ces mécanismes peuvent intervenir seuls, en association ou séquentiellement (Lepoivre, 2003).

Les travaux de Baker (1988) et de Lynch et *al.* (1991) ont montré que certaines souches de *Trichoderma* exerceraient une action stimulatrice sur la croissance de certaines plantes. Dans ce cadre, Lynch et *al.* (1991) ont étudié l'effet de *Trichoderma* sur la croissance de la laitue et son aptitude à lutter contre *Rhizoctonia solani kuhn.* et *Phytium ultimum Trow.* Les auteurs ont démontré l'effet de certaines souches de *Trichoderma* sur la croissance de la laitue et la germination des graines en l'absence de tout agent pathogène.

Cependant, ce n'est qu'à partir de 1990 que ce champignon a été commercialisé sous forme de bio pesticide ; l'utilisation pratique de cette méthode de lutte biologique vient après l'acquisition de nombreuses connaissances sur l'effet des *Trichoderma* ; Les principales espèces utilisées sont *T. harziaunum* et *T. viride* (Mohamed-Benkara, 2006).

Selon Djafer (2011), en Algérie, une étude récente sur le biocontrôle du mildiou de la pomme de terre a confirmé l'effet biofongicide des isolats algériennes de *Trichoderma sp.*

## 1.1.2 *Beauveria bassiana*

### 1.1.2.1 Historique

*B. bassiana* (Hyphomycète) est un microchampignon pathogène contre de nombreux insectes. Sa pathogénicité a été démontrée pour la première fois par Agostino Bassi de Lodi (1835) qui est le précurseur des études des maladies infectieuses, en démontrant pour la première fois qu'un micro-organisme pouvait être responsable de maladie infectieuse chez l'animal.

### 1.1.2.2 Taxonomie et classification

Le champignon *B. bassiana* est un mycète filamenteux naturel initialement décrit par Beauverie en 1911 sous le nom de *Botrytis bassiana*. Le genre a été établi par Veullemine (1912) et appartient à la classe des *Deuteromycetes* et à l'ordre des *Hyphomycetes* qui regroupe plus de 10000 espèces appartenant à plus de 1 800 genres (Subramanian, 1983).

L'identification des *Hyphomycetes* est principalement basée sur la morphologie, l'arrangement, la pigmentation et la texture externe des conidies. Du point de vue systématique, les deux systèmes de classification des *Hyphomycetes* sont celui de Saccardo (1886) qui est basé sur la morphologie et la pigmentation des conidies et conidiophores et celui de Hughes (1953) qui s'appuie sur le développement et la

morphologie considérant la pigmentation et la septation des conidies comme des caractères secondaires.

Selon Talbot (1971), les espèces sont essentiellement instables et sont définies de diverses manières selon leur intérêt pour différents aspects de leur variation (morphologique des mycètes, variation génétique). Selon cet auteur, les caractéristiques des hyphomycètes peuvent varier en fonction des conditions de croissance et de maturité ; il a donc reclassé toutes les espèces du genre *Tolypocladium* comme des synonymes de *Beauveria*.

Cependant, les profils d'utilisation de 49 hydrates de carbone en se basant sur les tests biochimiques API 50 CH, ont été utilisés par Todorova *et al.*, (1998) ; ils ont identifié et distinguer 75 souches des genres *Beauveria* et *Tolypocladium*. Plusieurs études basées sur des techniques de biologie moléculaire permettent de classer les isolats fongiques par leurs profils génétiques.

Des recherches ont été réalisées afin de mettre en évidence les variations génétiques entre les isolats de *B. bassiana*. Pfeifer et Khachatourians (1993) ainsi que Viaud *et al.* (1996) ont démontré des différences significatives entre les ADN des différents isolats.

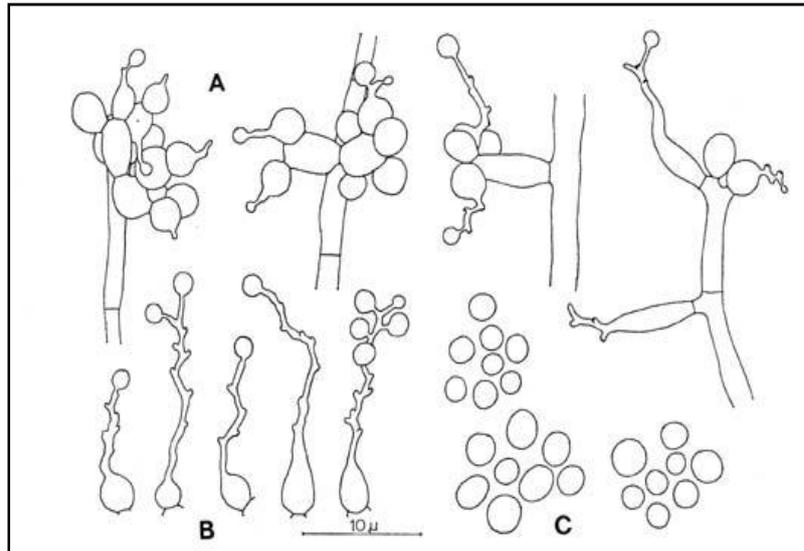
Une analyse phylogénétique a révélé que l'espèce anamorphe de *B. bassiana* était plus proche des pyrénomycètes que des plectomycètes de type ascomycètes. Ceci était inattendu d'après les comparaisons antérieures des réarrangements de gènes chez les champignons filamenteux (Hegedus *et al.*, 1998).

De Kouassi (2001) rapporte que la classification la plus complète de *Beauveria bassiana* est celle de Mugnai *et al.* (1989) et qu'elle serait issue d'études morphologiques et de tests enzymatiques.

**Embranchement**.....Mycètes  
**Classe**.....Deutéromycètes  
**Ordre**.....Hyphomycètes  
**Famille**.....Moniliaceae  
**Genre**.....*Beauveria*  
**Espèce**.....*Beauveria bassiana*

### 1.1.2.3 Aspect cultural et morphologie :

Le genre *Beauveria* est caractérisé par un conidiophore à base renflée et à extrémité terminale en zigzag formant de façon sympodiale de petites spores unicellulaires. Le conidiophore continue de croître après avoir donné naissance aux spores et, chaque spore laisse une cicatrice en relief (aspect denticulé). Les bouquets de conidiospores donnent un aspect en "fausse tête" (Figure 3).



**Figure 3.** Morphologie de *Beauveria bassiana* : **A** -structures conidiales; **B** -cellules conidiennes ; **C** -spores (Vuillemin, P., 1912).

On distingue deux types de spores selon la présence ou l'absence d'oxygène: les conidiospores formées en présence d'air et les blastospores en condition d'anaérobiose. Les conidiospores prennent une forme sphérique ou ovale tandis que les blastospores sont uniquement ovales. Les deux types de spores peuvent avoir le même effet pathogène sur les insectes infectés (Weiser, 1972 et Lipa, 1975).

Le champignon *B. bassiana* est une espèce fréquemment retrouvée dans les sols du monde entier. Il forme des hyphes transparents et septaux de 3,5 µm de diamètre. Cette espèce produit des colonies cotonneuses de couleur blanchâtre à jaunâtre. Ce champignon croît et sporule sur une large variété de milieux de culture et peut être conservé à des températures de 5° à 8°C sans toutefois perdre sa viabilité et sa capacité de sporulation (Tong-kwee et al., 1989).

#### 1.1.2.4 Mécanismes d'action

Le champignon *B. bassiana* infecte l'insecte par contact et n'a pas besoin d'être ingéré par son hôte pour causer l'infection. En général, le processus d'infection de *B. bassiana* est divisé en quatre phases distinctes : phases d'adhésion, de germination, de différenciation et de pénétration.

La phase d'adhésion constitue la première étape du processus d'infection. Elle se déclenche par un mécanisme de reconnaissance et de compatibilité des conidies avec le tégument de l'insecte. Ce phénomène peut être déclenché par des polysaccharides fongiques extra-cellulaires, des lectines et des enzymes extracellulaires (Boucias et Pendland, 1991).

La phase de germination dépend des conditions environnementales et également de la physiologie de l'hôte (composition biochimique de la cuticule) qui peut favoriser ou inhiber la germination (Ferron *et al.*, 1991). Il a été démontré que la germination des spores était affectée par des lipides épicuticulaires et les acides gras (Boucias et Pendland, 1991).

La phase de différenciation est importante dans le processus d'infection. Au cours de laquelle, la spore germée produit une structure appressoriale, qui sert de point d'ancrage et de ramollissement de la cuticule ce qui a pour effet de favoriser la pénétration de la spore. La production des appressorias est dépendante de la valeur nutritive de la cuticule de l'hôte (Magalhaes *et al.*, 1989).

La phase de pénétration consiste à la pénétration du microchampignon dans l'hôte à travers les orifices naturels, la cuticule ou par ingestion. En général, la cuticule de l'insecte est une barrière structurellement et chimiquement complexe pour la pénétration du champignon. L'épicuticule contient une protéine stable au phénol et est couverte d'une couche cireuse contenant des acides gras, des lipides et des stérols (Andersen, 1979).

#### 1.1.2.5 Utilisation en agriculture

L'exploitation directe d'organismes vivants afin d'éliminer les ravageurs nécessite une compréhension des mécanismes d'interaction entre l'agent entomopathogène et l'insecte nuisible visé.

En effet, la pathogénicité de l'inoculum sporal et la spécificité de l'hôte sont deux paramètres importants dans le choix de l'isolat fongique. Le microchampignon *B. bassiana* s'avère être un agent de lutte intéressant puisqu'il possède l'avantage, par rapport aux autres microorganismes pathogènes, d'infecter l'hôte sans être ingéré.

Ce qui peut rendre les différents stades de développement de l'hôte sensibles à ce biopesticide (Wraight et Roberts, 1987).

Cette caractéristique fait aussi en sorte que ce mycète peut être efficace contre les insectes piqueurs-suceurs qui sont relativement peut exposés à l'infection par des spores déposées sur le feuillage des plantes (Wraight et Roberts, 1987).

Les espèces de champignon du genre *Beauveria* ont un intérêt agronomique considérable dans la lutte biologique contre les ravageurs de cultures et font donc l'objet d'études de plus en plus poussées. En outre, la persistance des conidies dans le sol peut assurer un contrôle à long terme en provoquant la mycose sur les générations suivantes de l'hôte (Gaugler et Lashomb, 1989). Au niveau de la biosécurité, plusieurs études ont prouvé que ce mycète n'est pas dangereux pour les vertébrés (Faria et Wraight, 2001).

Le champignon *B. bassiana*, comme la plupart des microchampignons entomopathogènes, peut être produit en masse et peut être appliqué avec les méthodes conventionnelles (Faria et Wraight, 2001).

#### 1.1.2.6 Utilisation de *B. bassiana* contre les ravageurs.

Contrairement aux insecticides chimiques qui tuent rapidement les insectes, la plupart des mycètes entomopathogènes, mettent quelques jours avant de tuer leur hôte. Selon Liu *et al.*, (2003b), une période minimum d'incubation de six jours après un traitement fongique est nécessaire afin d'évaluer l'efficacité de *B. bassiana* sur l'insecte hôte. Plusieurs études ont montré que le *B. bassiana* peut infecter une grande variété d'insectes (Goettel, 1992).

Chez l'ordre des lépidoptères, la virulence de 23 isolats de *B. bassiana* a été testée en laboratoire contre les larves du troisième stade de la tordeuse à bandes obliques, *Choristoneura rosaeana* (Tortricidae) (Todorova *et al.*, 2002a).

Tous les isolats ont causé plus de 66 % de mortalité des larves après 16 jours. Une réduction du comportement d'alimentation a été observée 3 jours après l'inoculation des larves de deuxième stade de la pyrale de maïs *Chilo partellus* (pyralidae) par *B. bassiana* (Tadela et Pringle, 2003).

Cette réduction a été attribuée à la production de substances toxiques par les mycètes et/ou la rupture mécanique de l'intégrité structurale de l'insecte par la croissance des hyphes. 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) (Todorova *et al.*, 2002b; Todorova *et al.*, 1996).

Également, l'utilisation de certains isolats de *B. bassiana* contre le scarabée argentin, *Cyclocephala signaticollis* (Scarabeidae), peut provoquer une mortalité de 70 % de larves du troisième stade après 16 jours (Cornia et Beatriz, 2004).

Les criquets, appartenant à l'ordre des orthoptères, sont les principaux ravageurs causant des dégâts aux cultures et aux pâturages. Actuellement, les deux genres d'hyphomycètes reconnus pour leur effet sur ces insectes sont *Metarhizium* et *Beauveria*. Dans les régions tempérées, il existe des souches efficaces infectant les criquets. La plupart de ces champignons ne provoquent pas de symptômes visibles avant la mort. Les criquets atteints perdent l'appétit et deviennent de moins en moins actifs et leur couleur devient parfois rougeâtre (Greathead *et al.*, 1994).

### 1.1.3 *Metarhizium anisopliae*

#### 1.1.3.1 Historique

Parmi les micro-organismes entomopathogènes ayant un potentiel d'agent de lutte biologique contre les insectes nuisibles, plus de 500 espèces de champignons sont susceptibles d'infecter des insectes (Starnes *et al.*, 1993). *Metarhizium anisopliae* était le premier pathogène utilisé délibérément pour le contrôle d'insecte ravageur par le Russe Eli Metchnikoff (1880) considéré comme étant le père de la lutte microbiologique.

*Metarhizium anisopliae* est une espèce bien étudiée et appliquée pour le contrôle microbien des insectes nuisibles (Liu *et al.*, 2007 ; Hoe *et al.*, 2009). C'est un hyphomycète pathogène se reproduisant naturellement dans le sol (Entz, 2005). C'est un organisme intéressant pour son attaque de l'hôte, et il produit des métabolites biologiques actives *in vitro* et *in situ* (Rao *et al.*, 2006). Il est l'agent de Muscardine verte, la maladie d'insectes, il est également l'un des plus célèbres habitants entomopathogènes du sol, avec un potentiel de virulence sur les ravageurs des plantes et des animaux (Tajick Ghanbary *et al.*, 2009). Il est destiné à contrôler des insectes nuisibles divers y compris les termites, les blattes, le charançon noir de la vigne, les aleurodes, les pucerons, la pyrale du maïs, hannetons et d'autres insectes (Strasser *et al.*, 2000 ; Khetan, 2001 ; Wraight *et al.*, 2001).

Les différentes souches de *Metarhizium anisopliae* s'attaquent aux espèces d'insectes. Mais, son utilisation générale en tant qu'insecticide est restreinte, cela limite aussi les effets du champignon sur les organismes non ciblés, ce qui en fait un produit plus sécuritaire (Kabaluk *et al.*, 2001).

*Metarhizium anisopliae* var. *acridum* est un entomopathogène fongique qui infecte les sauterelles et les criquets (Lomer et al., 2001 ; Prior, 1992), retrouvé sur *Ornithacris cavroisi* au Niger, il serait le plus virulent (Zakaria et Sagnia, 2003 in Bissad et al., 2010).

### 1.1.3.2 Taxonomie et classification

Le genre *Metarhizium* comprend près de 200 espèces appartenant à sept ordres (Veen, 1968). Les premières approches de la taxonomie considèrent les caractéristiques morphologiques au niveau macro - et microscopique. Metchnikoff (1879) fut le premier à décrire les spores d'*Entomophthora anisopliae*.

En 1883, Sorokin a rebaptisé le champignon *Metarhizium anisopliae*. Mais, jusqu'en 1969 au moins huit autres noms ont été proposés pour le seul genre *Metarhizium* (Tulloch, 1976). *M. brunneum* a été décrit d'abord par Petch (1935), a été déterminé par la suite être *M. anisopliae* par Roberts (1967) quand l'irradiation de spores vertes de *M. anisopliae*. Dans la mesure où aucunes différences microscopiques ne pourraient être trouvées entre *M. brunneum* et *M. anisopliae*, il a été conclu que *M. brunneum* était un mutant naturel de *M. anisopliae*. En 1915, Johnston a proposé la classification de *M. anisopliae* dans des formes longues et courtes spores. Gams et Rozsypal (1973) ont décrit une troisième espèce *Metarrhizium flavoviride* isolée des insectes et des sols. Elle présente une forme à courte spores décrite par Rombach et al. (1986).

D'autres espèces ont été proposées en Chine et au Japon avec des confusions morphologique et phylogénétique (Tzean et al, 1993; Liang et al, 1991; Shimazu, 1989; Guo et al, 1986).

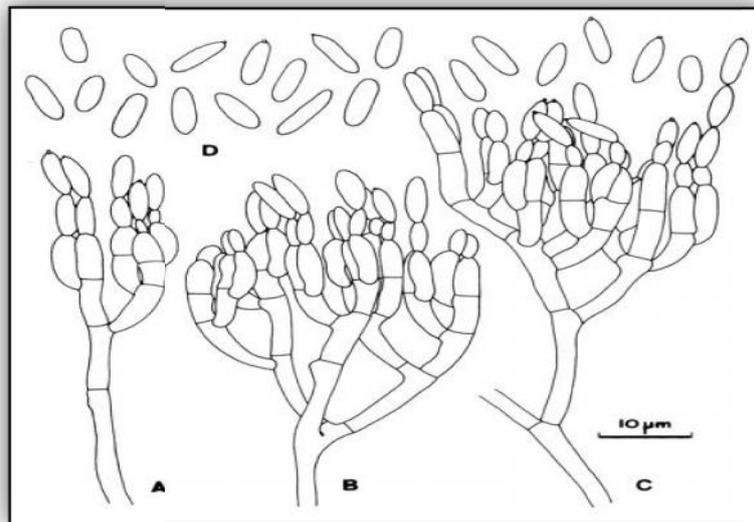
Selon Kleespies et al. (2000), *Metarhizium anisopliae* se classe comme suit :

<b>Règne</b> .....	Fungi
<b>Division</b> .....	Eumycota
<b>Sous division</b> .....	Deutromycotina
<b>Classe</b> .....	Hyphomycètes
<b>Ordre</b> .....	Molinizles
<b>Famille</b> .....	<i>Moliniaceae</i>
<b>Genre</b> .....	<i>Metarhizium</i>
<b>Espèce</b> .....	<i>Metarhizium anisopliae</i>

### 1.1.3.3 Aspect cultural et morphologie

La couleur des spores est un premier caractère pour l'identification du champignon. Sur Agar la couleur dépend des ingrédients du milieu mais, généralement les spores sont vertes chez le genre *Metarhizium*.

La forme des spores et des conidiophores intervient aussi dans la détermination. Les conidiophores du *Metarhizium anisopalis* sont relativement courts, irrégulièrement ramifiés ou non et arrangés en groupes compacts formant une masse de spores (Greathead et al., 1994) (Figure4).



**Figure. 4 :** Différents aspects du *Metarhizium anisopalis*, A.B.C- Conidiophores ; D- Conidies (Hoog, 2000).

L'identification en se basant seulement sur les caractéristiques morphologiques est extrêmement difficile (absence de clés de détermination), ce qui peut entraîner des erreurs d'identification. Les techniques basées sur l'ADN sont largement utilisées et précises pour identifier les espèces et les variétés (Driver et al., 2000 ; Entz et al., 2005).

### 1.3.4 Mécanismes d'action

La maladie causée par ce champignon est appelée la muscardine verte due à la couleur verte de ses spores, ces dernières en contact avec le corps d'un insecte hôte, germent et les hyphes qui émergent pénètrent la cuticule (Neil et Donald, 2005) au moyen d'une combinaison de pressions physiques et de dégradation enzymatique.

Une fois que le champignon atteint l'hémocèle, il grandit en formant des hyphes (blastospores). La mort de l'hôte se produit habituellement par l'épuisement d'éléments nutritifs, l'invasion d'organes et l'action des toxines fongiques (Butt et Goettel, 2000 ; Inglis et al., 2001). La cuticule du cadavre devient souvent rouge. Si l'humidité ambiante est assez élevée, une moisissure blanche pousse sur le cadavre qui très tôt devient verte comme les spores produites (Neil et Donald, 2005).

Ce champignon produit des peptides cycliques qui sont des destruxines (Hsiao et Ko, 2001) qui peuvent jouer un rôle dans la pathogénicité (Kershaw et al., 1999). La capacité des destruxines dans le contrôle pratique est moins étudiée, mais certaines enquêtes ont décrit ses propriétés insecticides (Brousseau et al., 1996 ; Thomsen et Eilenberg, 2000). Plus de 35 différents destruxines structurellement liées ont été isolés à partir de culture de *Metarhizium anisopalis* (Pedras et al., 2002).

### 1.3.5 Utilisation en agriculture

La première tentative de lutte contre les parasites avec un agent fongique a été effectuée en Russie en 1888, lorsque le champignon actuellement connu sous le nom de *Metarhizium anisopalis* (Metschn). Sorokin a été produit en masse sur le moût de bière et pulvérisé dans le domaine du contrôle de la betterave charançon *Cleonus punctiventris* (Germar) (Lord, 2005).

Actuellement, des produits commerciaux à base de *Metarhizium anisopalis* sont fabriqués à des fins commerciales et sont utilisés dans plusieurs pays. C'est le cas notamment des granules Bio-Green et Bio-Cane utilisées en Australie contre les vers dans les pâturages et les cultures de canne à sucre ; Green Muscle utilisé contre le locuste en Afrique, l'Ago Biocontrol visant à contrôler différents ravageurs de plantes ornementales est utilisé en Amérique du sud et Bio-Path, utilisé aux États-Unis pour enrayer les blattes (Kabaluk et al., 2001).

Depuis 1989, le projet de lutte biologique contre les locustes et les sautereaux (LUBILOSA) a permis la mise au point d'un mycopesticide : *Metarhizium anisopalis* var. *acridium* ou « Green Muscle ». Il s'agit d'un champignon obtenu à partir des spores d'un insecte mort. Il se présente soit sous la forme d'une poudre sèche ou en formulation huileuse (Joachim Saizonou, 2004). La formulation des suspensions huileuses ultra bas volume (UBV) de conidies des deutéromycètes du genre *Metarhizium* est relativement facile et offre des possibilités d'application en conditions sèches. Cette formulation à base d'huile tue les insectes plus rapidement qu'une formulation à base d'eau, les huiles s'attaquent aux exo cuticules des insectes, elles s'y étalent facilement et peuvent ainsi aider le transport des conidies vers les

membranes inter segmentaires vulnérables et à la pénétration ultérieure des hyphes (Bateman, 1991 in Hallouane, 1997).

Il a été très efficace contre la plupart des locustes et particulièrement le criquet pèlerin dans le Sahel. Des tests ont été réalisés notamment dans la zone du lac Tchad et ont permis d'évaluer l'efficacité de ce produit dont l'utilisation est maintenant recommandée par la FAO (Joachim Saizonou, 2004).

Des résultats satisfaisants sont obtenus en 2005 lors des essais de Green Muscle effectués en Algérie dans la wilaya d'El-Oued, sur des nymphes de criquet pèlerin, montrant 80% de mortalité au bout des 7 à 8 jours (Kooyman et al., 2005). Ce produit représente une avancée intéressante car, étant beaucoup moins nocif pour l'environnement, il ne met pas l'homme et les animaux en danger. Le délai nécessaire à son action, 4 à 6 jours, ne lui permet pas de stopper la destruction d'une récolte, car les insectes ont le temps de dévorer les récoltes avant de mourir. Par contre, le « Green Muscle » permet une éradication plus durable des criquets et paraît parfaitement adaptés à la lutte préventive dans les zones de reproduction (Joachim Saizonou, 2004). En outre, la forte variabilité de thermotolérance a été observée chez les isolats de *Metarhizium anisopaliæ* quand des suspensions de conidies ont été exposées à des températures élevées et basses (Rangel et al., 2005 ; Fernandes et al., 2008).

Pour que l'utilisation de ce bio pesticide se généralise en Afrique, une condition reste à satisfaire : parvenir à obtenir une production industrielle pour faire face aux besoins (Joachim Saizonou, 2004).

## 1.2 Données bibliographiques sur les plantes étudiées

Les substances de défense synthétisées par les végétaux sont des sources d'inspiration de plus en plus fréquentes pour la recherche de nouveaux produits phytosanitaires. Les produits naturels sont de plus en plus recherchés pour une agriculture durable, l'utilisation sans discernement des pesticides conventionnels de synthèse ayant eu un impact écologique et sanitaire néfaste (résistance des ravageurs, contamination de l'environnement et des écosystèmes, perte de la biodiversité...). Le recours au monde végétal et aux molécules qui ont permis aux plantes de se protéger contre les ennemis naturels devient donc indispensable (Regnault, 2008).

La plupart des composés extraits des végétaux ont montré des effets sur le développement de la croissance mycélienne de plusieurs champignons et des effets sur leur sporulation et leur germination.

Dans ce sens, plusieurs plantes ont été valorisées dans le cadre de la production en masse des champignons utiles pour l'agriculture.

## 1.2.1 Mauve (*Malva sylvestris*)

### 1.2.1.1. Description botanique

Les mauves (*Malva*) ont donné leur nom à la famille des Malvacées et à l'ordre des Malvales. Elles se ressemblent étroitement par leurs caractères anatomiques comme par leurs propriétés.

La mauve sylvestre est une plante bisannuelle. Mais elle peut éventuellement être vivace par des bourgeons souterrains (Bonnier et Douin, 1912-1935 ; Belzung, 1900). La mauve sylvestre est une plante poilue. Elle peut avoir une pubescence simple à poils simples ou à poils presque tous étoilés ou bien pubescence mixte, à poils simples et étoilés (Rouy, 1893-1913). Elle mesure de 30 cm à 1m 50 de long (Fournier, 1934-1940 ; Blamey & Grey-Wilson, 1991).

C'est une plante polymorphe, au fil du temps les feuilles tendres se font dévorer par les insectes et les escargots, ce qui donne à l'ensemble de la plante un aspect négligé (Fletcher, 2007).

La floraison de *Malva sylvestris* (fig. 5) se produit du mois de mai au mois de septembre (Schaffner, 1993 ; Coste, 1901 ; Bonnier & Douin, 1912-1935).



**Figure 5.** La morphologie des feuilles et des fleurs de *Malva sylvestris* dans son milieu naturel (Fournier, 1934-1940 ; Blamey & Grey-Wilson, 1991).

### 1.2.1.2 Composition chimique

Les principales molécules présentes chez les mauves sont des mucilages, des flavonoïdes et des tanins. Les mauves sont aussi riches en sels minéraux (calcium, magnésium, fer) et en vitamines.

Les mucilages présents dans les mauves sont des polysaccharides acides polyuroniques et neutres. Ce sont des mucilages qui donnent ses propriétés émolliente, anti-irritative et laxative à la mauve. Ces mucilages sont souvent accompagnés de raphides ou de mâcles d'oxalate de calcium (Wichtl, 2003 ; Classen et Blaschek, 1998).

Les polysaccharides et les flavonoïdes se trouvent dans les fleurs et les feuilles. Mais les tanins ne sont présents que dans les feuilles (PDR for herbal medicines, 2000). L'étude de Cutillo et *al.* en 2006 a permis de mettre en évidence dans les extraits aqueux de mauve sylvestre fraîche de très nombreux sesquiterpènes, un diterpène linéaire tétrahydroxylé, 2 monoterpènes, 6 C13 nor-terpènes et 11 composés aromatiques (acides-phénoliques).

### 1.2.2 Le caroubier (*Ceratonia siliqua*)

Scientifiquement, le caroubier est appelé *Ceratonia siliqua*. Ce nom dérive du grec *keras* et du latin *siliqua*, faisant allusion à la forme de son fruit qui ressemble à la 'corne' de bouc (Bolinos, 1955).

Le genre *Ceratonia* appartient à la famille des *Leguminosae* (*Fabaceae*) de l'ordre des *Rosales*. Toutefois, cette position taxonomique reste litigieuse. Il est généralement placé dans la tribu des *Cassieae*, sous famille des *Cesalpinoïdae*. Cependant, certains auteurs tels qu'Irwin et Barneby (1981) ainsi que Tucker (1992a, 1992b), ont émis des réserves en ce qui concerne ce positionnement taxonomique.

#### 1.2.2.1 Description botanique

Le caroubier est un arbre à croissance lente, pouvant atteindre une quinzaine de mètres de hauteur (Quezel et Santa, 1962/63). Il possède une cime très étalée et un tronc dont la base peut atteindre 2 à 3 mètres de circonférence. Sa longévité est importante, dépassant souvent les 200 ans (Rejeb et *al.*, 1991). Les feuilles (fig. 6), de 10 à 20 cm de longueur, sont persistantes, composées de 4 à 10 folioles glabres, vertes, luisantes sur la face dorsale, plus claires et mates sur la face ventrale, à folioles ovales entières, légèrement échancrées au sommet et paripennées (Diamantoglou et Mitrakos, 1981; Rejeb, 1995).



**Figure 6.** La morphologie des feuilles de *Ceratonia siliqua* dans son milieu naturel (Diamantoglou et Mitrakos, 1981; Rejeb, 1995).

### 1.2.2.2 Composition chimique

Dans les domaines forestiers, les pieds mâles sont souvent taillés pour le fourrage. Plusieurs études ont montré que l'utilisation des feuilles associées avec le polyéthylène glycol (PEG) améliore la digestibilité et la qualité nutritive des tanins contenus dans les feuilles (Priolo *et al.*, 2000).

Rejeb *et al.* (1991) ont estimé la valeur nutritive des feuilles du caroubier à 0.25uf/kg de matière sèche. En Turquie, des extraits des feuilles contenant des tanins sont utilisés dans la médecine traditionnelle pour traiter la diarrhée et dans l'alimentation diététique (Baytop, 1984). Ces extraits foliaires sont également désignés comme étant porteurs des activités cytotoxiques et antimicrobiennes (Kivçak et Mart, 2002).

### 1.2.3 Le citron (*Citrus limon*)

Selon Padrini et Lucheroni (1996), le citron appartient au genre *Citrus*, à la famille des *Rutaceae*, à de l'ordre des *Sapindales*. Il est généralement placé dans la tribu des *Cassieae*.

#### 1.2.3.1 Description botanique

Le citronnier est un arbuste appartenant au groupe des agrumes. Les fruits sont de forme ovale, avec un mamelon plus au moins apparent à leurs extrémités.

La peau fine est colorée en jaune à maturité du fruit; elle est pourvue de nombreuses glandes oléifères renfermant des essences. La pulpe, de coloration jaune ou verdâtre, est généralement riche en acide citrique, ce qu'il lui donne sa saveur acide (Blancke, 2001).

Cette plante vigoureuse, de croissance rapide, elle produit de nombreuses branches et fructifie abondamment, et la fructification de l'hiver est plus importante (de 60 à 70% de production annuelle de l'arbre) (Dubois, 2006). Les principales variétés méditerranéennes cultivées de citronnier sont «Verna », «Eureka », «Lisbonne », «Monachello », «Interdonato » et «Lunaris » (Blancke, 2001).

Le fruit mûr (fig. 7) a une écorce qui va du vert tendre au jaune éclatant sous l'action du froid. La maturité est en fin d'automne et début d'hiver dans l'hémisphère nord. Sa chair est juteuse, acide et riche en vitamine C. De l'écorce on extrait une huile essentielle qui renferme du limonène et du citral.



**Figure7.** La morphologie des feuilles et du fruit de *Citrus limon* dans son milieu naturel (Blancke, 2001).

### 1.2.3.2 Composition chimique

La norme ISO : NF T 75-335 (1995) In Robert et Lobstein (2005) a donné la composition de l'huile essentielle extraite par expression de l'écorce du *Citrus limon* avec un rendement de 1,2 à 1,5%. Les principaux constituants sont le limonène (65 à 70%), le citral (1 à 5%), le  $\beta$ -pinène (4 à 9%), le  $\gamma$ -terpinène (9 à 12%), le linalol (1,5%), le cinéole, d'acétate de géranyle, le nonanal, le citronellal, l' $\alpha$ -terpinéol, le camphène et l' $\alpha$ -bisabolène.

### 1.2.4 La Carotte (*Daucus carota*)

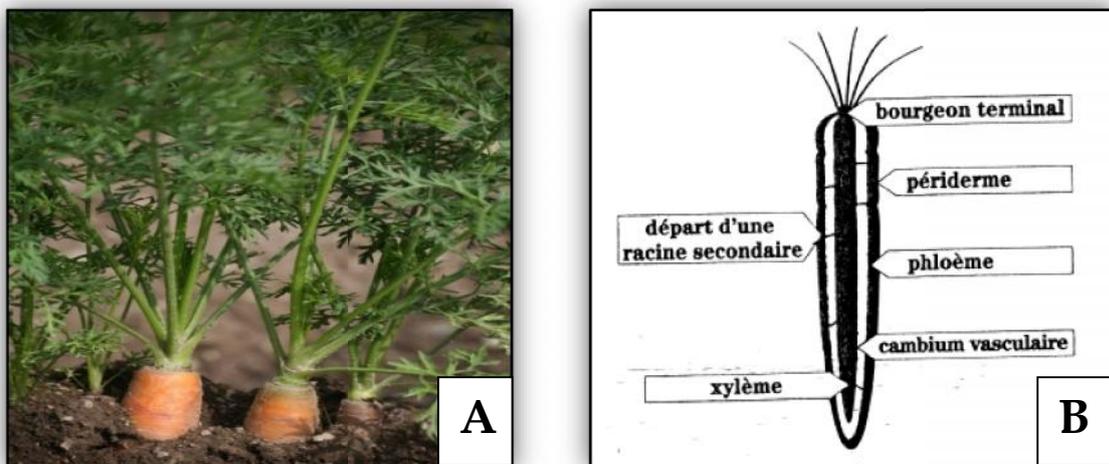
La carotte appartient au genre *Daucus*, à la famille des *Apiaceae*, à l'ordre des *Apiales*. Il est généralement placé dans la tribu des *Scandiceae* (Chaux et Foury, 1994 ; Renaud, 2003).

Elle est cultivée pour sa racine, utilisée en alimentation humaine et animale (Clement, 1981), pour sa valeur diététique, liée surtout à sa teneur en vitamine A (11000UI), sa valeur appréciée et ses modes de consommation variées (Chaux et Foury, 1994).

#### 1.2.4.1. Description botanique

La carotte est une plante à racine bisannuelle, cultivée en annuelle (Encyclopédie de la cuisine, 1999 ; Renaud, 2003). La carotte est, cultivée pour sa racine, utilisée en alimentation humaine et animale (Clement, 1981).

La carotte est plus ou moins allongée ou trapue, selon les variétés (fig.8). Sa couleur peut être orangée, blanche, jaune, rouge, pourpre ou noire (Encyclopédie de la cuisine, 1999). Selon Renaud (2003) c'est une racine longue, pivotante et charnue.



**Figure 8.** La morphologie de *Daucus carota*(A) et Coupe longitudinale d'une carotte(B) (Villeneuve et Leteinturier, 1992 cités par Villeneuve, 1999).

#### 1.2.4.2 Composition chimique

La carotte renferme des réserves considérables de sucres, principalement du saccharose et des sucres simples tels que glucose et fructose. Sa teneur en sucres solubles varie en fonction de la variété et de l'époque de récolte, de 2 à 8 g pour 100 g de carotte fraîche. Ces sucres participent pour une large part au plaisir gustatif.

Elle renferme des Acides Aminés (AA) libres (glutamique), des substances terpéniques et phénoliques qui interviennent dans l'agrément gustatif des préparations de ce légume (Villeneuve, 1999).

### 1.2.5 La betterave (*Beta vulgaris*)

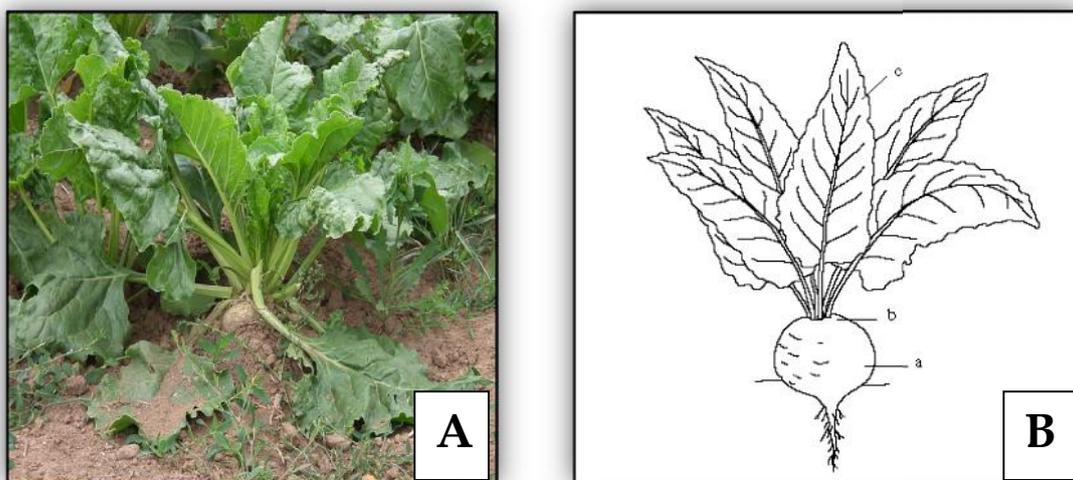
La betterave appartient au genre *Beta* de la famille des Chénopodiacées. La betterave potagère *Beta vulgaris*, variété *cicla*, la betterave fourragère *Beta vulgaris*, variété *macrohiza* et la betterave de table *Beta vulgaris*, variété *crassa*.

#### 1.2.5.1 Description botanique

La betterave (*Beta vulgaris* L.) est une plante bisannuelle dont la racine (conique, ronde ou plate) est tubérisée, pivotante et possède une chair rouge dans le cas de la betterave potagère (utilisée uniquement dans l'alimentation humaine), ou une chair blanche dans le cas de betterave fourragère, demi-sucrière et sucrière (LELONG F. 2008., LORGUE G. et al (1987)., NEDELEC P.Y. 1993)

Les feuilles (fig. 9) forment une rosette surmontant la racine (24.27.30), elles sont grandes, luisantes, ovales et pétiolées (LELONG F. 2008, NEDELEC P.Y. 1993).

La racine donne naissance la deuxième année à une tige anguleuse et ramifiée, atteignant un mètre de hauteur et portant des fleurs verdâtres disposées en glomérules (LELONG F. 2008, LORGUE G. et al 1987., NEDELEC P.Y. 1993) (24 à 30).



**Figure 9.** Présentation de la morphologie de betterave ; **A-** feuilles ; **B-** a : racine rugueuse à forme conique, b : collet (tige), c : feuilles (d'après Boiffin et Choppin de Janvry, 1994).

### 1.2.5.2 Composition chimique

La betterave *Beta vulgaris* est constituée d'environ 23.5% de matière sèche et de 76.5% d'eau. Le saccharose représente environ 17% de la matière sèche. Le reste est constitué de composés solubles et insolubles. La partie insoluble, appelée marc, est formée essentiellement de cellulose, d'hémicelluloses et de substances pectiques. La cellulose et les hémicelluloses constituent le squelette de la cellule, et les substances pectiques jouent le rôle de ciment.

La partie soluble est constituée principalement de composés organiques azotés ou non, de sels et de cendres. La composition approximative de la pulpe de la betterave sucrière selon Viénat-Nikodemski (1994).

### 1.2.6 Les petits pois (*Pisum sativum* L.)

Le petit pois appartient au genre *Pisum* à la famille des *Fabaceae* et à la tribu des *Fabeae*. Le genre *Pisum*, après avoir compté plus d'une douzaine d'espèces, il n'en existe actuellement que deux espèces : *Pisum sativum* L. et *Pisum fulvum*. Toutes les autres ont été reléguées au rang de sous espèces ou variétés de *Pisum sativum* (Free 1993 ; Pouvreau 2004).

#### 1.2.6.1 Description botanique

L'espèce *Pisum sativum* est une plante annuelle (fig. 10). C'est une plante essentiellement autogame (Free 1993 ; Pouvreau 2004) ; mais des taux d'allogamie peuvent être observés chez certains cultivars. Ses fruits, appelés gousses ou cosses renferment des graines, les pois. Ils sont consommés, selon les variétés (Haskell 1943).



**Figure 10.** *Pisum sativum* dans son milieu naturel (Free 1993 ; Pouvreau 2004).

### 1.2.6.2 Composition chimique

Le petit pois du genre *Pisium* est constitué essentiellement de glucide, les lipides, les minéraux. La partie glucidique des pois est formée essentiellement d'amidon (amylose et amylopectine en proportion variable selon les variétés), et de sucres, comprenant du saccharose et des oligosaccharides et riche en protéines et en fibres.

Il est considéré comme une bonne source de minéraux, notamment potassium, phosphore, calcium et fer, ainsi que de la vitamine B.

### 1.2.7 Fenugrec (*Trigonella foenum-graecum*)

Le fenugrec est une plante herbacée annuelle (Maletic et Jevdjovic, 2007) ou de vivaces (Burnie *et al.*, 2006) de la famille des Fabaceae. Apparenté au trèfle, ce genre réunit environ quatre- vingt espèces (Burnie *et al.*, 2006).

#### 1.2.7.1 Description botanique

Le fenugrec est une plante herbacée (fig. 11), elle pousse en plein champ, sur les sols riches en calcaire. Cette plante se distingue par sa tige haute pouvant atteindre 50 cm, ses feuilles ovales et dentées et ses fleurs qui oscillent entre le jaune et le violet. Le fruit est une gousse recourbée qui peut mesurer jusqu'à 20 cm de long (Maletic et Jevdjovic, 2007).



**Figure 11.** *Trigonella foenum-graecum* : Feuilles (A) et grains(B)  
(Maletic et Jevdjovic, 2007).

### 1.2.7.2 Composition chimique

Les graines de fenugrec renferment une quantité importante de composés médicinaux. Elles contiennent notamment des mucilages, des substances liquides riches en glucides. Elles possèdent la particularité de se gonfler au contact de l'eau, au même titre que les albumines.

Les protéines sont présentes en grand nombre dans les graines de fenugrec. Elles sont aussi bien pourvues en acides gras essentiels grâce à la lécithine. Les graines de fenugrec contiennent de petites quantités de magnésium, de phosphore, de coumarine et un alcaloïde la trigonelline (Maletic et Jevdjovic, 2007).

### 1.2.8 La laitue de mer (*Ulva sp.*)

L'ulve appartient au règne des *Protista*, à la division des *Chlorophyta*, à la classe des *Ulvales*, à l'ordre des *Chlorophyceae*, à la famille des *Ulvaceae* et au genre *Ulva*. (Hayden et al., 2003).

#### 1.2.8.1 Description botanique

La plante est constituée d'un thalle vert (fig. 12). Les algues peuvent se reproduire par multiplication végétative ou par fragmentation qui est le mode de reproduction le plus courant chez les algues.

Elles peuvent aussi libérer des spores qui germent et donnent naissance à un nouvel individu. La reproduction sexuée est moins utilisée. Les algues vertes contiennent des chlorophylles A, B et d'autres pigments. Elles sont présentes dans les eaux douces et les eaux salées. Si certaines atteignent le mètre, d'autres sont microscopiques (M.B.A.R.I., 2001).

*Ulva sp.* généralement connue comme la laitue de mer, a une morphologie qui permet à l'assimilation nutritive rapide, la haute capacité de stocker des substances nutritives et la reproduction massive spontanée (Santelices et Ugarte, 1987; M.B.A.R.I., 2001). Ces caractéristiques leur ont permis de développer une distribution mondiale (Lahaye et Robic, 2007).

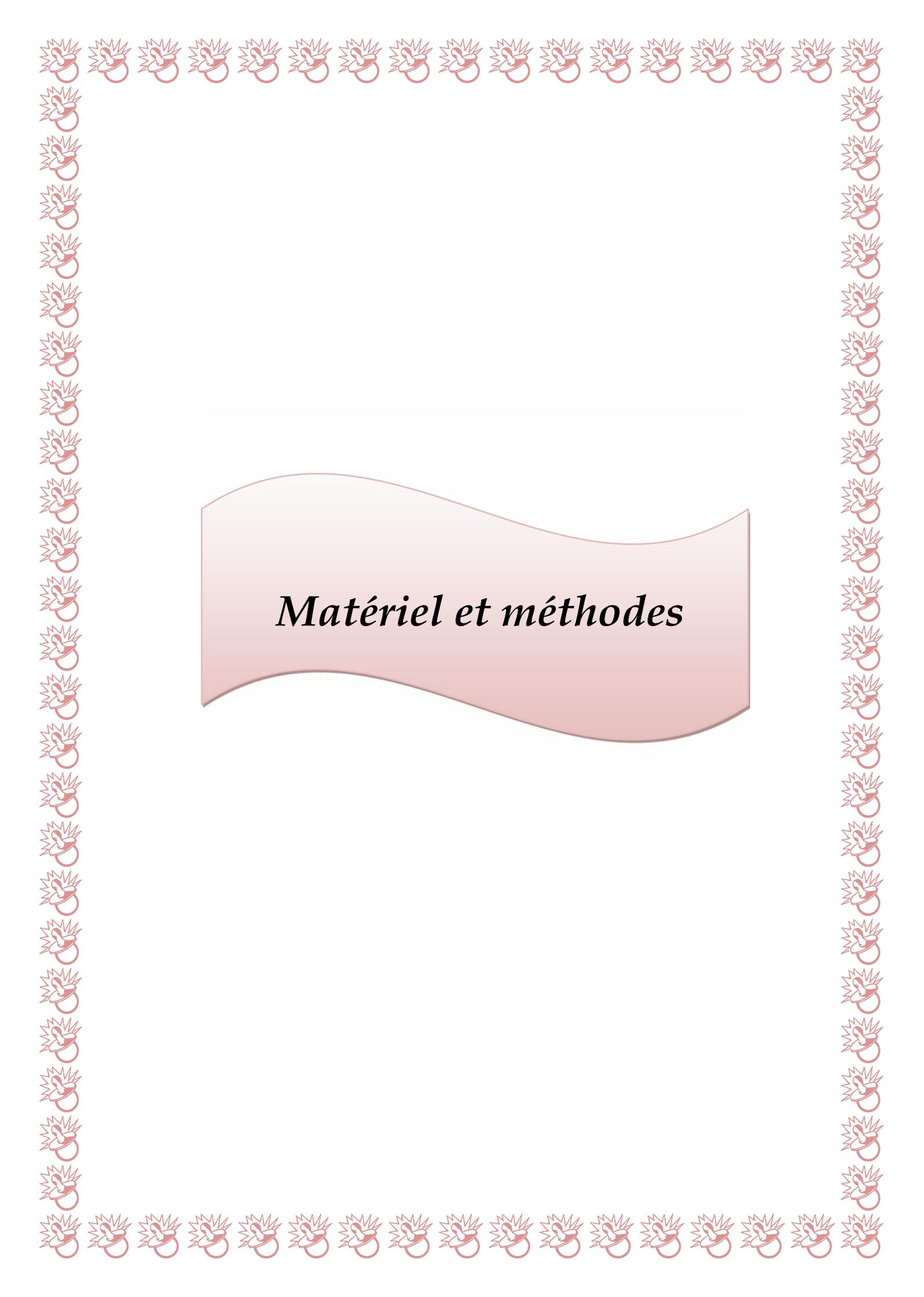


**Figure 12.** La morphologie d'un thalle *Ulva* dans son milieu naturel (Hayden et *al.*, 2003).

#### 1.2.8.2 Composition chimique

les algues marines sont une source riche de composés bioactifs qui peuvent trouver plusieurs applications dans l'agriculture (Aziz et *al.*, 2003; Delattre et *al.*, 2005; Chandia et Matsuhira, 2008).

La paroi de leurs cellules renferme des polysaccharides sulfatés, dont les propriétés technologiques et biologiques commencent à être bien décrites (Lahaye et Robic, 2007). Ces polysaccharides présentent des potentialités d'applications dans des domaines très variés comme la nutrition animale, la pharmacie, mais aussi l'agriculture (Lahaye et Robic, 2007).

A decorative border consisting of a repeating pattern of red icons, each depicting a hand holding a heart with radiating lines, surrounds the central text.

# *Matériel et méthodes*

## 2.1 Introduction

Ce présent travail nécessite l'utilisation d'un matériel biologique représenté par un matériel végétal terrestre et marin ainsi qu'un matériel fongique appartenant à trois genres de champignons utiles pour l'agriculture.

Il comporte trois parties essentielles:

- 1- La collecte et le séchage du matériel végétal,
- 2- Préparation des extraits aqueux des plantes terrestres et d'algue marine verte,
- 3- Etude *in vitro* de l'effet des extraits végétaux et d'un extrait algale sur la production en masse des champignons utiles des genres *Trichoderma*, *Beauveria* et *Metarhizium*.

## 2.2 Matériel biologique

### 2.2.1 Matériel végétal

Le matériel végétal terrestre est composé de huit espèces : *Malva sylvestris*, *Ceratonia siliqua*, *Citrus reticulata*, *Daucus carota*, *Trigonella foenum-graecum*, *Beta vulgaris*, *Pisum sativum*

Le matériel végétal marin : Algue verte du genre *Ulva*.

La collecte des échantillons pour analyses a été effectuée au mois de mars 2013 dans différentes localités :

- Boufarik (W. Blida) : *Malva sylvestris*
- Ouled yaich (W. Blida) : *Ceratonia siliqua*
- Berrouaghia (W. Médea) : *Citrus limon*, *Daucus carota*, *Trigonella foenum-graecum*, *Beta vulgaris* et *Pisum sativum*
- Au bord de la plage de chenoua (W. Tipaza) : *Ulva*.

Les données relatives aux échantillons récoltés sont résumées dans le tableau 1 suivant :

**Tableau 1. Données sur les espèces végétales et l'algue macroscopique marine testées**

Données sur les végétaux testés	Illustrations
<p>Nom commun : Mauve  Nom latin : <i>Malva sylvestris</i> L.  Partie utilisée : feuilles</p>	 <p>Feuilles de Mauve</p>
<p>Nom commun : Caroubier  Nom latin : <i>Ceratonia siliqua</i> L.  Partie utilisée : feuilles</p>	 <p>Feuilles de Caroubier</p>
<p>Nom commun : Citron  Nom latin : <i>Citrus limon</i>  Partie utilisée : péricarpe</p>	 <p>Ecorce de Citron</p>
<p>Nom commun : Carotte  Nom latin : <i>Daucus carota</i>  Partie utilisée : péricarpe</p>	 <p>Racine de Carotte</p>

<p>Nom commun : Betterave Nom latin : <i>Beta vulgaris</i> Partie utilisée : péricarpe</p>	 <p><b>Bulbe de Betterave</b></p>
<p>Nom commun : Petit pois Nom latin : <i>Pisum sativum</i> Partie utilisée : écosses</p>	 <p><b>Fruits de Petit pois</b></p>
<p>Nom commun : Fenugrec Nom latin : <i>Trigonella foenum-graecum</i> Partie utilisée : grains</p>	 <p><b>Graines de Fenugrec</b></p>
<p>Nom commun : laitue de mer ou ulve Nom latin : <i>Ulva</i> sp Partie utilisée : Lames (thalle)</p>	 <p><b>Thalle de Ulve</b></p>

Après la collecte, le matériel végétal a été nettoyé séparément avec de l'eau courante pour le débarrasser des débris de sol. L'algue marine a également subi plusieurs rinçages successifs pour éliminer le sel, puis le tout a été mis à sécher à l'abri de la lumière, à la température ambiante et à l'air libre.

### 2.2.2 Matériel fongique

Quatre isolats fongiques utiles purifiés et ayant déjà fait objet des travaux de recherche (Moumene et *al.*, 2013a) et du projet PNR (Moumene et *al.*, 2013b) ; ont été retenues pour notre étude.

Deux isolats antagonistes Algériennes de *Trichoderma sp.* (fig. 13) et deux isolats fongiques entomopathogènes dont un isolat de *Beauveria sp.* (fig. 14) et un isolat de *Metarhizium sp.*(fig. 15).



**Figure 13.** Aspect cultural des deux isolats de *Trichoderma* T4 et T8 respectivement cultivées sur milieu PDA à 25°C après 6<sup>ème</sup> jour (**originale**).



**Figure 14.** Aspect cultural de *Beauveria sp.* Cultivé sur milieu PDA à 25°C après 6<sup>ème</sup> jour (**originale**).



**Figure 15.** Aspect cultural de *Metarhizium sp.* Cultivé sur milieu PDA à 25°C après 6<sup>ème</sup> jour (**originale**).

### 2.3 Séchage et broyage du matériel végétal :

Après séchage à l'air libre pendant 20 jours, les plantes et les lames de l'algue *Ulva* sp. ont été broyées à l'aide d'un mixeur jusqu'à l'obtention de poudres (Figure16), pesées et récupérées dans des boîtes propres portant le nom de chacune et conservées à l'abri de la lumière et de l'humidité pour des tests ultérieurs.



Figure 16. Préparation des poudres du matériel végétal et algal.

### 2.4 Préparation des extraits aqueux

Les extraits aqueux ont été obtenus par décoction de 100 g de chacune des espèces végétales et de l'algue marine étudiées dans 1L d'eau distillée. Cette opération a été réalisée à l'aide de l'autoclave à 100°C pendant 30 mn dans des fioles bien fermées et cela, afin d'éviter toute forme de contamination provenant des plantes.

L'extrait aqueux est récupéré par filtration sur papier Wattman stérile sous hotte aspirante. Le filtrat obtenu a été récupéré dans des flacons en verres stériles hermétiquement fermés et couverts par un papier d'aluminium et conservés au réfrigérateur à 4°C jusqu'à son utilisation à l'état pur et aux concentrations 20 et 50%.

### 2.5 Effet des extraits de plantes et de l'algue marine sur la production en masse des champignons

Notre travail consiste à l'amélioration du milieu de culture PDA par l'addition des extraits aqueux des plantes et de l'algue..

Trois concentrations (20, 50 et 100%) de chaque extrait aqueux correspondant respectivement aux doses D1, D2 et D3 ont été retenues dans cette étude.

Les procédures microbiologiques des extraits aqueux ont été déterminées selon la méthode de Paranagama *et al.* (2003).

Pour chaque dilution, 5 ml d'extrait de plante est versé dans des boîtes de Pétri de même diamètre (90 mm) à l'aide de micropipettes.

Le milieu PDA (voir annexe 01) maintenu en surfusion à 45°C est ensuite coulé dans les boîtes contenant les extraits. Ces dernières sont légèrement agitées pour homogénéiser le milieu.

Ainsi, à l'aide des pipettes Pasteur stériles, un disque d'inoculum de 5 mm de diamètre de chaque isolat est prélevé séparément puis déposé au centre des boîtes de pétri.

Des boîtes de Pétri contenant du milieu PDA sans extraits des plantes sont inoculées pour servir comme témoins.

Les boîtes seront bien fermées et entourées d'un parafilm. L'incubation de ces dernières ainsi préparées se fait dans l'étuve réglée à la température de 25°C pour évaluer les paramètres biologiques de chaque isolat fongique selon chaque extrait et chaque concentration.

### **2.5.1 Evaluation de la croissance mycélienne**

La croissance mycélienne a été estimée quotidiennement, pendant une durée d'incubation de 15 jours, en calculant la moyenne des deux diamètres mesurés sur deux axes perpendiculaires tracés au revers des boîtes de culture. Tous les trois jours pendant 15 jours, le diamètre de chaque colonie est mesuré jusqu'à ce que le mycélium envahisse la totalité des boîtes de Pétri (Rapilly, 1968).

En ce qui concerne les colonies confluentes à contour réguliers les taux de croissance mycélienne ont été déterminés selon les taux de recouvrement de la surface de la boîte de Pétri (100%).

### 2.5.2 Caractérisation culturelle des champignons étudiés

Une description culturelle de chaque champignon cultivé sous l'effet de chaque extrait aqueux utilisé a complété notre étude sur la croissance mycélienne. Cette dernière a porté sur leur pigmentation, leur texture, leur contour, leur aspect, la présence ou l'abondance des exsudats et leur vitesse de croissance après 6 jours d'incubation à 25°C (Botton *et al.*, 1990).

### 2.5.3 Evaluation de la sporulation et de la germination

L'évaluation de la sporulation et de la germination de chaque isolat fongique cultivé sous l'effet de chaque extrait aqueux préparé et pour chaque dilution nécessite la préparation des suspensions conidiennes.



**Figure 17.** Préparations des suspensions conidiennes.

Les suspensions conidiennes ont été déterminées après une période d'incubation de 20 jours de croissance des isolats. Ce qui consiste à verser 20 ml d'eau distillée stérile dans chaque boîte de culture d'isolat puis, racler cette dernière à l'aide d'une pipette pasteur stérile pour récupérer les suspensions sporales dans des tubes à essai stérilisés.

Ces derniers ont été soumis à l'agitation à l'aide d'un agitateur de tubes vortex. Ainsi, la concentration en spores est déterminée pour chaque suspension conidienne préparée par le biais d'une cellule de Malassez sous microscope optique au grossissement (X500).

D'autre part, le pourcentage de la germination est déterminé pour chaque isolat développé sous l'effet de chaque extrait aqueux et pour chaque concentration, en comparaison avec les témoins.

## 2.6 Analyse statistique

L'activité stimulante des extraits des plantes et de l'algue marine sur la production en masse des trois champignons utiles pour l'agriculture a été basée sur la détermination des taux de leur croissance mycélienne, de leur sporulation et de leur germination. Les répétitions ont été résumées par le calcul de la moyenne dans l'Excel, puis le calcul du pourcentage.

Afin de vérifier l'activité stimulatrice des extraits aqueux des végétaux vis-à-vis des isolats fongiques testés et de comparer les différents extraits aqueux utilisés à différentes concentrations sur les différents paramètres biologiques des trois champignons étudiés à savoir, la croissance mycélienne, la sporulation, la germination, des analyses statistiques ont été effectuées au moyen du logiciel SYSTAT vers.7, en déterminant la variance à l'aide du GLM (General Linear Model), les différences ont été considérées comme significatives pour une  $P \leq 0,05$ .

Les corrélations existantes entre les différents extraits, leurs concentrations et les paramètres biologiques étudiés ainsi que les isolats de *Trichoderma*, *Beauveria* et *Metarhizium* ont été mis en évidence par une analyse en composantes principales (ACP). L'interprétation de l'ACP se fait à partir de l'examen du cercle de corrélation et de la position du statut des variables sur les axes factoriels (Philippeau, 1989).

A decorative border consisting of a repeating pattern of red icons, each depicting a stylized figure with arms raised in a gesture of praise or joy, set against a circular background with radiating lines.

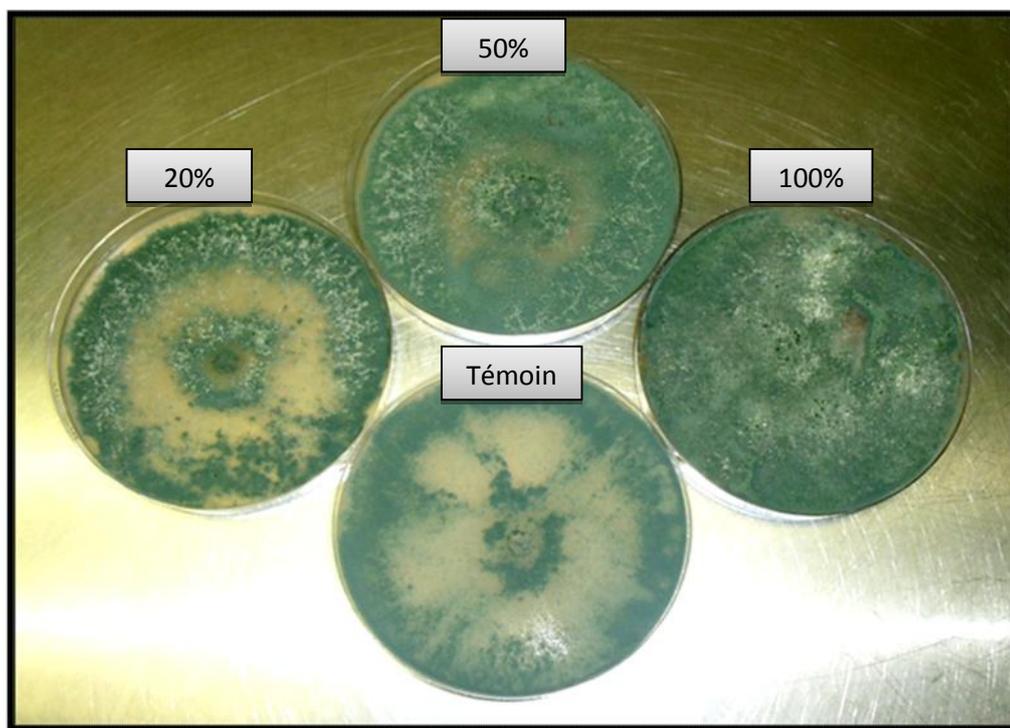
## *Résultats et discussion*

### 3.1 Effet des extraits de plantes et de l'algue marine sur la production en masse des champignons

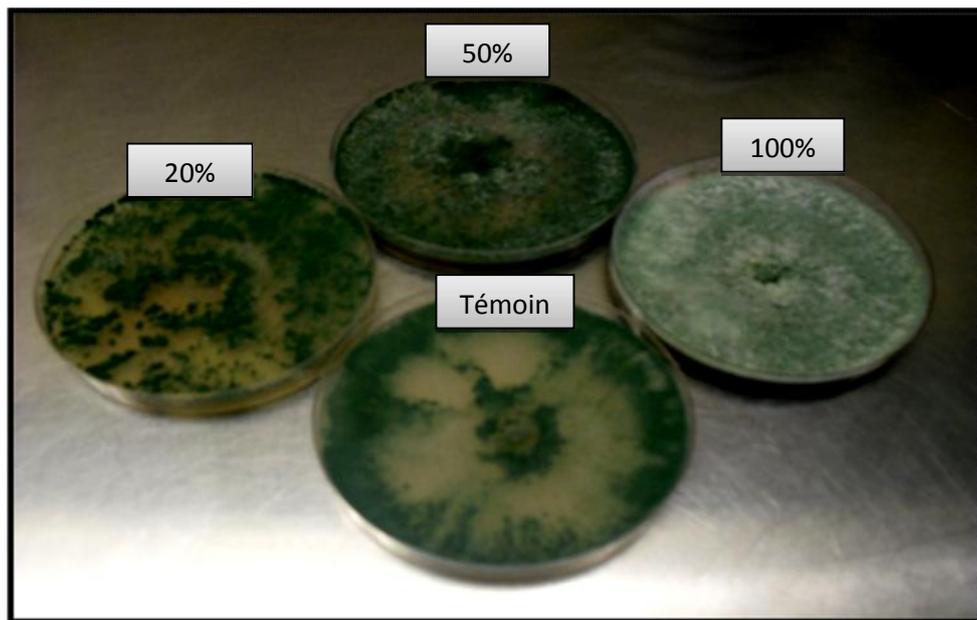
Tous les extraits de plantes ont permis la croissance mycélienne des champignons à des taux variés et à différentes doses. D'après les résultats obtenus, la dose 100% a été plus efficace au développement des champignons par rapport à 50% et à 20%.

#### 3.1.1 Effet sur la croissance mycélienne

Les taux de la croissance mycélienne chez *T4* obtenus montrent que tous les extraits de plantes donnent une bonne croissance mycélienne par rapport au témoin ; Les meilleurs résultats sont obtenus par les extraits de la mauve (fig.18) et de betterave (fig.19) contrairement à ceux du caroubier.

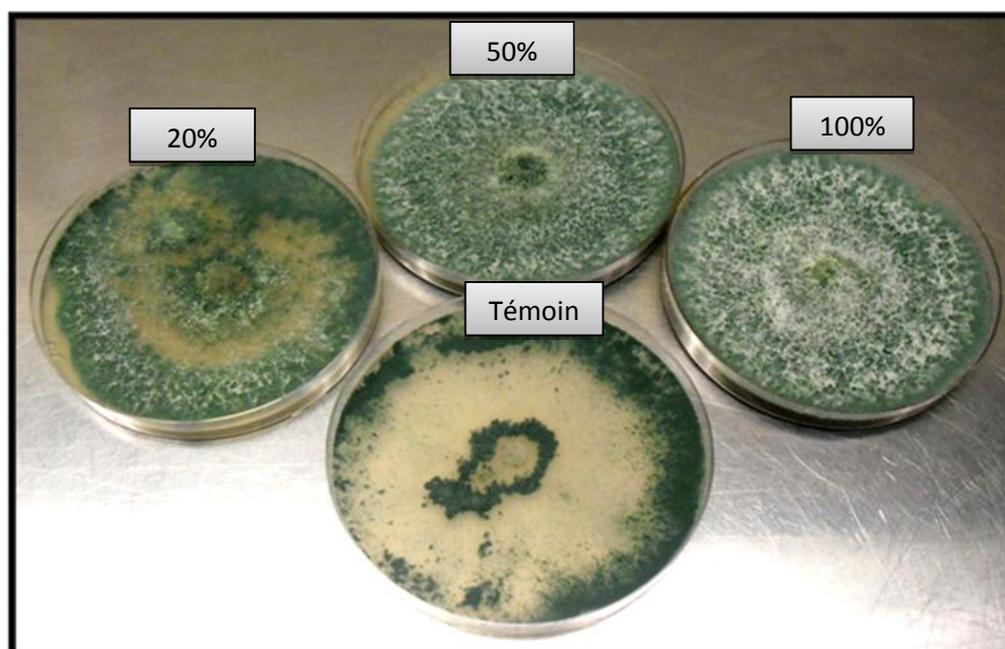


**Figure 18.** Aspect cultural de *T4* sur l'extrait de la mauve après le 6<sup>ème</sup> jour à 25°C.

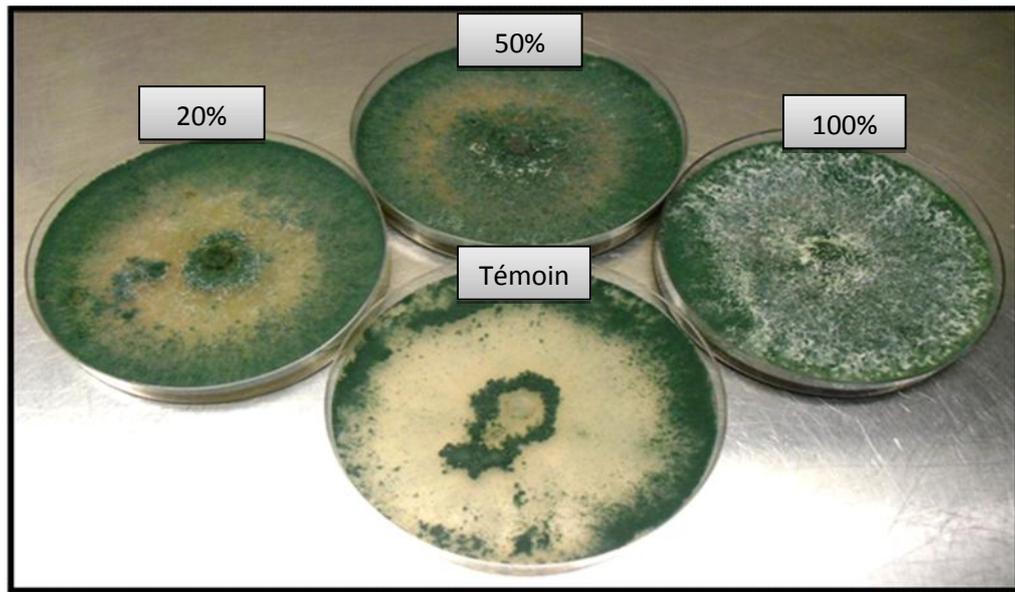


**Figure 19.** Aspect cultural de *T4* sur l'extrait de betterave après le 6<sup>ème</sup> jour à 25°C.

De même, les meilleurs extraits de plantes qui donnent une bonne croissance mycélienne par rapport au témoin sont les extraits de la mauve (fig.20) et de betterave (fig.21).

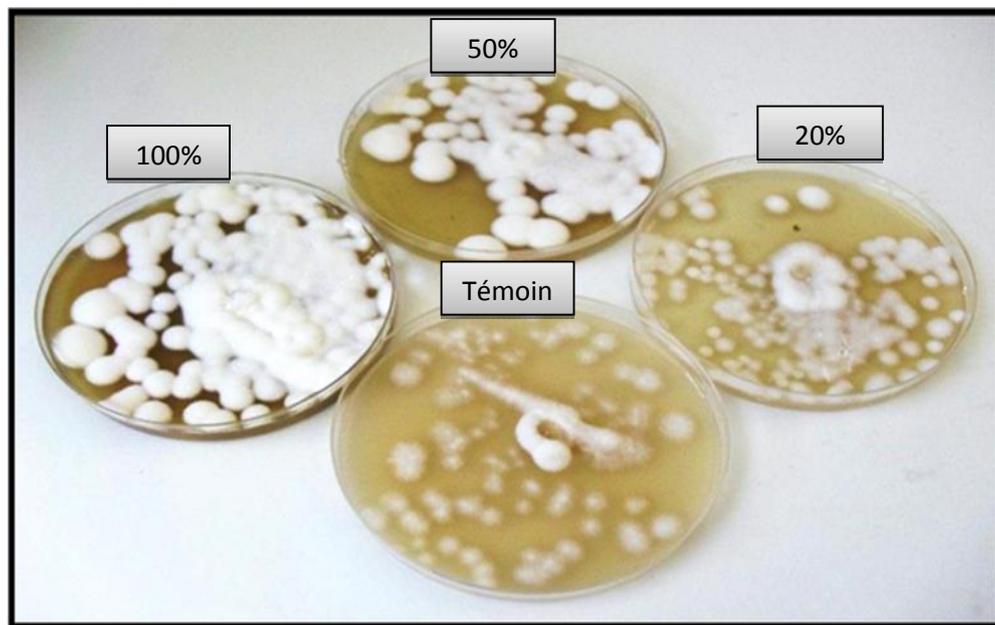


**Figure 20.** Aspect cultural de *T8* sur l'extrait de la mauve après le 6<sup>ème</sup> jour à 25°C.



**Figure 21.** Aspect cultural de *T8* sur l'extrait de betterave après le 6<sup>ème</sup> jour à 25°C.

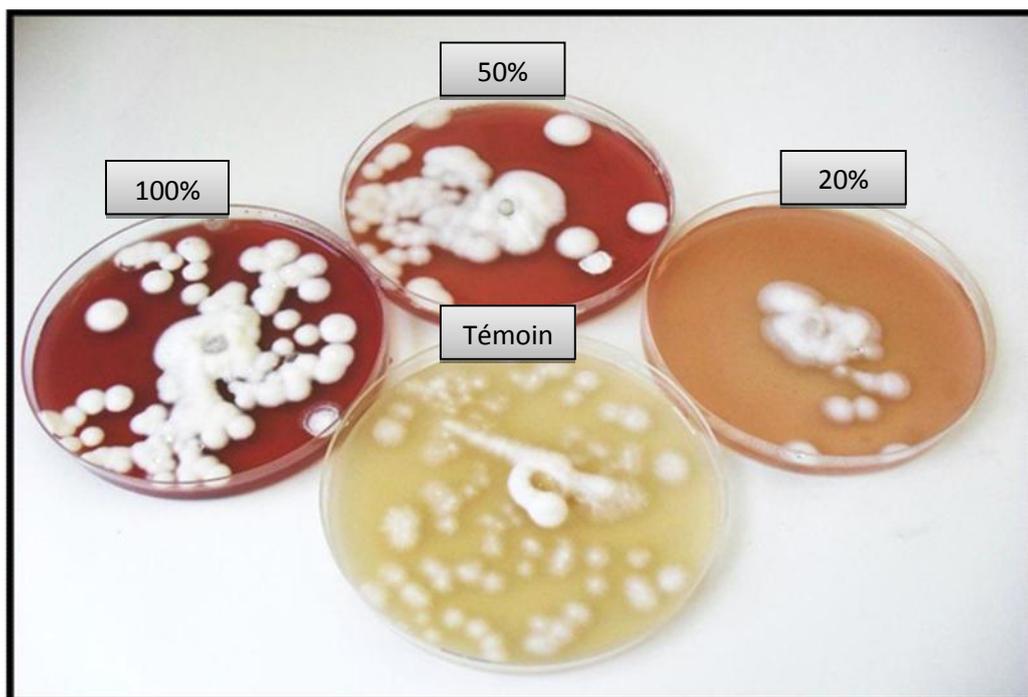
Par ailleurs, les résultats obtenus montrent que les extraits qui permettant une meilleure croissance sont ceux de la mauve (fig.22), du petit pois (fig.23) et l'extrait de la betterave (fig.24).



**Figure 22.** Aspect cultural de *Beauveria sp.* sur l'extrait de la mauve après le 6<sup>ème</sup> jour à 25°C.



**Figure 23.** Aspect cultural de *Beauveria sp.* sur l'extrait de petit pois à concentration de 100% après le 6<sup>ème</sup> jour à 25°C.

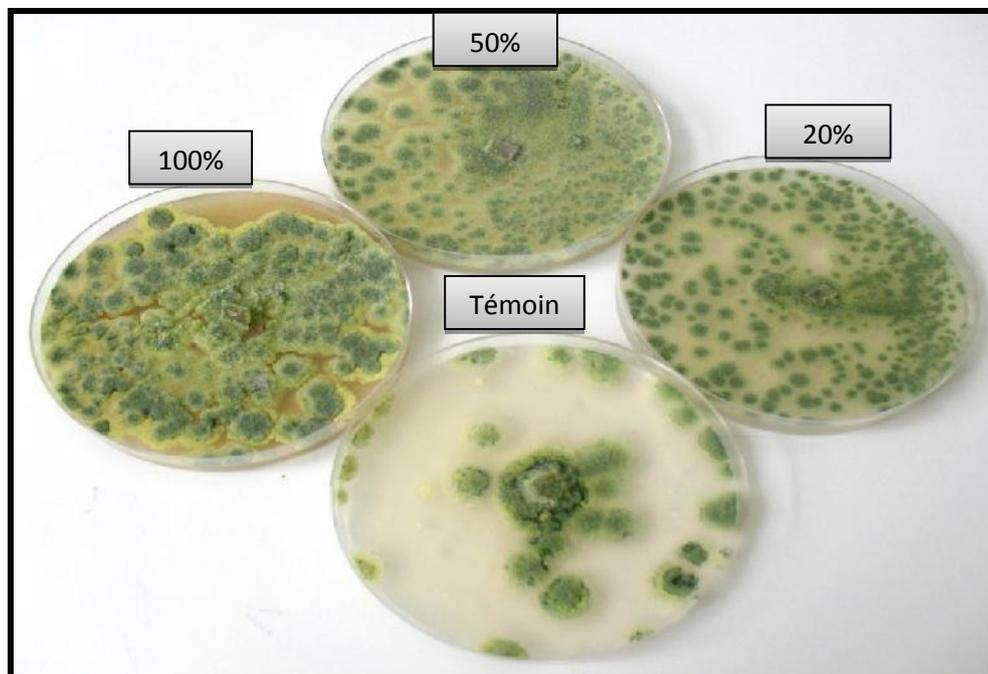


**Figure 24.** Aspect cultural de *Beauveria sp.* sur l'extrait de betterave après le 6<sup>ème</sup> jour à 25°C.

De même, les résultats montrent que la meilleure croissance par rapport le témoin est présentée par l'extrait de la mauve (fig.25) et du fenugrec (fig.26).



**Figure 25.** Aspect cultural de *Metarhizium sp.* sur l'extrait de la mauve à concentration de 100% après le 6<sup>ème</sup> jour à 25°C.



**Figure 26.** Aspect cultural de *Metarhizium sp.* sur l'extrait de fenugrec après le 6<sup>ème</sup> jour à 25°C.

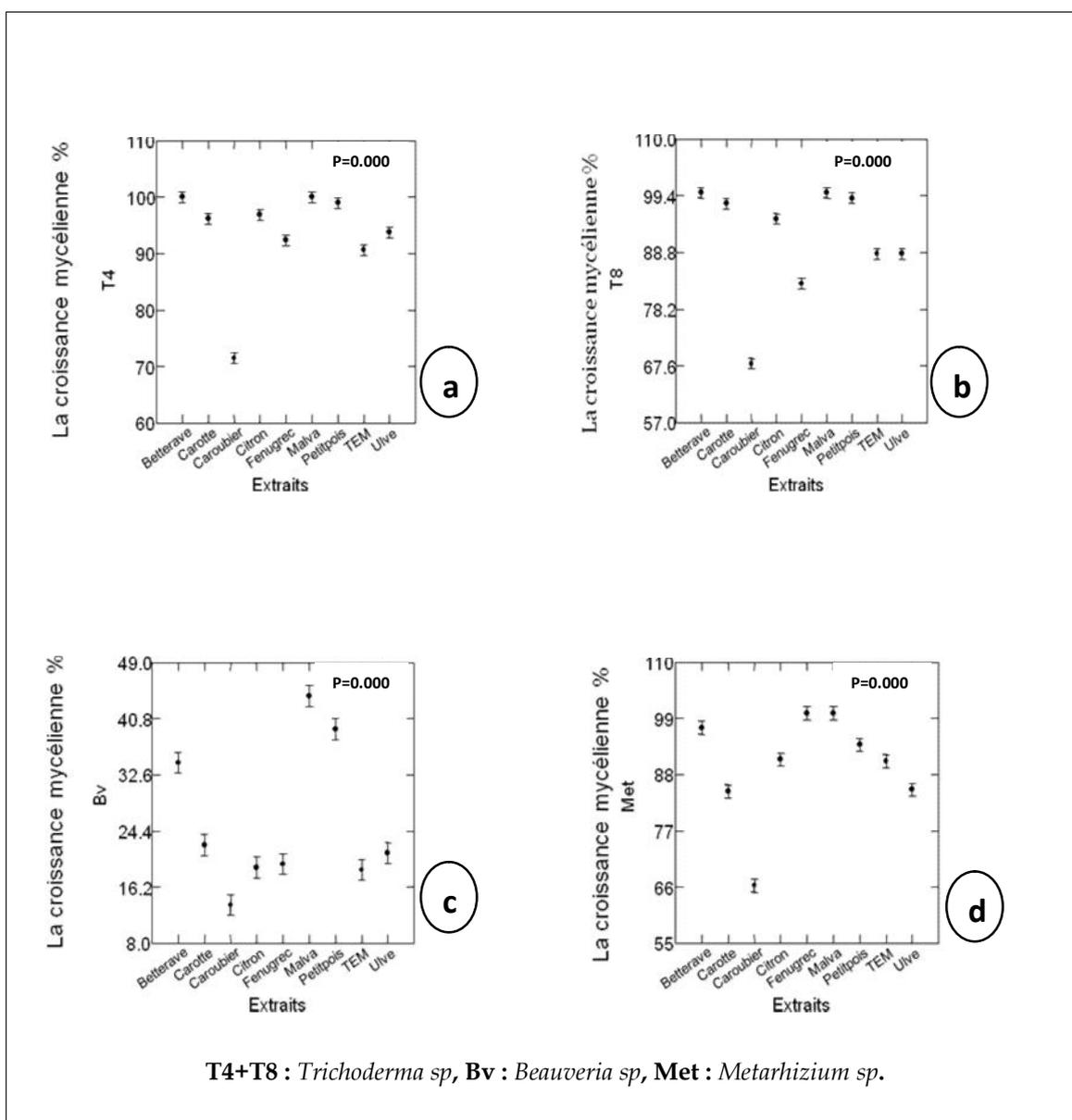
**Tableau 2.** Analyse de la variance des taux de croissance mycélienne des champignons étudiés en fonction des extraits des plantes et de leurs concentrations.

souches	Source	Somme des carrés	d.d.l	Moyenne des écarts	F-ratio	P
<b>T4</b>	Extraits des plantes	5625.965	8	703.246	82.248	0.000
	Doses	791.387	2	395.693	46.278	0.000
<b>T8</b>	Extraits des plantes	8031.289	8	1003.911	110.965	0.000
	Doses	532.128	2	266.064	29.409	0.000
<b>Bv</b>	Extraits des plantes	8151.543	8	1018.943	47.933	0.000
	Doses	3173.621	2	1586.810	74.646	0.000
<b>Met</b>	Extraits des plantes	7927.604	8	990.951	66.264	0.000
	Doses	829.196	2	414.598	27.724	0.000

**T4+T8** : *Trichoderma sp*, **Bv** : *Beauveria sp*, **Met** : *Metarhizium sp*.

D'après les résultats obtenus (Tab. 2), l'analyse de la variance de la croissance mycélienne de l'ensemble des champignons étudiés montre une différence hautement significative selon les extraits des plantes utilisés et leurs doses.

Les résultats présentés sur la figure 27 montrent les taux de croissance mycélienne. Les taux de croissance mycélienne chez *T4* (fig. 27a) et chez *T8* (fig.27b) varient entre 50% et 100% . Par ailleurs, les taux de croissance chez *Beauveria* varient entre 10% et 71.8% (fig.27c). De même, chez *Metarhizium*, les taux de croissance mycélienne varient entre 50% et 100% (fig.27d).



**Figure 27.** L'analyse de la variance des taux de croissance mycélienne des champignons testés en GLM selon les extraits des plantes.

Les calculs de la distance euclidienne ont fait ressortir 4 groupes d'extraits à différentes concentrations selon les taux de croissance mycélienne des champignons étudiés (fig.28a) :

- Le groupe 1 renferme les extraits de carotte avec trois concentrations, de l'ulve à la concentration D3 (100%), de la betterave à la concentration D1 (20%), de citron aux concentrations D2( 50%) et D3 ( 100%) et de petit pois à la concentration D1 (20%).



### 3.1.2 Caractérisation culturelle des champignons étudiés

Les résultats obtenus sur différents milieux après le 6<sup>ème</sup> jour sont représentés selon plusieurs critères (voir annexe.2) comme suit :

#### 3.1.2.1 Aspect et couleur de la colonie

##### a) *Trichoderma sp. T4 et T8*

Sur tous les extraits des plantes testés la croissance au départ par la formation des amas blancs, compactés en touffes, formant un anneau irrégulier dans chaque boîte de Pétri ; après 6 jours, l'anneau coloré en vert (conidies) occupe toute la surface ; il devient de plus en plus foncé jusqu'à devenir vert-bleu au 14<sup>ème</sup> jour.

##### b) *Beauveria sp.*

La surface du milieu est couverte d'une couche farineuse blanche, compactée en touffes au milieu et bombée, après 6 jours, des colonies occupent toute la surface sous forme dispersée et restent toujours blanches.

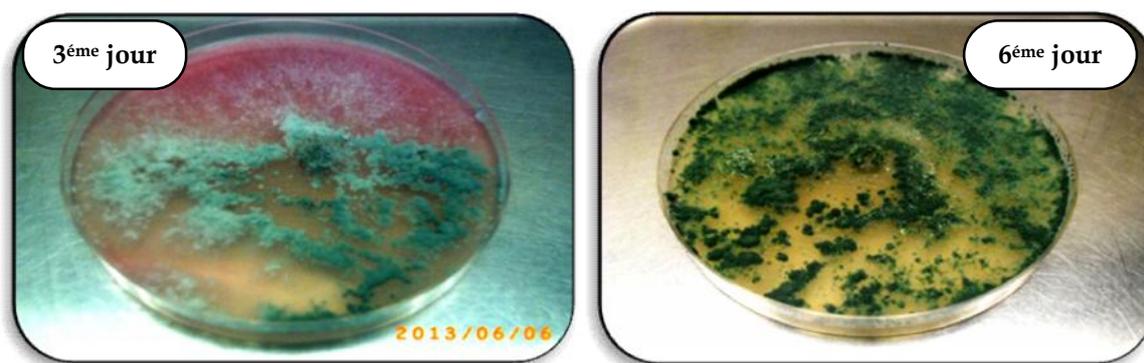
##### c) *Metarhizium sp.*

Au début, il y a une formation des amas blancs dispersés. Après 6 jours, des colonies de couleur vert pistache occupent toute la surface des boîtes puis, cette couleur devient plus foncée avec le temps.

#### 3.1.2.2 Couleur des extraits

Les extraits de PDA, de la mauve, du citron, de la carotte, de l'Ulve et du petit pois n'ont pas changé de couleur de leurs milieux. Par contre, les extraits de la betterave, du fenugrec et du caroubier, ont changé globalement la couleur de leurs milieux après le 3<sup>ème</sup> jours :

- Soit par la disparition totale de la couleur : ce qui signifie l'absorption complète de l'extrait. La couleur rouge de l'extrait de la betterave a disparu graduellement avec la croissance mycélienne chez *T4* (fig.29), *T8* et *Metarhizium sp.*, et reste inchangée chez *Beauveria sp.*



**Figure 29.** Disparition graduelle de la couleur rouge de l'extrait de betterave chez T4 à 20%.

- Soit par l'apparition d'autre couleur plus foncée que la couleur originale chez l'extrait du fenugrec (fig.30) et du caroubier (fig.31).



**Figure 30.** Changement de la couleur de l'extrait de fenugrec chez T4.



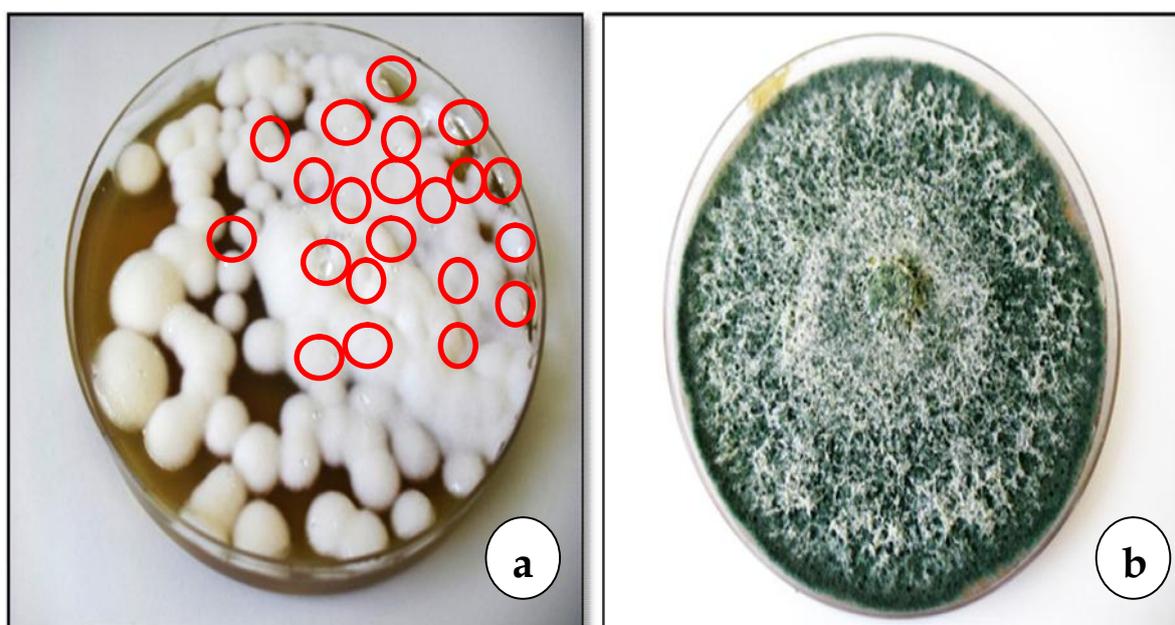
**Figure 31.** Changement de la couleur de l'extrait de caroubier chez T4.

### 3.1.2.3 La vitesse de la croissance

La vitesse de la croissance a été très rapide sur l'extrait de la mauve, de la betterave et du petit pois chez *T4*, *T8* et *Beauveria* avec l'extrait de fenugrec chez *Metarhizium* que le témoin (PDA) qui subit une croissance rapide que les extraits du caroubier, carotte, citron et ulva qui ont été lentes au départ de la croissance.

### 3.1.2.4 Exsudats

Une bonne présence des exsudats est observée au 20<sup>ème</sup> jour chez les extraits de la betterave, de la mauve (fig.32a), du petit pois (fig.32b) et du fenugrec et bien définie à l'état pur (100%) pour toutes les souches avec une simple présence ou absence totale chez les autres extraits (voir annexe 2).



**Figure 32.** Présence des exsudats chez *Beauveria sp.* (a) et chez *T8* (b) sur l'extrait de la mauve à 100% après le 6<sup>ème</sup> jour.

### 1.1.3 Effet sur la sporulation

Les résultats d'une meilleure sporulation obtenue par l'extrait de la mauve (fig.33) à 100% chez *T4* .



**Figure 33.** Aspect cultural de *T4* sur l'extrait de la mauve à concentration de 100% après le 6<sup>ème</sup> jours à 25°C.

Alors que chez *T8*, la meilleure sporulation est obtenue par l'extrait de la mauve (fig.34) à 100%.



**Figure 34.** Aspect cultural de *T8* sur l'extrait de la mauve à concentration de 100% après le 6<sup>ème</sup> jour à 25°C.

Egalement, chez *Beauveria bassiana*, la meilleure est obtenue par l'extrait de la mauve (fig.35).



**Figure 35.** Aspect cultural de *Beauveria sp.* sur l'extrait de la mauve à concentration de 100% après le 6<sup>ème</sup> jour à 25°C.

Par contre la chez *Metarhizium anisopalié*, la meilleure sporulation est obtenue par l'extrait de fenugrec (fig.36).

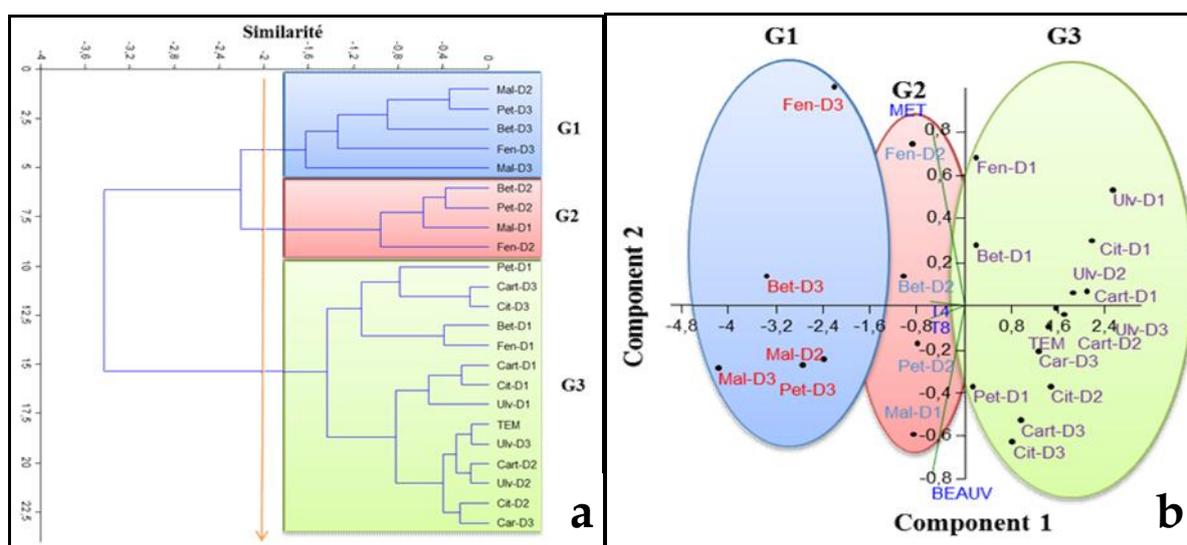


**Figure 36.** Aspect cultural de *Beauveria sp.* sur l'extrait de fenugrec à concentration de 100% après le 6<sup>ème</sup> jour à 25°C.

La classification hiérarchique des extraits de plantes testés à différentes concentrations selon les taux de sporulation enregistrés pour chaque champignon étudié a mis en évidence trois groupes distincts (fig.38a) :

- Le groupe 1 renferme les extraits de Malva aux concentrations D2 (50%) et D3 (100%), de petits pois, betterave et fenugrec à la concentration D3 (100%).
- Le groupe 2 renferme les extraits de Malva à la concentration D1 (20%), de petits pois, betterave et fenugrec à la concentration D2 (50%).
- Le groupe 3 renferme les extraits aux différentes concentrations ayant enregistrés des taux de sporulation proches des témoins. Ils correspondent aux extraits de la carotte, du citron et d'ulve aux trois concentrations, de la betterave, du petits pois et du fenugrec à la concentration D1 (20%), et du caroubier à la concentration D3 (100%).

La corrélation entre les extraits de plantes testés à différentes concentrations et les trois champignons étudiés selon les taux de sporulation a révélé une nette stimulation par les extraits de plantes testés aux concentrations classées dans les groupes 1 et 2 (fig.38b).



**Figure 38.** Classification hiérarchique des extraits de plantes (a) et Analyse en composante principale (ACP) des taux de sporulation de champignons étudiés (b) selon les extraits de plantes et leurs concentrations 20%, 50% et 100%.

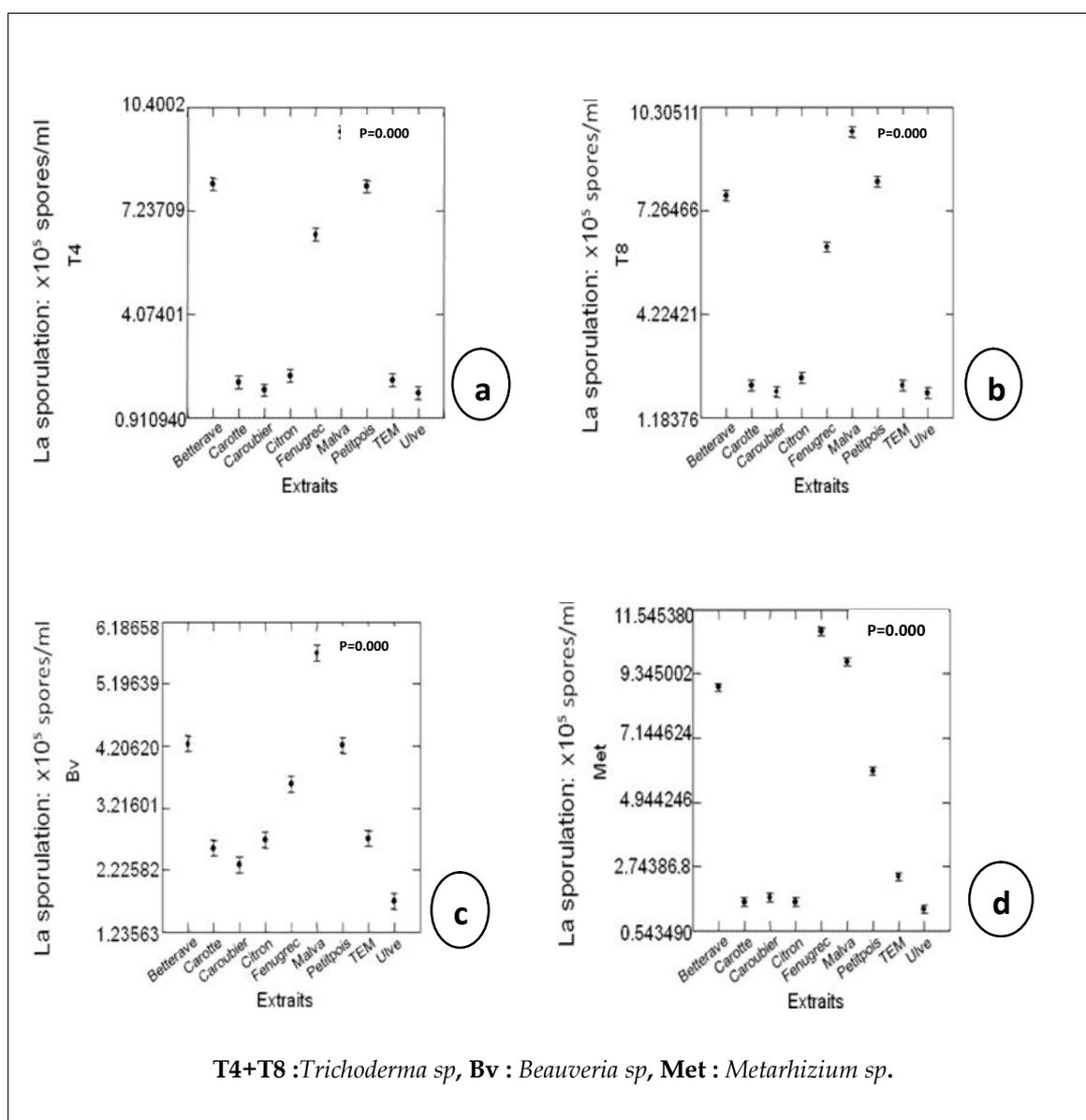
D'après les résultats obtenus (Tab. 3), l'analyse de la variance de la sporulation de l'ensemble des champignons étudiés a montré une différence hautement significative selon les extraits des plantes utilisés et leurs doses.

**Tableau 3.** Analyse de la variance des taux de sporulation des champignons étudiés en fonction des extraits des plantes et de leurs concentrations.

souches	Source	Somme des carrés	d.d.1	Moyenne des écarts	F-ratio	P
<b>T4</b>	Extraits des plantes	7.91831x10 <sup>12</sup>	8	9.89789x10 <sup>11</sup>	304.146	0.000
	Doses	1.38963x10 <sup>12</sup>	2	6.94815x10 <sup>11</sup>	213.505	0.000
<b>T8</b>	Extraits des plantes	7.26499x10 <sup>12</sup>	8	9.08123x10 <sup>11</sup>	431.678	0.000
	Doses	1.50522x10 <sup>12</sup>	2	7.52612x10 <sup>11</sup>	357.756	0.000
<b>Bv</b>	Extraits des plantes	1.09435x10 <sup>12</sup>	8	1.36794x10 <sup>11</sup>	94.866	0.000
	Doses	3.28128x10 <sup>11</sup>	2	1.64064x10 <sup>11</sup>	113.777	0.000
<b>Met</b>	Extraits des plantes	1.15041x10 <sup>13</sup>	8	1.43801x10 <sup>12</sup>	804.413	0.000
	Doses	1.71912x10 <sup>12</sup>	2	8.59560x10 <sup>11</sup>	480.831	0.000

**T4+T8** : *Trichoderma sp*, **Bv** : *Beauveria sp*, **Met** : *Metarhizium sp*.

Les résultats présentés sur la figure 37 montrent les taux de sporulation. Les taux de sporulation chez *T4* varient entre  $0.8 \times 10^5$  et  $13.8 \times 10^5$  (fig. 37a) ; ils varient entre  $0.8 \times 10^5$  et  $13.6 \times 10^5$  chez *T8* (fig.37b). Par ailleurs, les taux de sporulation chez *Beauveria bassiana* varient entre  $0.6 \times 10^5$  et  $7.6 \times 10^5$  (fig.37c). Alors que *Metarhizium anisopalié*, les taux de sporulation varient entre  $0.6 \times 10^5$  et  $13.8 \times 10^5$  (fig.37d).



**Figure 37.** L'analyse de la variance des taux de sporulation des champignons testés en GLM selon les extraits des plantes.

### 1.1.4 Effet sur la germination

Les résultats montrent que chez *T4* la meilleure germination est obtenue par l'extrait de la mauve (fig.33). La mauve a également permis une bonne germination chez *T8* (fig.34) et chez *Beauveria bassiana* (fig.35). Alors que chez *Metarhizium anisopali* la meilleure germination est obtenue par l'extrait de fenugrec (fig.36).

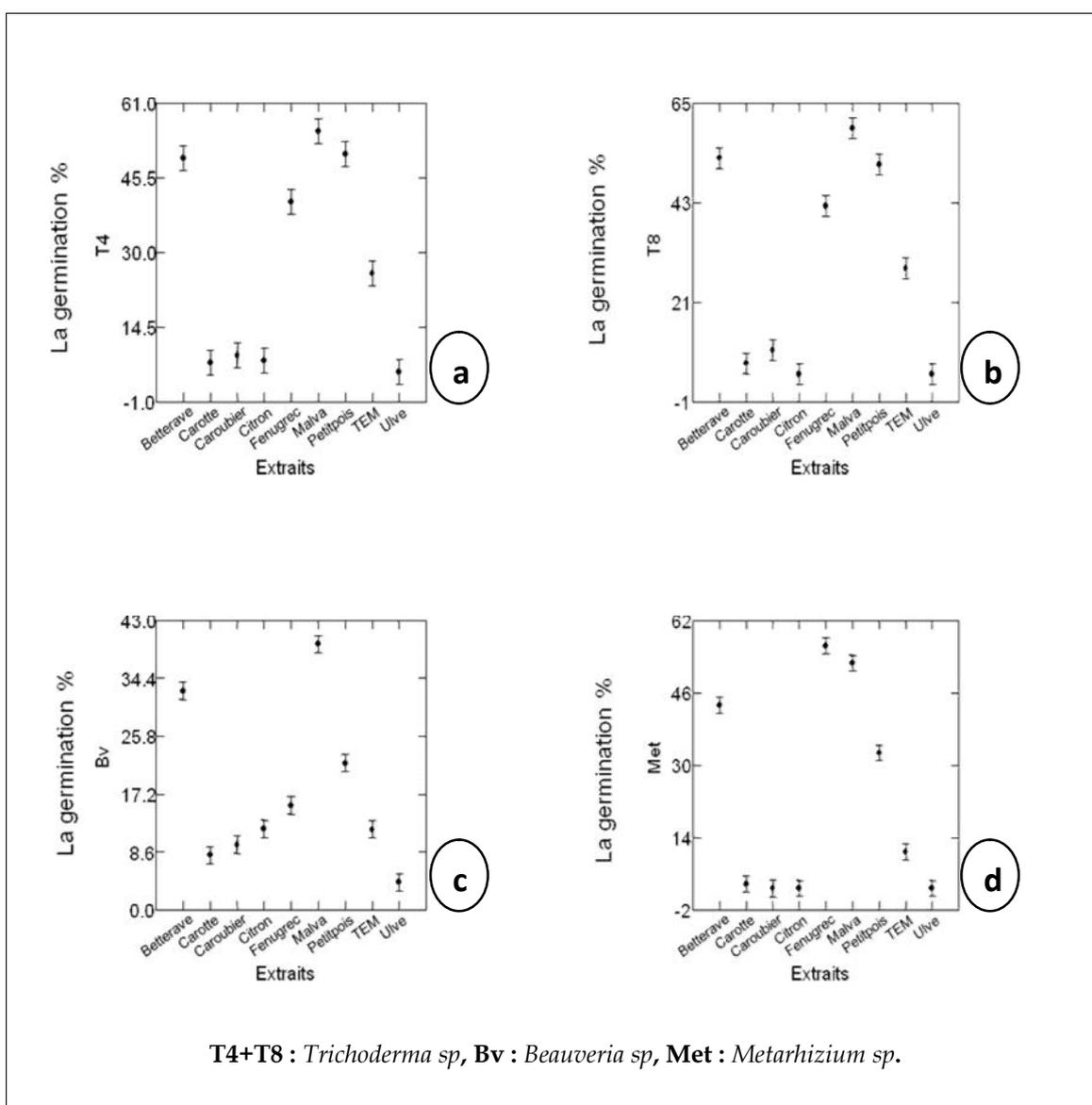
**Tableau 4.** Analyse de la variance des taux de germination des champignons étudiés en fonction des extraits des plantes et de leurs concentrations.

souches	Source	Somme des carrés	d.d.l	Moyenne des écarts	F-ratio	P
<b>T4</b>	Extraits des plantes	32472.944	8	4059.118	68.447	0.000
	Doses	8279.933	2	4139.966	69.811	0.000
<b>T8</b>	Extraits des plantes	37026.931	8	4628.366	98.692	0.000
	Doses	4998.847	2	2499.424	53.296	0.000
<b>Bv</b>	Extraits des plantes	10067.081	8	1258.385	85.705	0.000
	Doses	2141.078	2	1070.539	72.912	0.000
<b>Met</b>	Extraits des plantes	37505.386	8	4688.173	173.887	0.000
	Doses	5597.149	2	2798.575	103.801	0.000

**T4+T8** : *Trichoderma sp*, **Bv** : *Beauveria sp*, **Met** : *Metarhizium sp*.

D'après les résultats obtenus (Tab. 4), l'analyse de la variance de la germination de l'ensemble des champignons étudiés a montré une différence hautement significative selon les extraits des plantes utilisés et leurs doses.

D'autre part, les résultats montrent que chez *T4* les taux de germination varient entre 0% et 100%, (fig.39a). Chez *T8*, les taux de germination varient entre 0% et 100% (fig.39b). Les taux de germination chez *Beauveria bassiana* varient entre 0% et 58.33%, (fig.39c). Aussi, les taux de germination chez *Metarhizium anisopali* varient entre 0% et 90%, (fig.39d).

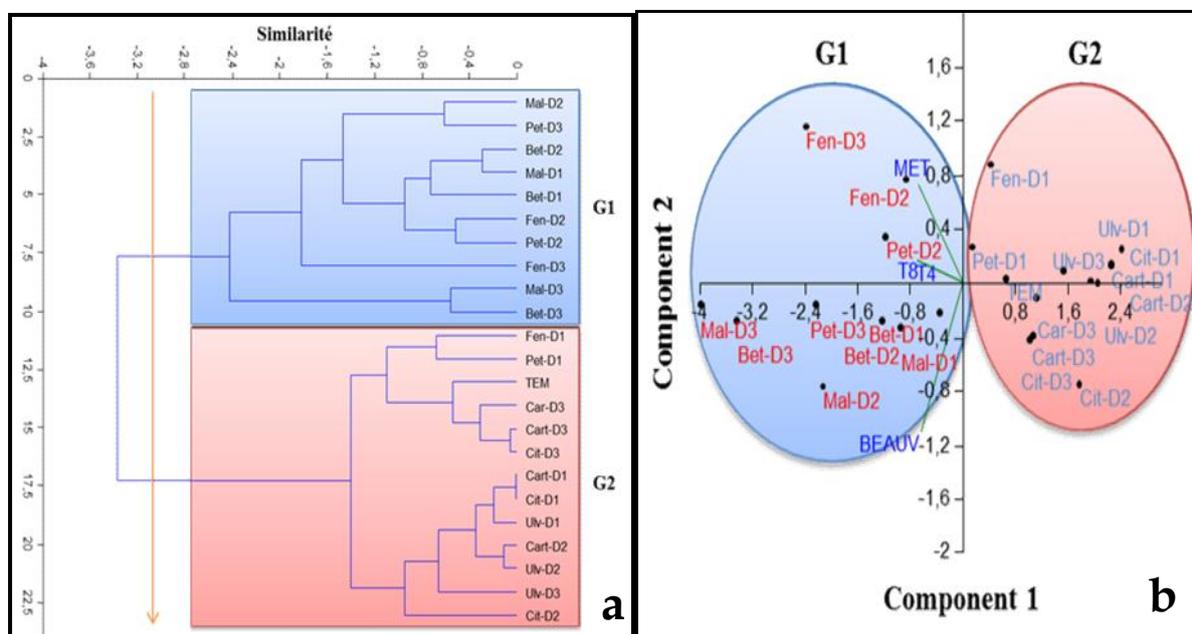


**Figure 39.** Analyse de la variance des taux de germination des champignons testés en GLM selon les extraits des plantes.

La classification hiérarchique des extraits de plantes testés à différentes concentrations selon les taux de germination enregistrés pour chaque champignon étudié a mis en évidence deux groupes distincts (fig.40a) :

- Le groupe1 renferme les extraits de Malva et de betterave aux trois concentrations, de petits pois et de fenugrec aux concentrations D2 (50%) et D3 (100%).
- Le groupe 2 renferme les extraits aux différentes concentrations ayant enregistrés des taux de germination proches des témoins. Ils correspondent aux extraits de citron, carotte et ulve aux trois concentrations, de petits pois et fenugrec à la concentration D1 (20%), et le caroubier à la concentration D3 (100%).

La corrélation entre les extraits de plantes testés à différentes concentrations et les trois champignons étudiés selon les taux de germination a révélé une nette stimulation par les extraits de plantes testés aux concentrations classées dans les groupes 1 (fig.40b).



**Figure 40.** Classification hiérarchique des extraits de plantes (a) et Analyse en composante principale (ACP) des taux de germination des champignons étudiés (b) selon les extraits de plantes et leurs concentrations 20%, 50% et 100%.

### 3.2 Discussion :

Dans la présente étude, plusieurs extraits de plantes ont été testés pour produire en masse des champignons utiles pour l'agriculture. Le succès de la lutte biologique ne dépend pas seulement de l'isolement, de la caractérisation et de la pathogénicité ; mais également, sur la production en masse de l'agent de succès fongique en laboratoire. La disponibilité de l'agent pathogène est une exigence primordiale dans la lutte biologique. Des efforts de recherche actuels visaient à sélectionner les meilleurs extraits de plantes pour la croissance de ces champignons. Cette étude est menée avec huit espèces (*Malva sylvestris*, *Ceratonia siliqua*, *Citrus limon*, *Daucus carota*, *Beta vulgaris*, *Pisum sativum*, *Trigonella foenum-graecum* et *Ulva*), dont leurs extraits aqueux sont testés à des doses D1 (20%), D2 (50%) et D3 (100%) et évalué leurs effets stimulateurs sur *Trichoderma sp.*, *Beauveria sp.* et *Metarhizium sp.*

Tous les milieux de culture ont permis la croissance mycélienne de *Trichoderma sp.*, *Beauveria sp.* et *Metarhizium sp.* Après 72h d'incubation à 25°C, des colonies de champignons envahissent toutes les boîtes de Pétrie et pour *Beauveria* qui tapissent la boîte après le 6<sup>ème</sup> jour.

Les milieux de la mauve, de la betterave, du petit pois et du fenugrec sont des milieux plus favorables par rapport au témoin, ils permettent une rapidité et une bonne croissance à divers doses. Les milieux montrent une croissance variable. Le caroubier présente la croissance la plus lente au départ. Le milieu de culture naturel à base de pomme de terre, le PDA a permis une croissance rapide et bonne des champignons.

La croissance rapide de la biomasse qui a été observée sur la mauve et la betterave serait due à la présence des sources de carbone et d'énergies (glucose, saccharose). Selon Chater et Bibb, (1997), Marwick *et al.*, (1999) ; Voelker and Altaba (2001), les substrats rapidement assimilables comme le saccharose et le glucose provoquent une augmentation de taux de croissance. La mauve serait le meilleur extrait pour la production de la biomasse à cause de sa richesse par des sources de carbone, par la

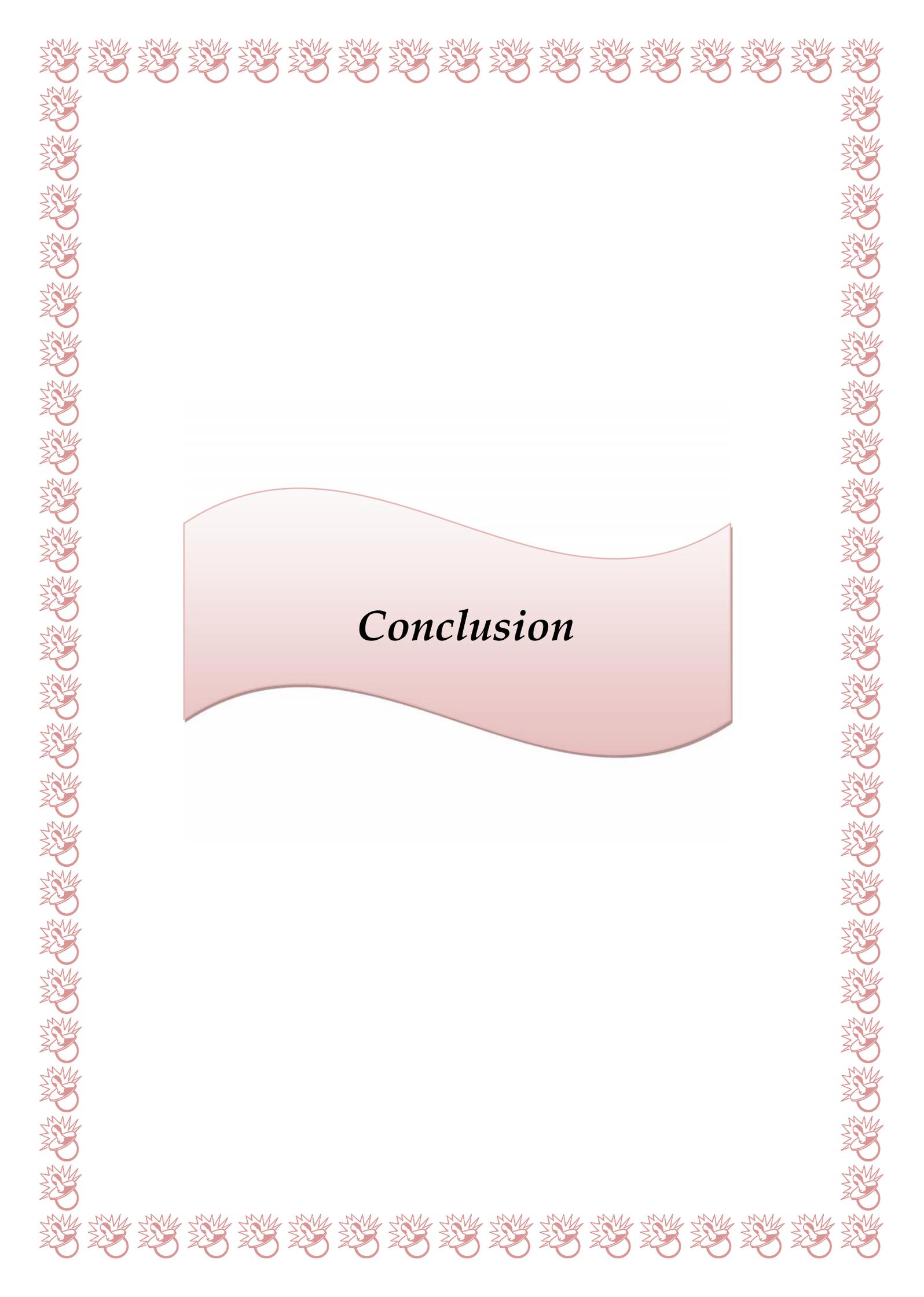
suite, l'extrait de betterave, l'extrait de petit pois et de fenugrec, ils sont aussi plus riche en glucoses et en saccharose.

La production en masse des champignons dépend aussi de conditions environnementales régissant des facteurs intrinsèques et extrinsèques (composition des substrats naturels, température, pH, taux d'O<sub>2</sub> et de CO<sub>2</sub>, compétitivité microbienne...) (Frisvad et Samsom, 1991).

Selon Jitendra Mehta *et al.* (2012), les impulsions (riz et blé) ont montré une forte croissance et un taux élevé de production de biomasse des champignons entomopathogènes (*Trichoderma viride*) comparativement à la betterave et à la pomme de terre.

Selon Fadwa NASSEUR (2013), d'autres travaux ont montré le même effet, l'étude de l'évaluation de la croissance d'un isolat de *Sphaerotheca macularis* « od2 » sur les milieux de culture organiques (Fraise), mixtes (PDA et MEA) et synthétiques (Czapek et Pétri), a révélé que les milieux "Fraise" et PDA permettent un bon développement de *S.macularis*. La Fraise est le milieu le plus favorable au développement de ce champignon. La performance de la croissance sur des disques flottant sur PDA suggérant le caractère de parasite obligatoire de *S.macularis* exprimé par de nombreux auteurs Maas (1984), Lanier *et al.*, (1978) et Agrios (1978), La croissance sur le milieu MEA est faible, elle est d'autant plus faible sur les milieux de synthèse ; Czapek (minéral contenant une source du carbone) et Pétri (purement minéral). Ces résultats confirment bien l'hétérotrophie des champignons signalée par plusieurs auteurs tels que Samson *et al.*, (1984) et Boutton (1990).

En effet, après 6 jours d'incubation, le diamètre est de 8 cm sur l'extrait de fraise (considéré comme optimum) et de 6 cm sur PDA, ainsi que sur le milieu MEA, celle-ci est de 3,02 cm. Par contre, pour nos résultats, après seulement 3 jours d'incubation, les boîtes ont été remplies par la majorité des extraits testés et chez toutes les souches sauf pour *Beauveria sp.* qui a été remplie après le 6<sup>ème</sup> jour.



*Conclusion*

### Conclusion

Le travail présenté dans cette étude consiste à montrer les meilleurs extraits de plantes pour la production en masse des champignons utiles pour l'agriculture du genre *Trichoderma*, *Beauveria* et *Metarhizium*, on se basant sur la croissance mycélienne, la sporulation et la germination.

Les résultats des tests menés *in vitro* sur *Trichoderma*, *Beauveria* et *Metarhizium* montrent que les taux de croissance mycélienne chez *T4, T8* et *Metarhizium sp.* varient entre 50% et 100%. Par ailleurs, chez *Beauveria bassiana* ils varient entre 10% et 71.8% et après le 3<sup>ème</sup> jour.

Par la suite, les taux de sporulation chez *T4* varient entre  $0.8 \times 10^5$  et  $13.8 \times 10^5$ ; ils varient entre  $0.8 \times 10^5$  et  $13.6 \times 10^5$  chez *T8*. Par ailleurs, les taux de sporulation chez *Beauveria sp.* varient entre  $0.6 \times 10^5$  et  $7.6 \times 10^5$ . Alors que *Metarhizium sp.*, les taux de sporulation varient entre  $0.6 \times 10^5$  et  $13.8 \times 10^5$ .

Le meilleur extrait pour la croissance mycélienne chez *T4* et *T8* a été l'extrait de la mauve et l'extrait de betterave. Par ailleurs, chez *Beauveria sp.* le meilleur extrait a été l'extrait de la mauve, l'extrait de petit pois et l'extrait de betterave et chez *Metarhizium sp.* a été l'extrait de la mauve et de fenugrec.

Les résultats montrent que chez *T4* les meilleures sporulations et germinations ont été obtenues par l'extrait de la mauve. La mauve a également permis une bonne sporulation et germination chez *T8* et chez *Beauveria sp.* Alors que chez *Metarhizium sp.* le meilleur résultat a été obtenu par l'extrait de fenugrec.

*In vitro*, les extraits de plantes ont donné des résultats satisfaisants et encourageants sur la croissance mycélienne, la sporulation et la germination des espèces étudiées.

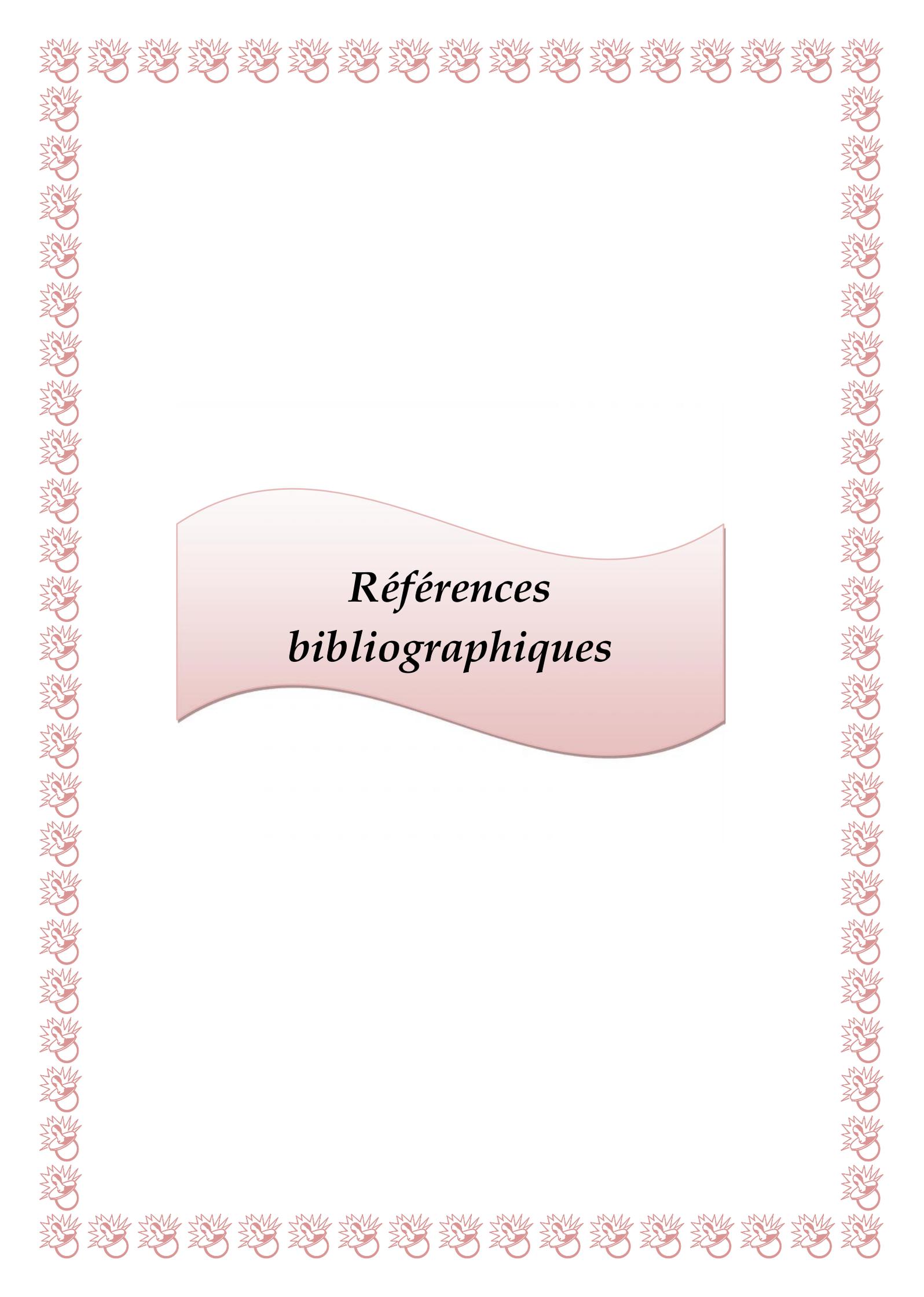
## Conclusion générale

---

A la l'issue de ce travail on peut conclure qu'on peut produire en masse des champignons utiles pour l'agriculture d'après les plantes qui possèdent dans leur composition chimique des métabolites primaires de la source de carbone tel que les glucides et les polysaccharides.

En perspectives, pour une meilleure poursuite de la recherche des molécules stimulateurs de la production en masse des champignons, de la présente étude, il est souhaitable de:

- Faire une étude *in vivo*, et compléter ce travail en pulvérisant le sol par ces extraits de plantes.
- Faire les analyses chimiques de ces extraits de plantes.
- Tester l'efficacité et l'activité de ces champignons cultivés sur le milieu des extraits.



*Références  
bibliographiques*

## Références bibliographiques

---

1. **Andersen, S.O. 1979.** Biochemistry of insect cuticle. Annual Review of entomol, 24: 29-61p.
2. **Aziz A.B., Poinssot X., Daire M., Adrian A., Bézier B., Lambert J-M. et Joubert A., 2003:** Laminarin elicits defense responses in grapevine and induces protection against *Botrytis cinerea* and *Plasmopara viticola*, Mol. Plant-Microbe Interact. 16, 1118-1128p.
3. **Baker R., 1988:** Trichoderma spp. as plant-growth stimulants, CRC Crit. Rev. Biotechnol. 7 (2), 97-106p.
4. **Bateman R. P. 1997.** The development of a mycoinsecticide for the control of locusts and grasshoppers. Outlook on agriculture 26, pp: 13-18.
5. **Baytop T. (1984).** Therapy with medicinal plant in Turkey (Past and Present). Publication of the Istanbul University. No: 3255. Istanbul.
6. **Beauverie, J. 1911.** Notes sur les Muscardines. Sur une muscardine du ver à soie, non produite par le *Botrytis bassiana*. Étude du *Botrytis effusa* sp. nov. Rapp. Comm. administrative du lab. d'études de la soie, Lyon, 14: 5-31p.
7. **Belzung, 1900.** Anatomie et physiologie végétales - Félix Alcan editeur.
8. **Bissett J., 1991:** A revision of the genus *Trichoderma*. Section *Pachybasium*. Can. J. Bot 69, 2373-2417p.
9. **Bissett, J. . 1984.** A revision of the genus *Trichoderma*. L. Section *Longibrachiatum* Can. J. Bot, 62 : 924-931.
10. **Bissett, J. 2004.** Commentaires de l'adresse internet suivante : [http : //www.Medicalglossary .org/fungi\\_ mitosporic \\_ fungi\\_ definitions.html](http://www.Medicalglossary.org/fungi_mitosporic_fungi_definitions.html).
11. **Blamey & Grey-Wilson, 1991.** (pour l'édition française) - La flore d'Europe occidentale - Arthaud.
12. **Blancke R., 2001.** Guide des fruits et légumes tropicaux. Ed : Eugen Ulmer, Paris. 288 p.
13. **Bolonos M. (1955).** Rapport sur le caroubier. Instituto forestal de Investigaciones y experiencias Madrid(Espagne) 9p.
14. **Bonnier & Douin, 1912-1935.** La grande flore en couleur de Gaston Bonnier-Belin.
15. **Botton ;Breton,A ;Fevre,M ;Guy,PH ;Larpeni,J ;P ;Veau.1990** .Moisissures utiles et nuisibles importance industrielle.2°Edition Massan, Paris, Newyork, Million, Barcelone, Mixico, Saopawlo.
16. **Boucias, D. G. et Pendland, IC. 1991.** Attachment of mycopathogens to cuticle: The initial event of mycosis in anthropod host. In: The Fungal Spore and Disease Initiation in Plants and Animals. G. T. Cole and H. C. Hoch (eds.), Plenum, New York, 101 -128.

## Références bibliographiques

---

17. **Brousseau, C., Charpentier G., Belloncik S. 1996.** Susceptibility of spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* Clemens, to destruxins, cyclodepsipeptidic mycotoxins of *Metarhizium anisopliae*. J.Invertebr. Pathol.68, pp: 180-183
18. **Burnie G., Forrester S., Greig D., Guest S., Harmony M., Hobley S. et al., 2006:** Botanica Encyclopédie de botanique et d'horticulture. Edition Place des Victoires. Paris. France.
19. **Butt T.M., Goettel M.C.2000.** Bioassays of entomogenous fungi. In: Navon, A. and K.R.S. Ascher (eds.), Bioassays of Entomopathogenic Microbes and Nematodes, CABI publishing Wallingfo, pp: 141-96.
20. **Caron J. L., Laverdière P. O., Thibodeau & R. R. Bélanger., 2002 :** Utilisation d'une souche indigène de *trichodermaharzianum* contre cinq agents pathogènes chez le concombre et la tomate de serre au Québec. Phytoprotection 83,73-87p.
21. **Carruthers, R. I. et Soper, R. S. 1987.** Fungal diseases. In: Fuxa, J. R. and Tanada, Y. (eds), Epizootiology of Insect Diseases. Wiley-Interscience, New York, pp. 357-416.
22. **Castillo G., Sottiaux L., Hainaut A., Dengis B. et Waller A., 2010 :** De la plante au médicament, Initiation aux plantes médicinales, Espaces Botaniques Universitaires de Liège, 324p.
23. **Chandía N.P. etMatsuhira B., 2008:** Characterization of afucoidan from *Lessoniavadosa*(Phaeophyta) and its anticoagulant and elicitor properties, Int. J. Biol. Macromol. 42, 235-240p.
24. **Chater K and Bibb M. 1997.** Regulation of bacterial antibiotic production, Klein Kauf AND H. Vandhoven edn. INK.
25. **CHAUX Cl., FOURY Cl. (1994).** Production légumière - tome1. Généralités (série Agriculture d'aujourd'hui). Edition Tec et Doc Lavoisier Paris, Londres, New York.
26. **Classen&Blaschek, 1998.** High molecular weight acidic polysaccharides from *Malvoasylvestris*and *Alcearosea*, Planta Med. 64(7), 640-4.
27. **CLEMENT J.M. (1981).** « Larousse agricole » Librairie Larousse Paris p1208.
28. **Coderre, D. et Vincent, C. (1992).** La lutte biologique : toile de fond de la situation. In Vincent, C. et Coderre, D. (réd.), *La lutte biologique* (chap. 1, p. 3-16). Boucherville (Québec), Gaëtan Morin Éditeur.
29. **Cornia, M.B. et Beatriz, M.D. 2004.**Pathogenicity of hyphomycètes fungi against *Cyclocephalassignaticollis*. Bio-Control 00: 1-8, 2004. Kluwer Academie Publishers. Printed in the Netherlands.
30. **Coste, 1901.** Flore descriptive et illustrée de la France, de la Corse et des contrées Limitrophes -Tome I- Librairie de sciences naturelles, Paul Klincksieck.

## Références bibliographiques

---

31. **Cournut B., 1984** : Le genre *Trichoderma* hyphomycètes. Th.Pharmacie : Marseille , current concepts. Plant Dis. 87(1), 4-10p.
32. **Delattre C.P., Michaud B., Courtois J. et Courtois M., 2005**: Oligosaccharides engineering from plants and algae applications in biotechnology and therapeutics, Minerva Biotech.17, 107-117p.
33. **Diamantoglou and Mitrakos K. (1981)**. Leaf longevity in Mediterranean evergreen sclerophylls. In Components of Productivity of Mediterranean Climate Region. Basic and Applied Aspects (N.S.Margaris and H.A. Mooney, eds), pp: 17-19. Junk Publishers, The Hague ISBN. 90: 6193-9445.
34. **Djafer A., 2011** : Impact de l'utilisation des isolats algériens de *Trichoderma* sp. sur la culture de la pomme de terre *Solanum tuberosum* L.en Algérie. Th. Mast .Univ. Saad Dahleb de Blida, 74p.
35. **Domsch, K.H., Gams, W. & Anderson, T.-H. (1980)** *Compendium of Soil Fungi*. Vol 1, Academic Press, London.
36. **Driver F., Milner R.J., Trueman J.W.H.2000**. A taxonomic revision of *Metarhizium anisopliae* based on a phylogenetic analysis of DNA sequence data, Mycol. Res. pp: 104, 134-150.
37. **Dubois C., 2006**. Les arbres fruitiers. Ed : Rustica, Paris. 127 p.
38. **Encyclopédie de la cuisine (1999)**. Les Editions Québec Amérique inc.
39. Entz-Susan C.2005. Molecular methods and isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* for environmentally sustainable control of grasshoppers in Canada. Master of Sciences. University of Lethbridge.
40. **Fadwa nasseur, 2013**. Effet du différents milieux de culture sur la croissance de *sphaerotheca macularis* et sa resistance a trois fongicides, Volume 5 , N ° 131001.
41. **Faria, M. et Wraight, S.P. 2001**. Biological control of *Bemisia tabaci* with fungi. Crop Protection. 20, 767-778p.
42. **Ferron, P., Fargues, J. et Riba, G. 1991**. Les champignons agents de lutte microbiologique contre les ravageurs. In Handbook of applied mycology, 2: 237-270p.
43. **Fletcher, 2007**. Reconnaître la nature comestible et savoureuse sans peine - Nathan.
44. **Fournier, 1934-1940**. Les quatre flores de France - Dunod.
45. **Free J.B. 1993**. *Insect pollination of crops*. 2nd ed. Academic Press. London, 152p.
46. **FRISVAD, J. C. & SAMSOM, R.A**. Filamentous fungi in foods and feeds: ecology, spoilage and mycotoxin production. Handbook of applied mycology, Volume 3, Foods and Feeds, Dekker, M. New York : Arora, D.K., Mukerji, K.G. & Marth, E.H., 1991, pp 31-68.

## Références bibliographiques

---

47. **Gams, W. and Bissett J. 1998.** Morphology and identification of Trichoderma sp. Trichoderma & Gliocladium, Volume1: Basic Biology, Taxonomy and Genetics.: <http://nt.ars.grin.gov/taxadescriptions/keys/Genusoverview.cfm>.
48. **Gaugler, R. L. et Lashomb, J. 1989.** Stability and efficacy of *Beauveria bassiana* soil inoculations. Environ. Entomol. pp.18: 412-418p.
49. **Goettel, M.S. 1992.** Biological control of locusts and grasshoppers. Wallingford, UK: C.A0B. International, 122-130.
50. **Greathead, D.I, Kooyman, c., Launois-Luong, M. H., et Popov, G.B. 1994.** Les ennemis naturels des criquets du Sahel. Collection Acridologie Opérationnelle N8 CILSS/DFPV, Niamey, 12625.
51. **Guo, H.-L., Ye, B.-L., Yue, Y.-Y., Chen, Q.-T. & Fu, C.-S. (1986)** [Three new species of *Metarhizium*.] *Acta Mycologica Sinica* **5**: 177-184 [In Chinese].
52. **HALLOUANE F.1997.** Cycle biologique de *Schistocerca gregaria* (forskal, 1775) (ORTHOPTERA, CYRTACANTHACRIDINAE) et de *Locusta migratoria* Efficacité de *Metarhizium anisopliae* (Mech) (Hypomycètes : Deutromycètes) et effet sur quelques paramètres physiologiques de *Schistocerca gregaria*. Mémoire Magister 235p.
53. **Haskell. G. 1943.** Spatial isolation of seed crops. *Nature* **152**: 591-592 (London).
54. **Hayden H. S., Blomster J., Maggs C. A., Silva P. C., Stanhope M. J. et Waaland J. R., 2003:** Linnaeus was right all along, *Ulvaand Enteromorpha* are not distinct genera, *Eur. J. Phycol.* **38**, 211-294p.
55. **Hegedus, O.O., Pfeifer, T.A., Mulyk, O.S. et Khachatourians, G.G. 1998.** Characterization and structure of the mitochondrial small rRNA gene of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Genome*, **41**: 471. 476p.
56. **Hoe P.K., Bong C.F.J., Jugah K., Rajan A.2009.** Evaluation of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* (Deuteromycotina: Hypomycete) Isolates and their Effects on Subterranean Termite *Coptotermes curvignathus* (Isoptera: Rhinotermitidae). *Am. J. Agric. Biol. Sci.*, **4**, pp: 289-297.
57. **Hoog G.S.D.E., Guarro J., Gene J., Figueras M.J.2000.** Atlas of Clinical Fungi, 2<sup>nd</sup> ed., Vol. 1. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands.
58. **Hsiao Y.M., ko J. L.2001.** Determination of destruxins, cyclic peptide toxins produced by different strains of *Metarhizium anisopliae* and their mutants induced by ethyl methane sulfonate and ultraviolet using HPLC method *Toxicon*, **39**, PMID: 11137544, pp: 837-841.
59. **Hughes, S.J. 1953.** Conidia, conidiophores and classification. *Can Jf Bot*, **31**: 577-659p.

## Références bibliographiques

---

60. **Inglis G.D., Goettel M.S., Butt T.M., Strasser H.**2001. Use of hyphomycetous fungi for managing insect pests. In : Butt T.M., Jackson C., W., Magan N. (eds) *Fungi as Biocontrol Agents: progress, problems and potential*, CABI Publishing, Wallingford, pp: 23-69.
61. **Irwin H. S. and Barneby R. C. (1981)**. Cassieae. Pp. 97-106 in *Advances in Legume Systematic*. Vol. 1 (R. M. Polhill and P. H. Raven, eds.).Royal Botanic Gardens, Kew, England.
62. **J. Boiffin et Choppin de Janvry**, L'implantation de la betterave industrielle, publication INRA, Paris, 1994, p 170.
63. **J Mehta, Naruka R, M Sain, Dwivedi A, D Sharma, Mirza J**, *Asian Journal of Plant Science et de la Recherche*, 2012, 2 (4) :518-523.
64. **Joachim Saizanou**, 2004. Criquets sacrées sauternelles. Défis sud N° 65 page 12.
65. **Kabaluk T., Goettel M., Vernon B., Noronha C. 2001**. Evaluation de *Metarhizium anisopliae* à titre d'agents de lutte biologique contre la larve de taupin centre d'agriculture biologique de Canada.
66. **Kershaw M.J., Moorhouse E.R., Bateman R., Reynolds S.E., Charnley, A.K.**1999. The Role of destruxines in the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* for three species of insect. *J. Invertebr. Pathol.*, 74, pp: 213-223.
67. **Khetan S.K.**2001. *Microbial Pest Control*, 1 st edition. Marcel Dekker.
68. **Kivçak B. and Mert T. (2002)**. Antimicrobial and cytotoxic activities of *Ceratonia siliqua* L. extracts. *Turk J.Biol.* 26:197-200.
69. **Kleespies R.G., Huger A.M., Stephan D., 2000**. Diagnosis and pathology of diseases from locust and other orthoperans. Ed. *Gesellschaft für pflanzenzucht und B.B.A.*, Berlin, 43p.
70. **Kooyman C., Ammati M., Moumen K., Chaouch A. et Zeyd A.**2005. Essai de Green Muscle sur des nymphes du criquet pèlerin dans la Wilaya d'El-Oued Nord-est d'Algérie. *FAO TAC*, n° 715,22p.
71. **Kulling C., Mach R.I., Lorito M. and Kubicek C.P., 2002**: Enzyme diffusion from *Trichoderma atroviride* (5t. *harzianum* pl) to *rhizoctoniasolani* is a prerequisite for triggering of *Trichoderma* ech42 gene expression before mycoparasitic contact. *Applied and Environmental microbiology* (5): 2232-2234 p.
72. **Lahaye M., Robic A., 2007**: Structure and functional properties of ulvan, a polysaccharide from green seaweeds, *Biomacromolecules* 8, 1765-1774p.
73. **Legrand P., Guillaumin J., Lung-Escarmant B. et Botton B., 2005**: L'armillaire et le pourridié-agaric des végétaux ligneux. Inra. 504 p.
74. **LELONG F. (2008)**, Les belles et les bêtes : précis illustré de toxicologie botanique à usage vétérinaire, Thèse de Doctorat, Faculté de Médecine, Nantes, 327p.

## Références bibliographiques

---

75. **Lepoivre P., 2003** : Phytopathologie bases moléculaires et biologiques des pathosystèmes et fondements des stratégies de lutte, Ed. Presse agronomique Gembloux, 432 p.
76. **Leuchtman, A. ; Petrini, O. & Samuels, G. 1996.** Isozyme subgroups in *Trichoderma* section *Longibrachiatum*. *Mycologia*, 88 (3) : 384-394
77. **Leuchtman, A. ; Petrini, O. & Samuels, G. 1996.** Isozyme subgroups in *Trichoderma* section *Longibrachiatum*. *Mycologia*, 88 (3) : 384-394 p.
78. **Liang, Z.-Q., Liu, A.-Y. & Liu, J.-L. (1991)** [A new species of the genus *Cordyceps* and its *Metarhizium* anamorph.] *Acta Sinica* **10**: 257-262 [In Chinese].
79. **Liette I., 2002** : Le biofongicide *Trichoderma* (rootshield) contre les maladies racinaires et la moisissure grise dans la fraise : tout un potentiel, présentation orale MAPAQ St-Rémi, Canada, 3p.
80. **Lillard-Roberts, S. 2004.** *Trichoderma harzianum*. Mold-Help [en ligne]. [consulté le 21 octobre 2004]. Disponible sur : <http://mold-help.org/content/view/431/>
81. **Lipa, J.J. 1975.** White muscardines (*Beauveria* sp.). In an outline of insect pathology. Foreign Sci. Publ. Dept NCSTEL, Warsaw, Poland. 139-142p.
82. **Liu B.L., Rou T.M., Rao Y.K., Tzeng Y.M. 2007.** Effect of PH and aeration rate on the production of Destruxins A and B from *Metarhizium anisopliae*. *Int. J. Applied Sci. Eng.*, 5: 17-26.
83. **Liu, H., Skinner, M. et Parker, B.L. 2003b.** Bioassay method for assessing the virulence of *Beauveria bassiana* against tarnished plant bug, *Lygus lineolaris* (Hem, Miridae). *J. Appl. Entomol.* 127: 299-304p.
84. **Lomer C.J., Bateman R.P., Johnson D.L., Langewald J., Thomas M.B. 2001.** Biological control of locusts and grasshoppers. *Annual Review of Entomology*, 46, pp: 667-702.
85. **Lord J.C. 2005.** From Metchnikoff to Monsanto and beyond: the path of microbial control. *Journal of Invertebrate Pathology* 89, pp: 19-29.
86. **LOGUE G., LECHENET J., RIVIERE A., (1987),** précis de toxicologie clinique vétérinaire, Edition du point vétérinaire, Maison Alfort, 208p.
87. **Lynch J.M., Wilson K.L., Ousleyet M.A., & Whipps J.M., 1991b:** Response of lettuce to *Trichoderma* treatment. *Lett. Appl. Microbiol.* 12, 56-61p.
88. **M.B.A.R.I., 2001:** *Ulva*, Marine Botany, Monterey bay aquarium research institute, Kirby, 7p.
89. **Magalhaes, B.P., Butt T.M., Humber, RA, Shields, EJ. et Roberts, D.W. 1989.** Formation of appressoria in vitro by the entomopathogenic fungus *Zoophthora radicans* (Zygomycetes: entomophthorales). *J. Inv. Pathol.* 55: 284-288p.
90. **Maletić R., Jevdžović R., 2007:** Sowing date –the factor of yield and quality of Fenugreekseed (*Trigonella foenum graecum* L). *Journal of Agricultural Sciences* Vol. 52, No 1 pp 1-8.

## Références bibliographiques

---

91. **Marinkovic B., Marin P.D., knezevic-Vukcevic J.M.D. et Brkic D., 2002:** Activity of essential oils of three *Micromeria* species (Lamiaceae) against micromycetes and bacteria, *Phytother.Res.*16 (4), 336-339p.
92. **Marwick J.D., Wight P.C. and Burgess J.G. 1999.** Bioprocess identification for production of novel marine bacterial antibiotics .Through bioreactor operation and design. *Mar. Biotechnol.* **12:** 495-507.
93. **Mohamed-benkada Mustapha. 2006.** Evaluation du risque fongique en zonesconchylicoles : substances toxiques de souches marines du genre *Trichoderma*. Th.:Pharmacie : Nantes : 9,10,11,12,13,p.
94. **Moumene S., Boukhalfa R., Saddek D., Bencheikh K., Zanonne S., Bellatreche M., Houmani Z.,** Bio-Stimulant effect of two Algerian isolates of *Trichoderma* spp on tomato (*Solanum lycopersicum*) in pots and their eliator effect on tuta absoluta, (2013a).
95. **Moumene S., Boukhalfa R., Saddek D., Bencheikh K., Zanonne S., Bellatreche M., Houmani Z.,** 2<sup>nd</sup> Symposium on organic Green house Horticulture (ISHS), ITAB and GAB on October 28-31, (2013b), Avignon.
96. **Mugnai, L., Bridge, P.D. and Evans, H.C. 1989.** A chemotaxonomic evaluation of the genus *Beauveria*. *Myc. Res.* 92:199-209.
97. **NEDELEC P.Y. (1993), Larousse du jardin, Paris, 607p.**
98. **Neil., Donald.2005.**Fungus fatal to mosquito May and global war on Malaria. The New York times Vol 104, pp: 135-151
99. **Oplachenova G. et Obreshkova D., 2003:** Comparative studies on the activity of basil-an essential oil from *Ocimum basilicum* L. against multidrug- resistant clinical isolates of the genera *Staphylococcus*, *Enterococcus*, and *Pseudomonas* by using different test methods, *J. Microbiol. Methods* 1785, 1-6p.
100. **Padrini P. et Lucheroni M.T., 1996.** Le grand livre des huiles essentielles –guide pratique pour retrouver vitalité, bien-être et beauté avec les essences. Ed : De Vecchi, Paris. Pages 11, 15, 61 et 111.
101. **Paranagama P. A., Abeysekera K. H. T., Abeywickrama K. et Nugaliyadde L., 2003:** Fungicidal and anti-aflatoxigenic effects of the essential oil of *Cymbopogon citrates* (DC.) Stapf. (lemongrass) against *Aspergillus flavus* Link Isolated from stored rice, *Letter in Applied Microbio.* 37, 86 – 90p.
102. **Pedras M.S.C., Zaharia L.L., Ward D.E, 2002.** The destruxins: Synthesis, biosynthesis, biotransformation and biological activity. *Phytochemistry*, 59, pp: 579-596.
103. **Petch, T. (1935)** Notes on entomogenous fungi. *Transactions of the British Mycological Society* **19:** 161-194.
104. **Pfeifer, T.A. et Khachatourians, G.G. 1993.** Electrophoretic karyotype of the entomophatogenic deuteromycete *Beauveria bassiana*. *J. Inv. Pathol.* 61,231-235p.

## Références bibliographiques

---

105. **Philippeau G., 1986.** Comment interpréter les résultats d'analyse en composantes principales (ACP), Institut technique des céréales et des fourrages, Edit. Paris, Institut technique des céréales et des fourrages (ITCF), 63 p.
106. **Pivkin, M. V. 2000** Filamentous fungi associated with holoturians from the Sea of Japan, off the Primorye coast of Russia. *Biol. Bull.*, 198 (1) : 101-109 p.
107. **Plant, R. et Freudenberger, D. (2005).** Changes in Global Agriculture: A Framework for Diagnosing Ecosystem Effects and Identifying Response Options. *In World Wildlife Fund.WWF*, [Enligne]. [http://assets.panda.org/downloads/wwf\\_mpo\\_final\\_submitted.pdf](http://assets.panda.org/downloads/wwf_mpo_final_submitted.pdf) (Page consultée le 7 février 2010).
108. **Pouvreau A. 2004.** *Les insectes pollinisateurs*. Delachaux & Niestlé, 157 p.
109. **Priolo A., Waghorn G. C., Lanza M., Biondi L. and Pennisi P. (2000).** Polyethylene glycol as a means for reducing the impact of condensed tannins in carob pulp: Effects on lamb growth performance and meat quality. *J. Anim. Sci.* 78: 810- 816p.
110. **Prior C. 1992.** Discovery and characterization of fungal pathogens for locust and grasshopper control, in *Biological Control locusts and Grasshopper*; edited by C. J. Lomer and C. J. Lomer and C. Prior (CAB International, Wallingford, Uk, pp. 159-180.
111. **Quezel P. et Santa S. (1962/63).** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méditerranéennes. Tome 1. Edit CNRS. Paris.
112. **Rangel D.E.N., Braga G.U.I., Anderson A.j.; Roberts D.w. 2005.** Variability in conidial thermotolerance of *Metarhizium anisopliae* isolates from different geographic origins. *J Invertebr Patho Beal* 88; pp:116-12.
113. **Rao Y.k.; Tsou C.H.; Tzeng Y. M. 2006.** Antioxidants enhanced production of destruxin E from cultivation of *Metarhizium anisopliae*. *Applied Microbial. Biotechnol.*, 73, pp: 519-524.
114. **Rapilly, 1968.** *Éléments d'écologie fondamentale*. Ed. Mac. Graw. Hill, Paris, 197p.
115. **Regnault R., 2008:** Sauge officinale, *J. Serb. Chem. Soc.* 615, 28-188p.
116. **Rejeb M. N. (1995).** Le caroubier en Tunisie: Situations et perspectives d'amélioration. Dans: *Quel avenir pour l'amélioration des plantes?* Edit. AUPELF-UREF. John LibbeyEurotext. Paris. pp: 79-85.
117. **Rejeb M. N., Laffray D. and Louguet P. (1991).** Physiologie du caroubier (*Ceratonia siliqua* L.) en Tunisie. *Physiologie des arbres et arbustes en zones arides et semi-arides*, Group d'Etude de l'Arbre, Paris, France. P:417-426.
118. **RENAUD V. (2003).** Tous les légumes courants, rares ou méconnus, cultivables sous nos climats Les éditions Eugen Ulmer Paris p 224.

## Références bibliographiques

---

119. **Rifai, M.A.** 1969. A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycologia. Papers*, 116:1-56
120. **Robert A. et Lobstein A., 2005.** Plantes aromatiques : épices, aromates, condiments et huiles essentielles. Ed : Tec & Doc, Lavoisier, Paris, 522 p.
121. **Roberts, D.W. (1967)** Entomogenous fungi as microbial control agents: some areas for research emphasis. *Proceedings of the Joint U.S. Japan Seminar on Microbial Control of Insect Pests*, Fukuoka.
122. **Roquebert, M.-F. , 1996.** Interactions antagonistes des *Trichoderma* sp. dans les systèmes telluriques : Systématique, biologie et écologie des organismes. Comptendu des 4èmes Rencontres en Toxinologie, Paris, 13-15.
123. **Rouy, 1893-1913.** Flore de France ou description des plantes qui croissent spontanément en France, en Corse et en Alsace - Lorraine, Tome IV. Société des sciences naturelles de la Charente - Inférieure.
124. **Saccardo, P.A. 1886.** *Sylloge fungorum omnium hucusque cognitorum*. Pavia 4.
125. **Samuels, G. J.; Petrini, O. & Manguin, S.** Morphological and macromolecular characterization of *Hypocrea schweinitzii* and its *Trichoderma* anamorph. *Mycologia*, 1994, 86: 421-435 p.
126. **Santelices B. et Ugarte R., 1987:** Algal life-history strategies and resistance to digestion, *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 35, 267-275p.
127. **Sattar A. A., Bankova V., Kujumgiev A., Galabov A., Ignatova A. et Todorova C., 1995:** Chemical composition and biological activity of leaf exudates from some Lamiaceae plants, *Pharmazie* 50, 62-65p.
128. **Schaffner, 1993.** Les plantes médicinales et leurs propriétés, Manuel d'herboristerie, Delachaux & Niestlé.
129. **Shimazu, M. (1989)** *Metarhizium cylindrospora* Chen et Guo (Deuteromycotina: Hyphomycetes), a causative agent of an epizootic on *Graptosaltria nigrofuscata* Motchulski (Homoptera: Cicadidae). *Applied Entomology and Zoology* 24: 430-434.
130. **Stammati A., Bonsi P., Zucco F., Moezelaar R., Alakomi H-L., Wright A., 1999:** Toxicity of Selected Plant Volatiles in Microbial and Mammalian Short-term Assay, *Food and Chem. Tox.* 37, 813-823p.
131. **Starnes, R. L., C. L. Liu et P. G. Marone. 1993.** History, use and future of microbial insecticides. *Amer. Entomol.* 39: 83-91.
132. **Strasser H., Vey A., Butt T. M. 2000.** Are there any risks in using entomopathogenic fungi for pest control, with particulier reference to the bioactive metabolites of *Metarhizium*, *Tolyplodadium* and *Beauveria* species, *Biocontrol Science and Technology* 10, pp: 717-735.
133. **Subramanian, C.V., 1983.** *Hyphomycetes: taxonomy and biology*. Academic Press. New York, 28p.

## Références bibliographiques

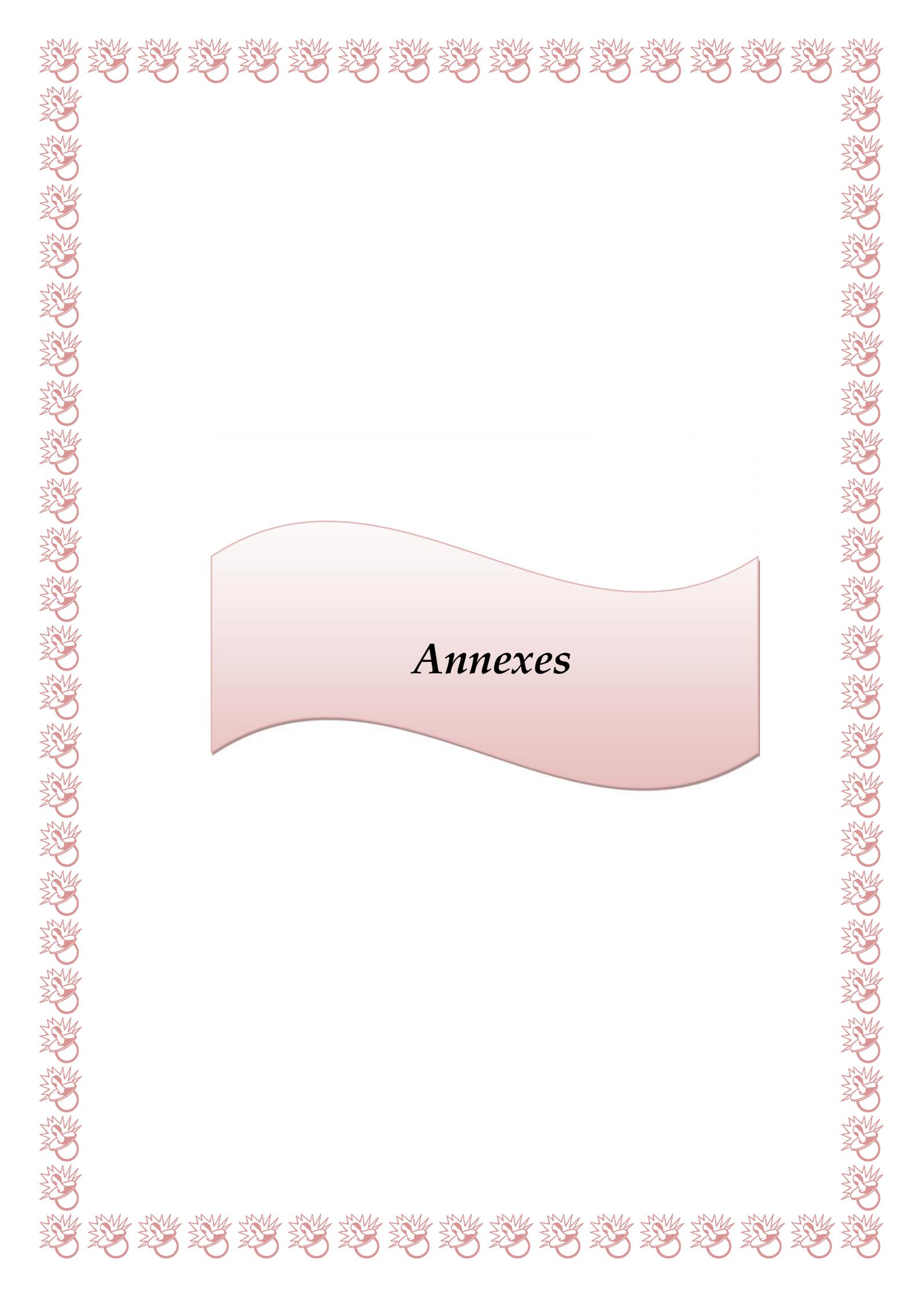
---

134. **Sugiyama J., 1987:** Pleomorphic fungi: the diversity and its taxonomic implications. Tokyo, Elsevier, 325p.
135. **Tadela, T. et Pringle, K.L. 2003.** Food consumption by *Chilo partellus* (Lepidoptera: Peralidae) larvae infected with *Beauveria bassiana* and *Metharizium anisopliae* and effects of feeding natural versus artificial diets on mortality and mycosis. J. Inv. Pathol. 84: 220-225p.
136. **Tajick Ghanbary A., Asgharzadeh A.R., Hadizadeh., Mohammadi Sharif M. 2009.** A Quick Method for *Metarhizium anisopliae* isolation from Cultural Soils, American Journal of Agriculture and Biological Sciences 4 (2);, pp: 1557-4989.
137. **Talbot, P.H.B. 1971.** Principes of Fungal Taxonomy. Mac Millian, Press, London. 78p.
138. **Todorova, S.I. 1998.** Caractérisation et utilisation de *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin dans les programmes de lutte biologique. Thèse de Doctorat. Université du Québec à Montréal.
139. **Todorova, S.I., Cloutier, C., Côté, I. et Coderre, D. 2002a.** Pathogenicity of six isolates of *Beauveria bassiana* (balsamo) vuillemin (Deuteromycotina, hyphomycetes) to *Perillus bioculatus* (Hem: Pentatomidae). J. Appl. Ent. 126: 182-185p.
140. **Todorova, S.I., Coderre, D., Côté, I. et Vincent, e. 2002b.** Screening of *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes) isolates against *Choristoneura rosaceana* (Lepidoptera: Tortricidae). Cand. Entomol. 134 : 77-84p.
141. **Todorova, S.I., Côté, I. et Coderre, D. 1996.** Evaluation of the effects two *Beauveria bassiana* (Balsamo) vuillemin strains on the development of *Coleomegilla maculatae lengi* Timberlake (col, Coccinellidae). J. Appl. Ent. 120: 159-163p.
142. **Tong-kwee, L., Muhamad, R., Fee Gait, C. and Lan Chiew, C. 1989.** Studies on *Beauveria bassiana* isolated from the cocoa mirid, *Helopeltis theobromae*. Crop Protection 8: 358-362.
143. **Tucker S. C. (1992a).** The developmental basis for sexual expression in *Ceratonia siliqua* (Leguminosae:Caesalpinoideae: Cassieae). Am. J. Bot. 79(3): 367-327p.
144. **Tucker S. C. (1992b).** The role of floral development in studies of legume evolution. Can. J. Bot. 70:692-700p.
145. **Tulloch, M. (1976).** The genus *Metarhizium*. Transactions of the British Mycological Society 66: 407-411.
146. **Tzean, S.S., Hsieh, L.S., Chen, J.L. & Wu, W.J. (1993)** *Nomuraea cylindrospora* comb. nov. Mycologia 85: 514-519.

## Références bibliographiques

---

147. **U.S. Congress, Office of Technology Assessment (1995).** Biologically based technologies for pest control. In Princeton University. *Biologically based technologies for pest control*, [En ligne]. <http://www.princeton.edu/~ota/disk1/1995/9506/9506.PDF> (Page consultée le 20 janvier 2010).
148. **Veen, K.H. (1968).** Recherches sur la maladie, due a *Metarrhizium anisopliae* chez le cricket pelerin. *Mededingen Landbouwhogeschool Wageningen, Nederland* **68**: 1-77.
149. **Vienat-Nikodemski S. (1994).** Isolement et caractérisation des polysaccharides des jus concentrés de betterave sucrière. *Thèse de Doctorat, Biotechnologie et Industrie Alimentaires, Institut National Polytechnique de Lorraine, I.N.P.L. - Nancy.*
150. **VILLENEUVE F. (1999).** La carotte (pp45-63). Dans Technologie des légumes par TIRILLY Y et BOURGEOIS CM Collection science et techniques agroalimentaires. Edition Lavoisier Tec et Doc Paris.p558
151. **Voelker F. and Altaba S. (2001).** Nitrogen source governs the patterns of growth and pristimycine production in *Streptomyces pristinaspirales*. *Microbiology*. **147**: 2447-2459.
152. **Vuillemin, P., 1912 -** *Beauveria*, nouveau genre de Verticilliacées. - *Bull. Soc. bot. Fr.* **29**: 34-40.
153. **Weeden, C.R., Shelton, A.M. et Hoffman, M.P. (2007).** Biological Control: A Guide to Natural Enemies in North America, [En ligne]. <http://www.nysaes.cornell.edu/ent/biocontrol/info/needstatus.html> (Page consultée le 3 décembre 2009).
154. **Weiser, J. 1972.** *Beauveria* Vuill. In. *Nemoci hmyzu. Naklad. Ceskoslov. Akademie, parapha.* 361-377p.
155. **Wichtl Max, 2003.** (2ème édition française) - *Plantes thérapeutique : tradition, pratique officinale, science et thérapeutique* - Editions Tec & Doc, Editions médicales internationale.
156. **Wraight S.P., Jackson M.A., De Kock S.L. 2001.** Production, stabilization and formulation of biocontrol agents. In: Butt, T.M., Jackson, C. and Magan, N., (eds). *Fungi as Biocontrol Agents, Progress, Problems and potential.* CABI Publishing, New York. pp : 253-288.
157. **Wraight, R. 1. et Roberts, D. W. 1987.** Insect control effort with fungi. *Devel. Industr. Microbiol.* **28**: 77-87p.
158. **Zakaria et Sagnia, 2003 in Bissad F., Mahmoud Y. et Doumandji-Mitiche B., (2010)** Effet d'un champignon entomopathogène *Metarrhizium anisopliae* Var. *Acridium* Sur la cuticule de Criquet pèlerin (*Schistocerca gregaria*, Forskal, 1775). *European journal of scientific research* Vol.45 No.1 (2010), pp : 055-063.

A decorative border consisting of a repeating pattern of red icons, each depicting a hand holding a heart, surrounds the central content.

# *Annexes*

## Annexe 1.

### A. Matériel non biologique utilisé

#### 1. Verreries et accessoires

- Ballons
- Béchers
- Bec bunsen
- Boîtes de Pétri
- Pipettes
- Pipettes Pasteur
- Micropipette
- Tube à essai
- Parafilm
- Cellule de Malassez
- Entonnoir
- Papier filtre
- Scalpel
- Lames et lamelles
- Ciseaux

#### 2. Appareillage

- Balance électronique
- Microscope photonique
- Hotte
- Broyeur
- Etuve
- Autoclave
- Agitateur

### B. Composition du milieu de culture PDA

<b>GÉLOSE POMME DE TERRE GLUCOSE (PDA)</b>	
Pommes de terre	200 g
Glucose	20 g
Agar	20 g
Eau	1000 ml
pH final	5,6

## Annexe 2.

Tableau 5. Etude macroscopique de *Trichoderma* (T4) sur différents milieux à 25°C après le 6<sup>ème</sup> jours.

Milieux	Face	Revers	Aspect	croissance	Exsudats
PDA	Vert	Pale jaune	Un peu dense, velouté et plat	Rapide	+
Malva	Vert	Ambre jaune	Très dense, rugueuse, filamenteux et plat.	Très rapide	+++
Betterave	Vert	Pourpre	Très dense, rugueuse, filamenteux, plat.	Très rapide	+++
Citron	Vert	Jaune	Dense, rugueuse, filamenteux, plat.	Lente au début	++
Caroubier	Vert	Marron	Eparpillé, rugueuse, velouté, plat.	Lente au début	++
Fenugrec	Vert	Marron clair	Eparpillé, rugueuse, velouté, plat.	Rapide	++
Petit pois	Vert	Pale jaune	Très dense, rugueuse, filamenteux, aérienne.	Très rapide	+++
Carotte	Vert	Jaune	Dense aux extrémités, rugueuse, velouté, plat.	Rapide	-
Ulva	Vert	jaune clair	Dense, rugueuse, filamenteux, aérienne.	Lente	-

- : Absent/ + : Abondant/ ++ : Un peu plus abondant/ +++ : Très abondant

Tableau 6. Etude macroscopique de *Trichoderma* (T8) sur différents milieux à 25°C après le 6<sup>ème</sup> jours.

Milieux	Face	Revers	Aspect	croissance	Exsudats
PDA	Vert	Pale jaune	Dense aux extrémités et au milieu, velouté et plat	Rapide	+
Malva	Vert	Ambre jaune	Très dense, rugueuse, filamenteux et plat.	Très rapide	+++
Betterave	Vert	Pourpre	Très dense, rugueuse, filamenteux, plat.	Très rapide	+++
Citron	Vert	Jaune	Dense, rugueuse, filamenteux, plat.	Lente au début	++
Caroubier	Vert	Marron	Eparpillé, rugueuse, velouté, plat.	Lente au début	++
Fenugrec	Vert	Marron clair	Eparpillé, rugueuse, velouté, plat	Rapide	++
Petit pois	Vert	Pale jaune	Très dense, rugueuse, filamenteux, aérienne.	Très rapide	+++
Carotte	Vert	Jaune	Dense aux extrémités, rugueuse, velouté, plat.	Rapide	-
Ulva	Vert	jaune clair	Dense, rugueuse, filamenteux, aérienne.	Lente	-

- : Absent/ + : Abondant/ ++ : Un peu plus abondant/ +++ : Très abondant

**Tableau 7.** Etude macroscopique de *Beauveriasp.* sur différents milieux à 25°C après le 6<sup>ème</sup> jours.

Milieux	Face	Revers	Aspect	croissance	Exsudats
<b>PDA</b>	Blanche	Pale jaune	Compactée en touffe, lisse, cotonneuse, semi bombée.	Lente	-
<b>Malva</b>	Blanche	Ambre jaune	Très dense, lisse e cotonneuse t, très bombée.	Très rapide	+++
<b>Betterave</b>	Blanche	Pourpre	Très dense, lisse et cotonneuse, bombée.	Rapide	++
<b>Citron</b>	Blanche	Jaune	Eparpillé, lisse et cotonneuse, semi bombée.	Lente	-
<b>Caroubier</b>	Blanche	Marron	Non dense, cotonneuse, plat.	Lente	-
<b>Fenugrec</b>	Blanche	Marron clair	Eparpillé, cotonneuse, semi bombée.	Lente	-
<b>Petit pois</b>	Blanche	Pale jaune	Très dense, lisse et cotonneuse, bombée.	Rapide	++
<b>Carotte</b>	Blanche	Jaune	Non dense, lisse, plat.	Lente	-
<b>Ulva</b>	Blanche	jaune clair	Compactée en touffe au milieu, lisse et bombée.	Lente	-

- :Absent/ + : Abondant/ ++ : Un peu plus abondant/ +++ :Très abondant

**Tableau 8.** Etude macroscopique de *Metarhiziumsp.* sur différents milieux à 25°C après le 6<sup>ème</sup> jours.

Milieux	Face	Revers	Aspect	croissance	Exsudats
<b>PDA</b>	Vert	Pale jaune	Dense, rugueuse, velouté, semi bombée.	Rapide	+
<b>Malva</b>	Vert	Ambre jaune	Très dense, rugueuse, velouté, semi bombée.	Très rapide	+++
<b>Betterave</b>	Vert	Pourpre	Très dense, rugueuse, filamenteux, semi bombée.	Très rapide	+++
<b>Citron</b>	Vert	Jaune	Eparpillé, rugueuse, filamenteux, aérienne, semi bombée.	Lente	-
<b>Caroubier</b>	Vert	Marron	Moins dense, rugueuse, velouté, semi bombée.	Un peu lente	-
<b>Fenugrec</b>	Vert	Marron clair	Très dense, rugueuse, filamenteux, semi bombée.	Très rapide	+++
<b>Petit pois</b>	Vert	Pale jaune	Très dense, rugueuse, filamenteux, aérienne, semi bombée.	Très rapide	+++
<b>Carotte</b>	Vert	Jaune	Non dense, rugueuse, velouté, semi bombée.	Rapide	-
<b>Ulva</b>	Vert	jaune clair	Non dense, rugueuse, filamenteux, semi bombée.	Lente	-

- :Absent/ + : Abondant/ ++ : Un peu plus abondant/ +++ :Très abondant

### Annexe 3.

Tableau 9. Résultats obtenus après 6ème jours sur différents milieux à 25°C.

	T4	T8	Bv	Met
<b>Témoin PDA</b>				
<b>Malva</b>				
<b>Betterave</b>				
<b>Citron</b>				
<b>Carotte</b>				
<b>Caroubier</b>				
<b>Fenugrec</b>				
<b>Petit pois</b>				
<b>Ulva</b>				

