**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE**

**MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR**

**ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE**

**UNIVERSITE DR YAHIA FARES DE MEDEA**

**FACULTE DES SCIENCES**

**Présenté pour l'obtention du diplôme de Master académique**
**En : Sciences de la nature et de la vie**
**Spécialité: Phytopathologie**

**Présenté Par :** - Benaissa Fatiha

**-** Lebel Sarah

# THEME :

# Evaluation de la pathogénicité du Green Muscle *Metarhizium anisopliae* sous différentes conditions biotiques et abiotiques. Mise en évidence d'un essai de lutte biologique

**Devant le jury composé de :**

| | | | |
|---|---|---|---|
| M$^{me}$ : OUTTAR F. | MCB | à l'U.Y.F.M | Promotrice. |
| M$^{r}$ : MAHDJOUBI Dj. | MCB | à l'U.Y.F.M | Co-Promoteur. |
| M$^{r}$ : AINAS M. | MCB | à l'U.Y.F.M | Examinateur. |
| M$^{me}$ : BELAMEUR Z. | MCB | à l'U.Y.F.M | Examinatrice. |

**Année universitaire : 2020-2021**

# *Remerciements*

Nous tenons à remercier notre promotrice madame OUTTAR F., et notre Co-promoteur Mr MAHDJOUBI Dj., pour leurs précieux conseils et leur aide durant toute la période du travail.

Nous remercions très sincèrement, les membres de jury, M$^{r}$ AINAS M. et M$^{me}$ BELAMEUR Z., d'avoir accepté d'examiner notre travail

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

# *Dédicace*

Avec respect et amour on dédie ce mémoire :

A nos très chers  parents.

A toute la famille Benaissa et Lebel

A  toutes nos amies et nos collègues de notre promotion :

<<Phytopathologie >>

*FATIHA et SARAH*

# Sommaire

**Sommaire**

**Introduction générale** ……...

**Chapitre I : synthèse bibliographique**

**Partie 01** : Les données bibliographiques sur le puceron noir de la fève (*Aphis fabae)* ……..

I.1 Généralité sur le puceron noir de la fève (*Aphis fabae)* …….

I.1.1 Position taxonomique du puceron noir de la fève (*Aphis fabae)* ……..

I.1.2 Description morphologique……

I.1.3 Cycle biologique ……..

I.1.4 Répartition géographique de puceron noir de la fève (*Aphis fabae)*

- Dans le monde……
- En Algérie…….

I.1.5 Importance économique…….

I.1.6 Les moyens de lutte contre les pucerons noirs de la fève (*Aphis fabae)* ……

- La lutte préventive……
- La lutte curative……
  - La lutte chimique ……
  - La lutte biotechnique
  - La lutte biologique……
    Par les insectes auxiliaires
    Par les bio-insecticide

**Partie 02** : Les données bibliographiques sur le champignon *Metarhizium anisopliae*……

I.1 Généralité sur le champignon *Metarhizium anisopliae*……

I.2 Taxonomie et classification ……

I.3 Identification et Morphologie ……

I.4 Reproduction……

I.5 symptomatologie et Mode d'action

- La phase d'adhésion……
- La phase de germination……
- Phase de pénétration

I.6 Les voies d'infection par le champignon *Metarhizium anisopliae*

II. Facteurs affectant l'efficacité de champignon *Metarhizium anisopliae*

II.1 Facteurs liés aux pathogènes

II.2 Facteurs dépendant de l'hôte

II.3 Facteurs de l'environnement

a. Rayonnement solaire
b. Température
c. Humidité
d. L'effet de sol

III Avantage de l'utilisation de *M. anisopliae*

IV La production et la conservation de *M. anisopliae*

V Formulation a base de champignon entomopathogène *M. anisopliae*

VI Les assai biologiques et l'évaluation de l'infection et l'utilisation de *M. anisopliae* dans la lutte biologique

**Chapitre II : Matériels et Méthodes**

I Matériels et produits utilisés

I.1 Matériel biologique

- le champignon *Metarhizium anisopliae*

- les insectes

I.2 Matériel non biologique
II Méthodes utilisées
II.1 Purification de *Metarhizium anisopliae*
II.1.1 Préparation d'inoculum (suspension entomopayhogènes de *M. anisopliae*)
II.2 Influence des facteurs abiotiques sur la croissance mycélienne de champignon entomopathogène *M. anisopliae*
II.2.1 Influence de Température sur la croissance mycélienne de *M. anisopliae*
II.2.2 Influence de l'humidité relative
II.2.3 Influence du milieu de culture sur la croissance mycélienne de *M. anisopliae*
II.2.4 Influence du Ph sur la croissance mycélienne de *M. anisopliae*

**Chapitre III : Résultats et discussion**

III.1 Effet de la température sur la croissance mycélienne de *M. anisopliae*
III.2 Effet du milieu de culture sur la croissance mycélienne de *M. anisopliae*
III.3 Effet du Ph sur la croissance mycélienne de *M. anisopliae*

**Conclusion**
**Références bibliographiques**
**Annexe**

# Résumé

# Evaluation de la pathogénicité du Green Muscle *Metarhizium anisopliae* sous différentes conditions biotiques et abiotiques. Mise en évidence d'un essai de lutte biologique

**Résumé**

Notre travail consiste à étudier l'influence de quelque facteurs abiotiques tel que le milieu de culture, la température et le sur le développement mycélien d'un champignon entomopathogene *M. anisopliae* et dans la même vision à connaitre l'impact de ces paramètres sur l'efficacité de ce champignon contre les insectes ravageur et son application dans la nature. Pour réaliser cette étude, nous avons commencé nos essais par la préparation des milieux et de l'inoculum entomopathogène suivi par la purification de la souche fongique à partir de l'isolement et la multiplication afin d'obtenir une culture monosporique pure. Ensuite l'étude de l'influence des facteurs abiotiques sur la croissance mycélienne de notre cryptogame. L'utilisation de *M.anisopliae* dans le terrain et dans la lutte biologique à un rôle considérable dans la régulation des populations des insectes ravageur et plusieurs études révélant une forte activité toxique de ce champignon vis-à-vis important ravageur de culture afin de réduire la présence de ces insectes. La lutte biologique est une alternative à la lutte chimique pour une meilleure protection de l'environnement.

**Mots clés :** champignon entomophatogène, facteurs abiotique, développement mycélien, *M anisopliae*, lutte biologique.

# Evaluation of the pathogenicity of Green Muscle *Metarhizium anisopliae* under different biotic and abiotic conditions. Demonstration of a biological control test

**Abstract**

Our work consists in studying the influence of some abiotic factors such as the culture medium, the temperature and the PH on the mycelial development of an entomopathogenic fungus *M. anisopliae* and in the same vision at know the impact of these parameters on the effectiveness of this fungus against pest insects and its application in nature. To perform this study, we started our trials by preparing the media and entomopathogenic inoculum followed by purification of the fungal strain from isolation and multiplication to obtain a pure monosporic culture. Then the study of the influence of abiotic factors on the mycelial growth of our cryptogam. The use of *M. anisopliae* in the field and in biological control has a considerable role in the regulation of insect pest populations and several studies revealing a strong toxic activity of this fungus vis-à-vis an important crop pest in order to reduce the presence of these insects. Biological control is an alternative to chemical control for better protection of the environment.

**Key words:** entomophatogenic fungus, abiotic factors, mycelial development, *M anisopliae*, biological control.

تقييم إمراضية العضلة الخضراء ***Metarhizium anisopliae*** تحت ظروف حيوية وغير حيوية مختلفة. عرض اختبار المكافحة البيولوجية


ملخص:

**يتكون عملنا من دراسة تأثير بعض العوامل اللاأحيائية مثل وسط الاستزراع ودرجة الحرارة ودرجة الحموضة على التطور الفطري للفطر الممرض للحشرات** *M. anisopliae* **وفي نفس الرؤية لمعرفة تأثير هذه المعلمات على فاعلية هذه الفطريات ضد الآفات الحشرية وتطبيقاتها في الطبيعة. لإجراء هذه الدراسة ، بدأنا اختباراتنا من خلال تحضير الوسط والتلقيح الممرض للحشرات ثم التنقية من السلالة الفطرية من العزلة والتكاثر من أجل الحصول على ثقافة أحادية البوغ نقية. ثم دراسة تأثير العوامل اللاأحيائية على النمو الفطري في الكريبتوجام لدينا.استخدام** *M.anisopliea* **في الميدان وفي المكافحة البيولوجية له دور كبير في تنظيم تجمعات الحشرات الآفات والعديد من الدراسات كشفت عن نشاط سام قوي لهذه الفطريات تجاه آفة المحاصيل الرئيسية من أجل تقليل وجود هذه الحشرات.المكافحة البيولوجية هي بديل للمكافحة الكيميائية من أجل حماية أفضل للبيئة.**



الكلمات المفتاحية: **الفطريات المولدة للحشرات ، العوامل اللاذعة ، التطور الفطري ،**

***M anisopliae*** **، المكافحة البيولوجية**

# Introduction

## Introduction

La lutte microbiologique, c'est l'utilisation de micro-organismes et virus contre d'autres micro-organismes, mais aussi contre des nématodes, des insectes, des plantes adventices ou invasives. Moins connue du public, elle apparaît avec le développement de la microbiologie et de la pathologie végétale à la fin du 19ème siècle. L'idée que des microorganismes pathogènes d'insectes, produisant des maladies chez les ravageurs, puissent être utilisés pour les contrôler fut proposée par Le Conte (1872) aux Etats-Unis et Pasteur (1874) en France, rejoints en cela par Metchnikov, Krassil'schik, Paillot et d'Hérelle, que l'on compte au nombre des précurseurs de cette forme de lutte. Il faudra cependant attendre le milieu du 20ème siècle et les développements technologiques de moyens de production de ces microorganismes pour en voir les premiers succès avec les premières productions commerciales de bacille de Thuringe, une bactérie pathogène d'une grande variété d'insectes.

Parmi les espèces utilisées dans la lutte biologique contre les ravageurs des cultures il y a les champignons entomopathogènes (Papierok et Hajek 1997). L'utilisation de certains de ces champignons a donné des résultats satisfaisants contre plusieurs espèces d'insectes (Yee et Lacey 2005 ; Ekesi et al. 2003) et le genre de *Metarhizium* et *Beauveria* sont les plus utilisés en lutte biologique. En particulier le *M. anisopliae* a fait l'objet de nombreux travaux qui concernent le mode d'infestation du champignon (Hajek et Leger 1994),les mécanismes de la toxicité de l'insecte (Clarkson et Charnley 1996) , la pénétration des spores qui varie selon le degré de contamination et l'épaisseur de la cuticule de l'hôte (Brooks et al. 2004). Plusieurs produits phytosanitaires commerciaux destinés à la lutte contre différents types de ravageurs des cultures ont été extraits à partir de ce champignon (Butt et al.1994). Ces produits sont caractérisés par la présence de toxines appelées les destruxines sécrétées essentiellement par *M. anisopliae* (Vey et al. 2001).

Dans cette optique beaucoup travaux sont menées, citant en Algérie les travaux de travaux de Hallouane (1997), Bissad (1998), Benssaad, (1999), Haddadj (2001), Bissad (2002), Kaidi (2004), Hemour (2005), Outtar(2006),Djezzar (2007), Kaidi (2007), Hallouane (2008), Hemour (2009), Outtar (2009) et Outtar (2015). Dans le monde, nous pouvons citer les travaux de Bawin et al .,(2014), proposant l' utilisation de la technique de micro-injection pour l'évaluation de la toxicité fongique dans le contrôle des moustique, et ceux réalisés par Bateman et al. (1998), Gillespie et al. (1999), Arthurs et Thomas (2000), Blanford et Thomas (2001), Seymoun et al. (2002), Ouedraogo et al, (2004), Vander Valk (2007).

Dans ce contexte, notre travail est orienté vers un objectif visant à étudier l'influence de quelques facteurs abiotiques sur la croissance mycélienne du champignon entomopathogène *metarhizium anisopliae* dans le cadre de la lutte biologique.

Le présent travail comprend trois chapitres. Le premier est consacré à un aperçu général sur les champignons entomopathogènes d'une part et sur *Metarhizium anisopliae* d'une autre part. Le second chapitre porte sur le matériel et les méthodes que nous avons utilisés. Le troisième chapitre traite les résultats et les discussions trouvés lors de notre travail. Enfin en termine par une conclusion générale.

# Chapitre I :

# Synthèse bibliographique

## Partie I : Données bibliographiques sur le champignon entomopathogène *Metarizium anisopliae*

### I.1 Généralité sur le champignon *Metarizium anisopliae*

En Algérie, ce champignon a été isolé la première fois à partir d'un criquet pèlerin capturé au niveau d'un pivot à la station de Zaouiet Kounta dans la région d'Adrar. L'isolement a été réalisé au niveau du département de Botanique de l'Institut National Agronomique d'Alger (DOUMANDJI - MITICHE et al., 1997a).

D'après AMOURIQ (1973), le genre *Metarhizium* est le premier champignon entomopathogène utilisé par METCHNIKOFF en 1879, contre les insectes nuisibles à l'agriculture.

Dans le but de recherche des méthodes alternatives à la lutte chimique, le projet LUBILOSA (Lutte biologique contre les Locustes et les Sauteriaux) a mis au point un mycopesticide appelé GREEN MUSCLE. Il s'agit d'un champignon entomopathogène, *Metarhizium anisopliae var. acridum* Gams & Rozsypal (Deuteromycotina : Hyphomycetes) obtenu à partir des spores d'un insecte mort. Ce champignon spécifique aux espèces de criquet à antenne courtes (Acridoidea : Acrididae et Pyrgomorphidae), il est préparé sous forme de poudre sèche ou en forme de concentration huileuse des spores. Les spores

### I.2 Taxonomie et classification :

*Metarizium anisopliae* est un champignon imparfait qui présente d'après Greathead et al. (1994) la classification suivante/

Règne : Fungi
Division Ascomycota
Classe : Sordariomycetes
Sous-classe : Hypocreomycetidae
Ordre : Hypocreales
Famille : Clavicipitaceae
Genre : Metarhizium
Espèce : *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin, 1883

### I.3 Identification et morphologie :

D'après ZIMMERMAN (1993), Metarhizium anisopliae peut être aisément identifié par les conidies cylindriques vertes de longueur variant de 5 à 8 µm, qui sont produites en chaînes et

qui forment une couche compacte de spores. Les souches de ce champignon forment des conidies particulièrement allongées (AMOURIQ, 1973)

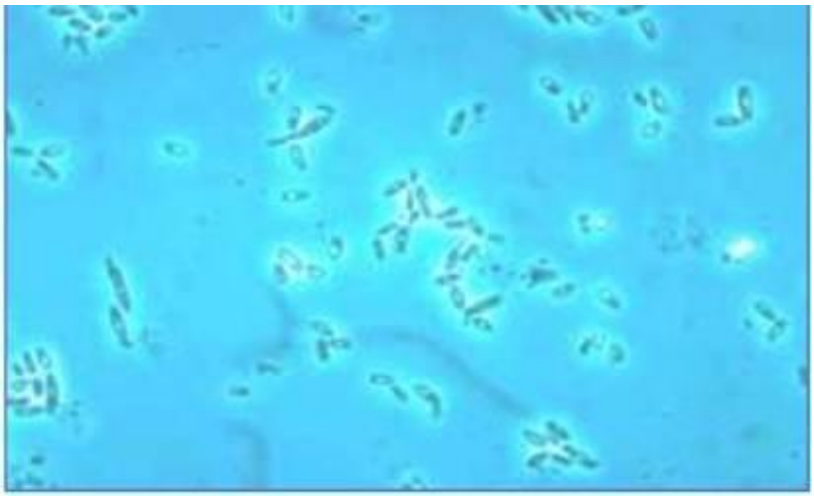


**Figure 1 :** Conidies de *Metarhizium anisopliae* (KOUASSI, 2001.*et al.*

### I.4 Reproduction :

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

Selon les conditions de croissance, trois types de spores peuvent être produits par le champignon. Lorsqu'il croit en milieu solide, *M.anisopliae* produit des conidies aériennes. En milieu liquide, il produit surtout des blastospore, des conidies submergées (Jenkins et al., 1998).

Les blastospores sont généralement de grande taille que les conidies et tendent à avoir une durée de vie plus courte que celles-ci lors de l'entreposage (Vega et al., 2003). Chez les champignons *M. anisopliae et Hirsutella thompsonii,* les blastospores ont une stabilité limitée et sont moins virulentes que les conidies (Hegedus et al., 1990). De plus, les blastospores sont plus sensibles à la dessiccation que les conidies (Burges, 1998). Pour ces raisons, les formulations contenant des conidies sont plus souvent utilisées sur le terrain.

Les champignons entomopathogènes peuvent être produits de différentes façons : par méthode simple en sacs plastiques en utilisant comme milieu du riz stérile, des grains

concassés de mais, de l'orge ou d'autres produits, en fermentation liquide ou en fermenteurs semi-solides.

### I.5 symptomatologie et Mode d'action :

Les symptômes d'un insecte atteint par *Beauveria* ont été décrites par NOURZHANOV et al., 1987 in LATCHININSKY et LAUNOIS-LUONG (1992). L'insecte s'alimente peu, perd le contrôle de ses mouvements, ses pattes sont agitées de tremblement puis une paralysie générale survient. Une teinte cramoisie se surimpose à la coloration générale du corps. L'insecte meurt intoxiqué par des toxines produites par les blastospores qui se sont multipliées dans l'hémocoele. La tête, le pronotum et l'extrémité abdominale se couvrent d'un mycélium de couleur blanchâtre et d'aspect velouté.

L'infection des champignons entomopathogènes passe par trois phases successives

**a) Phase d'adhésion**

Certains auteurs, PAILLOT (1933), FERRON et al. (1991); montrent que les spores des champignons entomopathogènes se fixent sur le tégument de l'insecte et germent lorsque les conditions du milieu optimales sont favorables.

**b) Phase de germination**

Elle dépend directement des caractéristiques thermohydriques (24 à 29°c et 50 à 58 % d'humidité).

**c) Phase de pénétration**

D'après FERRON et al. (1991), le mode de pénétration des champignons entomopathogènes est finalement très comparable à celui de la plupart des champignons phytopathogènes. Ce processus faisant intervenir des forces mécaniques et hydrolyses enzymatiques.

### I.6 Les voies d'infection par le champignon *Metarizium anisopliae*

L'infection par les champignons entomopathogènes se fait par la pénétration des conidies dans l'hôte par les différentes voies : par la cuticule, les stigmates et par voie digestive. La mort de l'insecte survient en générale après l'infiltration des différents tissus par les filaments mycéliens (AMOURIQ, 1973, INGLIS et al., 1997). D'après PAILLOT (1933) ces champignons infectent le système respiratoire et le système alimentaire.

## II. Facteurs affectant l'efficacité de champignon *Metarizium anisopliae*

### II.1 Facteurs liés aux pathogènes :

PICARD in PAILLOT (1933), a montré que la virulence des champignons pour une espèce d'insecte déterminé est variable. Elle peut être atténuée par repiquage successif sur milieu artificiel, ou la renforce par passage à travers l'organisme nuisible. La capacité de survie a également une influence. De nombreux champignons entomopathogènes formant des structures de résistance peuvent être importants pour la survie et la régénération de la population du pathogène (FERRON et al., 1991).

### II.2 Les facteurs dépendants de l'hôte

Selon FERRON *et al* (1991), il existe une sensibilité des populations envers *Beauveria bassiana* chez plusieurs ordres d'insectes. Tous les stades de développement de l'insecte depuis l'œuf jusqu'à l'adulte sont généralement sensibles à l'infection par les champignons mais cette sensibilité dépend du stade de l'infection et varie au sein d'une même espèce hôte.

### II.3 Facteurs de l'environnement :

Parmi les facteurs interagissant dans les écosystèmes du sol, la matière organique et inorganique, la microflore et la microfaune antagonique et le pH peuvent affecter la persistance des pathogènes fongiques (FERRON et al., 1991). AMOURIQ (1973), a montré que la température et l'humidité du milieu jouent un rôle important dans la conservation du pouvoir germinatif des spores, leur dissémination et leur germination. D'après PAILLOT (1933), les conidies de *Beauveria bassiana* conservées à l'air sec ne perdraient le pouvoir germinatif qu'au bout de 3 ans environ

**a. Rayonnement solaire :**

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

Il ya des différences significatives dans la sensibilité aux radiations, les micro habitats jouent un rôle important en augmentant la persistance des conidies fongiques en fournissant l'ombre des arbres (Inglis *et al*.,2001). Malgré son effet nocif sur la persistance des conidies, la lumière peut stimuler certaines étapes du cycle évolutif des champignons entomopathogènes cultivés *in vitro* ou *in vivo* (Silvy et Riba, 1989). De plus, afin d'assurer une protection contre

ces rayons, les coelomycètes, tels que le genre *Aschersonia,* produisent des cellules conidiogènes dans des pycnides fortement pigmentés (McCoy *et al.,* 1990).

**b. Température :**

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

Les variations de températures (élevées et basses) affectent la vitesse de l'infection des insectes par l'inhibition de la germination des spores, ce qui affecte à son tour la formation du tube germinatif et la pénétration à travers la cuticule de l'insecte. (Ekesi *et al*., 1999 ; Fargues et Luz., 2000 ; Soza-Gomez et Alves, 2000 ; Mitsuaki, 2004). Les conidies de *B. bassiana* et de *M anisopliae* ne peuvent pas survivre plus que 15 minutes à 40°C (McCoy *et al.,* 1990).

**c. Humidité :**

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

**d. L'effet de sol :**

Un certain nombre d'études a indiqué que les conditions sèches juste après l'application des champignons entomopathogènes sont moins pathogènes car les souches de *Metarhizium et Beauveria* peuvent germer et infecter efficacement les insectes à une basse humidité à condition qu'il y ait suffisamment d'humidité dans les microhabitats (Inglis *et al*., 2001).

L'humidité relativement élevée dans les endroits abrités fournit un micro-environnement favorable pour le développement des spores (Liu *et al.,* 2003).

Les effets de la température et de l'humidité sont intimement reliés d'où la tolérance de quelques champignons à des températures extrêmes lorsqu'il y a plus d'humidité ou lorsque la condensation se produit aisément et la perte d'eau est réduite au minimum. Le vent peut aussi

modifier de manière significative l'humidité microclimatique et considérablement influencer le comportement fongique (McCoy *et al.*, 1990).

**III. Avantage de l'utilisation de *M. anisopliae :***

Le Champignon *M. anisopliae* est devenu la pierre angulaire de plusieurs programmes de lutte intégrée, notamment dans les secteurs agricoles ou la présence de résidus de pesticides dans les aliments constitue une source de préoccupation majeure. Le champignon *M.anisopliae* est inoffensif pour la santé humaine, en plus d'être sans danger pour l'environnement (Faria et Wraight, 2001).

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

Le champignon *M .anisopliae* comporte d'autres avantages. En effet, son activité insecticide est plus rapide que d'autres agents entomopathogènes et sa durée de conservation est longue. De plus sa production exige des milieux de culture relativement peu dispendieux.

Son application s'effectue à l'aide d'équipements standards, et ses effet sur les insectes bénéfiques et les organismes non ciblés sont nuls à négligeables (Zimmermann 2007). Le champignon *M .anisopliae* peut infecter l'hôte par ingestion ou par simple contact, contrairement aux autres agents entomopathogènes, qui doivent être ingérés pour infecter (Cloutier et Cloutier 1992). Ce mode d'action particulier rend tous les stades (œuf, larve, adulte) sensibles. De plus, les conidies peuvent persister dans l'environnement par la propagation des enzooties ou des épizooties.

**IV La production et la conservation de *M. anisopliae :***

Selon SWEARINGER (1993), la conservation des spores de *B. bassiana* et *M. anisopliae* est faite en formulation à base de poudre d'argile avec de l'eau. D'après LOMER et PRIOR, (1991), la conservation de ces champignons est meilleure en formulation huileuse car elle évite la nécessité traditionnelle de maintenir une humidité élevée pour le champignon.

**V Formulation à base de champignon entomopathogène *M. anisopliae***

Il y a plusieurs formulations, soit de substance aqueuse, huileuse à base végétale, soit une formulation faite à base de poudre d'argile avec de l'eau. Cette dernière formulation est

inappropriée pour la lutte contre les Locustes. Elle se dessèche rapidement dans les conditions semi-arides (PRIOR, 1993). Dans ce cas on utilise des huiles végétales ou minérales, car les champignons entomopathogènes sont beaucoup plus efficaces à l'égard de leurs hôtes dans une suspension huileuse qu'aqueuse (BATEMAN, 1991).

## Partie II : Les données bibliographiques sur le puceron noir de la fève (*Aphis fabae)* :

### I.1 Généralité sur le puceron noir de la fève (*Aphis fabae)* :

*Aphis fabae* est l'une des espèces les plus polyphages qui soient, elle peut évoluer sur plus de 200 espèces de plantes, parmi lesquelles la betterave, la fève, la féverole, le haricot, la pomme de terre, la carotte, l'artichaut, le tabac, ainsi que certaines cultures florales et ornementales (FRAVAL, 2006).

#### I.1.1 Position taxonomique du puceron noir de la fève (*Aphis fabae)* :

REMAUDIEREet REMAUDIERE(1997), ont classé *A. fabae* comme suit :

| | |
|---|---|
| Règne | Animalia |
| Embranchement | Arthropoda |
| Classe | Insecta |
| Super-ordre | Endopterygota |
| Ordre | Homoptera |
| Famille | Aphididae |
| Genre | *Aphis* |
| Espèce | *Aphis fabae* (D'après SCOPOLI, 1763). |

#### I.1.2 Description morphologique :

**A. Forme aptère**

La forme aptère d'*A.fabae* mesure entre 2et 2,4 mm (BENOUFELLA-KITOUS, 2005). Elle est de couleur vert olive foncé à noir mat et recouverte d'une forte sécrétion cireuse blanche (HEIN *et al*., 2005). Les cornicules sont coniques nettement plus longues que la cauda. Cette dernière est digitiforme et trapue (LECLANT, 1999).



**Figure 2 :** forme aptère du puceron noir de la fève *A. fabae* (https://www.syngenta.fr)

**B. Forme ailée**

Sous sa forme ailé, *A. fabae* est plus allongée que l'aptère (Hulle et al., 1999). Elle est de couleur sombre, avec des antennes courtes et qui représentent environ les deux tiers de la longueur du corps (Hulle et al, 1999). D'après LECLANT (1999), le troisième article antennaire porte un grand nombre de sensoria secondaires disposés irrégulièrement. Parfois il existe quelques sensoria sur le quatrième article antennaire.



**Figure 3 :** forme ailée du puceron noir de la fève *A. fabae* (https://www.syngenta.fr)

### I.1.3 Cycle biologique

Une des plus remarquables caractéristiques des pucerons est leur polymorphisme, lié à leur cycle de vie souvent très compliqué, où peuvent se succéder sur des plantes fort différentes des formes aptères et ailées, des individus sexués (mâles et femelles) et parthénogénétiques (femelles) (BALACHOWSKY et MESNIL, 1934).Les pucerons sont dotés d'une capacité de multiplication très élevée : 40 à 100 descendants par femelle, ce qui équivaut à 3 à 10 pucerons par jour pendant plusieurs semaines (KOS *et al.*, 2008).

Selon HULLE *et al*.(1999), le puceron noir de la fève est dioecique ou héteroecique, il alterne entre deux types de plantes au cours de son cycle biologique. Selon les mêmes auteurs, ce cycle se déroule en deux temps : d'abord en automne et hiver sur des plantes hôtes primaires arbustes tels que le fusain d'Europe et le seringat, puis à partir d'avril-mai sur des plantes hôtes secondaire très diverses : fève, haricot, pomme de terre, betterave…, sur lesquelles ils forment des colonies compactes de plusieurs milliers d'individus.

Dès le mois de mars, après l'éclosion des œufs d'hiver, plusieurs générations parthénogénétiques se développent sur l'hôte primaire, la proportion d'ailés augmente alors au sein des colonies.

Selon BENOIT (2006), les premiers ailés s'observent au cours du mois d'avril, et seront à l'origine de colonies en manchons parfois très denses sur les plantes hôtes secondaires sauvages et cultivées. Les ailés impliqués dans la reproduction sexuée apparaissent à l'automne et regagnent l'hôte primaire. La fécondation et la ponte interviennent au courant du mois d'octobre. La reproduction sexuée n'est pas toujours obligatoire chez ce puceron. Dans les régions à climat doux, des populations peuvent se maintenir tout l'hiver sous forme de femelles parthénogénétiques se multipliant uniquement par voie asexuée (parthénogénèse) (VANLERBERGBE-MASUTTI, 1996 ; HULLE et al., 1999).

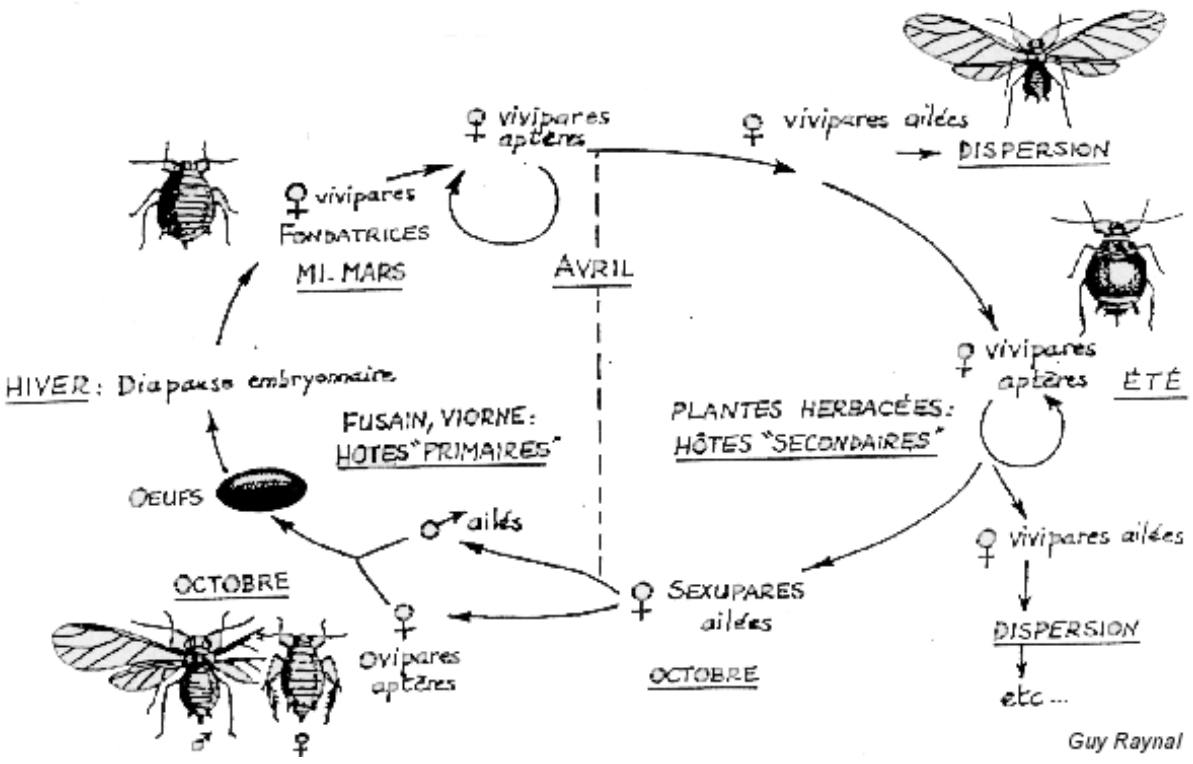



**Figure 4 :** Cycle de vie du puceron noir de la fève (*Aphis fabae*)

# Chapitre II :

# Matériel et Méthodes

**Objectif**

Le but de notre travail est d'étudier l'impact des paramètres abiotique (milieu de culture, la température, le PH) sur l'efficacité d'un champignon entomopathogène *M. anisopliae* dans des conditions contrôlés, afin de maitriser son utilisation au terrain dans le cadre de la lutte biologique contre les ravageurs des cultures.

Dans ce présent chapitre, nous avons présenté le matériel et les méthodes utilisées pour la régénération, la purification et la multiplication des spores de *M. anisopliae*, et nous avons aussi suivi l'influence de quelques facteurs biotiques et abiotiques sur la croissance mycélienne de ce cryptogame. On termine notre travail par un essai de la lutte biologique sur le puceron noir de la fève.

Le stage a été réalisé au niveau de la structure scientifique : Le laboratoire du projet de fin d'étude de l'université de Médéa

## I. Matériel et produits utilisés

### I.1.Matériel biologique

#### I.1.1 Le Champignon *Metrarhizium Anisopliae*

Notre souche *Metarhizium anisopliae,* a été obtenu à partir du département de lutte antiacridienne de l'Institut National de la Protection des Végétaux (INPV) d'El Harrach, sous forme lyophiliser d'un bio pesticide appelé «GREEN MUSCLE », formulé en poudre sèche de spores

#### I.1.2 Les insectes

Notre étude a exigé l'utilisation des abeilles proviennent du terrain

### I.2 Matériel non biologique

Le matériel non biologique (matériel de travail) comporte des équipements, de la verrerie, des produits chimiques et des réactifs ainsi que les milieux de cultures.

## II. Méthodes utilisées :

Les champignons entomopathogènes ont attiré l'attention de plusieurs chercheurs à cause de leurs compétences dans l'infection d'une large gamme d'insectes, c'est pour cela que

nous avons choisi ce thème .Nous avons consacré la première partie à la purification de notre champignon. La deuxième partie traite l'étude de l'influence des facteurs abiotiques sur le développement mycélien de *M .anisopliae*.

### II-1Purification de *M .anisopliae*

On doit régénérer les spores de notre champignon pour augmenter sa virulence, on doit le pulvériser sur un hôte après avoir préparé l'inoculum.

#### II.1.1.Préparation d'inoculum (suspension entomopathogéne de *M .anisopliae*)

Pour préparer l'inoculum afin de l'appliquer sur les insectes ramené du terrain, nous avons procédé aux étapes suivantes :

_ Dans un tube à essai nous avons dilué à 0 ,5g de poudre sporale du biopesticide Greem Muscle (figure) dans 10 ML d'eau distillée, puis une agitation pendant 10min à l'aide d'un vortex

On pulvérise les abeilles suspension déjà préparé

_ Les insectes sont mis dans des boites de pétri stérile fermer par le parafilm.

_ On met ces boites dans l'étuve à 25°pendant 24h.

_ transférer les abeilles vers d'autres boites de pétri qui contiennent du coton humidifiée (figure).

_ mettre ces boites dans une étuve réglé à 25°pendant 10 Jour

-Apparition d'une couleur blanche au tour du pied d'abeille

- couper un explant de sabore qui contient les spores de *M .anisopliae* dépose dans une boite de pétrie qui contient le milieu GN

- incubation de boite de pétrie dans étuve réglé à 25 ˚c ⁄ 15 jours

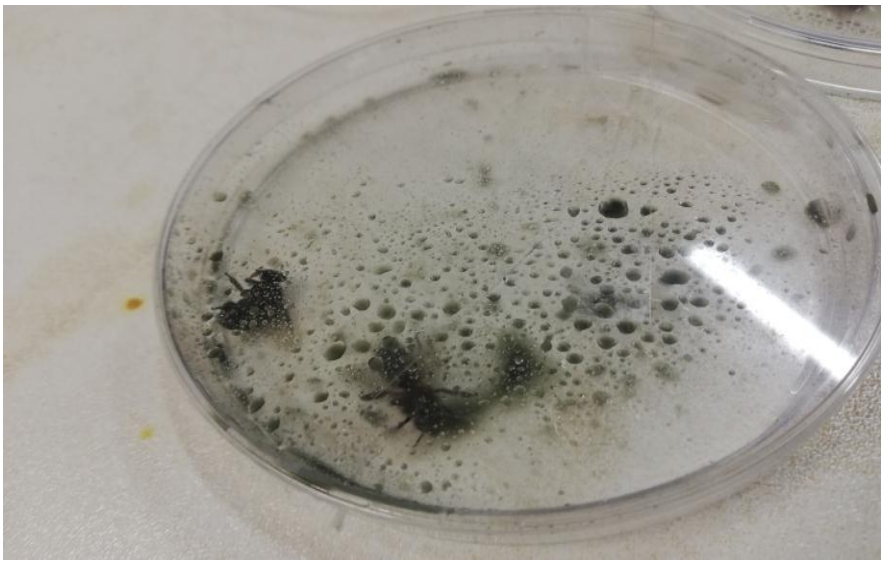


**Figure 5:** pulvérisation des abeilles par la suspension entomopathogéne.

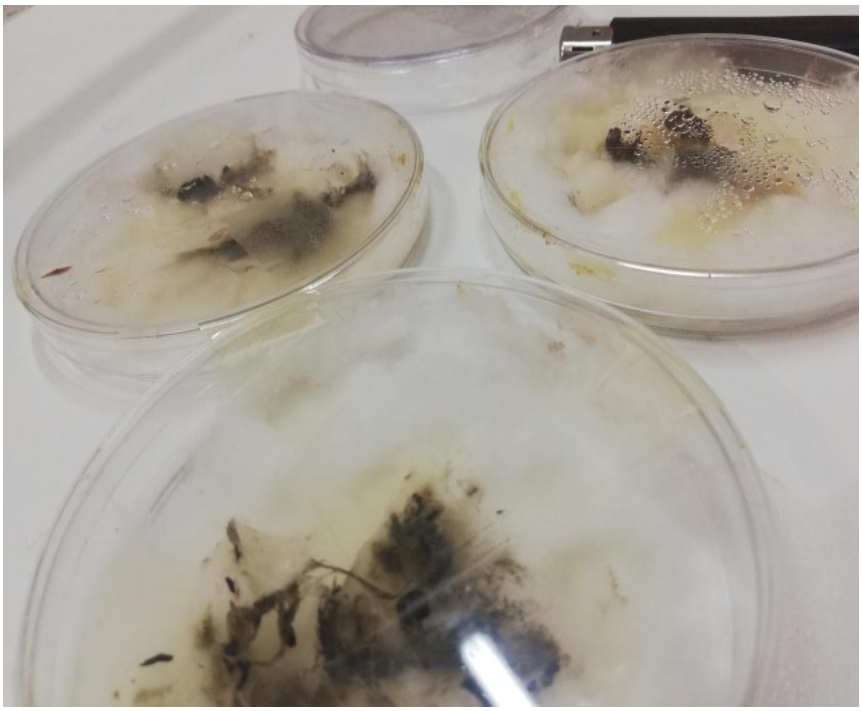


**Figure 6:** transfère les abeilles vers les biotes du coton humidifié

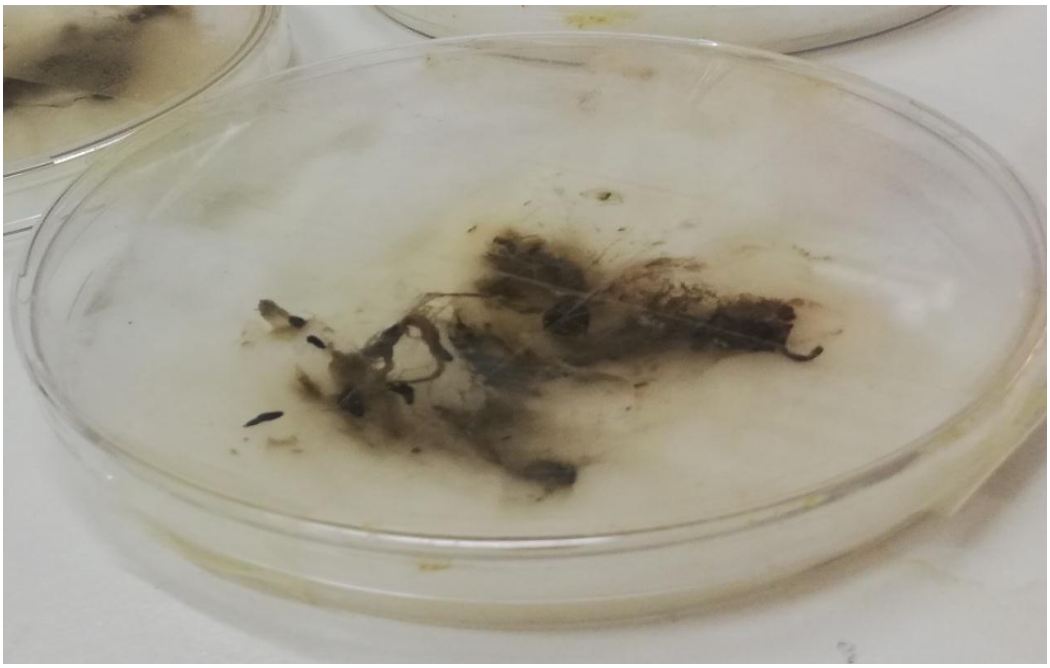


**Figure 7:** appariation d'une couleur verte sur les cadavres des abeilles

**II.2. Influence des facteurs abiotiques sur la croissance mycélienne de champignon entomopathogène *M. anisopliae.***

L'estimation de la croissance mycélienne consiste à mesurer la croissance diamétrale des colonies à partir de la formule suivante :

$L=D-d/2$ Où*:* L : croissance mycélienne D : diamètre de colonie d : diamètre de l'explant

Afin d'évaluer la vitesse de la croissance en fonction du temps, des mesures journalières du diamètre de la colonie sont effectuées (Rappily, 1968 et Fargues *et al*., 1992).

**II.2.1.Influence de la température :** Les valeurs de la température étudiées sont : 25°C, 30°C, et 40°C,

**II.2.2. Influence du pH :** Dans le but d'évaluer l'influence du pH sur la croissance mycélienne, on a essayé les valeurs de pH suivantes 4,1 ;6,1 ; 8,1 et 12,1.

**II.2.3. Influence du milieu de culture**

Nous avons préparé trois types de milieu de culture pour étudier l'influence de quelques facteurs abiotiques sur la croissance mycélienne de *metarhizium anisopliae*:

### II.2.3.1 Milieu de culture PDA (Potatos Dextres Ager ) :

C'est un milieu riche en amidon, sa composition est comme sui

_ 39g dépoudre d'PDA

_ Mélanger 1000ml d'eau distille avec la poudre d' PDA dans un Erlen , mettre le tout sous agitation pendant 5 min .

ajuster et homogénéiser la solution sur l'agitateur magnétique à plaque chauffante et mélanger de tempe et temps jusqu'à l'ébullition

_ Remplir les bouteilles par le milieu et passer autoclavage à 120° C pendent 20min(figure ) .

### II.2.3.2.Milieu de culture OGA (OXYTETRACYCLINE_ EGLUCOS_ AGAR BASE).

_ On met 7,5g de poudre d'OGA

Mélanger 250 ml d'eau distillée avec poudre d'OGA dans erlenmeyer, mettre le tout sous agitation pendant5 min.

_ mettre ce mélange sur un agitateur magnétique a plaque chauffante jusqu'à ébullition, et passer l'autoclavage à 120/20min.

### II.2.3.3 Milieu de culture GN (Gélose nutritifs

- Peser 5.7 g de poudre de GN

- Mélanger cette poudre avec un volume de 250 ml d'eau distillée dans un Erlen Meyer puis ajuster.

- Déposer ce mélange sur un agitateur magnétique a Plaque chauffante jusqu'à ébullition, et passer à l'autoclavage à 120°C / 20 min.

# Chapitre III :

# Résultats et discussions

## I. Influence des facteurs abiotiques sur la croissance mycélienne de *M. anisopliae*

### I.1. Influence de la température sur la croissance mycélienne de *M. anisopliae*

**Tableau 1 :** Influence de la température sur la croissance mycélienne de *M. anisopliae*

| Jour / Température | 25° C | 30°C | 40°C |
|---|---|---|---|
| **Jour 1** | $E_1$= 1.1cm $E_2$= 2.3cm $E_3$= 1.3cm | $E_1$=2.5 cm $E_2$=3.5 cm $E_3$=2c m | $E_1$=1.9 cm $E_2$=2.5 cm $E_3$=2.3 cm |
| **Jour 2** | $E_1$= 3.5cm $E_2$= 4cm $E_3$= 4.8cm | $E_1$=3.9 cm $E_2$=3.7 cm $E_3$=4c m | $E_1$=2.1 cm $E_2$=3c m $E_3$=2.9 cm |
| **Jour 3** | $E_1$= 5.6cm $E_2$= 6cm $E_3$= 7.1cm | $E_1$=5c m $E_2$=5.2 cm $E_3$=7c m | $E_1$=3c m $E_2$=3.4 cm $E_3$=4c m |
| **Jour 4** | $E_1$= 7cm $E_2$= 7.3cm $E_3$= 8cm | $E_1$=6.9 cm $E_2$=7c m $E_3$=8c m | $E_1$=5.5 cm $E_2$=6.7 cm $E_3$=5.4 cm |
| **Jour 5** | $E_1$= 8.5cm $E_2$= 8.5cm $E_3$= 8cm | $E_1$=7.9 cm $E_2$=8.5 cm $E_3$=8.2 cm | $E_1$=6.5 cm $E_2$=7.9 cm $E_3$=6.2 cm |
| **Jour 6** | $E_1$= 8.5cm $E_2$= 8.5cm $E_3$= 8.5cm | $E_1$=8.1 cm $E_2$=8.5 cm $E_3$=8.5 cm | $E_1$=6.8 cm $E_2$=8c m $E_3$=6.6 cm |

**I.2. Influence du PH sur la croissance mycélienne de *M. anisopliae***

**Tableau 2 : Influence du PH sur la croissance mycélienne de *M. anisopliae***

| Jour / pH | 4.1 | 6.1 | 8.1 | 12.1 |
|---|---|---|---|---|
| Jour 1 | $E_1$=1.2 cm<br>$E_2$=1.5 cm<br>$E_3$=1.6 cm | $E_1$=2cm<br>$E_2$=1.8 cm<br>$E_3$=2cm | $E_1$=1cm<br>$E_2$=1.2 cm<br>$E_3$=0.9 cm | $E_1$=0cm<br>$E_2$=0cm<br>$E_3$=0.6 cm |
| Jour 2 | $E_1$=3.7 cm<br>$E_2$=3.3 cm<br>$E_3$=2.5 cm | $E_1$=2.6 cm<br>$E_2$=1.8 cm<br>$E_3$=2.5 cm | $E_1$=1.4 cm<br>$E_2$=1.2 cm<br>$E_3$=1cm | $E_1$=0cm<br>$E_2$=0cm<br>$E_3$=0.6 cm |
| Jour 3 | $E_1$=7cm<br>$E_2$=3.4 cm<br>$E_3$=2.5 cm | $E_1$=3cm<br>$E_2$=1.9 cm<br>$E_3$=3cm | $E_1$=1.9 cm<br>$E_2$=1.4 cm<br>$E_3$=1.1 cm | $E_1$=0cm<br>$E_2$=0cm<br>$E_3$=0.7 cm |
| Jour 4 | $E_1$=7.3 cm<br>$E_2$=6cm<br>$E_3$=3.6 cm | $E_1$=3.8 cm<br>$E_2$=1.9 cm<br>$E_3$=3.5 cm | $E_1$=1.9 cm<br>$E_2$=1.5 cm<br>$E_3$=1.3 cm | $E_1$=0cm<br>$E_2$=0.8 cm<br>$E_3$=1.8 cm |
| Jour 5 | $E_1$=7.5 cm<br>$E_2$=7.2 cm<br>$E_3$=3.6 cm | $E_1$=3.8 cm<br>$E_2$=1.9 cm<br>$E_3$=4cm | $E_1$=2cm<br>$E_2$=1.7 cm<br>$E_3$=1.4 cm | $E_1$=0cm<br>$E_2$=0.8 cm<br>$E_3$=1.8 cm |
| Jour 6 | $E_1$=8cm<br>$E_2$=8cm<br>$E_3$=4cm | $E_1$=4.5 cm<br>$E_2$=2.1 cm<br>$E_3$=4.5 cm | $E_1$=2.5 cm<br>$E_2$=1.7 cm<br>$E_3$=1.5 cm | $E_1$=0cm<br>$E_2$=1cm<br>$E_3$=2cm |

**I.3. Influence du milieu de culture sur la croissance mycélienne de *M. anisopliae***

**Tableau 3 : Influence du milieu de culture sur la croissance mycélienne de *M. anisopliae***

| Jour / milieu | PDA | SB | GN | OGA |
|---|---|---|---|---|
| Jour 1 | $E_1$=3cm<br>$E_2$=2.4cm<br>$E_3$=2.3cm | $E_1$=2.5cm<br>$E_2$=3.5cm<br>$E_3$=2cm | $E_1$=1.1cm<br>$E_2$=1.3cm<br>$E_3$=1.4cm | $E_1$=3cm<br>$E_2$=2cm<br>$E_3$=2cm |
| Jour 2 | $E_1$=3.4cm<br>$E_2$=3.1cm<br>$E_3$=4cm | $E_1$=4cm<br>$E_2$=5cm<br>$E_3$=6cm | $E_1$=1.1cm<br>$E_2$=1.4cm<br>$E_3$=1.7cm | $E_1$=3.5cm<br>$E_2$=4.1cm<br>$E_3$=5.1cm |
| Jour 3 | $E_1$=3.9cm<br>$E_2$=4cm<br>$E_3$=5cm | $E_1$=4.9cm<br>$E_2$=6cm<br>$E_3$=7cm | $E_1$=1.9cm<br>$E_2$=1.5cm<br>$E_3$=1.9cm | $E_1$=4.8cm<br>$E_2$=5cm<br>$E_3$=6cm |
| Jour 4 | $E_1$=4.9cm<br>$E_2$=4.5cm<br>$E_3$=6.1cm | $E_1$=6.5cm<br>$E_2$=8.5cm<br>$E_3$8.5cm | $E_1$=2.1cm<br>$E_2$=1.9cm<br>$E_3$=2.3cm | $E_1$=5.5cm<br>$E_2$=6cm<br>$E_3$=8cm |
| Jour 5 | $E_1$=7.5cm<br>$E_2$=8.5cm<br>$E_3$=7cm | $E_1$=7.9cm<br>$E_2$=8.5cm<br>$E_3$=8.5cm | $E_1$=2.5cm<br>$E_2$=2cm<br>$E_3$=2.8cm | $E_1$=8cm<br>$E_2$=7.6cm<br>$E_3$=8.5cm |
| Jour 6 | $E_1$=8.5cm<br>$E_2$=8.5cm<br>$E_3$=7.4cm | $E_1$=8.5cm<br>$E_2$=8.5cm<br>$E_3$=8.5cm | $E_1$=3cm<br>$E_2$=3.4cm<br>$E_3$=3.5cm | $E_1$=8cm<br>$E_2$=7.9cm<br>$E_3$=8.5cm |

La plupart des auteurs s'accordent à dire que la température optimale pour la croissance se situe entre 25° et 30 °C, Lihnell (1944) mesurait le poids du mycélium en culture flottante et trouvait un optimum de 27°-30°C, Latch (1965) faisait la comparaison de six isolements de *M. anisopliae* , Les optima de température de cinq de ces souches se trouvaient en effet entre 25 ° et 30 °C , une souche formant une exception, ayant son optimum à 20 °C. Il indique 7°C et 35 °C comme respectivement minimum et maximum pour la croissance. Ces données correspondent donc assez bien avec celles de Lihnell.

Huber (1958) indique comme extrêmes de pH pour la croissance 3,3 et 8,5 Ces informations correspondent approximativement avec celles de Lihnell(1944) qui démontre que l'extrêmes de pH 2,0-8,5 optimum pH 6,9 et D'après Vouk et Klas (1931) l'optimum de pH pour la formation des conidies se situe entre pH 6,9 et 7,4d'après eux la croissance peut avoir lieu entre pH 4,7 et 10.

# Conclusion

## Conclusion

Les mesures de contrôle et les méthodes de lutte mises en place sont donc très importantes mais ne sont pas suffisamment efficaces. L'utilisation des champignons entomopathogènes dans le cadre de la lutte biologique peuvent être influencé par plusieurs facteurs abiotiques tels que la température, le ph et le milieu…….ect

C'est dans ce cadre que notre travail est établit dans le but d'étudies l'influence des quelques facteurs abiotiques (milieu de culture, température, PH, L'humidité relative et la salinité) sur la croissance mycélienne de champignon entomopathogène *Metarhizium anisopliea*.

Dans la littérature il y a de très nombreuses données concernant la culture de *M. anisopliae*. On peut distinguer deux buts de la culture

a. Culture en petites quantités, entubes ou en boîtes de Pétri pour des essais de laboratoire ou pour l'observation des caractères culturaux. Gough (1910) indique la pomme de terre, le riz, les carottes et les pois, Picard (1913) le pain, Rorer (1910) les haricots.

b. Culture en masse pour la lutte biologique, en plus une subdivision suivant la nature du milieu est possible :

a. Culture sur milieu solide (gélose ou naturel).

b. Culture sur milieu liquide (culture flottante).

c. Culture dans milieu liquide (culture immergée).

L'humidité environnementale est un paramètre très important pour la germination des conidies dans la nature, Elle affecte aussi la persistance et la survie des champignons entomopathogènes et donc La plupart de ces champignons exigent au moins 95 % de l'humidité relative à la surface de l'insecte afin de germer (Hallsworth et Magan, 1999).

Un certain nombre d'études indique que les conditions sèches juste après l'application des champignons entomopathogènes sont moins pathogènes, et L'humidité relativement élevée dans les endroits abrités fournit un microenvironnement favorable pour le développement des spores (Liu et al. 2000).

# Références bibliographiques

# Références bibliographiques

ZIMMERMAN G., 1993 – The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and its potential as a biocontrol agent. *Pest. Sci., N°37, pp: 375 – 379.*

AMOURIQ L., 1973 – Rapports entomologo-cryptogamiques : Eléments sur la relation entre les insectes et champignons. Ed. Herman, Paris, 135 p.

KOUASSI M., 2001 – Les possibilités de lutte biologique : Emphase sur le champignon entomopathogène B. bassiana. Sci. Environ., Vol. 2, N°2, pp : 1 – 8.

LATCHININSKY A.V., et LAUNOIS-LUONG M. H., 1992 – Le Criquet marocain, Dociostaurus maroccanus (Thunberg, 1815), dans la partie orientale de son aire de distribution. Etude monographique relative à l'ex-URSS et aux pays proches. # CIRAD-GERDAT-PRIFAS : Montpellier / VIZR : Saint-Pétersbourg, 270 p.

BENFEKIH L. et DOUMANDI-MITICHE B., 1997 – Observation sur le parasitisme de criquet marocain solitaire D. maroccanus (Orthoptère, Gomphocerinae) par un acarien Trombidium sp. Dans le Sud de Médéa (Algérie). Med. Fac. Landboww. Unv. Gent, 62/2b, pp 437-447.

INGLIS G. D., JHONSON D. L. et GOETTEL M. S., 1997 – Field laboratory évaluation of two batches of Beauveria bassiana (BALSAMO) Veuillemin against grasshoppers. Canadian entomolog., 29, pp: 171 –186.

FERRON P., FARGUES J. et RIBA G., 1991 – Des champignons agents de lutte microbiologique contre les ravageurs. Dost. Cell. ENV. N°5, pp : 55 – 76.

PAILLOT, 1933 – L'infection chez les insectes. Ed. Patissier, Paris, 471 p

SWEARINGER W.D., 1993 – Lutte biologique contre les acridiens. Lettre d'information du 19 octobre. Surveillances des acridiens du Sahel. CIRAD-P.R.I.F.A.S., Montpellier, pp. 17-20

PRIOR C., 1993 – Les biopesticides contre les criquets. La recherche N° 251, Vol 24,pp 219-221.

**Références bibliographiques**

BATEMAN R. P., 1991 – L'application de mycopesticides antiacridiens en gouttelettes calibrées, pp : 250-257 cité par LOMER C.J. et PRIOR C., 1991, Lutte biologique contre les acridiens. Compte rendu d'un atelier (29 avril – 1er mai) Bénin. Ed. C.A.B International, Wallingford, 399 p

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

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

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

Jenkins N.E., Heviefo G., Langewald J., Cherry A.J et Lomer C.J. (1998). Development of mass production technology for aerial conidia for use as mycopesticides. Biocontrol News Information. 19 :21–31

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

Hegedus D.D., Bidochka M.J et Khachatourians G.G. (1990). Beauveria bassiana Submerged Conidia Production in a Defined Medium Containing Chitin, Two Hexosamines or Glucose', Appl. Microbiol. Biotechnol. 33 :641647.

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

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

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

FRAVAL A., 2006. Les pucerons. Insectes 3 n°141, office pour les insectes et leur environnement, France, 2eme trimestre, pp 03-08.

REMAUDIERE G. et REMAUDIERE M., 1997. Catalogue des Aphidae du monde, I.N.R.A, Paris, pp. 473p.

HEIN L., VAN KOPPEN K., RUDOLF S., EKKO C. et IERLAND V., 2005. Towardimprovedenvironmental and social management of Indianshrimpfarming. Environmental Management 29, pp. 349-359.

LECLANT F., 1999. Les pucerons des plantes cultivées. Clefs d'identification. I- Grandes cultures. Ed. ACTA, INRA. Paris. 64p.

HULLE M., TURPEAU-AIT IGHIL E., ROBERT Y., et MONET Y., 1999. Les pucerons des plantes maraichères. Cycle biologique et activités de vol. Ed A.CT.A. I.N.R.A. Paris.

BALACHOWSKY A.S. et MESNIL, 1934. Les insectes nuisibles aux arbres fruitiers, à la vigne, aux céréales et aux graminées des prairies. Ed. Victor Massé. T I, Paris, 627 p.

BENOIT R., 2006. Biodiversité et lutte biologique. Comprendre quelques fonctionnements écologiques dans une parcelle cultivée, pour prévenir contre le puceron de la salade.
Certificat d'Etude Supérieures en Agriculture Biologique. ENITA de Clermont Ferrand, 10, pp 1-25.

VANLERBERGBE-MASUTTI F., 1996. La variabilité des pucerons : causes et conséquences. Rev. Phra. Horticole. N° 369. Aril. pp13-17.

SIMON J.-C., STOECKEL S. et TAGU D. 2010. *Evolutionary and functional insights into reproductive strategies of aphids*. C. R. Biol. 333, pp. 488–496.

HARMEL N., FRANCIS F., HAUBRUGE E. et GIORDANENGO P., 2008. Physiologie des interactions entre pomme de terre et pucerons : vers une nouvelle stratégie de lutte basée sur les systèmes de défense de la plante. Cahiers Agricultures vol. 17, n°, 396 : pp. 395-398.

CHRISTELLE L., 2007. Dynamique d'un système hôte-parasitoïde en environnement spatialement hétérogène et lutte biologique Application au puceron Aphisgossypii et au parasitoïde Lysiphlebustestaceipes en serre de melons. ThèseDoctorat Agro, Paris Tech, Paris. 280p.

LECOQ H., 1996. Les pucerons : de redoutables vecteurs de virus des plantes. Revuehorticole. pp.25-28.

HULLE M., TURPEAU-AIT IGHIL E., LECLANT F., et RAHN M.J., 1998. Les pucerons des arbres fruitiers, cycle biologique et activité de vol. Ed. I.N.R.A., Paris. 668p.

DEDRYVER CA., 2010. Les pucerons : biologie, nuisibilité, résistance des plantes. Journées techniques fruits et légumes biologique. 23-26.

DOGIMONT C., BENDAHMANE A., CHOVELONN V., BOISSOT N., 2010. Host plant resistance to aphids in cultivated crops: genetic and molecular bases, and interactions with aphid populations. C. R. biologies. 333: pp. 566-573.

GEORCRET et SCHEROMM O., 1995. Lutte contre les insectes ravageurs des cultures : les apports de la biologie. Ed. INRA, France, 42 p.

LAMBERT L., 2005. Les pucerons dans les légumes de serre : Des bêtes de sève. Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation, Québec.

SALIN C., 2011. Lutte biologique contre le puceron du fraisier pour faire face à l'imprévisible 'imprévisible diversité des pucerons, associer plusieurs hyménoptères parasitoïdes. Mémoire d'ingénieur d'état en biologie. Université catholique de Louvain. 62p.