REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE DR. Yahia Farès de Médéa

Faculté des sciences nature et vie



Mémoire de Fin d'études

En vue de l'obtention du Diplôme de Master en Sciences Agronomique

Option : Phytopathologie

Présenté par : Boukoffa Kenza Yasmine

Bellatrache Wissem

Isolement des champignons entomopathogènes à partir des insectes des denrées stockées et évaluations de leurs activités biocides

Soutenue publiquement le 23/06/22

Devant le jury :

Président :	M^{me}.Dif S.	**MAA**	Université de Médéa
Promoteur :	M^{me}.Mostefaoui H.	**MCA**	Université de Médéa
Co-promoteur:	M^{lle}.Abdelaziz O	**MCB**	Université de Constantine 1
Examinateur :	M^{r}.Chaouach A.	**MCA**	Université de Médéa

Médéa 2021/2022

Résumé

Isolement des champignons entomopathogènes à partir des insectes des denrées stockées et évaluations de leurs activités biocides

L'utilisation de micro-organismes entomopathogènes est une alternative très prometteuse, dans la lutte biologique. Cette étude a pour objectif d'évaluer l'influence des champignons entomopathogénes isolés à partir des vers de farine ***Tenebrio molitor***, carpophilus ***Carpophilus hemipterus*** et la larve de pyrale des dattes ***Ectomyelois ceratoniae*** ; sur le puceron vert des rosiers **(*Macrosiphum rosae*)**. Les résultats de l'isolement, purification et de l'identification ont mise en évidence la présence de 24 souche fongiques représentant 3 genres : *Aspergillus, Fusarium et Penecillium* dans 12 espèces de genre *Penicillium, 10* espèces de genre*Fusarium* et 02 espèces de genre*Aspergillus.*Le test de pathogénicité ont été fait par le genre *Penecilium,* les biocontrôles sur l'aptitude à induire l'infection et/ou des mortalités sur adultes de *Macrosiphum rosae*montre que *Penecilium sp* issue de la souche (f) vers de farine a un effet sur la mortalité des adultes de puceron vert de rosier.

Mot clé : Entomopathogènes*Aspergillus, Fusarium, Penecillium et Macrosiphum rosae*

Abstract

Isolation of entomopathogenic fungi from insects in stored foodstuffs and evaluation of their biocidal activities

The use of entomopathogenic microorganisms is a very promising alternative in biological control. This study is to evaluate the influence of entomopathogenic fungi isolated from meal worms ***Tenebrio molitor***, carpophilus ***Carpophilus hemipterus*** and the date moth larvae ***Ectomyelois ceratoniae***; on the green rose aphid (***Macrosiphum rosae***). The results of the isolation, purification and identification revealed the presence of 24 fungal strains representing 3 genera: *Aspergillus, Fusarium and Penecillium* in 12 species of genus *Penicillium*, 10 species of genus *Fusarium* and 02 species of genus *Aspergillus*. pathogenicity test were made by the genus *Penecilium*, the biocontrols on the ability to induce infection and/or mortality on adults of *Macrosiphum rosae* shows that *Penecilium sp* issue of the strain (f) meal worms has an effect on the mortality of green rose aphid adults.

Key words: entomopathogenic *Aspergillus, Fusarium, Penecillium et Macrosiphum rosae*

الملخص

عزل الفطريات الممرضة للحشرات من الحشرات في المواد الغذائية المخزنة وتقييم أنشطتها المبيدات الحيوية

يعد استخدام الكائنات الدقيقة الممرضة للحشرات بديلاً واعدًا للغاية في المكافحة البيولوجية. تهدف هذه الدراسة إلى تقييم نتائج .تأثير الفطريات الممرضة للحشرات المعزولة من دودة الوجبة ويرقات عثة التمر على من الوردة الخضراء. بعد العزل والتنقية والتعرف ظهرت 24 سلالة فطرية تمثل 3 أجناس:الاسبرجيلوس، الفيوزاريوم والبنسليوم حيث وجد 12 نوع من جنس البنسليوم ، 10 أنواع من جنس الفيوزاريوم و 02 نوع من جنس الاسبرجيلوس. جنس البينيسليوم من السلالة fله القدرة الحيوية على إحداث العدوى و / أو الوفاة عند البالغين حشرات المن الورد الأخضر.

الكلمات المفتاحية : الكائنات الدقيقة الممرضة للحشرات، الاسبرجيلوس، الفيوزاريوم والبنسليوم

Remerciements

La ou il y'a des ténèbres, il met la lumière ; là où il y'a l'affliction, il met l'espoir, là où il y'a anéantissement, il met le courage, le compagnon éternel …**Dieu** merci.

Nous remercions à notre encadreur Madame **Mostefaoui Houda**, M.C.A à université Yahia fares de Médéa pour la confiance qu'elle nous a accordée en acceptant de dirigé ce mémoire, ainsi que pour son soutien scientifique, nos sincère remerciement, Nous remercions à notre co-encadreur Madame **Abdelaziz Ouided**, M.C.B à université Mentouri Constantine qui était d'une aide précieuse et d'une grande disponibilité durant toute cette aventure prodigieuse.

Très sincères remerciements aux membres de jury, qui avec leur mission de correction servent d'appui pour le savoir et l'instruction :

Madame **Dif Sabrine** M.A.A.à université Yahia fares de Médéa qui nous a fait l'honneur de présider le jury.

Monsieur **Chaouach Abdelrazek** M.C.A à université Yahia fares de Médéa qui a accepté d'examiner ce travail

Nous voudrions aussi remercier les professeurs qui nous ont formés au long de notre parcours universitaire.

Toute notre gratitude revient à ceux qui nous ont apportés tous les jours leur soutien sans faille, nous redonnons la motivation pour aller de l'avant et sans qui nous n'aurions probablement pas su trouver les ressources pour achever cette thèse, mille et un mercis.

Dédicace

Je dédie ce modeste travail :

A Celle Qui m'a mis au monde, et sans elle plus rien n'était…… Ma mère

A mon frère pour nos désaccord nos disputes nostalgiques…….. Merouane

A Celui qui est grand dans mes yeux, l'homme exemplaire……. Mon grand-père (paix à son âme) Et aussi à ma grand-mère

La sœur d'une mère est une mère! A Habiba et Lamia

A Mohammed Abdelrazzek Benacer Toufik Abdelghani Idris Ismail… Mes oncles et leurs épouses ! Tout le bonheur de la vie !!

A tous mes Cousins et cousines! A Iman et Wafia, A Wail , KarimetHoucine , Omnia , Akram, Ritedje ,t Abdelrahim , Adam, Wissem , A Aroua et Wassim , Islam et Houssem ,aRania et Jihane , Lina et la partie du domino Sidra !Les arrière cousine Mélissa et Raghad. Joyeuse vie .

A Wissem ma binôme de travail qui m'a soutenu et encouragé pendant tous les moments difficiles ; et son support pour réaliser ce mémoire

A tous mes chères bellesamies : Manel,Ikram,Amira, sarah, Nesrine,Leila, selma ; kaouthar

Merci pour les moments ensemble

A tous ma promo phytopathologie 2022. ;

A qui les jours m'ont réuni.

A tous mes amis qui m'ont accompagnée dans l'aventure : Merci pour tous.

Kenza.

Dédicace

Je dédie ce modeste travail :

A la femme qui a souffert sans me laisser souffrir, qui n'a épargné aucun effort pour me rendre heureuse, ma chère mère Khadîdja.

A l'homme, mon précieux offre du dieu, qui doit ma vie, ma réussite et tout mon respect mon chère père Noureddine.

A mes chères sœurs Maroua et Khaoula pour mes soutiens moral et leurs conseils précieux tout au long de mes études.

A mon adorable petite sœur Assil qui sait toujours comment procurer la joie et le bonheur pour toute la famille.

A ma grande mère, mes oncles et mes tantes que dieu donne une longue et joyeuse vie.

A tous mes cousins Amine, Abdesslem, Nourin, Abdelmoumen, Azeddine et Wael.

A toute mes cousines Fethia, Ilhem, Hadjer, Aicha, Raihana, Houda, Khouloud, Wissal, Anfel et Khouloud.

A mon binôme Kenza Yasmine, ma belle qui a eu la patience de me supporter duarant de mémoire, et qui m'a soutenu et encouragé pendant tout les moments difficiles.

A tous mes adorables amis Linda, Imene, Soumia, Sihem, Feriel , Abir, Achouak, Nourhene, Leila, Nesrine, Jouhaina et Houda.

A tous mes amis de promo de 2ème année Master phytopathologie et toute personne qui occupe une place dans mon cœur.

Sans oublier mes collègues du travail de Laboratoire Chifa Madame Meftahi,Lilia, Selma,Fouzia et Anissa.

Wissem

Liste des abréviations

PDA: Potato-Dextrose- Agar.

FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations (organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture).

Sp : Specie.

Liste des figures

Figure 01 : Cycle biologique des champignons entomopathogènes 7
Figure 02: Relation de symbioseprotectrice entre l'insecte de genre *Paederus et bactériePseudomonas.*..... 10
Figure 03: Relation de symbiose protectrice entrepsylle asiatique des agrumes et *bactérieCandidatusProfftella* 11
Figure 04: Relation de symbiose protectriceentre guêpe *Philanthustriangulum* - Bactérie *Streptomyces* 12
Figure 05: Fourmi du genre *Apterostigma dentigerum* et molécules isolés de *Pseudonocardia*……13
Figure 06 Relation de symbiose mutualisme entre la fourmi champignonniste du genre *Acromyrmex* avec bactérie *Streptomyces*visible sur la cuticule (en blanc) et métabolites produits par la bactérie……14
Figure 07 : Adulte aptère de *Macrosiphumrosae*..... 17
Figure 08: Technique d'isolement 22
Figure 09: Purification des souches fongique 23
Figure 10: Observation macroscopique 23
Figure 11: Technique de préparation des lames 24
Figure 12: Dénombrement par la cellule de Malassez 25
Figure 13: Test de pathogénicité 25
Figure 14: Pourcentage des isolats fongiques 28
Figure 15: Effet d'entomopathogène de différentes souches *Pinicilium sp* sur la mortalité des pucerons vertsde rosier ……..…..35

Liste des tableaux

Tableau1 : Aspect macroscopique et microscopique des fongiques……..30

Tableau1 : Aspect macroscopique et microscopique des fongiques (suite1)…… 31

Tableau1 : Aspect macroscopique et microscopique des fongiques (suite2)…….32

Tableau 02 : Suivi journaliers de la mortalité des individus adultes de pucerons vert de rosier de différentes souches *Penicillium sp*…….34

Table des matières

Introduction ……..1

Chapitre I : Partie bibliographique

I.1. Généralité sur les champignons 4
I.2. Champignons entomopathogènes 5
I.2.1. Mode d'action 5
I.2.1.1. L'adhésion..... 6
I.2.1.2. La germination 6
I.2.1.3. La pénétration, multiplication et la dissémination 7
I.2.2. Les métabolites des champignons entomopathogènes..... 8
I.3. Interaction insectes micro-organismes entomopathogènes 9
I.3.1. Les relations de mutualisme..... 10
I.3.1.1. Les symbioses protectrices 10
I.3.1.2. Les symbioses nutritives 14
I.3.2. Les relations de parasitisme : les micro-organismes entomopathogènes 15
I.4. Les pucerons verts de rosier *Macrosiphum rosae*..... 16
I.4.1. Caractéristiques générales des pucerons..... 16
I.4.2. Systématique..... 16
I.4.3. Discription et biologie de *Macrosiphum rosae*..... 16
I.4.4. Dégàts des aphides.. 17
I.4.4.1. Dégàts directs..... 17
I.4.4.2. Dégàts indirects..... 18
a. Miellat et fumagine..... 18
b. Transmission des virus 18
I.4.5. Méthodes de lutte utilises contre les pucerons..... 18
I-4.5.1. Lutte préventive..... 18
I-.4.5.2. Lutte curative..... 19
a. La lutte chimique..... 19
b. La lutte biologique 19
c. La lutte microbiologique par les champignons entomopathogènes 19
d. La lutte intégré 20

Chapitre II: partie expérimental

II- Partie expérimentale 22
II.1. Introduction 22
II .2. Echantillonnage 22
II.3. Matériel et méthodes 22
II.3.1 Isolement et identification des entomopathogènes 22
II.3.1.1 Isolement 22
II.3.1.2. Purification 23
II.3.1.3. Identification 23
II.4. Test de pathogénicité 24
II.4.1. Méthode de préparation de la sollution entomopathogènes 24
II.4.2. Test de pathogénicité 25
II .4.3. Analyse statistique 26

Chapitre III: Résultats et Discussions

Résultats 28
III.1. Etude mycologique 28
III.1. Isolements et identifications des entomopathogènes 28
III.2. Test de pathogénicité 33
III.3.Tests d'efficacités des traitements biocides de différents biocides des souches *penicillium sp* sur la mortalité des adults pucerons verts de rosier 33
III.4. Effet d'entomopathogènes de différentes souches *penicillium sp* sur la mortalité des pucerons vert de rosier 33
Discussions 36
Conclusion générale 38
Référence bibliographique 39
Annexe 52

Introduction :

La diversité climatique et écologique de l'Algérie est favorable pour le développement de divers produits agricoles mais également à la prolifération des bioagresseur qui peut nuire aux cultures. Ainsi les problèmes phytosanitaires se posent avec acuité à l'agriculture.

Les pesticides ou produit phytosanitaire sont des substances chimiques destinées à minimise les organismes nuisibles aux végétaux. Ils ont sévèrement réglementé à travers le monde en raison de leur dangerosité **(Benzine 2006)**.

L'usage de ces produits est en constante augmentation à travers tous les pays du monde. Selon les constatations des experts mondiaux, la demande en pesticides est telle que les quantités produites doublent pratiquement tous les dix ans depuis 1945. Ce sont les pays en voie de développement qui les utilisent le plus. Au niveau mondial, la valeur marchande des pesticides est de l'ordre de 32 milliards de dollars **(Bouziani,2007)**.

L'Algérie importe en moyenne 8827 tonnes de pesticides pour un coût estimé à près de 4 milliards et demi de dinars par an **(Anonyme, 2006)**. Cependant, depuis quelques années, on observe dans notre pays, que l'usage des pesticides, des fertilisants, des engrais, et autres se répand de plus en plus avec le développement de l'agriculture, mais aussi dans le cadre des actions de lutte contre les vecteurs nuisibles. Cette utilisation intense de produits chimiques toxiques, à l'échelle nationale, risque de polluer gravement les sols, les nappes d'eau et menace la santé de la population **(Bouziani,2007)**.

En parallèle**,** La maîtrise de la lutte biologique contre les fléaux agricoles constitue désormais une priorité nationale afin de réduire l'utilisation des pesticides**.** Sans aucune incidence sur l'homme et son environnement. Une autre piste qui est en train de se développer actuellement et qui s'avère très intéressante et efficace, c'est le développement et l'utilisation de microorganismes antagonistes notamment des champignons pathogènes d'insectes ou « entomopathogènes »

Alors, l'étude des champignons entomopathogènes, constitue un bon modèle pour aborder le principe de lutte biologique et intégrée contre les pucerons mais il demeure

cependant en Algérie que la connaissance et la maîtrise des paramètres biologiques et physiologiques sous-tendant les champignons entomopathogènes restent encore négligées voire absentes. Ainsi La pathogénicité que l'on définit comme la capacité d'un agent microbien à provoquer une maladie et la virulence correspondant au caractère nocif et violent d'un pathogène sont deux éléments essentiels dans le choix d'un bon candidat de lutte biologique **(Lacey,1997 ; Ferron et al., 1993)**.

C'est dans ce contexte que s'inscrit notre étude qui comporte trois parties :

1. L'isolement et purification des souches de moisissures à partir des vers de farine ***Tenebrio molitor***, carpophilus ***Carpophilus hemipterus*** et la larve de pyrale des dattes ***Ectomyelois ceratoniae***.
2. L'identification des souches isolées ;
3. La mise en évidence de l'activité biocide des trois souches de ***Penicillium sp*** sur le puceron vert des rosiers ***Macrosiphum rosae***.

***Chapitre* I**

Synthèse bibliographique

I-1. Généralité sur les Champignons

Les champignons (fungi ou mycètes) constituent un groupe d'organismes hétérotrophes de vaste gamme d'hôtes, riches de plus 120000 espèces, avec des structures et des caractéristiques biologiques différentes, adaptés au mode de vie saprophyte, parasitaire ou symbiotique **(Semal et al., 1993 ; Kirk et al., 2001)**.

Les mycètes sont des microorganismes eucaryotes, thallophytes filamenteux, aérobies strictes et rarement anaérobies **(Mathew, 1995 ; Tortora et al., 2003)**, ayant un métabolisme hétérotrophe, tirent leur énergie de la respiration et de la fermentation des matières organiques solubles dans leur environnement **(Leveau et Bouix, 1993 ; Nicklin et al., 1999)**.

Sur le plan morphologique, le mycète est constitué d'un thalle qui forme son appareil végétatif **(Hawksworthet al., 1994)**. L'appareil végétatif se compose d'élément de base appelé hyphe qui forme un réseau de filaments ramifiés ; le mycélium **(Mathew, 1995)**. Chez la plupart des mycètes, les hyphes sont divisés par des cloisons, ou septa (septum au singulier) formant des unités qui ressemblent à des cellules distinctes avec un seul noyau, on les appelle alors hyphes segmentés ou septés. Dans quelques classes de mycètes, les hyphes ne contiennent pas des cloisons et ont l'aspect de longues cellules continues à noyau multiples ; ils sont appelés cénocytes **(Tortora et al., 2003)**.

Les hyphes, segmentés ou non sont des petits tubules transparents s'entourent d'une paroi cellulaire rigide formée de polymère de chitine et des polymères de la cellulose, éléments chimiques qui lui confèrent une grande rigidité, une longévité et une grande capacité de résistance à la chaleur et à des pressions osmotiques élevées. De ces faits, les mycètes sont donc capables de vivre dans un environnement dur **(Tortora et al., 2003)**. En effet, les mycètes se développent à pH légèrement acide (3 et 7) et à une température optimale entre 20°C et 30°C, cependant certaines espèces sont psychrophiles, se développant à des températures très basses <15°C ou même parfois à <0°C **(Botton et al., 1990 ; Guiraud, 1998 ; Tortora et al., 2003)**.

Comme chez les bactéries, la digestion des grosses molécules chez les mycètes doit commencer dans le milieu extérieur car seules les molécules de taille relativement petites peuvent franchir la paroi et gagner le cytoplasme **(Davet, 1996)**. Les molécules complexes ou polymères doivent auparavant être dégradés en monomères par des enzymes excrétées ou liées à la paroi. Ces enzymes extracellulaires sont largement exploitées par la bio-industrie **(Botton et al., 1990)**.

La plupart des champignons possèdent deux modalités de reproduction ; la reproduction asexuée et la reproduction sexuée **(Semal et al. 1993)**. La plupart des espèces sont, en effet, capables de former des spores, soit à l'intérieur de sporocystes chez les champignons inférieurs à thalle non cloisonné, soit sur des ramifications différenciées du mycélium (conidiophores) **(Davet, 1996).**

I -2. Champignons entomopathogènes

Le mot « champignons entomopathogènes » ou « champignons qui provoquent des maladies aux insectes » est limité aux genres ou aux espèces de champignons qui peuvent être des agents pathogènes d'arthropodes tels que des insectes ou des acariens. **(Samson et al., 1988).**

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)**. Les genres *Metarhizium*et *Beauveria* sont les plus utilisés en lutte biologique. *Metharizium Anisopliae*a fait l'objet de nombreux travaux relatifs ou le mode d'infestation du champignon **(Hajek et St Leger, 1994),** les mécanismes de la toxicité de l'insecte **(Clarkson etCharnley, 1996)** et la pénétration des spores à travers 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. Ces produits sont caractérisés par la présence de toxines appelées destruxines, sécrétées essentiellement par *M. Anisopliae* **(Vey** et **al.,2001)**.

I -2.1. Mode d'action

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

La cuticule de l'insecte s'impose comme barrière structurellement et chimiquement complexe pour la pénétration du champignon **(Clarkson et Charnley, 1996).**

Les champignons peuvent infecter les insectes par pénétration directe à travers la cuticule de l'insecte **(Clarkson et Charnley, 1996)**, parcontact ou la spore germe et pénètre à travers du tégument en combinant des pressions mécanique et enzymatiques **(Leger ,1993)**.

Le champignon croit rapidement dans l'hémocoele. Les insectes sensibles au champignon meurent généralement dans un délai de 3 à 10 jours. Quand l'insecte meurt, le champignon entre dans un stade hyphal, colonise les organes internes puis sporule à la surface de l'insecte.

Le cycle infectieux est généralement le même pour tous les champignons entomopathogènes le processus de pénétration est l'étape la plus importante de la pathogénèse. Le mode d'infection des champignons entomopathogènes se divise en quatre étapes distinctes : l'adhésion, la germination, la pénétration, la multiplication et la dissémination (Figure 1) **(Ferron et al.,1991)**.

I -2.1.1. L'adhésion

L'adhésion est généralement assurée par les spores qui se fixent sur la cuticule au premier contact avec l'insecte. La réussite de l'infection dépend, entre autre, de la quantité de l'inoculum, des conditions climatiques et de la densité de l'hôte **(Boucias et Pendland, 1988)**. Deux types de spores peuvent assurer l'infection des insectes, les spores sèches et les spores visqueuses **(Samson et al., 1988)**. Le premier type utilise une combinaison de forces électrostatique et chimique pour s'adhérer à la cuticule de l'hôte **(Leger et Frank, 1992)**. Quant au deuxième type, il s'attache à son hôte à l'aide d'une substance visqueuse adhésive.

I -2.1.2. La germination

La germination des spores dépend à la fois de la température et de l'humidité du milieu, ainsi que sur les substances nutritives contenues dans celles-ci **(Samuels et Pinnock, 1990)**. Après la fixation des spores sur l'hôte, ces dernières émettent un tube germinatif qui traverse les assises supérieures de l'insecte pour pénétrer à l'intérieur de celui-ci **(Hong Wan, 2003).** Des moyens physiques et enzymatiques facilitent la pénétration. Aussitôt pénétré, le champignon forme l'appressorium qui lui permet le prélèvement des substances nutritives nécessaires à son développement et à sa reproduction **(Samson et al., 1988)**.Cependant, il existe des champignons entomopathogènes qui ne pénètrent jamais à l'intérieur de l'hôte, mais ils forment leur appressorium sur la cuticule même et procèdent au prélèvement de la

nourriture en employant une combinaison de substances enzymatiques leur permettant la dégradation de la cuticule de l'arthropode **(Goettel et St Leger, 1990)**.

I -2.1.3. La pénétration, multiplication et la dissémination

A l'intérieur de l'hôte, le champignon commence son développement et sa propagation dans les tissus de l'insecte. La réussite de l'attaque dépend, entre autre, de la capacité de l'entomopathogènes à dépasser les mécanismes de défense employés par l'hôte (quinines et mélanines) pour faire face à cette attaque **(Latge et Monsign, 1988)**. La colonisation de l'hôte dépend du stade de l'insecte, de sa taille et de la température ambiante. Alors de la capacité des champignons à surmonter la réponse immunitaire ou de l'insecte à se défendre (mélanisation, réponse cellulaire, etc.) dépend d'une série d'enzymes hydrolytiques pour assurer la pénétration cuticulaire et fournis la nourriture nécessaire à la croissance. On connaît surtout la protéase. Cette enzyme a une forte activité sur la cuticule des insectes et est la protéine prédominante produite pendant la formation de 1'appressorium **(St Léger el al., 1993)**. Après une phase de développement du champignon dans l'hémocoele, les tissus (corps gras, tissu intestinal, tube de Malpighi) sont attaqués, provoquant l'arrêt du processus d'alimentation de l'insecte

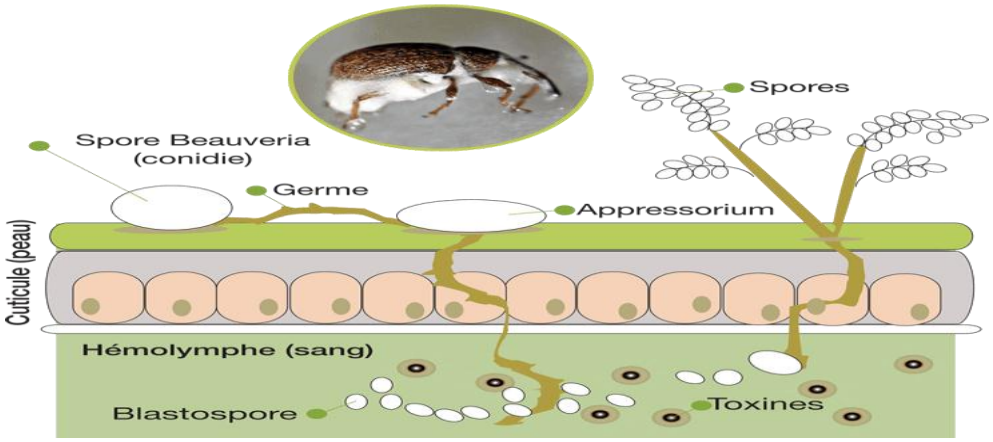


Figure 01 : Cycle biologique des champignons entomopathogènes **(Roxanne S. Bernard2016)**

Lorsque l'insecte meurt, le champignon sécrète un antibiotique, l'oosporine, qui lui permet de surmonter la compétition des bactéries intestinales. Il s'ensuit une momification du cadavre transformé en sclérote, phase nommée saprophyte (Figure 01).

I -2.2.Les métabolites des champignons entomopathogènes

Beaucoup de champignons et de bactéries peuvent produire des composés appelés métabolites secondaires **(Demain et al., 1983)**.Les métabolites secondaires se caractérisent par le fait que, leur production n'est pas indispensable à la croissance du microorganisme lui-même et ils sont de structure et d'activité biologique très diverses qui peut être activités antibiotiques, pharmaceutiques, immunosuppressive et toxiques (mycotoxine et phytotoxine) **(Jae-Hyuk et Keller, 2005 ; Keller et Woobok, 2005)**. Habituellement, ils sont sécrétés sous forme de mélange qui représente une structure chimique unique (**Howksworth et al., 1995 ;Boiron, 1996)**.

Les microorganismes ne produisent pas leurs métabolites secondaires avant d'avoir terminé leur phase de croissance et d'avoir entamé la phase stationnaire, appelé idiophase. En effet, le métabolite secondaire peut être un produit d'un métabolite primaire du même microbe **(Calvo et al., 2002 ; Tortora et al., 2003)** qui se forme au moment où les cellules se divisent durant la phase de croissance logarithmique appelée trophophase**(Tortora et al., 2003)**.

Chez les mycètes, la production de métabolites secondaires est un processus couplé au développement morphologique en particulier à la phase de sporulation **(Calvo et al., 2002)**. Qui peuvent avoir certaines activités :

1. Métabolites qui activent la sporulation (acide linoléique et ses dérivés produit par Aspergillus nidulans) **(Calvo et al., 2002)** ;
2. Pigments nécessaires (mélanine) pour la formation des spores sexuelles et asexuelle **(Kawamura et al., 1999)** ;
3. Métabolites toxiques secrétés par des colonies à la période approximative de la sporulation (la biosynthèse des mycotoxines) **(Alspaugh et al., 1997) pour :**
   - Retarder la germination des spores jusqu'à ce que les conditions environnementales soient favorables ;
   - Protéger les spores en dormance contre des amibes ;

- Eliminer dans l'environnement immédiat des microorganismes concurrents pendant la germination **(Demain et Fang, 2000).**

Génétiquement, les gènes responsables de la biosynthèse des métabolites secondaires sont habituellement arrangés dans des faisceaux contenant également les gènes responsables de la résistance à l'action toxique et parfois, des gènes précurseurs de la biosynthèse d'antibiotiques **(Martin et Liras, 1989 ; Cundliff, 1989 ; Chater et Bibb, 1997 ; Martin, 1998)**.

Ce processus constitue chez les mycètes un régulateur global de métabolites secondaires appelé Lae A. En effet, ce facteur a été identifié chez *A. nidulans* et plus récemment chez *A. fumigatus*. Cette découverte a permis d'augmenter ou diminuer la production des métabolites secondaires chez un mycète en modulant l'expression de Lae A. Par exemple, l'over expression du gène Lae A augmenté considérablement la production de pénicilline chez *A. nidulans* et la production de lovastatine chez l'*A. terreus*et la suppression de Lae A chez *A. fumigatus* élimine la production du gliotoxine et d'autre métabolites secondaires et diminue la virulence de ce mycète pathogène **(Woobok et Keller,2004 ; Keller et Woobok, 2005)**.

I-3. Interaction insectes microorganismes entomopathogènes

Avec plus d'un million d'espèces décrites (plus que pour tous les autres groupes d'animaux combinés), les insectes sont de loin le clade animal le plus diversifié et le plus abondant sur Terre, en terme d'espèces, d'habitat et de biomasse.

Les symbioses entre insectes et micro-organismes ont été démontrées comme pouvant jouer un rôle dans les mécanismes de digestion chez l'insecte hôte **(Brune ,2014)**. Des symbioses sont également impliquées dans les mécanismes de défense des insectes face à leurs prédateurs **(Nirma, et al;2013 ; Sorres et al ; 2017)**. Enfin il a été montré qu'elles contribueraient aux communications intra- et interspécifiques. En effet les micro-organismes auraient une influence sur les systèmes d'accouplement et de reproduction de leur hôte. De plus, ils auraient la capacité de réguler la pathogénicité des micro-organismes transportés chez les insectes vecteurs de maladies **(Engel et Moran ; 2013).**

Les relations entre insectes et micro-organismes sont gouvernées par des interactions allant du mutualisme au parasitisme.

I -3.1. Les relations de mutualisme

I-3.1.1. Les symbioses protectrices

Certains coléoptères du genre *Paederus* produisent une toxine appelée pédérine qui les protège de prédateurs tels que les araignées (Figure 02). **(Kellner et Dettner ; 1996)** Connue depuis les années 50, ce n'est que récemment que ses origines biosynthétiques ont été découvertes. **(Piel ; 2002)** En effet la toxine n'est observée chez le coléoptère qu'en présence d'une gammaprotéobactérieendosymbiotique du genre *Pseudomonas*.

Le séquençage du génome bactérien a alors révélé un cluster de gènes cohérent avec la biosynthèse de la pédérine. **(Piel ; 2002)**Ce fut la première preuve convaincante de la capacité d'un endosymbiote à produire une toxine protégeant son hôte.



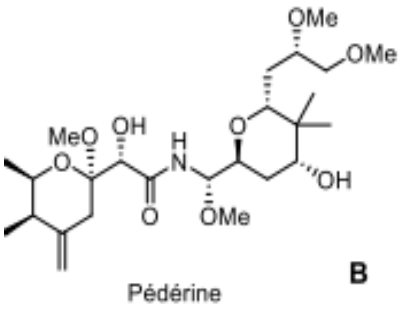


Figure 02 : Relation de symbioseprotectrice entre l'insecte de genre *Paederus et bactériePseudomonas.* **(Kaltenpoth et al ; 2005 ; Kroiss etal ;2010)**

(A) coléoptère du genre *Paederus* ;(B) toxine synthétise par la bactérie

Un autre exemple est celui du psylle asiatique des agrumes, *Diaphorinacitri*, et sa betaprotéobactérie, *CandidatusProfftella* armatura, qui produit un analogue de la pédérine : la diaphorine (Figure 3). **(Nakabachi et al ; 2013)** Bien que toxique pour les cellules de mammifères, le rôle écologique de cette toxine n'est pas connu à ce jour.

Toutefois il est intéressant de noter que l'insecte hôte présente un système immunitaire simplifié en comparaison d'autres insectes. **(Arp et al ; 2016)** La diaphorine pourrait donc contribuer à la protection de l'insecte en complétant son système de défense.

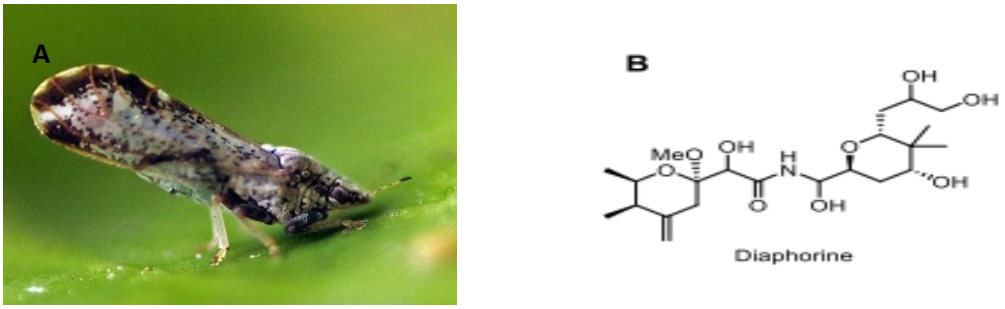


Figure 3 : Relation de symbiose protectrice entrepsylle asiatique des agrumes et *bactérie*Candidatus*Profftella***(Kaltenpoth et al ; 2005 ; Kroiss et al;2010)**

(A) *Diaphorinacitri ;* (B) toxine synthétise par la bactérie Diaphorine

Le cycle de vie des insectes ne favorise pas la transmission des micro-organismes entre les différentes générations. En effet, chez bon nombre d'insectes, les femelles abandonnent les œufs et le seul comportement social est l'accouplement des spécimens adultes. Cependant, les insectes sociaux (termites, fourmis, abeilles) et certaines espèces de guêpes et blattes montrent des comportements permettant les transmissions directes et/ou indirectes, favorisant ainsi l'évolution et l'établissement de symbiotes spécialisés. **(Martinson et al ; 2012)**. La guêpe solitaire *Philanthus triangulum* en est un parfait exemple. Elle tapisse son nid de bactéries du genre *Streptomyces* qu'elle cultive dans des glandes présentes au niveau de ses antennes. Les larves assimilent les bactéries et les distribuent au sein de leurs cocons. La présence de ces bactéries a été décrite comme améliorant le développement larvaire en éliminant les champignons parasites. **(Kaltenpoth et al ; 2005)** En effet ces bactéries produisent un cocktail de composés antimicrobiens à large spectre d'activité, incluant la streptochlorine et plusieurs piéricidines. **(Kroiss et al ; 2010)**.

L'effet complémentaire de ces composés est un parfait exemple de prophylaxie combinée dans un contexte écologique (Figure 4).

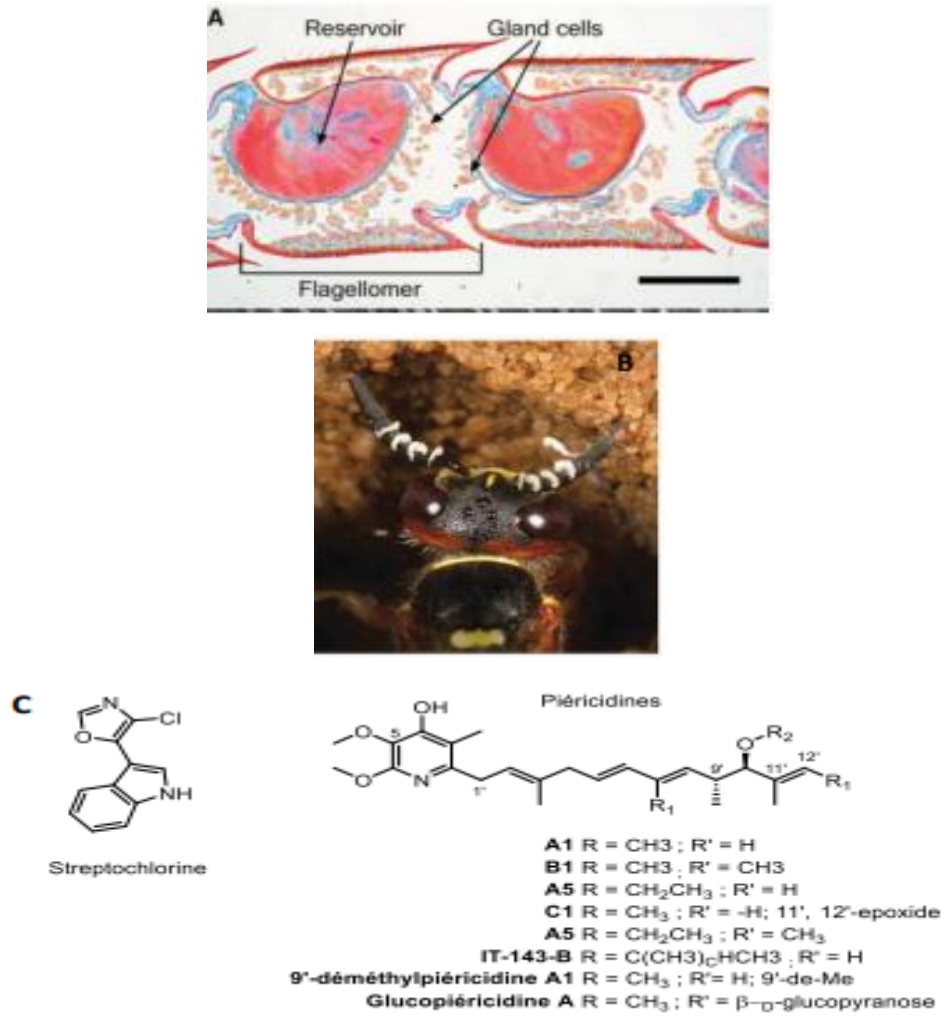


Figure 04 : Relation de symbiose protectriceentre guêpe *Philanthustriangulum* - Bactérie *Streptomyces* **(Kaltenpoth et al ; 2005 ; Kroiss et al;2010)**

A: coupe d'antenne femelle au microscope contenant la bactérie symbiotique en rouge dans les réservoirs **: B :** guêpe femelle avec la bactérie *Streptomyces* au niveau des glandes antennaires ; **C :** antibiotiques isolés des cocons

Les études des interactions mutualistes se fondent généralement sur l'idée que ces associations symbiotiques sont des systèmes bipartites, avec deux membres interagissant isolément des autres organismes. Il n'en est rien puisque les nombreuses études menées sur ces associations ont décrit des mutualismes très évolués faisant intervenir plusieurs acteurs. Les fourmis champignonnistes, parmi lesquelles on retrouve les fourmis du genre *Atta* « coupeuses de feuilles », vivent en symbiose stricte avec un champignon basidiomycète qu'elles cultivent dans des chambres souterraines. Elles lui apportent le substrat nécessaire à son développement et s'en nourrissent en retour. (**Caldera et al ; 2009)**. Bien que ce

mutualisme entre fourmis et champignons fût longtemps considéré comme impliquant deux acteurs seulement, l'équipe de Currie a mis en évidence la présence d'un mutualiste bactérien et d'un parasite spécifique. **(Currie ; 2001)**. L'association des fourmis avec cette bactérie remonterait à des dizaines de millions d'années. **(Currie et al ; 2006)**. En effet, les jardins des fourmis champignonnistes sont fréquemment infectés par un champignon parasite spécialisé et virulent du genre *Escovopsis*. **(Currie et al ; 1999)**. On le retrouve uniquement dans les jardins et déchets de ces fourmis dont il est capable de décimer une colonie entière. Pour s'en protéger, ces dernières peuvent compter sur une bactérie du genre *Pseudonocardia*, présente sur la cuticule des insectes. **(Currie et al ; 1999)**. Cette bactérie lui est bénéfique puisqu'elle produit des composés antimicrobiens spécifiquement dirigés vers le champignon parasite. En effet, il a été démontré que les métabolites secondaires produits par la bactérie *Pseudonocardiasp*. Inhibaient le développement du champignon parasite *Escovospsissp.*, sans effet délétère sur le champignon cultivé par les fourmis. **(Currie et al ;1 999)**. Ainsi elles participent à un système complexe de symbiose multipartite impliquant plusieurs espèces microbiennes.

Parmi les composés bioactifs isolés de *Pseudonocardia* on retrouve la dentigérumycine et la selvamicine, deux antifongiques produits par la bactérie associée aux fourmis *Apterostigmadentigerum* (Figure 05). **(Oh et al ; 2009)**. La selvamicine présente un mécanisme d'action différent des autres polyènes antifongique, elle est actuellement évaluée pour une utilisation clinique. (**Van Arnam et al ; 2016)**.

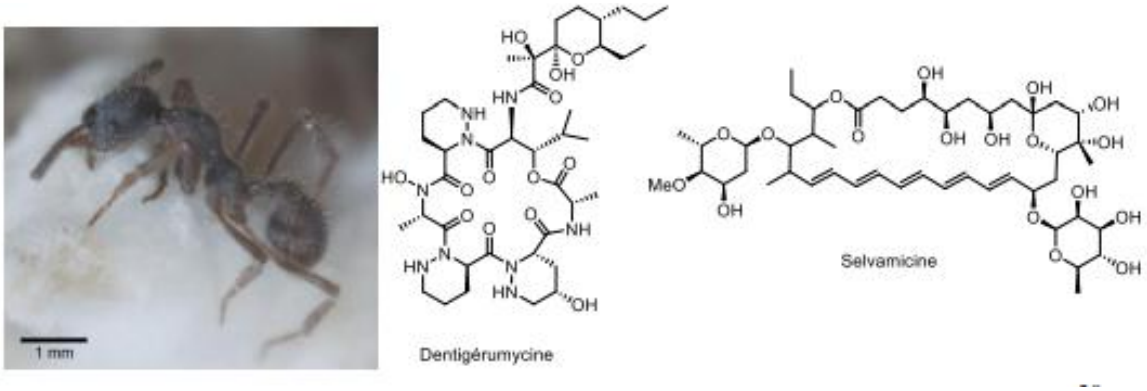


Figure 05 : Relation de symbiose mutualisme entre la fourmi du genre *Apterostigmadentigerum* et molécules isolés de *Pseudonocardia***(Oh et al ; 2009).**

La production d'antifongiques a également été décrite chez des actinobactéries telles que des *Streptomyces* associés à des fourmis champignonnistes. Ainsi des souches isolées de fourmis du genre *Acromyrmex* produisent la candicine et différentes antimycines (Figure 06). **(Barke et al ; 2011)**.

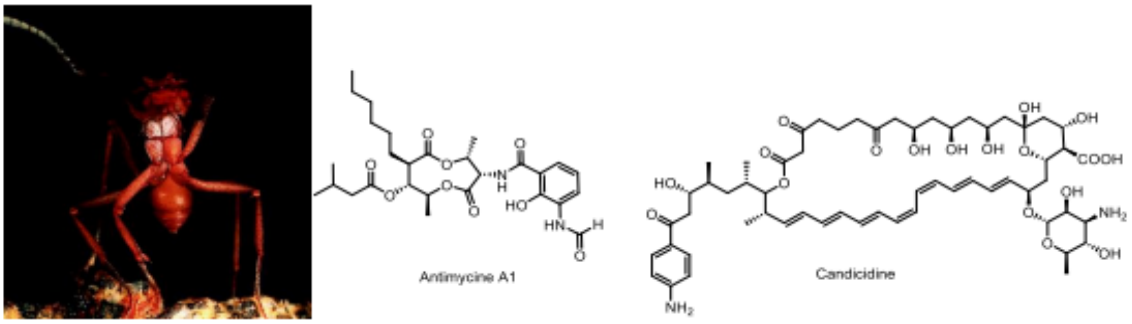


Figure 06 : Relation de symbiose mutualisme entre la fourmi champignonniste du genre *Acromyrmex* avec bactérie *Streptomycesvisible* sur la cuticule (en blanc) et métabolites produits par la bactérie **(Currie et al ; 1999).**

I -3.1.2. Les symbioses nutritives

Les insectes se sont adaptés à une vaste gamme de niches écologiques où ils prospèrent souvent dans des régimes pauvres en nutriments ou réfractaires. Par conséquent, les symbioses nutritionnelles avec des micro-organismes modifiant les nutriments alimentaires sont répandues. Ces relations persistantes et durables contribuent au mode de vie de l'hôte. **(Engel et Moran ; 2013)**.

Les symbioses nutritives (trophobiose, du grec trophê = nourriture et de -biose pour symbiose) sont particulièrement bien documentées chez les insectes. Ceux se nourrissant de matière végétale, en particulier de bois (xylophage), peuvent abriter des communautés microbiennes intestinales impliquées dans la dégradation de la cellulose. Ces communautés microbiennes sont très diversifiées et spécifiques, s'adaptant au régime de l'hôte.Les termites se nourrissent de matières végétales et contribuent ainsi de manière substantielle au cycle mondial du carbone. Les espèces de termites inférieures, considérées comme ayant un mode de vie ancestral, se nourrissent presque exclusivement de bois. Elles vivent en symbiose avec des protistes et bactéries intestinales. **(Wong et al ; 2014)**. Chaque espèce de termite abrite

une communauté intestinale microbienne hautement spécifique, composée de plusieurs centaines d'espèces microbiennes. **(Hongoh ; 2010)**.

Ces microorganismes jouent un double rôle mutualiste pour leur hôte. En premier lieu, ils contribuent à la digestion de la ligno-cellulose et produisent des niveaux élevés d'acétate, ce qui représente la principale source de carbone pour leur hôte. **(Warnecke et al ; 2007)**. Deuxièmement, ils fournissent à leur hôte de l'azote, élément généralement déficient dans la matière végétale en décomposition. (**Breznak et al ; 1973)**.

Les espèces de termites supérieures, appartenant à la famille des *Termitidae* incluent dans leur alimentation les plantes fourragères, la litière, l'herbe, le sol et le lichen, en plus du bois. **(Inward et al ; 2007)**. Ce mode de nutrition induit des changements conséquents au niveau du microbiote intestinal et suggère de nouvelles fonctionnalités dans le processus de digestion. Les termites supérieurs sont capables de digérer par eux-mêmes la cellulose du bois grâce à des enzymes produites dans leur tube digestif. **(Wong et al ; 2014)**. On retrouve aussi dans cette famille des espèces champignonnistes. Ces dernières ont la capacité de construire un « jardin fongique » au sein de la termitière. **(Mueller et al ; 2005)**. Le jardin est construit à partir de matériel végétal partiellement digéré, qui sera dégradé par le champignon. Les ouvrières peuvent ensuite se nourrir du champignon qui leur apporte de surcroît les enzymes nécessaires pour finaliser la digestion de la cellulose. **(Wong et al ; 2014)**.

I-3.2. Les relations de parasitisme : les micro-organismes entomopathogènes

Les relations entre micro-organismes et insectes ne sont pas toujours bénéfiques. Certaines communautés microbiennes peuvent être parasites et se développer aux dépens de leur hôte, pouvant conduire à la mort de ce dernier. Ces micro-organismes pathogènes sont appelés entomopathogènes. Les micro-organismes entomopathogènes sont une composante importante et répandue dans l'écosystème terrestre. On ne les retrouve pas exclusivement dans les lieux d'habitat de leurs cibles. Certaines espèces se retrouvent pratiquement partout sur Terre, également au sein d'environnements extrêmes. **(Vega et al ; 2012)**.

I -4. Les pucerons verts de rosier *Macrosiphum rosae*

I -4.1. Caractéristiques générales des pucerons

Les pucerons verts de rosier *Macrosiphum rosae* appartenant à l'ordre des Hémiptères, au sous-ordre des Homoptères **(Remaudière et Remaudière, 1997)** sont réparties en quatre familles *: Eriosomatidae (Pemphigidae), Chermesidae (Adelgidae), Phylloxeridae et Aphididae*, hétérométaboles (à métamorphose incomplète) et hémimétaboles (stades larvaires ressemblent au stade adulte) sont phytophages **(Dixon, 1998),** Ils colonisent une grande variété de plantes ornementales et maraichères **(Dedryver et al. 2010).** Il existe des espèces de pucerons qui vivent sur les parties supérieures de la plante et d'autres sur les racines **(Crawley, 1992).**

I -4.2. Systématique

Régne : Animalia
Embranchement : Arthropodes
Classe : Insectes
Ordre : Hémiptères
Super-famille : Aphididés
Famille : Aphididae
Genre : Macrosiphum
Espèce : *Macrosiphumrosae***(Myers et al., 2018).**

I -4.3. Description et biologie de *Macrosiphum rosae*

Le Puceron vert du rosier ou le Puceron des pousses de rosier *(Macrosiphum rosae)* mesure entre 1,5-3,5 mm, possède un corps fusiforme, de couleur vert ou rose à brun rougeâtre. Possède de longs appendices noirs et longues cornicules noires effilées. Son cauda est claire allongée (Figure 07) **(Peter et Bryant, 2006)**. Ce dernier est un cosmopolite cause de graves dommages aux divers membres des Rosaceaeet d'autre espèces végétales comme hôte**(Hill, 1997).** Il colonise les boutons floraux et la face inférieure des feuilles. Ce puceron cause le ralentissement de la croissance des plants, la diminution de floraison, la diminution de la longueur des tiges et pas de recroquevillement du feuillage comme les autres pucerons. **(Van Emden et Harrington, 2007).** Ce qui réduise leur valeur décorative. Le plus important

les dommages sont infligés aux inflorescences, en particulier à l'éclatement des bourgeons **(Jaskiewicz, 1997).**

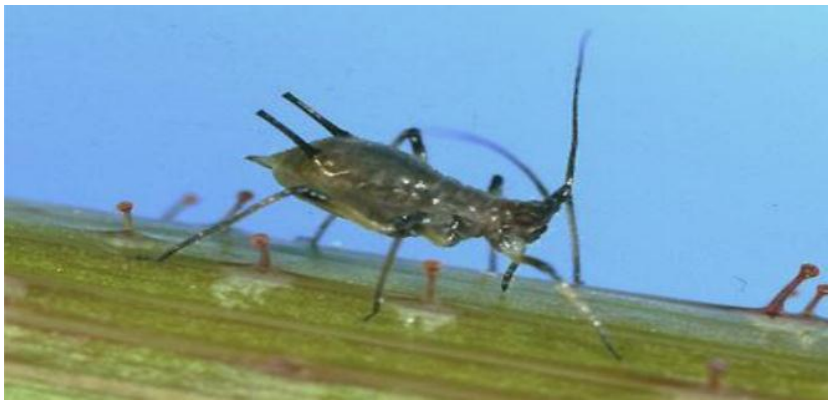


Figure 07 : Adulte aptère de *Macrosiphumrosae***(Peter et Bryant., 2006)**

Cette espèce hiverne surtout à l'état d'œuf sur le rosier, bien que les adultes puissants survivre à l'hiver en conditions favorables. Au printemps et en été, colonies très populeuses se forment. Puis, en été, les formes ailées assurent la dissémination de l'espèce sur d'autres rosiers, tout en pouvant aussi migrer sur des hôtes secondaires tels que chardon à foulon *(Dipsacusfullonum)*, houx commun *(Ilexaquifolium)*,knautia et scabieuses *(Scabiosa)*. Cette colonisation des rosiers peut survenir tout l'été durant, et les nouvelles colonies sont souvent présentes jusqu'en automne, où c'est le retour du froid qui réduit leur développement **(Alford, 2012).**

I -4.4. Dégâts des aphides

Les dommages causés aux cultures par les pucerons sont de différent ordre et sont produits à tous les stades phénologiques. Ils sont répartis en deux catégories **(Leclant, 1982).**

I -4.4.1. Dégâts directs

Les pucerons sont phytophages. Leur système buccal de type piqueur suceur est composé de stylets perforants. Au fur et à mesure qu'il pique la plante et enfonce ses stylets, le puceron émet une salive qui durcit en formant un fourreau. Ce mode de nutrition peut

entraîner au niveau de la plante un affaiblissement par perte directe de sève élaborée **(Hulle et al., 1998)**, éventuellement des déformations de types variés sur les feuilles et les rameaux **(Leclant, 1996).** Ces déformations se résument en l'enroulement et la crispation des jeunes feuilles et par la suite, la réduction du développement des pousses. En plus des réactions phytotoxiques induites par la salive, les pucerons peuvent entraîner la chute des fleurs et des jeunes fruits **(Sekkat, 2007).**

I -4.4.2. Dégâts indirects

a) **Miellat et fumagine :** Les pucerons ingèrent une très grande quantité de sève pour subvenir à leurs besoins en protéines. Le produit de la digestion, encore très riche en sucres est excrété par l'anus, c'est le miellat qui attire les fourmis **(Leclant, 1996).** Des champignons agents de fumagine se développent sur ce substrat et entravent la respiration de la plante et son assimilation chlorophyllienne **(Hulle et al., 1998).**
b) **Transmission des virus :** Les pucerons occupent un rôle de premier plan dans la dissémination des maladies à virus. Ils sont susceptibles de transmettre un nombre important de virus **(Leclant, 1996 ; Leclant, 1982).** La recherche active de la plante-hôte par les pucerons ailés favorise également la dissémination des virus.

I -4.5. Méthodes de lutte utilises contre les pucerons

La protection des plantes comprend toutes les activités et mesures qui visent à protéger les plantes cultivées (grandes cultures, cultures maraîchères, vergers et forêts) des maladies, des ravageurs et de la concurrence d'autres plantes. L'objectif est d'en assurer le rendement **(Schudel, 2008).**

I -4.5.1. Lutte préventive

Elles ont pour but d'éviter la propagation du parasite et d'éliminer les sources de contamination. Elle se fait par :

- Un contrôle des végétaux aux frontières pour éviter l'introduction de nouvelles populations sur un territoire.
- L'installation de brise-vent afin de minimiser le risque de dissémination par le vent **(Wang et al, 2000 ; Lambert, 2005).**

I -.5.4.2. Lutte curative

a) **La lutte chimique :** À l'heure actuelle, les infestations de pucerons sont généralement contrôlées à l'aide d'insecticides de synthèse tels que les néonicotinoïdes et les pyréthrinoïdes de synthèse **(SAUVION et al ; 2013)**. Malgré les progrès réalisés, les insecticides restent responsables de nombreux problèmes tant pour l'environnement (persistance de métabolites à tous les échelons édaphiques) que pour la santé humaine (possibilité de résidus dans les eaux de distribution ainsi que dans les aliments). De plus, l'utilisation massive d'insecticides depuis plus d'une trentaine d'années est à la base de la sélection de populations d'insectes résistants **(NAUEN et ELBERT ; 2003)**. Les scientifiques recherchent de nouvelles approches de lutte biologique utilisant des prédateurs ou des parasitoïdes des pucerons. Cependant, avec leur cycle de reproduction par parthénogenèse, les pucerons ont la capacité de diluer rapidement les attaques de leurs ennemis. Une autre voie actuellement envisagée est la formulation de nouveaux insecticides appelés bioinsecticides. Ces insecticides sont conçus pour perturber certaines fonctions biochimiques essentielles à la survie de l'insecte ravageur visé.

b) La lutte biologique : par l'utilisation des organismes vivants (insectes, bactéries, nématodes……..) ou de leurs dérivés pour contrôler les populations de nuisibles et empêcher ou réduire les pertes ou dommages causés aux cultures.

c) La lutte microbiologique par les champignons entomopathogènes : Les champignons entomopathogènes et leurs métabolites affectent plusieurs traits de la biologie de l'insecte tels que : la survie, le développement, la fécondité et la prise de nourriture **(Amiri et al., 1999 ; Ekesi et al., 2001).**

Les espèces fongiques les plus étudiées dans la lutte biologique contre les pucerons sont les ascomycètes appartenant à l'ordre des Hypocreales (*Beauveria, Metarhizium, Nomura, Verticillium* et *Peacilomyces*). *Beauveria bassianan* et Metarhizium anisopliae ont été considérés comme les plus efficaces en ce qui concerne le taux de mortalité élevé enregistré contre les insectes (épizooties) **(Burges, 1981 ; Carruthers et Soper, 1987 ; McCoy et al., 1988).**

Dans l'étude de **(Abdelaziz Ouided 2019),***Beauveria , Cladosporium* et *Verticillium* ont eu l'effet le plus puissant contre M. dirhudum avec un pourcentage supérieur à 50% (95,83, 63,98 et 51,83%, respectivement). En revanche, Aspergillus et *Metarhizium* ont montré un effet égal estimé de 41,97%. Enfin, *Trichoderma* et *Fusarium* ont eu l'effet le plus faible avec 31,44% et 20,83%, respectivement. *Beauveria* a été le plus efficace avec 90% de mortalité des pucerons après le 7 ème jour d'application, ce qui est conforme aux résultats obtenus et rapportés par **Mburu**

et al. (2009), il a été montré, dans le même contexte, que cette espèce présentait un large spectre et une forte virulence, affectant l'hôte avec une simple action de contact.

d) **La lutte intégrée :** La lutte intégrée vise à combiner toutes les méthodes de lutte possibles et utiles contre le ravageur. Elle comprend le piégeage, le meilleur produit de plantation, le contrôle biologique et l'utilisation rationnelle des pesticides **(Mawussi, 2008).**

Chapitre II

Partie expérimentale

II-Partie expérimentale

II.1. Introduction

Cette étude a pour objectif d'évaluer l'influence des champignons entomopathogénes isolés à partir des vers de farine ***Tenebrio molitor***, carpophilus ***Carpophilus hemipterus*** et la larve de pyrale des dattes ***Ectomyelois ceratoniae*** ; sur le puceron vert des rosiers **(*Macrosiphum rosae*)**.

II .2. Echantillonnage

Les échantillons des larves ***Ectomyelois ceratoniae*** et ***Carpophilus hemipterus*** sont prélevés à partir des dattes stockées. Les dattes récoltées sont ouvertes à l'aide d'un scalpel pour vérifier la présence de larves ou de nymphes de la pyrale. C'est une observation directe à l'œil nu ; de même les vers de farine ***Tenebrio molitor*** sont prélevés à partir de la farine stockées, à l'aide d'un tamis,

II .3. Matériel et méthodes

II .3.1. Isolements et identifications des entomophatogenes

La partie expérimentale est réalisée au sein du Laboratoire de microbiologie, faculté des sciences de la nature et de la vie. Université Yahia Fares, Médéa.

II .3.1.1. Isolement

Les insectes ont été désinfectés selon la méthode de **Zimmermann, (1986)**. Les étapes suivantes (Figure 08):

- Dans d'eaujavel stérile 12° cl pendant 5 minutes,
- Rincés dans l'éthanol,
- Eau distillé stérile pondant 5 minutes,
- Séché sur papier absorbant stérile ;
- Déposées dans des boites de Pétri contenant le milieu PDA (voir annexe) + antibiotique (1g).

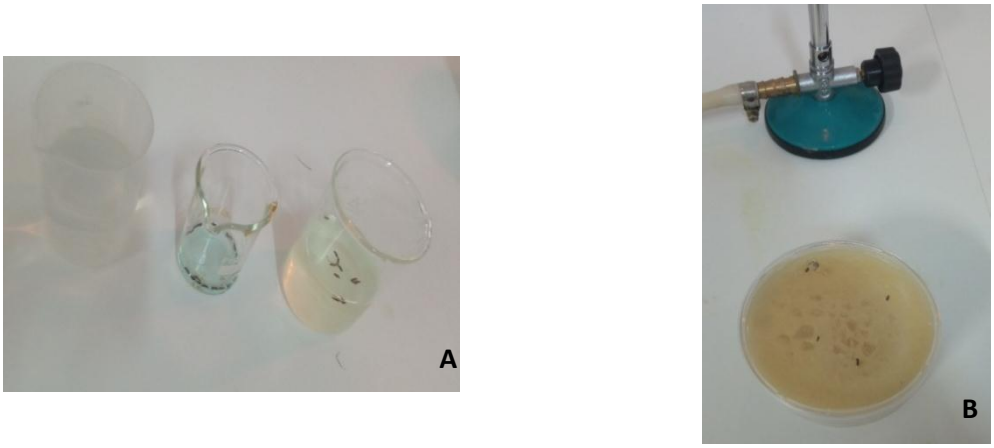


Figure08 : Techniques d'isolement (Original)

(A) : Désinfection des insectes**, (B**): Isolementdes champignons sur milieu PDA.

Les boites ont été incubées à 25°C à l'obscurité et observées quotidiennement pendant trois semaines. Les colonies obtenues sont purifiées puis identifiées morphologiquement.

II .3.1.2.Purification

Les colonies fongiques obtenues ont subi une purification par le repiquage successif nécessaires jusqu'à obtention d'une souche pure (Figure 09), confirmée par l'observation macroscopique et microscopique. Ces derniers ont été incubés (BINDER) à 25°C pendant 6 jours.



Figure 09 : Purification des souches fongiques (Original)

II .3.1.3. Identification

L'identification des isolats est basée sur les observations du mycélium fongique :

- **Observation macroscopique :** qui permet de déterminer la couleur de la colonie pendant le développement et à mesurer son diamètre (Figure10).



Figure 10 : observation macroscopique (Original)

- **Observation microscopique :** détecte la présence du thalle, la présence ou l'absence de septum, la nature de la production, les caractéristiques des fructifications et des spores **(Samson et Haesks, 1988 ; Hawkswarth, 1995 ; Hoog and Guarro, 1995 ; Gams et al., 1998).** La figure (11) montre les étapes de fixation de mycélium par la solution de lactophénol bleu coton (voir annexe) **(Packer et Thomas, 1990)**. A permis la prise et l'identification du mycélium (voir chapitre résultat).

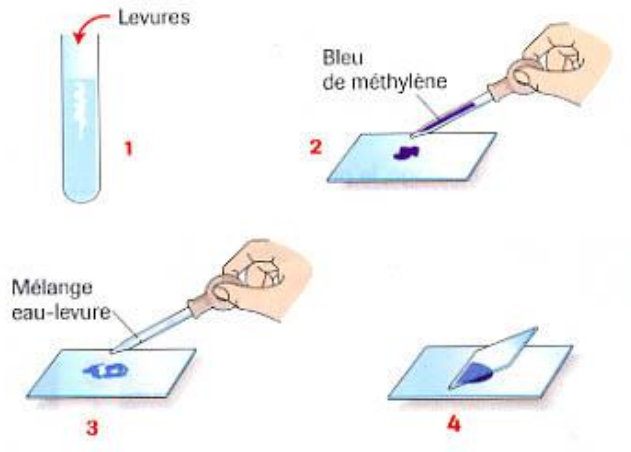


Figure 11 : Technique de préparation des lames. (www.m.maleplate.fr)

II .4. Test de pathogénicité

Afin d'identifier des différents isolats et mesurer la toxicité des champignons par contact, nous avons adopté la méthode de **Butt et Goettel(2000)** d'inoculation directe par

trempage. Cette technique est recommandée par la FAO (organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture) pour évaluer la résistance des insectes aux insecticides **(Devonshire et Rice, 1988).**

II .4.1. Méthode de préparation de la solution entomopathogènes

À l'aide d'une spatule stérile de petits fragments du champignon (*Penicillium sp*) en fructification des trois souches ont été prélevés par grattage de la surface de la boite introduits dans un tube à essai contenant 9 ml d'eau distillée. Et 0.05% de Tween 80 (le tween 80 est une solution d'agent tensioactif non ionique utilisé au tant que supplément dans divers milieux de culture, dans une configuration de laboratoire). La solution mère a été agitée pendant 10 minutes pour une libération maximale des spores. La concentration de la solution entomopathogènes 10^8 (mère) a été évaluée à l'aide d'une cellule hematimétrique (Figure 12) « Cellule de malassez ».

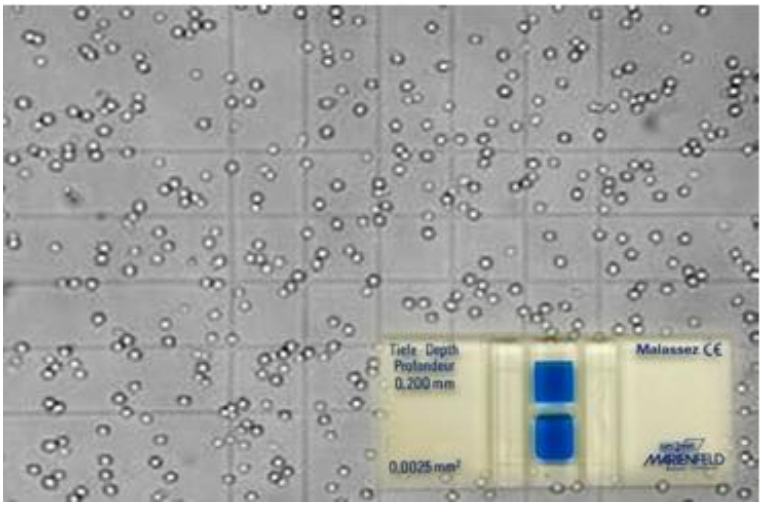


Figure 12 : Dénombrement par la cellule de Malassez (Original)

II .4.2. Test de pathogénicité

Pour le test de pathogénicité (Figure 13)**,** on a adopté la méthode de **Gannasi et *al*., (2006),** les pucerons prélevées a partir des feuilles infestées de rosiers **(*Macrosiphum rosae*)**, ont été trempés pendant 10 secondes dans les différentes suspension du champignon (*penicillium sp)* a une concentration 10^8 spores/ml. Les feuilles de rosiers désinfectées au préalable avec l'eau de Javel, puis rincées plusieurs fois à l'eau distillée sont déposées dans les biotes de Pétri (ϕ= 8.5cm), en suite les pucerons traités sont répartis sur ces feuilles, à raison de 20 individus par boîte avec cinq répétitions par traitement. Quant aux témoins, les

pucerons ont été trempés dans de l'eau distillée et la solution tween à 5% avant d'être répartis de même manier dans les biotes de Pétri.

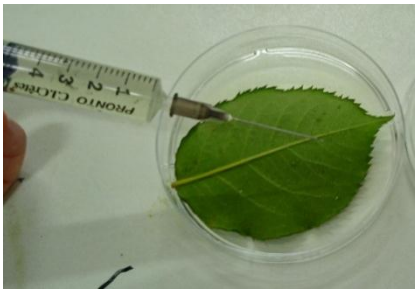


Figure 13 : Test de pathogénicité (Original)

Le contrôle journalier de la mortalité des individus a été effectué dès le premier jour du traitement jusqu'à la mort total individu ($9^{ème}$ jours). À chaque contrôle, les pucerons morts ont été éliminés avant la sporulation du pathogène pour éviter la transmission horizontale de l'infection dans une même boite.

II .3.3. Analyse statistique

Les propriétés insecticides des onze isolats ont été estimées par le pourcentage de mortalités obtenues.

$$\text{La mortalité \%} = \frac{(\text{pucerons vivants des témoins} - \text{pucerons vivants traités})\ X100\ \text{Pucerons vivants des témoins}}{\text{Pucerons vivants des témoins}}$$

Chapitre III

Résultats et Discussions

Résultat

Ce travail porte sur la lutte biologique contre les pucerons verts des rosiers par des champignons isolés à partir de : vers de farine ***Tenebrio molitor***, carpophilus ***Carpophilus hemipterus***, et la larve de pyrale des dattes ***Ectomyelois ceratoniae***.

En effet, L'incubation était dans une étuve à 25° pendent 21 jours on observe des colonies ayant des couleurs et des formes différentes sur les boite de pétrie.

III -1-Etude mycologique

III .1.Isolements et identifications des entomophatogènes

L'isolement des entomopathogène réalisé à partir des vers de farine ***Tenebrio molitor***, carpophilus ***Carpophilus hemipterus*** et la larve de pyrale des dattes ***Ectomyelois ceratoniae*** ; ont révélé la présence de 24 isolats fongiques représentant 03 genres : *Aspergillus, Fusarium et Penicillium.* (Figure 14, tableau1).

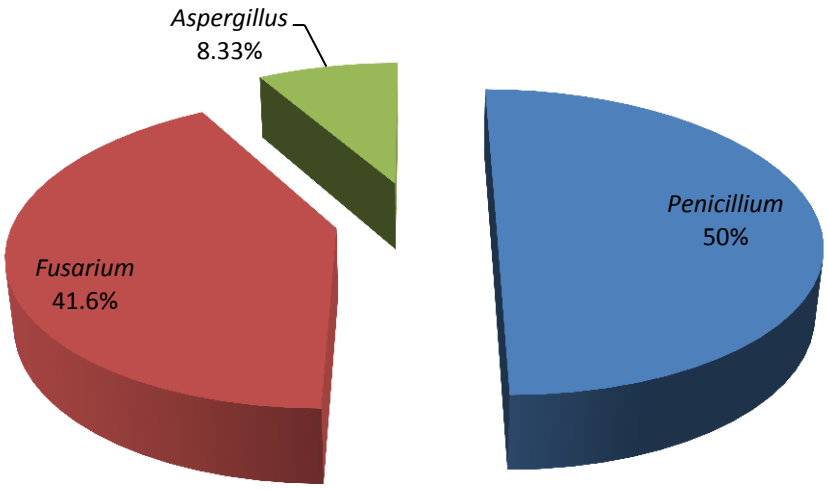


Figure 14 : Pourcentages des isolats fongiques

De l'ensemble des résultats obtenus, il ressort que le genre majoritaire est *Penicillium sp* représente 50% des isolats fongiques avec 12 espèces d'où :

- 07 espèces à partir de vers de farine (*Penicillium sp1, Penicillium sp2, Penicillium sp3 Penicillium sp4, Penicillium sp5, Penicillium sp6 et Penicilliumsp7*) ;
- 03 espèces à partir de carpophilus (*Penicillium sp1, Penicillium sp2* et *Penicilliumsp3*) ;
- 02espèces à partir de pyrale des dattes (*Penicillium sp1 et Penicillium sp2*).

Suivi par le genre *Fusarium sp* avec une fréquence de 41.6% regroupe 10 espèces :

- 01 espèce à partir de ver de farine (*Fusarium sp*) ;
- 03 espèces à partir de carpophilus (*Fusariumsp1, Fusariumsp2* et *Fusariumsp3*) ;
- 06 espèces à partir de pyrale des dattes (*Fusariumsp1, Fusariumsp2, Fusariumsp3, Fusariumsp4, Fusariumsp5* et*Fusariumsp6*).

Enfin le genre *Aspergillus* avec 8,33% regroupent deux espèces :

- 02 espèces d'*Aspergillus niger*.

Tableau1 : Aspect macroscopique et microscopique des fongiques.

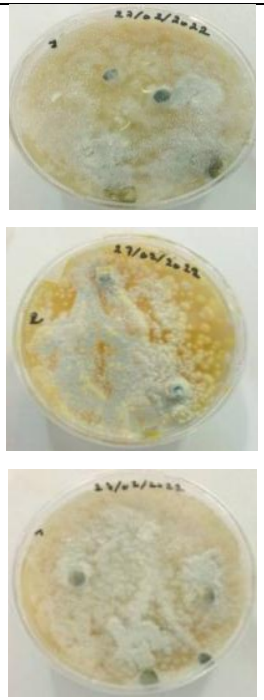
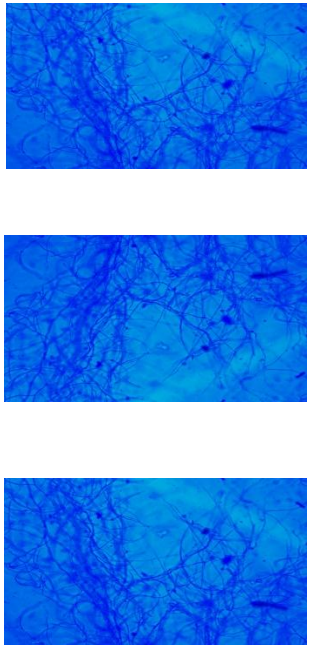
Isolat fongique	Identification macroscopique		Identification microscopique		
	Observation macroscopique	Aspect	Observation microscopique (G x 40)	Caractéristique	Genres
Souche 1 Souche2 Souche3		✓ Cotonné ✓ Filament blanc, absence des gouttelettes d'eau (exsudat)		Septé et incoloremycélium; ➢ Trois types de conidies :en forme de faucillemacroconidies à plusieurscloisons transversales ;microconidies scalariformes;blastoconidies avec 0 à 3cloisons	***Fusariumsp***

Tableau1 : Aspect macroscopique et microscopique des fongiques. (Suite 01)

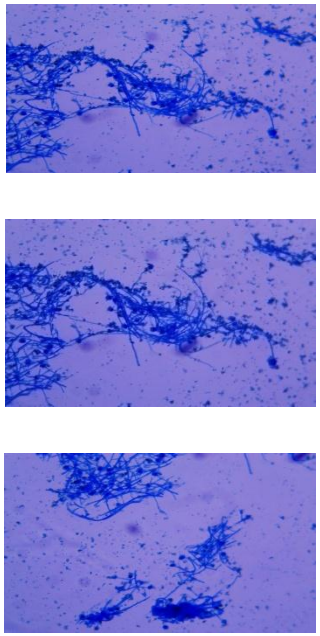
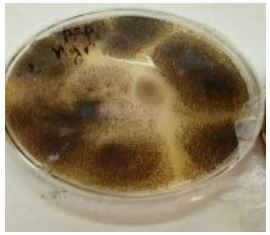
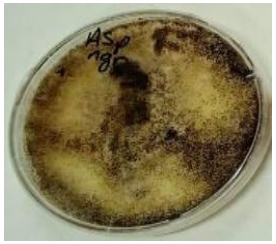
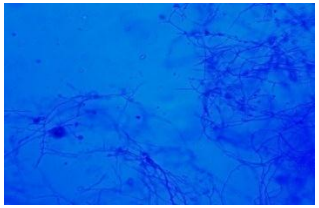
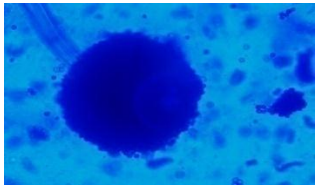
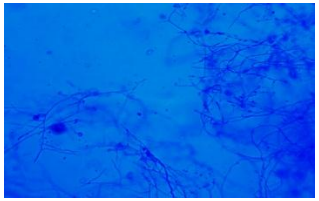
Isolat fongique	Identification macroscopique		Identification microscopique		
	Observation macroscopique	Aspect	Observation microscopique (G x 40)	Caractéristique	Genres
Souche1 **Souche2** **Souche3**		✓ Poudreux ✓ Pigmentation irrégulière ✓ Présence des gouttelettes d'eau (exsudat)		➢ Une organisation en brosse sous la forme d'un septum etfilament mycélien hyalin,des conidiospores simples qui se terminent par un crayon. Les phialides sont disposées dans extrémités des conidiospores	***Penicillium sp***

Tableau1 : Aspect macroscopique et microscopique des fongiques. (Suite 02)

Isolat fongique	Identification macroscopique		Identification microscopique		
	Observation macroscopique	Aspect	Observation microscopique (G x 40)	Caractéristique	Genres
Souche1 Souche2 Souche3	  	✓ ras à poudreux, velouté parfois cotonneux, ✓ développement fongique apparaissant de couleur noire sous peau sèche	  	➢ Une tête ronde, formes globuleuses, elliptiques, échinulées, verruqueuses ou longitudinales, développent en colonies	***Aspergillus niger***

III.2.Test de pathogénicité

Les champignons les plus utilise dans la lutte biologique de genres *Beauveria, Metarhizium, Tolypocladium, Verticillium et Paecilomyces***(Kamp et Bidochka,2002)**.Afin d'apporte de plus à la lutte biologique nous avons choisi l'utilisation de *Penicillium sp*Commeun biocide issu des trois espèces d'insectes différentes à savoir :

1. Vers de farine ***Tenebrio molitor***,
2. Cartophiles ***Carpophilus hemipterus***,
3. Larve de pyrale des dattes ***Ectomyelois ceratoniae***.

Les biocides essais sont été effectués au niveau de laboratoire de la faculté des sciences à l'université de Médéa dans les conditions contrôlées.

III.3.Tests d'efficacités des traitements biocides de différents biocides des souches *penicillium sp* sur la mortalité des adultes pucerons verts de rosier

12 espèces fongiques ont été isolées d'échantillons de Vers de farine *Tenebrio molitor*, Cartophiles *Carpophilus hemipterus*, et Larve de pyrale des dattes *Ectomyelois ceratoniae*. À partir de trois espèces nous avons utilisés les souches *Penicillium sp* sur des pucerons verts de rosier. Des contrôles journaliers ont été effectués afin de prendre en compte les individus morts (tableau 02) et les éliminés pour réduire la surcharge d'infection par *Penicillium sp* jusqu'à la mortalité globale des individus.

La confirmation de la pathogénicité des champignons collectés et identifiés, a été réalisée par évaluation de leur aptitude à induire l'infection et/ou des mortalités au sein des biocontrôls réalisées sur adultes de *Macrosiphum rosae*. Des tests d'entomopathogénicité de ces trois (03) souches entomopathogènes révèlent un effet de mortalité de l'ordre de 92% sont enregistrées avec la souche (P) *penicillium sp* issue de la pyrale des dattes dès le seizième jour avec une forte sensibilité observée dès le premier jour(tableau02) avec la souche (C) *penicillium sp* issue du carpophilus la mortalité été de l'ordre de 92% sont enregistrées à partir cinquième jour**.** Cependant, une moindre pathogénicité variant du vers de farine de 80 à 83 % a été notée entre cinquième au septième jour (tableau 02)

Tableau 02 : Suivi journaliers de la mortalité des individus adultes de pucerons vert de rosier de différentes souches *Penicillium sp*

	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7	J8
Souche (P) *penicillium sp* issue de la pyrale des dattes								
R1	5%	17%	41%	63%	69%	92%	100%	100%
R2	20%	24%	40%	60%	77%	82%	90%	100%
R3	10%	21%	33%	41%	67%	71%	85%	100%
R4	10%	11%	29%	47%	57%	75%	91%	82%
R5	10%	17%	31%	43%	54%	67%	100%	100%
Souche (C) *penicillium sp* issue du carpophilus								
R1	10%	28%	47%	56%	85%	100%	100%	100%
R2	15%	35%	47%	53%	54%	64%	80%	89%
R3	0%	11%	39%	53%	60%	64%	92%	100%
R4	10%	22%	41%	47%	71%	92%	73%	100%
R5	5%	11%	13%	7%	23%	33%	55%	100%
Souche (F) *penicillium sp* issue du vers de farine								
R1	10%	22%	29%	56%	54%	58%	83%	100%
R2	0%	0%	7%	27%	31%	36%	50%	100%
R3	0%	11%	39%	71%	80%	86%	85%	100%
R4	0%	11%	29%	60%	64%	67%	64%	100%
R5	10%	17%	38%	71%	77%	83%	82%	100%

R1, R2, R3, R4 et R5 : répétition des biocontrôles

III.4.Effet d'entomopathogène de différentes souches *Penicillium sp* sur la mortalité moyenne des pucerons verts de rosier

Le suivi des pucerons traités par la solution entomopathogène de différentes souches à base de *Penicillium sp* nous a permis de remarquer une variabilité mortalité moyenne journalière du puceron vert de rosier (Figure 15)

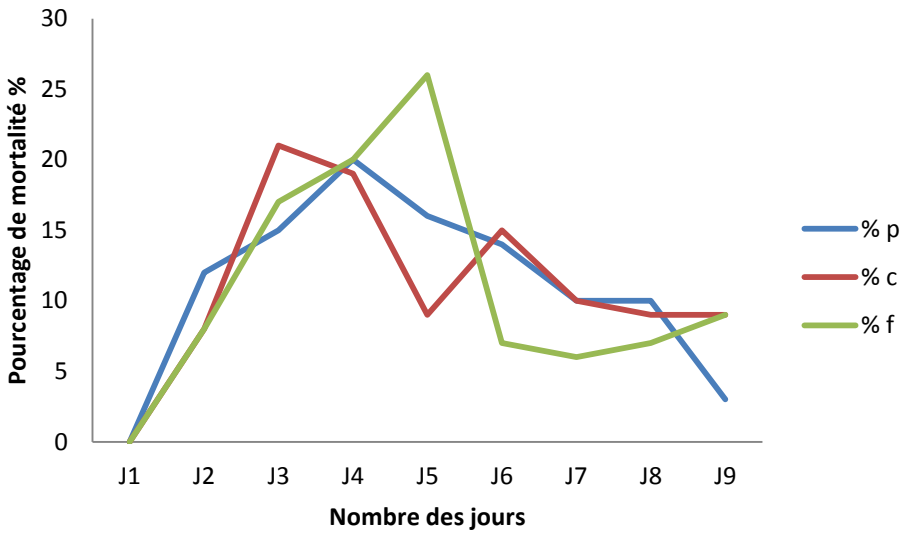


Figure 15 : Effet d'entomopathogène de différents biocides des souches *penicillium sp* sur la mortalité moyenne des adultes pucerons verts de rosier

(F = ver de farine ; C = carpophilus ; P = pyrale des dattes

Sur l'ordre chronologiques on remarque que le biocide de la souche Carpophilus (***Carpophilus hemipterus***) (c) a montré une mortalité moyenne importante des adultes des pucerons verts de rosier dès le troisième jour par contre le biocide de la souche de la larve de vers de farine (***Tenebrio molitor***) (f) a montré une mortalité moyenne plus importante des adultes des pucerons verts de rosier à partir du cinquième jour. Par ailleurs nous avons observé le chevauchement de mortalité moyenne des adultes des pucerons verts de rosier des trois biocides des souches de *Penicillium sp* jusqu'à le neuvième jour.

Discussion

La lutte contre le puceron vers des roses pose une problématique quant à la stratégie et les moyens à utiliser ; il constitue de nouveaux défis à relever. Les méthodes de lutte biologique, peuvent constituer une réponse aux attaques de cet insecte. En plus de l'utilisation des parasitoïdes, la lutte microbiologique pourrait être envisageable en particulier après les résultats fort satisfaisants qu'elle a donnés contre d'autres ravageurs des cultures. Il s'agit évidemment de la lutte par l'utilisation des entomopathogènes (champignons et bactéries) inféodés à ce parasite **(Saiah et al., 2011).**

Approximativement750 espèces de champignons décrites sont des pathogènes obligatoires ou facultatifs sur un ou plusieurs stades de développement des insectes dans des habitats aquatique, terrestres et souterrains **(Mccoy et al,1988).**

Les champignons entomopathogénes étant considérés comme des agents de mortalité des insectes naturels, on s'intéresse dans le monde entier à leur utilisation et leur manipulation pour la lutte biologique contre les insectes et d'autres ravageurs ,en particulier, les phases asexuées de champignons ascomycètes sont très étudiées en raison de leurs caractéristiques favorisant leur utilisation comme insecticides biologiques, ces derniers peuvent être élevés sur des milieux artificiels**(Amiri et al,1999 ;Eskesi et al,2001)**.

Les résultats obtenus montrent que sur l'ordre chronologiques montre que le biocide de la souche Carpophilus (***Carpophilus hemipterus***) (c) a montré une mortalité moyenne importante des adultes des pucerons verts de rosier dès le troisième jour par contre le biocide de la souche de la larve de vers de farine (***Tenebrio molitor***) (f) a montré une mortalité moyenne plus importante des adultes des pucerons verts de rosier à partir du cinquième jour. Par ailleurs nous avons observé le chevauchement de mortalité moyenne des adultes des pucerons verts de rosier des trois biocides des souches de *Penicillium sp* jusqu'à le huitième jour. Les champignons entomopathogénes et leurs métabolites affectent plusieurs traits de la biologie de l'insecte tels que : la survie, le développement, la fécondité et la prise de nourriture **(Amiri et al,1999 ; Eskesi et al,2001)**.

Le mode d'infection de *penicillium* se divise en quatre étapes distinctes qui sont l'adhésion, la germination, la différentiation ; la pénétration. L'adhésion est caractérisée par un mécanisme de reconnaissance et de compatibilité des conidies avec les cellules tégumentaires de l'insecte **(Vey et al., 1982)**. La colonisation de l'hôte se fait lorsque le champignon parvient à surmonter les mécanismes immunitaires de défense de l'insecte **(Boman et Steiner, 1981 ; Soderhall, 1981)** et envahit l'hemolymphe **(Ferron et al., 1993)**.

À la mort de l'insecte, le champignon produit un antibiotique Oosporin qui va lui permettre de surmonter la compétition des bactéries du tube intestinal de l'insecte. La phase saprophyte va être caractérisée par la mummification du cadavre transformé en sclérote. Les hyphes traversent le tégument préférentiellement au niveau inter segmentaire puis le recouvre d'un feutrage mycellien blanc cotonneux qui va amorcer la formation des conidiospores **(Weiser, 1972)**

Conclusion

Les microchampignons entomopathogènes occupent une place privilégiée parmi les agents microbiens de lutte biologique. En effet, leur mode d'action assez particulier, par ingestion ou par contact, permet de contrôler efficacement tous les stades du ravageur.

Dans le présent travail qui pour objectif principal l'isolement des champignons entomopathogènes à partir des insectes des denrées stockées et évaluations de leurs activités biocidessur le puceron vers des roses**,** les résultatsd'isolement des champignons entomopathogènes à partir des vers de farine *Tenebrio molitor*, carpophilus *Carpophilus hemipterus* et la larve de pyrale des dattes *Ectomyelois ceratoniae* .La purification et de l'identification a mis en évidence la présence de 24 isolats fongiques représentant 3 genres *Aspergillus*, *Fusarium* et *Penecilium*. Le genre majoritaire est *Penicillium* avec une fréquence de 50 %, suivie par le genre *Fusarium* avec un taux de 41 ,6% et enfin le genre *Aspergillus sp* avec 8,33%.

Nous avons utilisé le *Penicillium* comme un biocide issu des trois espèces d'insectes différentes à savoir : Vers de farine *Tenebrio molitor*, Carpophilus *Carpophilus hemipterus* et Larve de pyrale des dattes *Ectomyelois ceratoniae*. Le traitement sur *Macrosiphum rosae* par *Penicillium* de la souche (f) vers de farine a montré une aptitude pathogénicité importante.

- **Abbot's. 1925.** A method of computing the effectiveness of an insecticide:journal ofthe American Mosquito control association Vol.3 N;2.
- **Abdelaziz Ouided** Application des champignons entomopathogènes sur les puceronsdu blé ; 2019.
- **Alford David.V. 2012** : Ravageurs des végétaux d'ornement : arbres, arbustes, fleurs.Manson publishing ltd, 2012.pp: 110-111.
- **Alspaught J.A., Perfect J.R and Hatman j. 1997**. Cryptococcus neoformens mating andvirulance are regulated by the G- protein Alpha subinit GPAI and Camp.Genes.Dev.11 :3206-3217.
- **Amiri B., Ibrahim L. and Butt T. 1999.** Antifeedant properties of destruxins and their potential use with the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae* for improvedcontrol of crucifer pest. Biocontrol Science and Technology 9, p. 487-498.
- **Anand AAP, Vennison SJ, 2010.**Isolation and characterization of bacteria from the gutof Bombyx mori that degrade cellulose, xylan, pectin and starch and their impact ondigestion. J Insect Sci. ;10 :107.
- **Anonyme., 2006.** Profil National pour l'Evaluation des capacités deGestion Rationnelle des Produits chimiques, 60p : 13.
- **Arp AP, Hunter WB,** 2016; Innate immune system capabilities of the Asian citruspsyllid, Diaphorina citri. Front Physiol. 7:417–418.
- **Barke J, Seipke RF, Worgan J T 2010; A** mixed community of actinomycetes produce multipleantibiotics for the fungus farming ant Acromyrmex octospinosus. BMC Biol. 8 :109.
- **Benzine M., 2006.** Les pesticides, Toxicities, Résidus et analyse. Lestechnologies de laboratoires- N°0. 32p.
- **Boiron P. 1996.** Organisation et biologie des champignons. Edition Nathan. P: 13 69.
- **Boiron P., 1996.**Organisation et biologie des champignons. Nathan. Paris. P. 19-79.
- **Botton B., Breton A., Fevre M., Gauthier S., Guy P H., Larpent J P., Reymond P.,Sanglier J J., Vayssier Y., Veau P. 1990.** Moisissures utiles et nuisibles importanceindustrielle. 2ème édition. Masson. Collection Biotechnologies. P : 34-428.

- **Botton B., Breton A., Fevre M., Gauthier S., Guy P H., Larpent J P., Reymond P.,Sanglier J J., Vayssier Y., Veau P. 1990.** Moisissures utiles et nuisibles importanceindustrielle. 2ème édition. Masson. Collection Biotechnologies. P : 34-428.

- **Botton B., Bretton A., Fever M., Gautier S., Guy Ph., Larpent J.P., Reymond P.,Sanglier J-J., Vayssier Y and Veau P. 1990.** Moisissures utiles et nuisibles, importanceindustrielle, (edn) Masson, Paris.
- **Bouchet F., Lefevre C., West D., and Corbett D., 1999:** First paleoparasitologicalanalysis of the midden in the Aleutian Islands (Alaska): results and limits. J Parasitol85: 369-372.
- **Boucias,D. G. et Pendland J. C. 1988.**Nonspecific factors involved in the attachmentof entomopathogenic deuteromycetes to host insect cuticle. Appl. Environ. Microbiol.54(7) : 1795-1805.
- **Bouziani M., 2007.** L'usage immodéré des pesticides : De gravesconséquences sanitaires. Le guide de la médecine et de la santé en Algérie.Santemaghreb.com. 4p.
- **Breznak, J.** A., Brill, W. J., Mertins, J. W., and Coppel, H. C., *Abstr. ann. Meeting Amer. Soc. Microbiol.*, 168 (1973).
- **Breznak JA, Brune A. 1994;**Role of microorganisms in the digestion of lignocellulose bytermites. Annu Rev Entomol. 39:453–487.
- **Brooks A. J., Aquino de Muro. A, Burree E., Moore D., Taylor,M.A & Wall. R. 2004.**Growth and pathogenicity of isolates of the fungus *Metarhizium anisopliae* against theparasitic mite, Psoroptes ovis: effects of temperature and formulation. Pest ManagSci., 60, 1043-1049.
- **Brune A 2014;** Symbiotic digestion of lignocellulose in termite guts. Nature. 12:168–180.
- **Burges, H. D.1981.** Safety, safety testing and quality control of microbial pesticides.In: Burges HD, editor. Microbial control of pests and plant diseases 1970-1980.London: Academic Press, pp. 737-767.
- **Calvo A.M., Wilson R.A., BockJ.W and Keller N.P. 2002.** Relationship betweensecondary metabolism and fungal development. Microbiol.Mol.Bio.Rev. 66: 447-459.
- **Carruthers, RI and Soper RS. 1987.**Fungal diseases. In Epizootiology of InsectDiseases, J. R. Fuxa and Y. Tanada, eds.; New York: John Wiley and Sons.
- **Champ S.P and El-Zayat A.A.E. 1989.** Isolation of sexual sporulation hormone from*Aspergillus nidulans.* J. Bacterial.171: 3982-3988.
- **Champ S.P., Raw P. and Chang A.** 1987. An endogenous inducer of sexualdevelopement in *Aspergillus nidulans. J.* Gen. Microbiol. 133: 1383- 1388.

- **Chater K and Bibb M. 1997.** Regulation of bacterial antibiotic production, Klein KaufAND H. Vandhoven edn. INK.
- **Clarkson J. M & Charnley A. K. 1996.** New insights into the mechanisms of fungalpathogenesis in insects. Trends Microbiol., 4, 197-203.
- **Crawley M., 1992:** Natural enemies. Blackwell publishing. 592p.
- **Cundliffe E. 1989**. How antibiotiic- producing organisms avoid suicide.Ann. Rev.Microbiol .43: 207-333.
- **Currie C, Mueller UG, Malloch D. 1999 ;**The agricultural pathology of ant fungus gardens. ProcNatl Acad Sci USA 96 :7998– 8002.
- **Currie CR, Poulsen M; Mendenhall, J.; Boomsma, J. J.; Billen, J.2006;**Coevolved crypts and exocrine glands supportmutualistic bacteria in fungus-growing ants. Science. 311: 81–83.
- **Currie CR, Scott JA, RC Summerbell, D Malloch - Nature1999**; Fungus-growing ants use antibiotic-producing bacteria tocontrol garden parasites. Nature. 398: 701–704.
- **Currie CR. A. 2001;** Community of ants, fungi, and bacteria: a multilateral approach tostudying symbiosis. Annu Rev Micro 55:357–380.
- **Currie CR.2001;** Prevalence and impact of a virulent parasite on a tripartite mutualism.Oecologia. 128:99– 106.
- **Davet P. 1996.** Vie microbienne du sol et production végétales, (edn) INRA.Paris.
- **Dedryver C. A., Le Rarec A., et Fabre f. 2010 :** Les relations conflictuelles entre lespucerons et les hommes : une revue sur leurs dégâts et les stratégies de lutte. C. R.Biologies 333 : 539-553.
- **Demain A., Aharowitz Y and Martin J.F. (1983).** Metabolic control of secondarybiosynthetic pathway. Bitechnolgy serie, 1983.
- **Dixon A.F.G., 1998:** Aphid Ecology: An optimization approach, Chapman & Hall,London, 289 p.
- **Ekesi S., Maniania N. K and Lux S. A. 2003.** Effect of soil temperature and moistureon survival and infectivity to four tephritid fruit fly puparia. J. Invertebr. Pathol., 83,157-167.
- **Ekesi S., Maniania N. K et Lux S. A. 2003.**Effect of soil temperature and moistureon survival and infectivity to four tephritid fruit fly puparia. J. Invertebr. Pathol., 83, 157-167.

- **Engel P, Moran NA. 2013;**The gut microbiota of insects – diversity in structure andfunction. FEMS Microbiol Rev. 37: 699–735.
- **Ferron, P., Fargues, J. et Riba, G. 1991.**Fungi as microbial insecticides againstpests. In Handbook of Applied Mycology. (Arora, D.K., Ajello, L., Mukerji, K.G.,Eds.) Vol 2, 665-706, Marcel Dekker, New York.
- **Ferron, P., Fargues, J. et Riba, G.1991.**Les champignons agents de luttemicrobiologique contre les ravageurs. In Handbook ofappJied mycology, 2 : 237-270.
- **Gams W., Haekstra E.S. and Aptroot A. 1998.** CBS. Course of mycology.
- **Ganassi S., Moretti A., Stornelli C., Fratello B. etamp; Pagliai A.M. 2006.**Effect of*Fusarium, Paecilomyces* and *Trichoderma* formulations against aphid *Schizaphisgraminum*. Mycopathologia 151, p. 131-138.
- **Goettel, M. S. et St Leger R. J. 1990.** Pathogenicity and growth of *Metarhiziumanisopliae* stably transformed to benomyl resistance. Curr. Genet. 17: 129-132.
- **Goettel, M. S. et St Leger R. J. 1990.** Pathogenicity and growth of *Metarhiziumanisopliae* stably transformed to benomyl resistance. Curr. Genet. 17 : 129-132.
- **Guiraud J. 1998.** Microbiologie alimentaire. Edition Dunod, Paris. P: 8-101.
- **Hajek A. E and St.leger R. J. 1994.** Interactions between fungal pathogens and insecthosts. Ann. Rev. Entomol., 39, 293-322.
- **Hapwood D.A. 1988.**Toward's and understanding of gene switching in Streptomyces,the basis of sporulation and antibiotic production. Proc.R. Soc.Land B. 235: 121-138.
- **Hapwood D.A. 1988.**Toward's and understanding of gene switching in Streptomyces,the basis of sporulation and antibiotic production. Proc. R. Soc.Land B. 235: 121-138.
- **Hautier. L., 2003 -** Impacts sur l'entomofaune indigène d'une coccinelle exotiqueUtilisée en lutte biologique. Diplôme d'Etudes Spécialisées en Gestion del'Environnement., Université Libre de Bruxelles 13 : 1-99.
- **Hawksworth D.L., Kirk P.M., Sutton B. and Pegler D.N. 1995.** Dictionnary of thefungi, 8th ed. CAB.International Walling Ford. UnitedKingdom.
- **Hawksworth D.L., Kirk P.M., Sutton B.C. and Pegler D.N. 1994.** Ainsworth andBysby's dictionary of the fungi, 8 th ed. International Mycological Institute, Egham.Unitted. Kingdom.

- **Hill D. S. 1997:** The economic importance of insect. Chapman and hall: london. 59.Hoffman E.T.A. 1974: contes fantastiques complets in-8 broché – 3 vol. Ed.Flammarion - coll. L' age d'or. 1050p.
- **Hong Wan, Bruce E. Ankenman et Barry L. Nelson. 2003.** Controlled SequentialBifurcation: A New Factor -Screening Method for Discrete- Event Simulation.Proceedings of the 2003 Winter Simulation Conference, December 7-10, 565Ŕ573.
- **Hongoh Y. 2010;** Diversity and genomes of uncultured microbial symbionts in the termitegut. Biosci Biotechnol Biochem. 74 : 1145–1151.
- **Hulle M., Turpeau E., et Leclant F. 1998 :** les pucerons des arbres fruitiers, cyclebiologique et activités de vol. Ed. Acta, paris, 80p.
- **Inward DJG, Vogler AP,2007;**A comprehensive phylogenetic analysis of termites(Isoptera) illuminates key aspects of their evolutionary biology. Mol Phylogenet Evol.44:953–967.
- **Jae-Hyuk Y.et Keller N.P. 2005.**Regulation of secondary metabolisme infilamentous fungi. Ann. Rev. Phytopathol. 43: 437- 458.
- Kaltenpoth M, Gottler W, et al. Symbiotic Bacteria Protect Wasp Larvae from FungalInfestation. Curr. Biol., 2005; 15:475–479.
- **Kamp A.M et Bidochka M.J. 2002.**Conidium production by insect pathogenic fungion commercially avaible agars. Lett.App. Microbiol.35:74-77.
- **Kawamura C., Tsujimoto T. and Tsug T. 1999.** Targeted dissuption of melaninbiosynthesis gene effects conidial development and UV tolerance in the japeneses pearpathotype of *Alternaria* alternate. Mol. Plant. Microbe. Interact. 12: 59- 63.
- **Keller N.P. and Woobok.J. 2005.**Aglobal regulatory of secondary metabolitebiosynthesis in fungi, (edn) Warfe.
- **Kellner RL, Dettner K. 1996;**Differential efficacy of toxic pederin in deterring potentialarthropod predators of Paederus (Coleoptera: Staphylinidae) offspring. Oecologia. 107:293–300.
- **Kirk P.M., Cannon P.F., David J.C., Egham U.K. and Stophes J.A. 2001.** Ainsworthand Bysby's Dictionnary of fungi, 9 th edn .CABI. Bioscience.UK. Center and centralBureau Voie. Ultrech. The Net.
- Kroiss J, Kaltenpoth M, et al. Symbiotic Streptomycetes provide antibioticcombination prophylaxis for wasp offspring. Nat Chem Biol. 2010; 6:261–263.

- **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.
- **Larson R. A. 1992:** Introduction to floriculture. Academic Press, Inc.
- **Latge J. P. and Monsigny M. .1988.** Visualization of exocellular lectins in theentomopathogenic fungus *Conidiobolus obscurus*. J. Histochem. Cytochem. 36 : 1419-1424.
- **Leclant F. 1976.** Peut-on aménager la lutte contre les pucerons des agrumes. 13ème colloque (réunion de la commission agrotechnique du comap). Tunis, 23-27février,15p.
- **Leclant F. 1996 :** dégâts et identification des pucerons. Rev. P.h.m. Horticole n° 369.Pp 19-23.
- **Leveau J.Y. and BouixM. 1993.**Les moisissures. In florent J Microbiologieindustrielle. Les microorganismes d'intérêt industrielle. (edn) Tec et Doc- Lavoisier.
- **Mapleston R.A., Stone H.G. and Williams P.H. 1992.** The evolutionary role ofsecondary metabolite.A REVIEW.Gen. 115:151-157.
- **Martin J.F. 1998.** New aspect of genes and enzymes for B- Lactam. Biosynthesis.App.Microbiol. Biotechnol.50: 1-15.
- **Martin J.F. and Liras P. 1989.** Organisation and expression of genes involvbed in thebiosynthesis of antibiotics and other secondary metabolite. Annu. Rev. Microbiopl.43:173-206.
- **Martinson VG, Moy J, et al.2012;**Establishment of characteristic gut bacteria duringdevelopment of the honeybee worker. Appl Environ Microbiol. 78 :2830–2840.
- **Mathias de Kouassi,** « Les possibilités de la lutte microbiologique », vertigo - la revue électronique en sciences de l'environnement [En ligne], Volume 2 Numéro 2. (2001).Mis en ligne. Le (01 octobre 2001).consulté le 24 mars 2017. URL :http://vertigo.Revues.org/4091 ; DOI : 10.4000/vertigo.4091).
- **Mathiew R. 1995.** Biologie Campbell, (edn) ISBN Canada.
- **Mawussi G. 2008 :** bilan environnemental de l'utilisation de pesticides organochlorésdans les cultures de coton, café et cacao au togo et recherche d'alternatives parl'évaluation du pouvoir insecticide d'extraits de plantes locales contre le scolyte ducafé (*hypothenemus hampei ferrari*). Thèse doc. Sciences des agroressources. Univ.De toulouse.207 p.

- **Mazure P., Nakanishi K., El-Zayat A.A.E. and Champ S.P. 1991.** Structure andsynthesis of sporogenic psifactors from *Aspergillus nidulans*.J. Chem.Soc. Chem.Commun.20 : 1486- 1487.
- **Mburu, D. M., L. Ochola, N. K. Maniania, P. G. N. Njagi, L. M. Gitonga, M.W.Ndung'u, A. K. Wanjoya and A. Hassanali .2009.** Relationship between virulence andrepellency of entomopathogenic isolates of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveriabassiana* to the termite *Macrotermes michaelseni*. J. Insect Physiol., 55, 774-780.
- **McCoy, C.W., R. A. Samson and D.G. Boucias .1988.** Entomogenous Fungi. In:Handbook of Natural Pesticides: Microorganisms. (Eds.: Ignoffo et.al.). CRC Press,pp. 260.
- **Mound L. A., Et Teulon D. A. J. 1995 :**Thysanoptera as phytophagous opportunists,pp. 2-9. In b. L. Parker, m. Skinner, and t. Lewis [eds.], thrips biology andmanagement. Plenum, New York.
- **Mueller UG, Gerardo NM, et al. 2005;**The evolution of Agriculture in Insects. Ann RevEcology, Evol, System. 36:563– 595.
- **Myers P. R., Espinosa C. S., Jones G. S., Hammond et Dewey T. A. 2018 :**The animal diversiry web. Accessed at animaldiversity. Org. Consuler le (20 mai 2018).
- **Nakabachi A, Ueoka K, et al. 2013;** Defensive bacteriome symbiont with a drasticallyreduced genome. Curr Biol. 23:1478–1484.
- **Nauen R et Elbert A., 2003 -** European monitoring of resistance to insecticidesin *Myzus persicae* and *Aphis gossypii* (Hemiptera: Aphididae) with special referenceto imidacloprid. Bull. Entomol. Res., 93, 47-54.
- **Nicklin J., Greame-Cook K., Paget T and Killington R. 1999.**Essentiel enmicrobiologie, (edn) BERTI. Paris.
- **Nirma C, Eparvier V, etD Stien - 2015;**Antibacterial ilicicolinic acids C and D and ilicicolinalfrom *Neonectria discophora* SNBCN63 isolated from a termite nest. J Nat Prod. 78:159–162.
- **Nirma C, Eparvier V, et D Stien 2013;**Antifungal agents from Pseudallescheria boydii SNB-CN73 isolated from a Nasutitermes sp. termite. J Nat Prod. 76:988−991.
- **Oh DC, Poulsen M, CR Currie, J Clardy - Nature Chemical Biology, 2009;** Dentigerumycin: a bacterial mediator of an ant-fungussymbiosis. Nat Chem Biol. 5:391–393.

- **Packer H.L. And Thomas C.R. 1990.** Microbiological measurements on.
- **Piel J. A2002;** Polyketide synthase-peptide synthetase gene cluster from an unculturedbacterial symbiont of *Paederus beetles*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 99:14002–14007.
- **Remaudière G., et Remaudière M. 1997 :** Catalogue des aphididae du monde.Homoptera, aphidoidea. Inra ed, paris. 473 pp.
- **Ruppert E.E., Fox R.S., and Barnes R.D.2004:** Invertebrate Zoology: AFunctionalevolutionary Approach...Seventh Edition,Thomson,Brooks/Cole.: vii-xvii,1-963, I1-I126.
- **Samson R.A., Evans H.C. et Latg J.P. 1988.**Atlas of entomopathogenic fungi. Ed.Springer, Berlin Heidelberg New York. 208 p.
- **Samuels K. D. Z., Pinnock D. E. 1990.** Scarabeid larvae control in sugarcane using M.anisopliae. Journal of invertebrate pathology. 55: 135-137.
- **Sauvion N., Calatayud P. A., Thiery D., et Marion-Poll F., 2013 -**Interactions insectes-plantes. Editions Quae.
- **Schudel P. 2008 :** écologie et protection des plantes. Guide pour l'utilisation desproduits phytosanitaires. Connaissance de l'environnement n° 0809. Office fédéral del'environnement, berne, 110 p.
- TOURÉ S. 2012 -Interactions insectes – micro-organismes entomopathogènes comme source d'inspiration pour la découverte concomitante de bio-insecticides et d'antimicrobiens Thèse de doctorat en Chimie des substances naturelles. Ecole Nationale Supérieure Agronomique EL Harrach-Alger.2012
- **Seipke RF, Barke J, Brearley, L Hill, DW Yu… - PLoS one, 2011 ;** A single Streptomyces symbiont makes multiple antifungalsto support the fungus farming ant Acromyrmex octospinosus. PLoS One. 6 : e22028.
- **Sekkat A. 2007 :** les pucerons des agrumes au maroc pour une agrumiculture plusrespectueuse de l'environnement. Ena 18 décembre 2007.
- **Senal J., Fraselle J., Impens R., Kummert J., Lepoivre Ph., Meulmans M., SeilleurP., Vandeveken J., et Viseur J. 1993.** Traité de pathologie végétale. Gembloux.Belgique.
- **Sorres J, Nirma C, V Eparvier, D Stien - Organic letters, 2017 -**Tyroscherin and tyroscherin analogs from Pseudallescheriaboydii SNB-CN85 isolated from termite Termes cf. hispaniolae. Phytochem Lett.22:142–144.

- **St Leger, R. J. et Frank D. C. 1992.** Molecular cloning and regulatory analysis of thecuticle-degrading- protease structural gene from the entomopathogenic fungusMetarhizium anisopliae. Eur J Biochem 204 (3): 991-1001.
- **St Leger, RJ. 1993.** Biology and mechanisms of insect-cuticule invasion bydeuteromycete fungal pathogens. In: Parasites and pathogens of insects (Vol. 2).Beckage NE, Thompson SN, Federici BA (eds.). Academie Press Inc., New York,USA. 211-225.
- **St Leger, RJ. 1993.** Biology and mechanisms of insect-cuticule invasion bydeuteromycete fungal pathogens. In: Parasites and pathogens of insects (Vol. 2).Beckage NE, Thompson SN, Federici BA (eds.). Academie Press Inc., New York,USA. 211-225.
- **Starnes R. L ; Liu C. L et Marone P.G. 1993.** History,use and future of microbialinsecticides.Amer.Entomol.39 :83-91.
- **Stone M.J. et Williams D.H. 1992.** On the evolution of functional secondarymetabolites (Natural products). Mol.Microbiol. 6: 29-34
- **Symes C. B.,** 1924: notes on the black citrus aphid. Rhodesia agricultural journal: 21,612-626, 725-737.
- **Taylor C. E., 1958:** the black citrus aphid. Rhodesia agricultural journal: 55, 192-194.
- **Tokuda G, Watanabe H. 2007;** Hidden cellulases in termites: revision of an old hypothesis.Biol Lett. 3:336–339.
- **Tortora J., Funk B.F. et Case Ch.l. 2003.**Introduction à la microbiologie, (edn)ISBN.Canada.
- **Trail F., Mahinti N. and Linz J. 1995.** Molecular biology of aflatoxine biosynthesis.Microbiology. 141: 755-765.
- **Van Arnam EB, Ruzzini AC, et al. 2016;**Selvamicin, an atypical antifungal polyene fromtwo alternative genomic contexts. Proc Natl Acad Sci USA. 113:12940–12945.
- **Van Emden H. F., Harrington R. 2007:** Aphids as crop pests. CABI: Wallingford.
- **Van Emden H. M., Harrington R. 2007:** aphids as crop pests, cabi press, 752p.
- **Vega FE, Meyling NV, JJ Luangsa-ard, M Blackwell -2012.**Fungal entomopathogens. In: Insect Pathology. Ed.Fernando E. Vega and Harry K. Kaya. p171–220.
- **Wang. Y., Ma. L., Wang. J., Ren. X. & Zhu. W. 2000.** A study on system optimumcontrol to diseases and insect pests of summer soybean. Acta Ecologica Sinica 20:502-509.

- **Warnecke F, Luginbühl P, N Ivanova, M Ghassemian2007;**Metagenomic and functional analysis of hindgutmicrobiota of a wood-feeding higher termite. Nature. 450: 560–565.
- **Wong LJ, H'ng PS, SY Wong, SH Lee2014;**Termite digestome as a potential source of symbioticmicrobiota for lignocelluloses degradation: a review. Pak J Bio Sci. 17:956–963.
- **Woobok J. and Keller N.P. 2004.** Lae A regulator of secondary metabolism inAspergillus sp. Eucaryotic Cell. 3(2): 527-535.
- **Wraight et Roberts. 1987.** Insect control effort with fungi.Devel.Industr.Microbiol.28:77- 87.
- **Yee W. L. and Lacey L. A. 2005.** Mortality of different life stages of Rhagoletisindifferens (Diptera, Tephritidae) exposed to the entomopathogenic fungusMetarhizium anisopliae J. Entomol. Sci., 40, 2, 167-177.
- **Zimmermann G.1986**The 'Galleria bait method' for detection of entomopathogenicfungi in soil,journal of applied entomology.

PDA:

39 g / 1L

Tween 80 :

Le tween 80 est une solution d'agent tensioactif non ionique utilisé au tant que supplément dans divers milieu de culture, dans une configuration de laboratoire. **(wikipédia).**

Lactophénol bleu coton :

(= BCL) : ce colorant est le meilleur bleu d'aniline utilisable en mycologie générale. Il est spécifique de la chitine, de la callose et du collagène. Il colore principalement la chitine présente dans les parois des hyphes. Chez de nombreux Ascomycètes il met également en évidence l'ornementation sporale (qualifiée alors de cyanophile) souvent caractéristique des espèces. L'acide lactique préserve les structures.

Cellule de Malassez :

Est un hématimètre qui permet de compter le nombre de cellules en suspension dans une solution. Cette méthode de dénombrement ne permet de compter que les cellules dans une solution, et non d'autres organismes tels que les Bactéries. **(wikipédia).**