

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

جامعة عبد الحميد ابن باديس. مستغانم.

UNIVERSITE ABDELHAMID IBN BADIS DE MOSTAGANEM

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département d'Agronomie



THÈSE

POUR L'OBTENTION DU GRADE
DE DOCTEUR EN SCIENCES

Option : Protection des végétaux

Présentée par :

M^{elle} BADAoui Mahdjouba (Ikram)

**Contribution à l'étude de la dynamique des
populations de *Tuta absoluta* Meyrick
(Lepidoptera ; Gelechiidae) et essais de contrôle
biologique sur la culture de tomate »**

Devant le Jury :

YOUCEF BENKADA Mokhtar	Professeur	Président	Univ-Mostaganem
BELABID Lakhdar	Professeur	Examineur	Univ-Mascara
BELAHCEN Miloud	Professeur	Examineur	Centre univ -Ain Témouchent
BENDAHRMANE Boubekour Seddik	Professeur	Examineur	Univ- Mostaganem
BICHE Mohamed	Professeur	Examineur	I.N.A-Alger
BERKANI Abdellah	Professeur	Directeur de thèse	Univ-Mostaganem

REMERCIEMENTS

Je remercie Dieu le Tout Puissant ALLAH de m'avoir donné les ressources morales, physiques, matérielles et intellectuelles pour accomplir cette thèse.

Ce travail n'aurait certainement pas pu voir le jour sans l'assistance de plusieurs personnes. Je citerai à leur tête mon directeur de thèse M. BERKANI Abdallah., professeur à l'université de Mostaganem. Malgré la somme de ses responsabilités, sa disponibilité, et sa patience n'ont jamais manqué. Je lui suis reconnaissante de m'avoir appuyé à maintes reprises, pour toute la confiance qu'il m'a accordée, en acceptant de me diriger dans ce travail. Ses compétences en dynamique des populations ont été d'un précieux apport pour ce travail. Sa fermeté scientifique a permis de répondre à beaucoup d'interrogations concernant ce sujet de recherche. Je lui suis énormément reconnaissante pour les nombreuses lectures de ce manuscrit et pour le temps qu'il a consacré pour m'aider. Merci aussi d'être un père avant d'être un encadreur.

Mes remerciements vont aussi à M. SIMONEAU Philippe, professeur à l'université d'Angers, à qui j'exprime toute ma gratitude pour m'avoir apporté ses connaissances en biologie moléculaire et m'avoir permis de réaliser des manipulations dans son laboratoire. Je le remercie chaleureusement pour son esprit généreux, sa gentillesse, sa compréhension, sa patience, son attention, ses conseils et ses regards critiques sur mes résultats durant les travaux de la caractérisation génétique des *B. bassiana*. Merci à tous les membres de l'équipe *FungiSem* (Laboratoire Phytopathologie et Semances) et l'équipe *ALSA* (Laboratoire Physiologie des Semances).

Mes sincères remerciements s'adressent également à M. YUCEF BENKADA Mokhtar, Professeur à l'Université de Mostaganem, qui m'a fait l'honneur d'accepter de présider le jury.

Cette thèse n'aurait pas sa valeur sans le jury ; je tiens à remercier vivement ses membres, d'avoir eu l'amabilité d'accepter de faire partie du jury et de donner de leur temps précieux pour juger ce travail: M. BELABID Lakhdar, Professeur à l'Université de Mascara, M. BELAHCEN Miloud, Professeur à l'Université de Ain Témouchent, M. BENDAHMANE Boubekur Seddik, Professeur à l'Université de Mostaganem et M. BICHE Mohamed, Professeur à l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique d'Alger.

Je tiens à exprimer mes vifs remerciements à tous les membres des équipes du laboratoire de protection des végétaux de l'Université de Mostaganem.

Par ces quelques lignes je tiens aussi à remercier les personnes avec qui j'ai pu collaborer dans le cadre de mes travaux de recherche. Merci aux Professeurs KEDAD A. et SAHRAOUI L. de l'INA d'Alger, et aux Professeurs CHABASSE D. et BOUCHARA J.P de la CHU d'Angers.

Merci à mes collègues M^{me} KOLAI N pour l'inventaire des auxilliaires de *T. absoluta*, M^{me} SAIAH F. et M^{me} BENNAMA R. maître de conférences à l'Université de Mostaganem pour leur aide précieuse et le partage de leur connaissance dans le monde des micro-organismes.

Une grande part de mes remerciements s'adresse aux membres de ma famille pour leur soutien moral, particulièrement ma très chère mère *NADJIBA*, lumière de ma vie, à qui je dois ce que je suis.

Je voudrais rendre hommage à la mémoire de mes chers amis (es) *NAOUEL*, *WAFI* et *HALIM* et mes chères enseignants *M. MOKHBI A.* et *M. DIDI M.* Que dieu vous accueille dans son vaste paradis.

Je ne pourrais passer sous silence l'apport de mes amis (es) qui m'ont soutenu et ont partagé avec moi les meilleurs et les pires des moments, en particulier *Farida* qui a toujours sue m'aider, m'encourager et me motiver pour me faire avancer, je lui souhaite plein de courage et surtout beaucoup de bonheur avec sa famille. Merci également à *Malika*, *Mostapha*, *Soulem*, *Zoula*, *Karima*, *Yasmine*, *Moufida*, *Soumia*, *Fouzia*, *Luiza*, *Fatima*, *Saida*, *Milouda* et à ma voisine *Malika*.

Un énorme merci à M. BOUZOUINA M., M. MKHARBECH A., M. CHEIKHI L., M. BENCHIKH M., M^{me} KETROUSSI N. et M. SOUANE A. pour leur gentillesse et leur aide. Je suis très reconnaissant à M. AZZEDINE et à tous les ouvriers de l'exploitation agricole de notre département.

Je voudrais remercier et exprimer ma gratitude à tous les enseignants qui ont contribué à ma formation.

BADAOUI Mahdjouba Ikram

Résumé

En Algérie, la culture de la tomate en plein champ et sous serre, a subi des dégâts considérables, provoqués par un phytophage redoutable : la mineuse de la tomate *Tuta absoluta* Meyrick (Lepidoptera: Gelechiidae). Le présent travail est une contribution à l'étude de ce déprédateur, il s'intéresse à plusieurs aspects et a été entamé par l'identification de l'espèce du ravageur par la méthode d'extraction des génitalia afin d'éviter toute confusion avec des espèces morphologiquement proches, ce qui nous a permis de déterminer avec exactitude qu'il s'agit bien de *T. absoluta*.

Le deuxième volet de ce travail s'est axé sur l'étude de la dynamique des populations sous serre de ce déprédateur dans la région de Mostaganem sur deux années consécutives (2012 et 2013). Les résultats obtenus ont montré que le taux d'infestation de cette espèce est important et a atteint 100% la première année d'étude et 80% la seconde. L'étude de la densité et la distribution des différents stades évolutifs de *T. absoluta*, témoigne, d'un accroissement rapide des populations dans l'espace et dans le temps. L'inventaire de la faune auxiliaire de *T. absoluta* a révélé la présence de deux punaises prédatrices (*Nesidiocoris tenuis* et *Macrolophus* sp.) et de deux espèces de parasitoïdes (*Necremnus artynes* et *Diglyphus isaea*), avec une prédominance de *N. artynes*.

La troisième partie a été consacrée à la recherche des entomopathogènes autochtones capables de réguler les populations de cet insecte nuisible, ce qui nous a permis d'isoler un certain nombre de bactéries et de champignons, où seuls les isolats du genre *Beauveria* étaient capables d'induire des infections vis-à-vis des larves de *Tuta absoluta*. Deux *Beauveria* sp. (BV1 et BV6) parmi les huit entomopathogènes isolés ont fait l'objet des tests approfondis *in vitro* pour évaluer leurs activités larvicides. Il s'est avéré que la souche BV6 était la plus efficace avec une DL50 de $10^{2,97}$ spores/ml.

La dernière étape de notre démarche avait comme objectif l'identification moléculaire et l'étude de la variabilité génétique des huit champignons entomopathogènes autochtones. L'analyse des régions ITS et du gène de facteur d'élongation (EF1- α) montre l'appartenance des souches à *Beauveria bassiana*. En plus l'absence des introns dans le gène du grand ARN ribosomique (LSU rDNA) indique que nos souches sont des *pseudobassiana* décrite clade C.

La diversité phylogénétique des huit *Beauveria bassiana* (*pseudobassiana*) a été examinée en analysant les inter-microsatellites (ISSR), les séquences nucléotidiques de deux locus des régions intergéniques mitochondriales (nad3- atp9 et atp6-rns) et les microsatellites (SSR). Les résultats des ISSR montrent une variation entre les champignons et le séquençage du locus ATP6 confirme ce polymorphisme et classe les huit souches en deux groupes distincts.

Mots clés : *Tuta absoluta*, génitalia, dynamique des populations, champignons entomopathogènes, activité larvicide, caractérisation moléculaire.

Abstract

In Algeria, the cultivation of tomatoes in open fields and greenhouses has suffered from considerable damage, caused by harmful phytophagous: tomato leafminer *Tuta absoluta* Meyrick (Lepidoptera: Gelechiidae).

The present work is a contribution to the study of this pest. It is interested in several aspects and has been initiated by the identification of the species of the pest through extraction of the genitalia in order to avoid any confusion with morphologically similar species, which enabled us to determine with precision that it is indeed *T. absoluta*.

The second part of this work focuses on the study of the dynamics of the pest populations in Mostaganem region during two consecutive years (2012 and 2013). The results obtained show that the infestation rate of these species is high and reached 100% in the first year of study and 80% in the second year. The study of the density and distribution of the different evolutionary stages of *T. absoluta* shows a rapid increase of populations in space and time. The inventory of *T. absoluta* ancillary fauna revealed the presence of two predatory bugs (*Nesidiocoris tenuis* and *Macrolophus* sp.) and two species of parasitoids (*Necremnus artynes* and *Diglyphus isaea*), with a predominance of *N. artynes*.

The third part of this work was devoted to the investigation of indigenous entomopathogens capable of regulating the populations of this insect pest, which enabled us to isolate a number of bacteria and fungi, where only isolates of the genus *Beauveria* were able to isolate, induce infections with *Tuta absoluta* larvae. Two *Beauveria* sp. (BV1 and BV6) of the eight isolated entomopathogens were subjected to extensive in vitro tests to evaluate their larvicidal activities. It was found that the BV6 strain was most effective with an LD50 of $10^{2.97}$ spores/ml.

The final objective of our research was molecular identification and the study of the genetic variability of the eight native entomopathogenic fungi. The analysis of the ITS regions and the elongation factor gene (EF1- α) shows the strains belonging to *Beauveria bassiana*. In addition, the absence of introns in the gene of the large ribosomal RNA (LSU rDNA) indicates that our strains are *pseudobassiana* described clade C.

The phylogenetic diversity of the eight *Beauveria bassiana* (*pseudobassiana*) was examined by analyzing the inter-microsatellites (ISSR), the nucleotide sequences of two locus of the mitochondrial intergenic regions (nad3-atp9 and atp6-rns) and microsatellites (SSR). The ISSR results show a variation between the fungi and the sequencing of the ATP6 locus confirms this polymorphism and classifies the eight strains into two distinct groups.

Key words: *Tuta absoluta*, genitalia, population dynamics, entomopathogenic fungi, larvicidal activity, molecular characterization.

ملخص

لقد عانت زراعة الطماطم في الجزائر، داخل الحقول و البيوت البلاستيكية من أضرار كبيرة تسببت بها حافرة أوراق الطماطم *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) Meyrick. هذا البحث هو مساهمة في دراسة هذه الآفة، ويشمل العديد من الجوانب بدءا بالتعرف على صنف الحشرة باستخراج أعضائها التناسلية وذلك تجنباً للخلط بينها وبين الأنواع المماثلة لها شكلاً، مما مكننا من تحديدها بدقة على أنها *Tuta absoluta*.

وقد ركز الجزء الثاني من هذا العمل على دراسة ديناميكية تجمعات الحشرة داخل البيوت البلاستيكية بمستغانم لمدة سنتين متتاليتين (2012 و 2013). وأظهرت النتائج أن معدل الإصابة بهذا النوع من الحشرات مرتفع وقد بلغ 100% في السنة الأولى من الدراسة و 80% في السنة الثانية. دراسة كثافة وتوزيع مختلف مراحل تطور الآفة *T. absoluta*، أظهر النمو السريع لتجمعات الحشرة المرتبطة بالمكان والزمان. كما أظهر جرد الأعداء الطبيعيين لـ *T. absoluta* وجود نوعين من الحشرات المفترسة (*Nesidiocoris tenuis* و *Macrolophus sp*) ونوعين من الطفيليات *Necremnus* (*Diglyphus isaea sartynes*).

خصص الجزء الثالث للبحث عن البكتيريا و الفطريات الممرضة للحشرات (entomopathogènes autochtones) القادرة على مكافحة هذه الآفة الخطيرة، مما سمح لنا عزل عدد كبير من البكتيريا والفطريات، ومن بينها عزلات من النوع *Beauveria* التي تقضي على العدوى.

اثان من بين ثمانية عزلات (BV1 et BV6) من النوع *Beauveria sp.* تم اختبارها بتعمق لتقييم نشاطهما. و تبين ان السلالة BV6 كانت الأكثر فعالية مع DL50 مساوية لـ $10^{2.97}$ أبواغ / مل

تهدف الخطوة الأخيرة من منهجنا الى التحديد الدقيق (moléculaire) ودراسة التباين الوراثي بين الفطريات الثمانية المسببة لأمراض الحشرات المستعملة للوقاية من الآفة *T. absoluta*. تحليل مناطق ITS وعامل استطالة الجينات (EF1- α) يحدد انتماء العزلات الثمانية الى نوع *Beauveria bassiana*. إلى جانب ذلك، غياب المناطق الغير مشفرة (introns) في جينات الحمض النووي الريبي الريبوزومي الكبير RNA (LSU rDNA) يشير إلى انتمائها تحديداً الى *pseudobassiana* الموصوفة بـ clade C.

دراسة التباين في التطور الجيني للسلالات الثمانية (*Beauveria bassiana pseudobassiana*) عن طريق تحليل ISSR وموضعين من جينات الميتوكوندري (*atp6-rns* et *atp9-nad3*) و SSR. وبينت نتائج ISSR الاختلاف بين الفطريات بينما يؤكد موضع ATP6 هذا التعدد ويصنف السلالات إلى مجموعتين متميزتين.

كلمات البحث: *Tuta absoluta*، الأعضاء التناسلية، ديناميكية تجمعات الحشرة، الفطريات الممرضة، التوصيف الجزيئي

Remerciement	
Résumé	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Listes des planches	
Liste des abréviations	
INTRODUCTION GENERALE	01

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I : La mineuse de la tomate Tuta absoluta Meyrick

Introduction	03
I. Systématique	03
II. Origine et distribution géographique	04
II.1 Dans le monde	04
II.2 En Algérie	05
III. Description morphométrique de <i>Tuta absoluta</i> Meyrick	05
III.1 Œuf	05
III.2 Larve	05
III.3 Nymphe	06
III.4 Adulte	06
IV. Biologie de la mineuse de tomate <i>Tuta absoluta</i> Meyrick	06
V. Plantes hôtes	08
V.1 Présentation de la plante hôte (Tomate)	09
V.2 Importance économique de la culture de tomate	09
V.2.1 Dans le monde	09
V.2.2 En Algérie	10
V.3 Valeur nutritionnelle	10
VI. Symptômes et dégâts	10
VI.1 Sur feuillage	11
VI.2 Sur fruits	11
VI.3 Sur tige	12
VII. Moyens de lutte	12
VII.1 Lutte préventive	12
VII.2 Lutte curative	13
VII.2.1 Piégeage massif à base de phéromone	13
VII.2.2 Lutte chimique	13
VII.2.3 Lutte biologique	14
VII.2.3.1 Utilisation d'auxiliaires	14
VII.2.3.2 Organismes entomopathogènes	15
VII.2.4 Résistance variétale	17
VII.3 Stratégie de la lutte intégrée	18

Chapitre II : Lutte biologique par les champignons entomopathogènes

Introduction	19
I. Champignons entomopathogènes	19
II. Position systématique des champignons entomopathogènes	20
II.1 Les Chytridiomycota	21
II.2 Les Zygomycota	21
II.3 Basidiomycota	22
II.4 Ascomycota	22
III. Reproduction des champignons entomopathogènes	24
IV. Exemple de champignon entomopathogène <i>Beauveria bassiana</i>	24
IV.1 Morphologie	24
IV.2 Taxonomie	25
IV.3 Mode d'action	25
IV.3.1 La phase d'adhésion	26
IV.3.2 La phase de germination	26
IV.3.3 La phase de différenciation	26
IV.3.4 La phase de pénétration de l'hôte	26
IV.4 Facteurs affectant l'efficacité de <i>B. bassiana</i>	27
IV.4.1 Facteurs liés aux pathogènes	27
IV.4.2 Facteurs dépendant de l'hôte	27
IV.4.3 Facteurs de l'environnement	27
IV.4.3.1 La lumière ultraviolette	27
IV.4.3.2 Température	28
IV.4.3.3 Humidité	28
IV.4.4 Effet du sol	28

PARTIE EXPERIMENTALE

Chapitre I : Identification du ravageur

Introduction	29
I. Matériel et méthodes	29
I.1 Matériel biologique	30
I.2 Extraction des genitalia	30
I.3 Montage des genitalia	30
II. Résultats et discussion	31
II.1 Génitalia femelle	31
II.2 Génitalia mâle	31
II.2.1 Valves	32
II.2.2 Gnathos	32
II.2.3 Vinculum	32
II.2.4 Penis ou l'édéage	32
Conclusion	33

Chapitre II : Dynamique des populations de *Tuta absoluta* Meyrick

Introduction	34
I. Présentation de la zone d'étude	34
II. Matériel et méthodes	34
II.1 Matériel biologique	34
II.2 Conduite de la culture	35
II.3 Méthode d'échantillonnage	36
II.4 Formules des calculs utilisées	37
II.5 Inventaire des espèces antagonistes de la mineuse de tomate	38
II.5.1 Inventaire des parasitoïdes	38
II.5.2 Inventaire des prédateurs	38
III. Résultats et discussion	39
III.1 Relevés climatiques	39
III.2 Taux d'infestations	41
III.2.1 Taux d'infestation globale	41
III.2.1.1 Première année d'étude (2012)	41
III.2.1.2 Deuxième année d'étude (2013)	42
III.2.2 Taux d'infestation par bloc	43
III.2.2.1 Première année d'étude (2012)	43
III.2.2.2 Deuxième année d'étude (2013)	44
III.2.3 Taux d'infestation par étage foliaire	44
III.2.3.1 Première année d'étude (2012)	44
III.2.3.2 Deuxième année d'étude (2013)	45
III.3 Evolution des effectifs de <i>T. absoluta</i>	47
III.3.1 Abondance relative des différents stades évolutifs des <i>T. absoluta</i> ...	48
III.3.1.1 Distribution des différents stades évolutifs	48
III.3.1.1.1 Première année d'étude (2012)	48
III.3.1.1.2 Deuxième année d'étude (2013)	49
III.3.1.2 Distribution des différents stades larvaires	51
III.3.1.2.1 Première année d'étude (2012)	51
III.3.1.2.2 Deuxième année d'étude (2013)	52
III.3.2 Densité des populations de <i>T. absoluta</i> sous serre	53
III.3.2.1 Effectif moyen par foliole des stades évolutifs de <i>T. absoluta</i>	53
III.3.2.1.1 Première année d'étude (2012)	53
III.3.2.1.2 Deuxième année d'étude (2013)	54
III.3.2.2 Effectif moyen par foliole des stades larvaires de <i>T. absoluta</i>	56
III.3.2.2.1 Première année d'étude (2012)	56
III.3.2.2.2 Deuxième année d'étude (2013)	56
III.4 Préférence de ponte	58
III.4.1 Première année d'étude (2012)	58
III.4.2 Deuxième année d'étude (2013)	59
III.5 Impact des facteurs de mortalité sur la mineuse	60
III.5.1 Première année d'étude (2012)	60

III.5.2 Deuxième année d'étude (2013)	62
III.6 Inventaire des espèces antagonistes de la mineuse de tomate	65
III.6.1 Inventaire des parasitoïdes	66
III.6.2 Inventaire des prédateurs	67
Conclusion	68

Chapitre III : Recherche d'entomopathogènes autochtones

Introduction	71
I. Matériel et méthodes	71
I.1 Provenance des insectes	71
I.2 Isolement	71
I.2.1 Isolement des bactéries	71
I.2.2 Isolement des champignons	72
I.3 Purification	72
I.3.1 Purification des bactéries	72
I.3.2 Purification des champignons	72
I.4 Identification	73
I.4.1 Identification des bactéries	73
I.4.1.1 Caractères morphologiques	73
I.4.1.2 Tests d'orientation	73
I.4.1.3 Caractères biochimiques	74
I.4.2 Identification des champignons	76
I.4.2.1 Aspect macroscopique	76
I.4.2.2 Aspect microscopique	77
I.5 Conservation	77
I.5.1 Conservation des bactéries	77
I.5.2 Conservation des champignons	78
I.6 Calcul de l'abondance des espèces isolées	78
I.7 Tests de pathogénicité des bactéries et des champignons isolés	78
I.7.1 Préparation de l'inoculum	78
I.7.2 Méthode d'inoculation	79
I.7.3 Ré-isolement des entomopathogènes	79
II. Résultats et discussion	80
II.1 Identification des bactéries isolées et purifiées	80
II.1.1 Caractères morphologiques des souches bactériennes isolées	81
II.1.2 Tests d'orientation	82
II.1.3 Caractères biochimiques des souches bactériennes isolées	83
II.2 Identification des souches fongiques isolées	88
II.2.1 <i>Rhizopus</i> sp.	88
II.2.2 <i>Penicillium</i> sp. ..	89
II.2.3 <i>Aspergillus</i> sp. ...	90
II.2.4 <i>Fusarium</i> sp. ...	91
II.2.5 <i>Beauveria</i> sp. ...	92
II.2.6 <i>Ulocladium</i> sp. ...	92

II.3	Calcul de l'abondance des espèces isolées	93
II.3.1	Calcul de l'abondance des bactéries	93
II.3.2	Calcul de l'abondance des champignons	93
II.4	Tests de pathogénicité	94
Conclusion	98

Chapitre IV : Evaluation de l'activité larvicide des *Beauveria* sp. isolées

Introduction	99
I. Matériel et méthodes	99
I.1	Analyse de la croissance des <i>Beauveria</i> sp. à différentes températures	99
I.1.1	Préparation de la plaque 96 puits	99
I.1.2	Arrêt de la mesure et récupération des données	100
I.2	Etude de l'activité larvicide des <i>Beauveria</i> sp. sur <i>T. absoluta</i>	100
I.2.2	Conduite du test de pathogénicité des champignons	101
II. Résultats et discussion	103
II.1	Analyse de la croissance des <i>Beauveria</i> sp. à différentes températures	103
II.2	Activité larvicide des champignons entomopathogènes sur <i>T. absoluta</i>	106
II.2.1	Effet larvicide de l'entomopathogène BV1 sur <i>T. absoluta</i>	107
II.2.2	Effet larvicide de l'entomopathogène BV6 sur <i>T. absoluta</i>	108
II.2.4	Développement de la muscardine blanche sur <i>T. absoluta</i>	110
Conclusion	113

Chapitre V : Caractérisation génétique des champignons entomopathogènes

Introduction	115
I. Matériel et méthodes	115
I.1	Identification moléculaire des isolats	115
I.1.1	Extraction de l'ADN fongique	116
I.1.2	Préparation du mélange réactionnel	117
I.1.3	Amplification de l'ADN fongique	118
I.1.3.1	Espaceur intergénique transcrit (ITS)	118
I.1.3.2	Facteur d'élongation (EF1- α)	118
I.1.3.3	Introns dans le gène du grand ARN ribosomique (LSU rDNA) .	119
I.1.4	Révélation des produits d'amplification	119
I.1.5	Purification des produits PCR	119
I.1.6	Séquençage	120
I.1.7	Analyse bioinformatique	120
I.2	Recherche du polymorphisme des souches entomopathogènes	121
I.2.1	Utilisation des marqueurs ISSR (<i>Inter Simple Sequence Repeat</i>).....	121
I.2.1.1	Amplifications inter-microsatellites (ISSR)	121
I.2.2	Analyse de l'ADN mitochondrial	122
I.2.2.1	Amplification	122
I.2.3	Analyse de microsatellites	123

I.2.3.1 Amplification et marquage	123
I.2.3.2 Génotypages des microsatellites	124
II. Résultats et discussion	126
II.1 Identification moléculaire des isolats	126
II.2 Recherche du polymorphisme des souches entomopathogènes	129
II.2.1 Utilisation des marqueurs ISSR	129
II.2.2 Analyse de l'ADN mitochondrial	130
II.2.3 Analyse des microsatellites	133
Conclusion	135
CONCLUSION GENERALE	136
Références bibliographiques	139
Annexes	

Liste des tableaux

Tableau 01: Différentes espèces d'insectes ennemis naturels de <i>T. absoluta</i>	15
Tableau 02 : Résumé de certains genres majeurs téléomorphiques et anamorphiques d'Hypocreales pathogènes aux invertébrés	21
Tableau 03: Champignons entomopathogènes appartenant à différents Phylums	23
Tableau 04 : Tests biochimiques utilisés pour l'étude des métabolismes bactériens	74
Tableau 05 : Différents aspects microscopiques des souches bactériennes isolées	82
Tableau 06 : Résultats des tests d'orientation (oxydase, catalase et type respiratoire)	82
Tableau 07 : Résultats des tests biochimiques des bactéries bacilles à Gram positif	83
Tableau 08 : Résultats des tests biochimiques des bactéries bacilles à Gram négatif	84
Tableau 09 : Récapitulatif des caractères biochimiques obtenus suite à la lecture des galeries API 20NE	87
Tableau 10 : Résultats de l'identification des bactéries à Gram négatif	88
Tableau 11 : Provenances des entomopathogènes <i>Beauveria</i> sp.	95
Tableau 12 : Séquences oligonucleotidiques des paires d'amorces utilisées pour l'identification des <i>Beauveria</i> sp. isolées.	116
Tableau 13: Séquences nucléotidiques des amorces ISSR utilisés pour la recherche de variabilité génétique de deux <i>Beauveria</i> sp. (BV1 et BV6)	122
Tableau 14 : Amorces des régions intergéniques mitochondriales et leur séquence nucléotidique	123
Tableau 15 : Paires d'amorces utilisées pour l'amplification des loci microsatellites dans <i>Beauveria bassiana</i>	125
Tableau 16 : Résultat du séquençage des régions ITS de l'entomopathogène BV1	126

Liste des figures

Figure 01: Aire de répartition de <i>Tuta absoluta</i> dans le monde des années 2006 à 2016	04
Figure 02 : Production en million de tonnes des principaux pays producteurs de la tomate dans le monde	10
Figure 03: Dégâts de <i>T. absoluta</i> sur feuille de tomate	11
Figure 04 : Symptômes de <i>T. absoluta</i> sur fruits de tomate	11
Figure 05: Dégâts de <i>T. absoluta</i> sur tiges de tomate	12
Figure 06 : Caractéristiques des nervures alaires des Gelechiidae	29
Figure 07: Génitalia femelle de <i>T. absoluta</i>	31
Figure 08 : Génitalia mâle de <i>T. absoluta</i>	32
Figure 09 : Planche de référence de <i>Tuta absoluta</i> Meyrick	33
Figure 10 : Préparation du matériel biologique.	35
Figure 11 : Méthode d'échantillonnage de la culture de tomate sous serre	36
Figure 12 : Variations mensuelles des températures à Mostaganem en 2012 et 2013	39
Figure 13 : Variations hebdomadaires des températures moyennes sous serre en 2012 et 2013	40
Figure 14: Taux d'infestation globale de <i>T. absoluta</i> sur tomate sous serre en 2012	41
Figure 15: Taux d'infestation globale de <i>T. absoluta</i> sur tomate sous serre en 2013.....	42
Figure 16: Taux d'infestation par bloc de <i>T. absoluta</i> sur tomate sous serre en 2012	43
Figure 17: Taux d'infestation par bloc de <i>T. absoluta</i> sur tomate sous serre en 2013	44
Figure 18: Taux d'infestation par étage foliaire de <i>T. absoluta</i> sur tomate en 2012	45
Figure 19: Taux d'infestation par étage foliaire de <i>T. absoluta</i> sur tomate en 2013	46
Figure 20: Abondance relative des différents stades de développement de en 2012	48
Figure 21: Abondance relative des différents stades de développement de en 2013	49
Figure 22: Abondance relative des différents stades larvaire de <i>T. absoluta</i> en 2012	51
Figure 23: Abondance relative des différents stades larvaire de <i>T. absoluta</i> en 2013	52
Figure 24: Evolution de l'effectif moyen par foliole des stades évolutifs en 2012	54
Figure 25: Evolution de l'effectif moyen par foliole des stades évolutifs en 2013	54
Figure 26: Evolution de l'effectif moyen par foliole des stades larvaires en 2012	56
Figure 27: Evolution de l'effectif moyen par foliole des stades larvaires en 2013	57
Figure 28: Evolution temporelle du nombre d'œufs pondus sur les faces supérieures et inférieures des folioles en 2012	58
Figure 29: Evolution temporelle du nombre d'œufs pondus sur les faces supérieures et inférieures des folioles en 2013	59
Figure 30: Estimation de la mortalité des larves de <i>T. absoluta</i> en 2012	60
Figure 31 : Taux de parasitisme des stades larvaires de <i>T. absoluta</i> en 2012	61

Figure 32: Estimation des taux de mortalité et de parasitisme en fonction des variations thermiques sous serre en 2012	62
Figure 33: Estimation de la mortalité des larves de <i>T. absoluta</i> en 2013	63
Figure 34 : Taux de parasitisme des stades larvaires de <i>T. absoluta</i> en 2013	63
Figure 35: Estimation des taux de mortalité et de parasitisme en fonction des variations thermiques sous serre en 2013	64
Figure 36: Abondance des différentes espèces de parasitoïdes de <i>T. absoluta</i>	66
Figure 37 : Abondance des différentes espèces de punaises prédatrices	67
Figure 38: Lecture de la galerie API 20NE utilisée pour l'identification des bacilles à Gram non entérobactéries.	75
Figure 39 : Technique d'inoculation de la galerie API 20NE. A et B : préparation de l'inoculum.	75
Figure 40: Détermination du profil numérique de la bactérie <i>Burkholderia cepacia</i>	76
Figure 41 : Prélèvement d'une moisissure à l'aide de scotch	77
Figure 42: Aspects macroscopiques des colonies bactériennes purifiées	81
Figure 43 : Schémas d'identification des bactéries bacilles Gram positif	84
Figure 44 : Identification biochimique de la souche C1 par la galerie Api 20NE	86
Figure 45 : Identification biochimique de la souche C3 par la galerie Api 20NE	86
Figure 46 : Identification biochimique de la souche L1 par la galerie Api 20NE	86
Figure 47 : Identification biochimique de la souche L2 par la galerie Api 20NE	86
Figure 48 : Aspect macroscopique et microscopique de <i>Rhizopus</i> sp.	88
Figure 49: Aspects macroscopiques et microscopiques de trois espèces de <i>Penicillium</i> sp. ...	89
Figure 50: Aspects macroscopiques et microscopiques de trois espèces d' <i>Aspergillus</i> sp.	90
Figure 51 : Aspect macroscopique et microscopique d' <i>Aspergillus niger</i>	91
Figure 52 : Aspect macroscopique et microscopique de <i>Fusarium</i> sp.	91
Figure 53 : Aspect macroscopique et microscopique de <i>Beauveria</i> sp.	92
Figure 54 : Aspect macroscopique et microscopique d' <i>Ulocladium</i> sp.	92
Figure 55 : Pourcentage d'abondance des souches bactériennes isolées	93
Figure 56 : Pourcentage d'abondance des champignons isolés	94
Figure 57 : Mortalité des larves de <i>T. absoluta</i> traitées par <i>Beauveria</i> sp. (BV6)	95
Figure 58 : Aspect macroscopique des huit <i>Beauveria</i> sp. utilisés pour l'évaluation de l'activité larvicide sur <i>T. absoluta</i>	100
Figure 59 : Comparaison de la croissance fongique des huit souches de <i>Beauveria</i> sp. à une température de 20 °C	103

Figure 60 : Comparaison de la croissance fongique des huit souches de <i>Beauveria</i> sp. à une température de 25 °C	104
Figure 61 : Comparaison de la croissance fongique des huit souches de <i>Beauveria</i> sp. à une température de 30 °C	104
Figure 62 : Comparaison de la croissance fongique des huit souches de <i>Beauveria</i> sp. à une température de 35 °C	105
Figure 63: Mortalité des larves de <i>T. absoluta</i> exposées à la concentration 10 ⁷ spores/ml des huit souches de <i>Beauveria</i> sp.	106
Figure 64: Effet de différentes doses de l'entomopathogène BV1 sur la mortalité des larves de <i>T. absoluta</i>	107
Figure 65 : Effet de différentes doses de l'entomopathogène BV6 sur la mortalité des larves de <i>T. absoluta</i>	108
Figure 66: Mortalité des larves de <i>T. absoluta</i> sous l'effet de l'entomopathogène BV1 enregistrée le 9 ^{ième} jour du traitement	109
Figure 67: Mortalité des larves de <i>T. absoluta</i> sous l'effet de l'entomopathogène BV6 enregistrée le 5 ^{ième} jour du traitement.	110
Figure 68: Mode d'action des <i>Beauveria</i> sp.	111
Figure 69: Développement de la muscardine blanche sur les larves de <i>T. absoluta</i> inoculées par deux <i>Beauveria</i> sp., BV1 et BV6	111
Figure 70: Formation de la muscardine blanche sur les larves infestées par l'entomopathogène BV1.....	112
Figure 71 : Formation de la muscardine blanche sur les larves infestées par l'entomopathogène BV6	113
Figure 72 : Dendrogramme représentant la région codante pour le facteur d'élongation	127
Figure 73 : Migration des produits PCR en utilisant les amorces I29 et M1.....	128
Figure 74: Empreinte génomique PCR/ISSR de deux souches entomopathogènes BV1 et BV6 engendrée par l'utilisation de quatre amorces ISSR	129
Figure 75: Arbre phylogénétique de la région intergénique mitochondriale (nad3- atp9)	131
Figure 76: Arbre phylogénétique de la régions intergénique mitochondriale (atp6-rns)	132
Figure 77 : Migration des produits PCR de BV1 en utilisant les deux marqueurs fluorescents HEX et FAM	133
Figure 78 : Chromatogramme obtenu à partir du programme GeneMapper™ du produit PCR de la souche BV1, utilisant les amorces Ba13F et Ba13R et marqueur HEX	134
Figure 79 : Chromatogramme obtenu à partir du programme GeneMapper™ du produit PCR de la souche BV6, utilisant les amorces Ba25F et Ba25R et marqueur FAM	134

Liste des planches

Planche 01 : Stades de développement de <i>Tuta absoluta</i>	07
Planche 02 : Purification des bactéries isolées à partir d'une larve de <i>G. deserticola</i> et d'un adulte de <i>T. absoluta</i>	80
Planche 03 : Test de pathogénicité. 1: inoculation des larves saines. 2 : ré-isolement de <i>Beauveria. sp</i> à partir des larves momifiées	97

Liste des abréviations

FAO: Food and Agriculture Organisation

EPPO : European and Mediterranean Plant Protection Organization

INPV: Institut National de Protection des Végétaux

ONM : Office National de Météorologie

GN : Gélose Nutritive

PDA : Potato Dextrose Agar

PDB : Potato Dextrose Broth

API 20 NE : tests biochimiques miniaturisés destinée à l'identification des non entérobactéries

Gram(+) : Bactéries à Gram positif

Gram(-) : Bactéries à Gram négatif

DL50 : dose létale pour 50% de population

R2 : coefficient de corrélation au carré

Ln : logarithme népérien

g : accélération de la pesanteur

rpm : rotations par minute

UV : ultraviolets

°C : degré Celsius

g, mg, µg, ng : gramme, milligramme, microgramme, nanogramme

j, h, min, sec : jour, heure, minute, seconde

l, ml, µl : litre, millilitre, microlitre

M, mM, µM :: molaire, millimolaire, micromolaire

RNU : Unité néphélométrique

V : volt

ADN : acide désoxyribonucléique

BET : bromure d'éthyldium

dNTP : désoxynucléotide 5' triphosphate

PCR : réaction de polymérisation en chaîne (Polymerase Chain Reaction)

ISSR : marqueurs inter-microsatellites (Inter Simple Sequence Repeats)

ITS : Espaceur intergénique transcrit (Internal Transcribed Spacer)

SSR : marqueurs microsatellites (Simple Sequence Repeats)

ATP6 : PCR amplifiés avec le couple d'amorces atp6-rns

NAD3 : PCR amplifiés avec le couple d'amorces nad3/atp9

et al. : et collaborateurs

Introduction générale

Introduction générale

Tuta absoluta Meyrick (Lepidoptera: Gelechiidae) est un microlépidoptère provoquant d'importants dégâts sur la culture de la tomate (Berkani et Badaoui, 2008). En 2007, de nombreux foyers d'infestation ont été observés le long de la côte méditerranéenne (Urbaneja et al., 2009). Il s'est manifesté en Algérie à partir de 2008, à Mostganem à l'Ouest dans un premier temps puis s'est propagé au centre et à l'Est (Badaoui et Berkani, 2011). Il est difficile de donner avec précision les voies d'introduction de ce ravageur, mais sa présence obéit au même itinéraire suivi par *Aleurothrixus floccosus* Maskell 1896 (Hemiptera: Aleyrodidae) en 1984 (Berkani, 1989) et *Phyllocnistis citrella* Stainton 1856 (Lepidoptera: Gracillariidae) en 1994 (Berkani, 1995).

Tuta absoluta se développe principalement sur la tomate mais aussi sur diverses autres espèces de Solanacées cultivées telles que la pomme de terre (Notz, 1992) et l'aubergine (Galarza, 1984); ainsi que plusieurs autres espèces sauvages comme les morelles noires et jaunes, le datura et le tabac (Mallea et al., 1972). Les dégâts qu'occasionne ce phytophage à la culture de tomate peuvent atteindre les 100 % (França, 1993). La larve qui vit en mineuse dans la feuille, le fruit ou la tige creuse des galeries et attaque le plant de tomate depuis le stade jeune plantation jusqu'au stade de maturité (Souza et Reis, 1986).

Plusieurs travaux de recherche ont proposé des stratégies de lutte intégrée qui atténuent l'ampleur de ce ravageur. La gestion de *Tuta absoluta* est largement fondée sur les mesures prophylactiques; la détection précoce par les pièges à phéromone sexuelle et l'utilisation d'insecticides sont des techniques souvent utilisés (Collavino et Gimenez, 2008). La lutte chimique est souvent vouée à l'échec en raison de la résistance de *T. absoluta* à de nombreux pesticides mais aussi parce qu'une grande partie de son développement se déroule à l'intérieur de la plante ou dans le sol, hors d'atteinte des traitements. Les méthodes de lutte biologique peuvent constituer une réponse aux attaques de ce redoutable insecte. Elles proposent de combattre les ravageurs des cultures en introduisant dans le milieu où ils se développent un de leurs ennemis. Ce procédé de lutte non polluant permet de réguler les attaques d'un insecte ravageur donné, de façon efficace sans engendrer des effets néfastes à la santé humaine ni à l'environnement (Marchiori et al., 2004; Medeiros et al., 2006).

La lutte biologique par l'utilisation des prédateurs et des parasitoïdes des larves a été testée avec plus ou moins de succès (Miranda et al., 1998; Marchiori et al., 2004; Medeiros et al., 2006). Les micro champignons entomopathogènes occupent une place privilégiée

parmi les agents de lutte biologique (Vey et *al.*, 1982). Des études réalisées sur différents isolats fongiques ont montré que les *Beauveria bassiana*, peuvent être des agents prometteurs pour le contrôle du phytophage éventuellement en combinaison avec des pulvérisations de *Bacillus thuringiensis* (Torres- Gregorio et *al.*, 2009).

De nombreuses études ont été entreprises en Algérie pour valoriser les moyens biologiques. En effet, des recherches ont été menées sur l'utilisation des prédateurs et des parasitoïdes indigènes (Kolai et *al.*, 2011 ; Boualem et *al.*, 2012 ; Dehliz et *al.*, 2013) et les champignons entomopathogènes (Badaoui et *al.*, 2011) et les biopesticides homologués (Gacemi et Guénaoui, 2012). La bioécologie de ce ravageur a également été étudiée, pour maîtriser les paramètres de son développement dans son milieu naturel et récolter le maximum de données sur sa biologie, sa dynamique des populations et ses ennemis naturels autochtones (Oukil et *al.*, 2011 ; Allache et *al.*, 2012)

La lutte biologique, précisément par l'utilisation des microorganismes, est une alternative très prometteuse pour assurer une protection phytosanitaire performante. C'est dans ce contexte que s'inscrit notre travail qui a pour objectif de rechercher des souches d'entomopathogènes autochtones capables de contrôler les populations de *Tuta absoluta* après avoir identifié ce ravageur par la technique d'extraction des génitalia et suivre sa dynamique des populations sur deux années consécutives (2012 et 2013). Des tests de pathogénicité des champignons entomopathogènes isolés ont été réalisés afin d'évaluer leur efficacité vis-à-vis des larves de *T. absoluta*. La dernière partie de ce travail est consacrée à l'identification moléculaire et l'étude de la diversité génétique des champignons ayant présenté des potentialités entomopathogènes.

PARTIE
BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I

La mineuse de la tomate *Tuta absoluta* Meyrick

INTRODUCTION

Depuis 2008, un ravageur originaire d'Amérique du sud a fait son entrée sur le territoire algérien. Il s'agit de *Tuta absoluta* Meyrick (Lepidoptera : Gelechiidae) un micro-lépidoptère phytophage dont les larves causent d'importants dégâts sur tomate et autres Solanacées (Pires et *al.*, 2010). Cette mineuse constitue un facteur limitant du développement de la culture puisqu'elle peut causer entre 70 % et 100% de pertes (Oliviera et *al.*, 2007). Les larves, à tous les stades causent des dégâts importants en creusant des galeries sur les parties aériennes des plants, les fruits verts ainsi que les fruits mûrs sont touchés (Colomo et Berta, 1995). Afin de lutter efficacement contre ce fléau qui préoccupe les producteurs, il est nécessaire de connaître sa biologie et son écologie avant de combiner les moyens de luttés.

I. Systématique

La mineuse de la tomate *Tuta absoluta* Meyrick est un insecte de la famille des Gelechiidae. Elle a été décrite pour la première fois en 1917 par l'entomologiste Meyrick au Pérou. Cette espèce a connu plusieurs appellations avant d'être nommée définitivement *Tuta absoluta* par Povolny en 1994 (Siqueira et *al.*, 2001). Depuis sa description, plusieurs noms ont été utilisés pour la désigner (Berkani et Badaoui, 2008).

- ✓ *Phthorimaea absoluta* Meyrick (1917)
- ✓ *Gnorimoschema absoluta* Clarke (1965)
- ✓ *Scrobipalpula absoluta* Povolny (1964)
- ✓ *Scrobipalpuloides absoluta* Povolny (1987)
- ✓ *Tuta absoluta* Povolny (1994)

Selon Povolny (1994), la position systématique de *Tuta absoluta* est comme suit :

Règne : Animalia

Phylum : Arthropoda

Classe : Insecta

Ordre : Lepidoptera

Sous-ordre : Glossata

Super-famille : Gelechioidea

Famille : Gelechiidae

Sous famille : Gelechiinae

Genre : *Tuta*

Espèce : *Tuta absoluta* Meyrick (1917)

II. Origine et distribution géographique

II.1 Dans le monde

Décrit initialement au Pérou, *T. absoluta* s'est répandu dans toute l'Amérique du Sud : Chili (1935), Argentine (1964), Bolivie et Brésil (1980) (Siqueira et al., 2001). En Europe, cet insecte a marqué sa présence pour la première fois en Espagne, dans le sud-est en Valence (Urbaneja et al., 2009). Le premier signalement de *Tuta absoluta* en Italie a été fait au printemps 2008 dans les régions de Calabria, Abruzzo, Campania et Sardegnia et en France était en Octobre 2008 en Corse (EPPO, 2009). En mars 2009 l'insecte a été détecté pour la première fois aux Pays-Bas et au Royaume-Uni dans un site de production de tomate sous serre dans le Sud-est dans la région d'Essex (Fera, 2009). La Grèce a déclaré la présence du ravageur dans la région de Crète en juin 2009, aussi en Allemagne la première détection était en 2009 et en Hongrie en 2010 (EPPO, 2011).

Le Maroc, a signalé la mineuse de la tomate pour la première fois en mai 2008 dans la province de Nador et a entraîné des dégâts très importants sur la tomate sous serre et de plein champ (EPPO, 2008), pour la Tunisie les premières attaques ont été observées sur tomate fin Octobre 2008 (Germain et al., 2009).

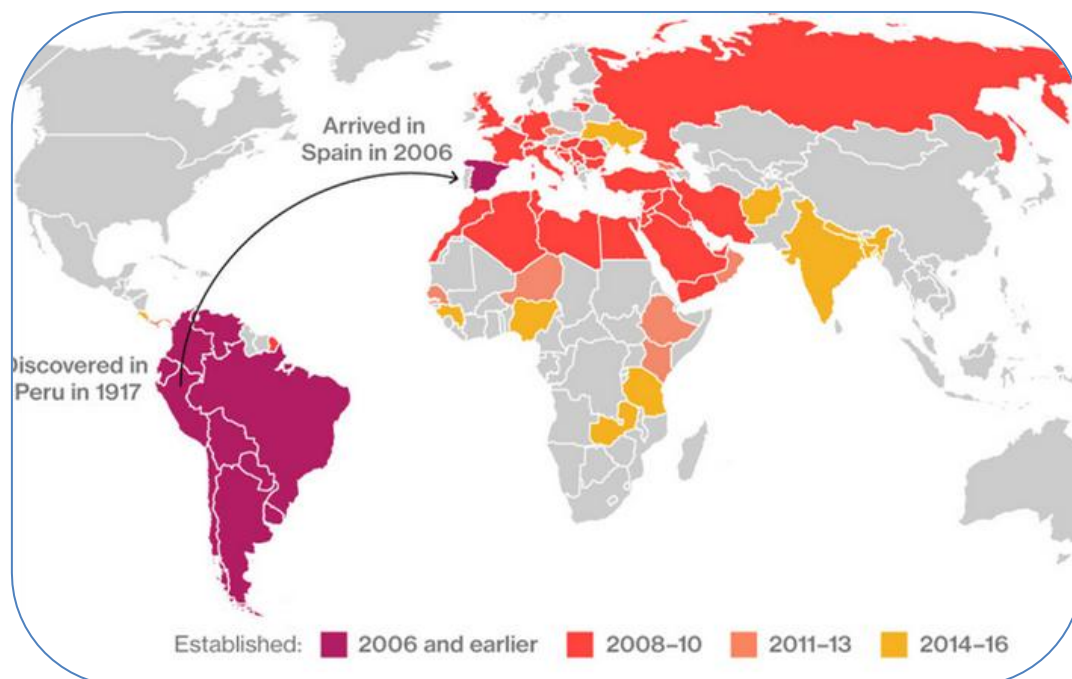


Figure 01: Aire de répartition de *Tuta absoluta* dans le monde de l'année 2006 à 2016 (EPPO , 2016)

II.2 En Algérie

Le ravageur a été signalé pour la première fois au printemps 2008 à Mostaganem, dans les cultures de tomate sous serre, puis s'est étendu dans les régions littorale et sublittoral vers l'Est (Berkani et Badaoui, 2008 ; Guenaoui, 2008 ; INPV, 2008).

Il est difficile de donner avec précision les voies d'introduction de *T. absoluta*, mais sa présence en Algérie obéit au même itinéraire suivi par *Aleurothrixus floccococcus* et *Phyllocnistis citrella*. En effet, lorsqu'un insecte est signalé pour la première fois en Espagne, il est automatiquement signalé en Algérie une année après. Il faut préciser que les côtes espagnoles ne sont pas éloignées des côtes algériennes, les facteurs climatiques (vent), le trafic important des voyageurs et les échanges commerciaux très intenses entre les deux pays sont autant de voies de pénétration (Berkani et Badaoui, 2008).

III. Description morphométrique de *Tuta absoluta* Meyrick

III.1 Œuf

Les œufs ont une forme ovale de couleur blanche crème à jaune (Planche 01(A)), mesurant environ 0,36 mm de long et 0,22 mm de large. Ils sont déposés sur la face inférieure de la feuille soit regroupés ou isolés. La couleur devient plus foncée à l'approche de l'éclosion des larves (Molla et al., 2008)

III.2 Larve

L'insecte se caractérise par la présence de quatre stades larvaires bien définis et différenciés en taille et en couleur (Molla et al., 2008).

A l'éclosion une larve néonate (Planche 01(B)) est de couleur claire avec une tête sombre mesurant environ 0,6 à 0,9 mm (Silva, 2008). Elle atteint une taille de 1,6 mm de long à la fin du premier stade larvaire (L1) (Molla et al., 2008 ; Silva, 2008).

Les larves plus âgées consomment plus. Leur couleur change du vert clair au deuxième stade larvaire (L2) au vert foncé au troisième stade larvaire (L3) (Planche 01(C et D)), leur taille atteint 2,8 mm au stade L2 et 4,7 mm au stade L3 (Silva, 2008 ; Molla et al., 2008).

Au dernier stade larvaire L4 (Planche 01(E)), la larve atteint entre 7,3 et 8 mm ; la face dorsale prend une couleur rose clair à rouge carmin (Molla et al., 2008). C'est la fin du développement larvaire et le début de la phase prénymphe.

III.3 Nymphe

C'est le stade pendant lequel la larve cesse de s'alimenter. La chrysalide est de couleur vert - marron (Planche 01(F)), de forme cylindrique, sa taille est de 4,3 à 5 mm de large et 1,1 mm de diamètre, couverte généralement par un cocon blanc et soyeux (Arno et Gabbara, 2010).

III.4 Adulte

Le petit papillon de nuit mesure environ 7mm de long pour une envergure de 10 à 11mm. Il est de couleur grise, et ses ailes sont couvertes de tâches brunes (Planche 01(G)). Il est muni d'antennes filiformes presque aussi longues que son corps (Germain et *al.*, 2009). Le mâle est plus petit et moins volumineux que la femelle. L'essentiel des activités (la ponte) est crépusculaire à nocturne et même matinale. Au cours de la journée, l'insecte est au repos et se dissimule parmi les feuilles (Uchoa-Fernandes et *al.*, 1995).

IV. Biologie de la mineuse de tomate *Tuta absoluta* Meyrick

T. absoluta est un insecte avec de grande potentialité de reproduction. Une femelle peut en effet pondre sur la partie aérienne de la plante hôte jusqu'à 260 œufs pendant sa durée de vie (Berkani et Badaoui, 2008). Selon Molla et *al.*, (2008), la dispersion et l'accouplement sont effectués le matin. Les femelles s'accouplent une fois par jour durant plus de quatre heures ; Plusieurs accouplements, six au maximum peuvent avoir lieu au cours de leur vie (Silva, 2008). La ponte commence en général de 2 à 3 jours après l'émergence, de préférence à la face inférieure des feuilles ou au niveau des jeunes tiges tendres et des sépales des fruits immatures (Haji et *al.*, 1988).

Dès l'éclosion de l'œuf, la larve jeune se déplace pendant plusieurs minutes avant de perforer l'épiderme des feuilles, des bourgeons ou les fruits pour vivre en endophyte (Silva, 2008). Les larves de différents stades de développement creusent des mines dans lesquelles il y'a des excréments bruns (Rodrigues et *al.*, 2007). La période larvaire varie en fonction de la température, elle est de 12 à 14 jours (Pereira et *al.*, 2008; Pires et *al.*, 2010).

Les chenilles sont très actives car elles se déplacent dans différentes parties de la plante dans les heures les plus chaudes de la journée, surtout le troisième et le quatrième stade qui font le plus de dégâts (Pires et *al.*, 2010). A la fin de son cycle, la larve aura consommé 2,8 cm² de surface foliaire, dont 2,2 cm² sont consommés par le 4ème stade (Bogorni et *al.*, 2003).

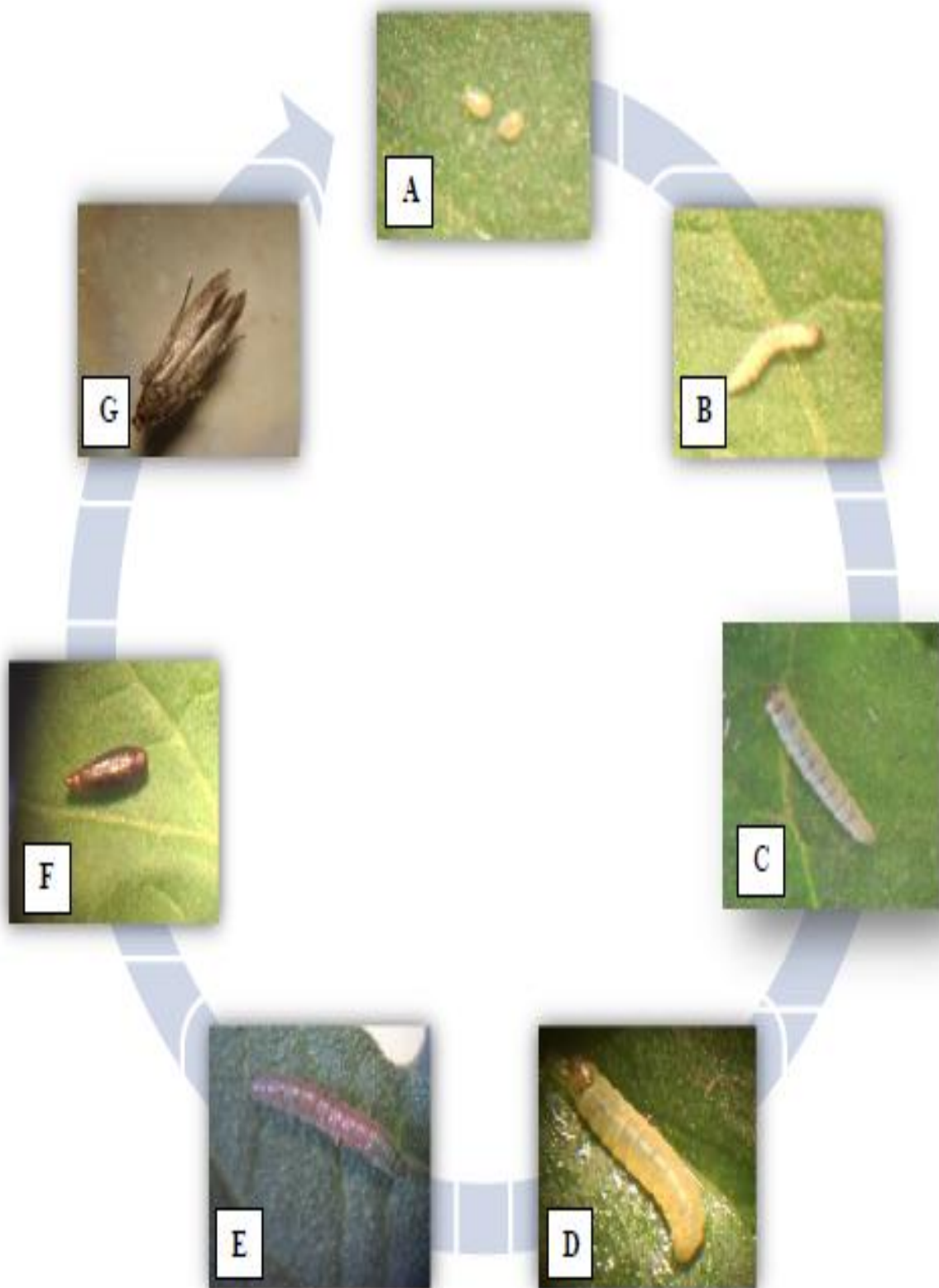


Planche 01 : Stades de développement de *Tuta absoluta*. A : œufs, B : L1, C : L2, D : L3, E : L4, F : nymphe et G : adultes (Original, 2013).

Arrivé à la fin du 4^{ème} stade larvaire, l'insecte cesse de s'alimenter et se prépare pour se métamorphoser. La larve peut quitter la galerie en se laissant transporter par un fil de soie sur le sol où se déroule la nymphose jusqu'à l'émergence (Torres et *al.*, 2002). La chrysalide reste dans le substrat environ 6 à 10 jours avant l'émergence (Silva, 2008). Parfois la nymphose a lieu dans une cavité de la feuille de la plante.

La longévité d'un adulte varie en fonction des conditions climatiques. Elle est estimée en moyenne entre 10 à 15 jours chez les femelles et de 6 à 7 jours chez les mâles (Estay et Bruna, 2002).

La mineuse de la tomate est une espèce multivoltine, elle possède 10 à 12 générations par an lorsque la nourriture est disponible (Schoen, 2009). La température minimale d'activité est de 9°C. Le développement est important lorsque les températures sont élevées comme pendant la période estivale (Notz, 1992). Le cycle de vie de *Tuta absoluta*, depuis la ponte jusqu'à l'émergence des adultes, est de 76 à 23,8 jours respectivement à une température moyenne de 14 à 27,1 °C (Barrientos et *al.*, 1998).

V. Plantes hôtes

Les plantes composant le spectre d'hôte de *Tuta absoluta* appartiennent essentiellement à la famille des Solanacées. Ce ravageur s'attaque principalement aux cultures de tomate, hôte de préférentiel mais il peut également infester d'autres plantes cultivées comme la pomme de terre (*Solanum tuberosum*) et l'aubergine (*Solanum melongena*), le poivron (*Capsicum annuum*) et le tabac (*Nicotiana tabacum*) (Vargas, 1970; Campos, 1976), ainsi que d'autres Solanacées adventices ou ornementales, telles que la morelle jaune et la morelle noire (*Solanum elaeagnifolium* et *Solanum nigrum*), la stramoine épineuse (*Datura ferox*), la datura stramoine (*Datura stramonium*) et le tabac glauque (*Nicotina glauca*) (Pereyra et Sánchez, 2006). Fernandez et Montagne (1990) ont comparé la préférence d'oviposition des femelles de *T. absoluta* sur des plants de tomate par rapport à d'autres solanacées ; il s'avère que la mineuse préfère toujours la tomate, sur laquelle le ravageur peut facilement compléter son cycle de vie en se nourrissant de toutes les parties aériennes de la plante.

Depuis 2008, c'est *T. absoluta* qui constitue le principal ravageur de la culture de tomate en Algérie. Elle présente un grand obstacle pour la production de tomate sous abri comme en plein champ. En effet des pertes considérables ont été la première année de son introduction dans le pays (Berkani et Badaoui, 2008).

V.1 Présentation de la plante hôte (Tomate)

La tomate (Annexe 01) est une espèce de plante herbacée de la famille des Solanacées. Elle est originaire de l'Amérique du sud, son introduction pour la première fois en Europe date de 1544 (Naika et al., 2005). Actuellement, sa culture est pratiquée dans le monde entier. Il existe plus de 4000 variétés de tomate ; certaines sont résistantes aux maladies et au ravageurs, d'autres sont différentes par les caractéristiques de leurs fruits et leur précocité (Van Eck et al., 2006).

Parmi les dénominations il existe ; *Solanum esculentum*, *Solanum lycopersicum*, *Lycopersicon lycopersicum* ou *Lycopersicum esculentum*. Les données génétiques, phylogénétiques, morphologiques et géographiques ont confirmé l'appartenance de la tomate au genre *Solanum*, ce qui a permis l'accepter définitivement le nom de *Solanum lycopersicum* par la communauté scientifique (Tanksley et al., 1992).

La tomate sous serre est sujette aux attaques de plusieurs maladies et ravageurs occasionnant parfois des dégâts très importants pour cette raison la prévention des maladies et des ravageurs est extrêmement importante pour la culture de la tomate (Laumonier, 1979).

Les principaux symptômes et dégâts des maladies et des ravageurs sont récapitulés dans l'annexe 02.

V.2 Importance économique de la culture de tomate

V.2.1 Importance de la tomate dans le monde

La tomate occupe une place très importante dans l'agriculture mondiale. Elle est cultivée dans presque tous les pays du monde; sa production est répartie dans toutes les zones climatiques, y compris dans des régions relativement froides grâce au développement des cultures sous abri (Desmas, 2005). En 2013 la Méditerranée couvre 31% de la production mondiale de la tomate, mais les deux premiers pays producteurs mondiaux ne sont pas méditerranéens, en effet, c'est la Chine qui domine avec les Etats-Unis (Giove et Abis, 2007). D'après la figure 02, la Chine est en première position avec une production de 52,86 millions de tonnes, suivie des Etats Unies pour 14,20 millions de tonnes, et en troisième rang vient l'Inde avec 11,97 millions de tonnes produites (Annexe 03).

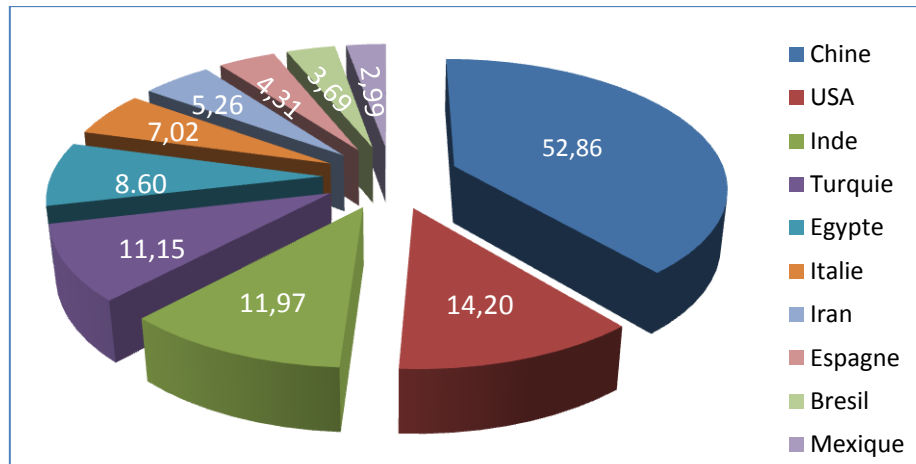


Figure 02 : Production en million de tonnes des principaux pays producteurs de la tomate dans le monde (FAOSTAT, 2013)

V.2.2 Importance de la tomate en Algérie

Une forte extension des superficies destinées à la production de la tomate a été enregistrée en raison de l'intérêt particulier que portent les agriculteurs à cette culture. Sa production est classée à la deuxième place après la pomme de terre et elle représente plus que 5% de la production maraichères (Baci, 1995). Les superficies sont passées de 18 020 ha en 1990 à 20 789 ha en 2012 ce qui présente un accroissement de 2 769 ha (DSA, 2013).

V.3 Valeur nutritionnelle

Dans la nutrition humaine, il est reconnu qu'une alimentation variée et riche en fruits et légumes frais permet de diminuer les risques de maladies cardiovasculaires et de cancers. En effet, 7 % à 31 % des cancers pourraient être évités par une consommation quotidienne d'au moins 400 g de fruits et de légumes (Hall *et al.*, 2008). La valeur calorifique de la tomate est relativement faible, environ 20 calories pour 100 g, elle est pauvre en lipides, exempte de cholestérol, et l'eau représente environ 94% de sa matière fraîche. La tomate est riche en provitamine A (β -carotène) et vitamine C (Frusciante *et al.*, 2007).

VI. Symptômes et dégâts

Les dommages sur tomate sont causés par les larves de *T. absoluta*, qui peuvent attaquer tous les organes aériens (tige, feuille, fruit et fleur), et entraîner des pertes considérables pouvant atteindre 80 à 100% (INPV, 2008). Ce ravageur produit des pertes par la réduction des rendements étant donné la destruction des feuilles et bourgeons, et par les dommages au niveau des fruits qui diminuent leur valeur commerciale (Biurrun, 2008).

VI.1 Sur feuillage

Les larves pénètrent entre les deux épidermes de la feuille et se nourrissent à partir des cellules du parenchyme à l'aide de leurs crochets mandibulaires entraînant une destruction d'une grande partie de la surface foliaire de la plante (Mihsfeldt et Parra, 1999).

Les attaques se manifestent par l'apparition sur les feuilles de galeries blanchâtres (Figure 03), renfermant chacune une chenille et ses déjections. Les mines finissent par se nécroser et brunir faisant penser à une violente attaque de mildiou (Suinaga et *al.*, 2004).



Figure 03: Dégâts de *T. absoluta* sur feuille de tomate (Originale, 2013)

VI.2 Sur fruits

Les chenilles s'attaquent aux fruits verts comme aux fruits mûrs (Figure 04). Les tomates présentent des nécroses sur le calice ou des trous de sorties à leur surface. Ces nécroses peuvent être profondes et rendent les fruits invendables et impropres à la consommation (Ramel et Oudard, 2008).



Figure 04 : Symptômes de *T. absoluta* sur fruits de tomate (Originale, 2013)

VI. 3 Sur tige

La larve pénètre à l'intérieur des tiges et forme des galeries et laisse ces déjections (Figure 05) (Pereira et *al.*, 2008).



Figure 05: Dégâts de *T. absoluta* sur tiges de tomate (Amazouz, 2008)

VII. Moyens de lutte

Depuis des années, plusieurs méthodes sont combinées en lutte intégrée et différentes techniques ont été appliquées pour lutter contre ce ravageur, afin de réduire son impact sur la production de tomate.

VII.1 Lutte préventive

La prévention correspond à la mise en place d'un ensemble de mesures pour empêcher la propagation du phytophage en réduisant les sources de l'infestation. Avant le repiquage, les plants utilisés doivent être sains, sans signe de présence de *T. absoluta* et tous les plants atteints doivent être éliminés au niveau de la pépinière. La destruction des résidus de récolte infestés et l'élimination des chrysalides au niveau du sol sont nécessaires pour prévenir toute contamination par le ravageur à partir des anciennes cultures (Lietti et *al.*, 2005). L'emploi du paillage du sol et l'installation de filet insect-proof sont vivement souhaités. En pleine culture l'élimination des feuilles sénescentes contaminées de la partie basale de la plante est une bonne pratique, car elle constitue un moyen de réduction des infestations par les larves (Larrain, 1992). Après arrachage de chaque culture infestée il faut respecter un délai de vide sanitaire d'environ 6 semaines avant l'installation d'une nouvelle plantation (Ramel et Oudard, 2008). D'autres options comme l'élimination des plantes hôtes adventives et l'assolement en intercalant la culture avec d'autres cultures qui ne sont pas Solanacées peuvent constituer des moyens du contrôle du bioagresseur

(Dubon, 2010). Avant toute intervention il faut suivre les populations et mettre en place un système de surveillance permettant de déceler la présence de l'insecte.

VII.2 Lutte curative

VII.2.1 Piégeage massif à base de phéromone

Ce procédé consiste à installer dans la zone à tomate sous serre des pièges à phéromone. Le piégeage permet une détection de ce ravageur dès son apparition dans la zone de culture et permet de limiter les dégâts sur plants par la mise en place rapide de stratégies de lutte adaptées (Monserrat, 2008). Dans cet optique, les pièges peuvent également être utilisés, en un nombre plus élevés afin de réduire les populations d'insectes (Trottin-Caudal et *al.*, 2010). Le piégeage massif a montré de bons résultats en complément à d'autres moyens de lutte puisqu'il permet de limiter au maximum les traitements curatifs à base d'insecticides dans les cultures de tomate (Michereff et Vilela, 2000).

VII.2.2 Lutte chimique

La lutte chimique contre les insectes fait appel aux insecticides dont l'utilisation a connu un essor très important avec les progrès de la chimie de synthèse. Elle est basée sur l'application de molécules détruisant ou limitant les populations de bio-agresseurs (Doré et *al.*, 2006). C'est la principale mesure de contrôle utilisée par les agriculteurs afin de maintenir le nombre de ravageurs en dessous du seuil de nuisibilité.

Lietti et *al.* (2005), rapportent que Les organophosphorés ont été initialement utilisés pour le contrôle de *T. absoluta*, ils ont été progressivement remplacés par des Pyréthriinoïdes pendant les années 1970. Au début des années 1980, l'utilisation du Cartap en alternance avec les Pyréthriinoïdes et le Thiocyclam a donné des résultats positifs en cette période (Lietti et *al.*, 2005). Durant les années 1990, plusieurs insecticides ont été introduits, tels que l'Abamectine, l'Acylurée, le Spinosad, le Tebufonozide. Ces molécules qui ont donné satisfaction au début de leur utilisation ont commencé à perdre leur efficacité sur le terrain suite à la résistance développée progressivement par les populations de l'insecte à travers les pays d'Amérique du Sud (Siqueira et *al.*, 2001; Suinaga et *al.*, 2004).

La lutte chimique est un élément incontournable pour le programme de lutte contre la mineuse de la tomate. Elle a donné des résultats très variables selon les matières actives, tout en restant inefficace pour l'éradication complète du ravageur (Filho, 2000). Malgré leurs effets néfastes sur la santé humaine et sur l'environnement, plusieurs insecticides appartenant à différents groupes chimiques ont été appliqués (Luna et *al.*, 2007).

VII.2.3 Lutte biologique

En raison des aspects négatifs de l'utilisation d'insecticides, de nombreux chercheurs ont envisagé d'autres moyens de lutte contre *Tuta absoluta*. Depuis 1991, des progrès significatifs ont été accomplis dans la lutte biologique contre ce ravageur, mais les populations d'ennemis naturels sont sévèrement réduites par les applications excessives de pesticides (Michereff et Vilela, 2000).

La lutte biologique est l'usage d'organismes vivants ou de leurs produits pour empêcher ou réduire les pertes ou dommages causés par des organismes nuisibles (Riba et al., 2008). Les organismes vivants utilisés, alors appelés auxiliaires, antagonistes ou agents de lutte, peuvent être des parasitoïdes, des prédateurs, ou des pathogènes (virus, bactéries, champignons), ou des compétiteurs qui occupent la niche écologique plus vite que l'espèce nuisible (Doré et al., 2006 ; Riba et al., 2008), tout en maintenant un équilibre naturel (Salvo et Valladares, 2007).

VII.2.3.1 Utilisation d'auxiliaires

Le principe de cette lutte biologique est la régulation des populations de ravageurs de culture par l'utilisation des auxiliaires. Chaque stade d'un ravageur est susceptible d'être la proie ou l'hôte d'une ou plusieurs espèces d'auxiliaires. Les prédateurs et parasitoïdes appartenant aux insectes constituent en général le groupe le plus important qui cause la mortalité larvaire de la mineuse (Miranda et al., 1998). Ils ont une fonction clé dans le contrôle des populations de ce déprédateur (Salvo et Valladares, 2007).

Ces auxiliaires sont soit indigènes dans le milieu et des mesures sont mises en œuvre afin de maintenir et développer ces populations. Ou bien ils sont introduits artificiellement par lâchers dans la zone de culture. Dans le bassin méditerranéen, plusieurs ennemis naturels de *Tuta absoluta* sont présents (Tableau 01).

A Mostaganem, l'inventaire a mis en évidence la présence de trois espèces de prédateurs de *Tuta absoluta* : *Nesidiocoris tenuis* Reuter, *Macrolophus pygmaeus* "caliginosus" Wagner et *Dicyphus errans* Wolff; ainsi que six parasitoïdes : *Necremnus artynes* Walker, *Neochrysocharis* sp., *Sympiesis* sp., *Diglyphus isaea* Walker, un Braconidae et un Ichneumonidae. *Necremnus artynes* a été le parasitoïde le plus fréquent et le plus abondant (Boualem et al., 2012)

Tableau 01: Différentes espèces d'insectes ennemis naturels de *T. absoluta* dans le monde

Ordre	Famille	Espèce	Auteurs
Hymenoptera	Vespidae	<i>Vespa sp</i>	Molla et al., 2008
	Eulophidae	<i>Dineulophus phthorimaeae</i> <i>Galeopsomy sp</i> <i>Retisympiesis phthorimaea</i> <i>Necremnus artynes</i> <i>Hemiptarsenus zilahisebessi</i>	Lietti et al., 2005; Luna et al., 2007 Molla et al., 2008,
	Braconidae	<i>Apanteles gelechiidivoris</i> Marsh <i>Pseudapanteles dignus</i> Muesebeck <i>Bracon sp*</i> et <i>Earinus sp.</i>	Lietti et al., 2005 ; Luna et al., 2007 Marchiori et al., 2004
	Chalcididae	<i>Conura sp.</i>	Marchiori et al., 2004
	Trichogrammatidae	<i>Trichogramma pretiosum</i> Riley <i>Trichogrammatoidea bactrae</i> <i>Trichogramma achaeae</i> <i>Trichogramma nerudai</i>	Torres et al., 2002 ; Carvalho et al., 2003 Pratissoli et al., 2006
	Bethylidae	<i>Goniozus nigrifemur</i> Ashmead	Miranda et al., 1998
Hemiptera	Miridae	<i>Nesidiocoris tenuis</i> Reuter <i>Macrolophus pygmaeus</i> Rambur	Urbaneja et al., 2009, Molla' et al., 2011
	Nabidae	<i>Nabis Pseudoferusibericus</i> Reman	Molla et al., 2011,
	Bertytidae	<i>Metacanthus tunellus</i>	
	Lygaeidae	<i>Geororis sp</i>	
Heteroptera	Pentatomidae	<i>Podisus nigrispinus</i>	Torres et al. 2002
	Anthocoridae	<i>Xylocoris sp</i>	Miranda et al., 1998
Coleoptera	Coccinellidae	<i>Cycloneda sanguinea</i> (L .)	

VII.2.3.2 Organismes entomopathogènes

La lutte biologique par utilisation de micro-organismes élargit le choix d'intervention. Les agents utilisés dans cette lutte, appartiennent à plusieurs taxons à savoir les virus, les bactéries, les champignons, les nématodes et les protozoaires (Ignoffo, 1973). Ces micro-organismes sont présents dans l'environnement (sol, air, eau) et infectent leur hôte soit par ingestion, par la cuticule ou par les orifices. Le pathogène se multiplie dans l'hôte en

lui causant des dégâts par destruction des tissus, par septicémie ou toxémie entraînant sa mort plus ou moins immédiate (Rampelotti et al. 2007). Les micro-organismes ont des spectres d'action assez étroits à cause de certains facteurs abiotiques qui peuvent être limitant pour leur développement optimal (Jourdheuil et al., 1992).

A- Champignons entomopathogènes : Ces microorganismes sont des agents de lutte de grand intérêt puisqu'ils ont l'avantage d'affecter tous les stades de développement de l'insecte, y compris les œufs (Samuels et al., 2002; Ferreira et al., 2005). Les espèces de champignons entomopathogènes les plus utilisées en lutte biologique appartiennent aux genres *Beauveria*, *Metharizium*, *Verticillium*, *Erynia*, *Hirsutella* et *Entomophthora* (De Kouassi, 2001). Des études réalisées sur différents isolats fongiques ont montré que les entomopathogènes comme *Beauveria bassiana* et *Metharizium anisopliae* peuvent être des agents prometteurs pour le contrôle du phytophage (Torres-Gregorio et al., 2009; Vey et al., 1982). Cependant leur efficacité dépend grandement des conditions climatiques (humidité et température élevées notamment), ce qui limite leur utilisation.

B- Bactéries entomopathogènes : Ces agents de contrôle biologique sont des procaryotes microscopiques. Selon Starnes et al. (1993), plus d'une centaine de bactéries ont été identifiées comme ayant un potentiel d'utilisation en lutte biologique. Ces bactéries entomopathogènes appartiennent surtout, à trois grandes familles qui sont *Bacillaceae*, les *Enterobacteriaceae* et les *Pseudomonaceae* (Greathead et al., 1994). Des études ont montrées qu'un traitement à base de la Bactérie *Bacillus thuringiensis* var. *Kurstaki* réduit significativement le nombre des larves et d'œufs pondus par *Tuta absoluta* (Ramel et Oudard, 2008). *B. thuringiensis* s'est montré prometteuse dans le bio-control du ravageur, en raison de son pouvoir pathogène et sa virulence sur les œufs (Marques et Alves, 1996). Cette bactérie produit des endotoxines à l'intérieur du tube digestif de l'insecte ce qui entraîne une paralysie de l'intestin et de l'appareil buccal quelques heures après son ingestion. Par ailleurs, l'utilisation répétée de cette bactérie peut toutefois, comme les pesticides chimiques, induire une résistance chez certaines espèces (Dunphy et Tibelius, 1992).

C- Acariens parasites : Les acariens *Pyemotidae* sont souvent observés en association avec des insectes dans différents habitats, y compris les élevages (Cross et al., 1975). La première observation du parasitisme des *Pyemotes sp* sur les larves de *T. absoluta* a été constatée au cours d'élevage (Cross et al., 1981). Cet acarien peut parasiter également le stade nymphal et les adultes (Moser et al., 1987). *Pyemotes sp.* peut être une nouvelle alternative pour le contrôle biologique de *T. absoluta*, mais avant de recommander

son utilisation , il faut prendre en considération qu'il peut également provoquer une dermatite chez les êtres humains (Oliveira et *al.*, 2007).

D- Nématodes entomopathogènes : Les nématodes entomopathogènes sont des parasites obligatoires d'insectes qui se développent et se multiplient aux dépens de ceux-ci. Ils appartiennent à l'ordre des Rhabditidae et concernent deux genres: *Heterorhabditis* et *Steinernema* (Boemare et *al.*, 1996). Les nématodes pathogènes d'insectes sont utilisés dans certains pays comme agents de lutte biologique pour le contrôle des insectes nuisibles des cultures. En 2010, Batalla-Carrera et *al.*, ont étudié la sensibilité des différents stades de *Tuta absoluta* aux nématodes entomopathogènes (*Heterorhabditis* et *Steinernema*). Les larves du prédateur se sont révélées être très sensibles aux nématodes, contrairement aux pupes qui se sont montrées beaucoup moins sensibles aux attaques du parasite.

VII.2.4 Résistance variétale

Parmi les alternatives de la lutte chimique l'utilisation de variétés résistantes. Leite et *al.* (2003), ont étudié le facteur de résistance et de la sensibilité variétale, ils ont démontré que les variétés ayant une faible quantité de substances allélochimiques pendant les différentes phases végétatives étaient les moins infestées, alors que le contraire va attirer la mineuse vers la culture de tomate et augmente ainsi la sensibilité de ces dernières aux attaques. Chez les espèces du genre *Lycopersicon* plusieurs sources de résistance à divers ravageurs de la tomate ont été identifiées (Ventura et Vendramim, 1996). La tomate sauvage *Lycopersicon hirsutum* f. *glabratum* contient des substances toxiques pour *T. absoluta* (Giustolin et Vendramin , 1994). Cette espèce sauvage se montre prometteuse comme source de résistance contre cet insecte. Par conséquent, des recherches sont nécessaires pour la détection des génotypes résistants (Maxwell et Jennings, 1991). Selon Demol et *al.* (2002), la création de variétés résistantes est la meilleure solution pour éviter les dégâts provoqués par le bio-agresseur. Ces résistances sont obtenues par croisement avec les espèces sauvages. Les tomates hybrides ainsi obtenues comportent de nouveaux gènes de résistances.

VII.3 Stratégie de la lutte intégrée

Dans le monde la gestion de *T. absoluta* est fondée principalement sur l'emploi de produits chimiques (Estay et Bruna, 2002). L'utilisation de ces produits a engendré des problèmes tel que ; le développement du phénomène de résistance à certaines matières actives, les effets néfastes sur l'homme, les animaux, l'environnement et sur la faune auxiliaire

(Lietti et *al.*, 2005). Pour ces raisons, il été nécessaire de trouver des alternatives pour le contrôle raisonnable de ce ravageur.

D'après Corbaz (1990), la gestion intégrée du ravageur, consiste dans l'emploi combiné et raisonné de toutes les méthodes pouvant exercer une action régulatrice sur *T. absoluta*, de façon à maintenir les populations en dessous du seuil de nuisibilité (Annexe 04). Pratisoli et *al.* (2006) indiquent que la lutte intégrée est l'option la plus viable dans le contrôle de *T. absoluta*.

Chapitre II

Lutte biologique par les champignons entomopathogènes

INTRODUCTION

Les champignons pathogènes d'insectes occupent une place particulière en pathologie des invertébrés et dans la recherche d'organismes capables de réguler les pullulations d'invertébrés nuisibles, en santé végétale, humaine ou animale. Néanmoins, ces champignons bien qu'efficaces ont souvent une activité très dépendante des conditions environnementales notamment climatiques (Ferron *et al.*, 1991 ; Lacey *et al.*, 1996).

Selon Ahmed et Leather. (1994), l'utilisation des bio-insecticides augmente de 10 à 25 % par année. Les micro-organismes entomopathogènes infectent généralement leur hôte soit par ingestion, par la cuticule ou par les orifices (Ramoska, 1984). Le pathogène se multiplie dans l'hôte en lui causant des dommages par destruction des tissus, par septicémie ou toxémie entraînant sa mort plus ou moins immédiate (Burgess, 1981).

I. Champignons entomopathogènes

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

Les espèces des genres *Beauveria*, *Metarhizium*, *Verticillium*, *Erynia*, *Hirsutella*, *Entomophthora* et *Entomophaga*, sont les plus utilisées en lutte biologique, elles infectent les insectes par pénétration directe à travers la cuticule (Goettel, 1992). Les conidies adhèrent à l'insecte, germent et pénètrent à travers la cuticule. Le champignon croît rapidement et les insectes meurent dans un délai de 3 à 10 jours, en fonction de la température. Quand l'insecte meurt, le champignon colonise les organes internes puis sporule à la surface de l'insecte (Silvy et Riba, 1999). De nombreux facteurs affectent l'efficacité des champignons entomopathogènes. Leur potentiel comme agents de protection biologique, résulte des propriétés des populations de l'hôte, du pathogène et des conditions du milieu. Leur sensibilité vis-à-vis les conditions environnementales (rayonnement solaire, température, humidité) reste leur principal inconvénient (Silvy et Riba, 1999).

Un certain nombre de mycoses se manifestent par des envahissements superficiels, n'entraînant pas de troubles sérieux. Mais la majorité des champignons entomopathogènes infectent leurs hôtes en pénétrant par la cuticule grâce à diverses enzymes libérées lors de la germination des spores (Ainsworth, 1983 ; Nicolai et Jorgen, 2007)

II. Position systématique des champignons entomopathogènes

La taxonomie des champignons entomopathogènes a connu un grand intérêt à partir des années 70 (Samson et *al.*, 1988 ; Feng et *al.*, 1994). D'après Ferron (1975) et selon la classification d'Ainsworth et Bisby (1971) in Hawksworth et *al.* (1983), les champignons entomopathogènes appartiennent à quatre groupes: les champignons imparfaits, les Entomophtorales, les Coelomomyces et les Ascomycètes (Annexe 05).

A présent, la systématique ou l'étude de la diversité biologique en vue de sa classification, se concentre, à la lumière des découvertes récentes, sur une classification phylogénétique remplaçant la classification classique (Saiah, 2014). La classification classique établit des groupes ou taxons en fonction d'un simple critère de ressemblance globale. Une classification phylogénétique suppose que l'on regroupe les êtres vivants en fonction de leurs liens de parenté. Tout groupe systématique (ou « taxon ») renferme donc des êtres vivants proches entre eux génétiquement (Vega et *al.*, 2012).

Pour reconstituer les liens de parenté entre êtres vivants, la phylogénie procède selon deux techniques : la phénétique et la cladistique. Il est donc vraiment important de saisir la différence entre analogue (caractère qui se ressemble) et homologue (caractère semblable hérité d'un ancêtre commun et dû à une évolution). La phénétique repose sur le postulat de base que le degré de ressemblance est corrélé au degré de parenté. Elle suppose donc de quantifier la ressemblance entre les êtres vivants à classer. Alors que la cladistique est basée sur des hypothèses phylogénétiques et postule que tout taxon doit être monophylétique, c'est à dire qu'il doit contenir tous les descendants de l'ancêtre commun et que les descendants de l'ancêtre commun, autrement dit : un taxon doit avoir un seul ancêtre commun. Il est alors possible d'établir un arbre phylogénétique et des cladogrammes ; et d'en tirer une classification scientifiquement rigoureuse (Hibbett et *al.*, 2007; Humber, 2012; Vega et *al.*, 2012).

A la suite de l'avènement de la biologie moléculaire, de nombreux concepts taxonomiques (règne, embranchement) ont changé, mais les nouveaux concepts sont mieux établis et on s'attend à ce qu'elle soit à peu près stable dans l'avenir. Par exemple, l'utilisation de techniques moléculaires et des analyses phylogénétiques ont permis une meilleure compréhension de la parenté génétique qui permet de relier la forme asexuée (anamorphe) des champignons à leur forme sexuée (téléomorphe) (Tableau .02). Cela va conduire à l'abandon des termes de Deutéromycètes, hyphomycètes et Fungi Imperfecti (Taylor, 1995; Blackwell et *al.*, 2006), dans lequel de nombreux champignons entomopathogènes ont été habituellement classés, et leur reclassement dans le phylum Ascomycota (Humber, 2012, Vega et *al.*, 2012).

Tableau 02 : Résumé de certains genres majeurs téléomorphiques et anamorphiques d'Hypocreales pathogènes aux invertébrés (Sung et al., 2007).

Forme	Famille		
	Clavicipitaceae	Cordycipitaceae	Ophiocordycipitaceae
Sexuée (Téléomorphe)	<i>Hypocrella</i> , <i>Metacordyceps</i> , <i>Regiocrella</i> , <i>Torrubiella</i>	<i>Cordyceps s.str.</i> , <i>Torrubiella</i>	<i>Ophiocordyceps</i> , <i>Elaphocordyceps</i>
Asexuée (Anamorphe)	<i>Aschersonia</i> , <i>Metarhizium</i> <i>Nomuraea</i> , <i>Paecilomyces-like</i> <i>Pochonia</i> , <i>Rotiferophthora</i> <i>Verticillium-like2</i>	<i>Beauveria</i> , <i>Engyodontium</i> <i>Isaria</i> , <i>Lecanicillium</i> <i>Mariannaea-like</i> <i>Microhilum</i> , <i>Simplicillium</i>	, <i>Haptocillium</i> , <i>Harposporium</i> <i>Hirsutella</i> , <i>Hymenostilbe</i> <i>Paraisaria</i> , <i>Purpureocillium</i> <i>Sorospora</i> , <i>Syngliocladium</i> , <i>Tolypocladium</i> , <i>Verticillium-like</i>

La Classification phylogénétique est importante dans la mesure où elle est souvent prédictive des traits collectifs hérités par les descendants d'un ancêtre commun (Hibbett et al., 2007). D'après Humber (2012) et Vega et al. (2012), les champignons entomopathogènes appartiennent à quatre divisions différentes: Chytridiomycota, Zygomycota, Basidiomycota et Ascomycota.

II.1 Les Chytridiomycota

Sont des espèces aquatiques dont les spores portent un flagelle. On les considère comme les ancêtres de tous les autres champignons. La classification la plus récente d'Hibbett et al. (2007) a redéfini l'embranchement des *Chytridiomycota* comme un ensemble polyphylétique qui a été scindé en trois phylums : les Chytridiomycota; les Neocallimastigomycota et les Blastocladiomycota ; Parmi ces trois phylums, le troisième regroupe un nombre important de genres avec de nombreuses espèces entomopathogènes.

II.2 Les Zygomycota

Ce sont des espèces à spores non flagellées dont les cellules ne sont pas séparées par des cloisons. Les études actuelles phylogénétiques moléculaires (White et al., 2006 ; Hibbett et al., 2007) placent les anciens membres des Zygomycetes en quatre sous-embranchements non affiliés (*Mucoromycotina*, *Zoopagomycotina*, *Kickxellomycotina* et *entomophthoromycotina*). Le reclassement phylogénétique des champignons (James et al., 2006; Hibbett et al., 2007) a validé ce que de nombreux mycologues savent depuis longtemps, que le phylum Zygomycota était un assemblage hétérogène. La nouvelle classification phylogénétique placée les zygomycètes mycorrhiziens dans le nouveau phylum

«Glomeromycota», et distribué les zygomycètes restants dans les nouveaux sous-embranchements Entomophthoromycotina, Kickxellomycotina, Mucormycotina et Zoopagomycotina chacun de ces sous-embranchements peut être reconnue comme un nouveau phylum (ou partiellement recombinaés dans un autre nouveau phylum). Les Entomophthorales représentent les plus importants zygomycètes entomopathogènes.

II.3 Basidiomycota

Les spores se développent à l'extrémité de cellules spécialisées appelés basides. Parmi les trois sous-embranchements des basidiomycètes (Pucciniomycotina, Ustilaginomycotina et Agaricomycotina), les parasites se trouvent seulement dans les Septobasidiales des Pucciniomycetes, un groupe qui inclut les champignons de la rouille phytopathogène (Aime et *al.*, 2006). Le genre *Septobasidium* et quatre autres genres *Auriculoscypha*, *Uredinella*, *Coccidioidictyon* et *Ordonia* sont des parasites spécialisés de cochenilles (Couch, 1938) qui tuent rarement leur hôtes, mais s'en nourrissent tout en les préservant (Humber, 2008).

II.4 Ascomycota

Les spores dans ce phylum sont produites à l'intérieur de sacs appelés les asques et sont à maturité projetées à l'extérieur par l'ouverture de ces derniers. Les *Ascomycota* sont classés en trois sous-embranchements. Deux d'entre eux ne renferment pas de genres pathogènes d'insectes. Le sous-embranchements *Taphrinomycotina* sont saprophytes ou pathogènes de plantes et de vertébrés (Hibbett et *al.*, 2007). Beaucoup de levures (*Saccharomycotina*) sont associés avec des insectes dans la mesure où ces derniers dispersent leurs spores (Vega et *al.*, 2012), cependant, il ne sont en aucun cas pathogènes d'insectes (Kurtzman et *al.*, 2011). Cependant, le sous-embranchements des *Pezizomycotina* renferment des genres entomopathogènes (Benjamin et *al.*, 2004; Humber, 2008; Blackwell, 2010), ce sont les plus nombreux et les plus complexes des Ascomycètes du point de vue morphologique et écologique (Schoch et *al.*, 2009). Leur cycle de vie est souvent divisé en deux formes, anamorphe et téléomorphe, les espèces appartenant à l'ordre d'Hypocréale fournissent de bons exemples de ce phénomène (Tableau .02). Dans certains cas, la forme sexuée n'est jamais ou seulement rarement produite. En outre, plus d'une forme asexuée morphologiquement distincte peut se produire dans le même organisme, et dans ce cas, chacun est considéré comme un synanamorphe. C'est dans cet embranchements également que les Deutéromycètes (ancienne classification) ont été reclassés. Le tableau 03 regroupe plusieurs espèces de champignons appartenant à différents phylums et reconnu comme étant entomopathogènes.

Tableau 03: Champignons entomopathogènes appartenant à différents Phylums (Saiah, 2014)

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

III. Reproduction des champignons entomopathogènes

Les champignons entomopathogènes à l'instar d'autres champignons peuvent se reproduire d'une manière sexuée ou asexuée. Dans la littérature scientifique, différents termes ont été utilisés pour décrire ces deux types de reproduction: téléomorphique contre anamorphique, et meiosporique contre mitosporique. La reproduction sexuée implique la fusion de deux noyaux suivie de la méiose, permettant ainsi une nouvelle combinaison de gènes, une possibilité qui habituellement ne se produit pas dans la reproduction asexuée. Cette dernière s'effectue par fragmentation du mycélium ou la production de spores appelées conidies qui sont le résultat de la division mitotique et sont formées directement sur des hyphes ou à partir des conidiophores situés souvent à l'extrémité des hyphes (Alexopoulos et *al.*, 1996 ; Read et *al.*, 2010).

IV. Exemple de champignon entomopathogène *Beauveria bassiana*

L'entomopathogène *Beauveria bassiana* (Hypocreales: Clavicipitaceae) très utilisé en lutte biologique, est l'agent responsable de la maladie appelée la muscardine blanche chez les insectes. L'individu infecté est recouvert d'une importante couche de mycélium blanc, évoquant la neige. Cette espèce à un large spectre d'action et une grande virulence peut infecter l'hôte par simple contact (Meyling et *al.*, 2009). Plusieurs études ont montré que *B. bassiana* peut infecter une large gamme d'insectes. Chez l'ordre des lépidoptères, 23 isolats de *B. bassiana* ont prouvé leur efficacité contre les larves du troisième stade de la tordeuse à bandes obliques, *Choristoneura rosaceana* (Tortricidae) (Todorova et *al.*, 2002). Des travaux effectués sur des espèces appartenant à l'ordre des coléoptères ont démontré que *B. bassiana* peut entraîner une mortalité élevée contre la coccinelle maculée, *Coleomegilla maculata* (Coccinellidae), le scarabée argentin, *Cyclocephala signaticollis* (Scarabeidae) et le doryphore de la pomme de terre (*Leptinotarsa decemlineata*) (Chrysomelidae) (Todorova et *al.*, 1994 ; Cornia et Beatriz, 2004). Chez les homoptères, l'effet pathogène de *B. bassiana* a été évalué au champ contre le puceron russe du blé *Diuraphis noxia* (Aphidae) (Hatting et *al.*, 2004).

IV.1 Morphologie

Le champignon *Beauveria bassiana* est une espèce fréquemment retrouvée dans les sols du monde entier. Ce champignon forme des hyphes transparents et septaux. Cette espèce produit des colonies cotonneuses de couleur blanchâtre à jaunâtre. Le genre est caractérisé par un conidiophore à base renflée et à extrémité terminale en zigzag. Le conidiophore continue de croître après avoir donné naissance aux spores et chaque spore laisse une cicatrice en relief (aspect denticulé). Il existe deux types de spores selon la présence ou l'absence d'oxygène: les conidiospores formées en présence d'air et les blastospores en condition d'anaérobiose.

Les conidiospores prennent une forme sphérique ou ovale tandis que les blastospores sont uniquement ovales. Les deux types de spores peuvent avoir le même effet pathogène sur les insectes infectés (Weiser, 1972 ; Lipa, 1975).

IV.2 Taxonomie

Beauveria bassiana est un micro-champignon pathogène pour de nombreux insectes. Cet entomopathogène été décrit par Beauverie en 1911 sous le nom de *Botrytis bassiana*. Le genre a été établi par Veullemin (1912) et fut classé dans la classe des Hyphomycètes. Plusieurs études basées sur des techniques de biologie moléculaire permettent de classer les isolats fongiques selon leurs profils génétiques. Des recherches ont été réalisées afin de mettre en évidence les variations génétiques entre les isolats de *B. bassiana* (Meyling et al., 2009 ; Ghikas et al., 2010 ; Garrido et al., 2011). Viaud et al. (1996) ont démontré des différences significatives entre les ADN des différents isolats. Une analyse phylogénétique a révélé que l'espèce anamorphe de *B. bassiana* était plus proche des pyrénomycètes que des plectomycètes de type ascomycètes. Ceci était inattendu d'après les comparaisons antérieures des réarrangements de gènes chez les champignons filamenteux (Hegedus et al., 1998).

D'après Rehner et Buckley (2005), la classification récente de *Beauveria bassiana* est comme suit :

Règne : Fungi

Phylum : Ascomycota

Sous-phylum : Pezizomycotina

Classe : Sordariomycete

Sous-classe : Hypocreomycetidae

Ordre : Hypocreale

Famille : Cordycipitaceae

Genre : *Beauveria*

Espèce : *Beauveria bassiana*

IV.3 Mode d'action

Le champignon *Beauveria bassiana* infecte l'insecte par contact et n'a pas besoin d'être ingéré par son hôte pour causer l'infection. Certaines souches produisent des toxines non enzymatiques telles que la beauvericine, les beauverolides , les bassianolides , les isarolides qui accentuent et accélèrent le processus d'infection (Robert, 1981). À la mort de l'insecte, le champignon produit un antibiotique qui va lui permettre de surmonter la compétition des bactéries du tube intestinal de l'insecte. La phase saprophyte va être caractérisée par la momification

du cadavre transformé en sclérote. Les hyphes traversent le tégument préférentiellement au niveau inter-segmentaire puis le recouvre d'un feutrage blanc cotonneux (Weiser, 1972).

En général, le processus d'infection de *B. bassiana* est divisé en quatre phases distinctes soit les phases d'adhésion, de germination, de différenciation et de pénétration.

IV.3.1 La phase d'adhésion

Pour que l'infection soit une réussite, les champignons entomopathogènes doivent pénétrer la cuticule des insectes, un réseau de polymère composé de chitine. L'adhésion est la première étape du processus d'infection, elle se déclenche par un mécanisme de reconnaissance et de compatibilité des spores avec les cellules tégumentaires de l'insecte (Vey et al., 1982). Cette phase se scinde en deux étapes distinctes : La première, passive, est la fixation sur la cuticule, réalisée grâce à des interactions hydrophobes et des forces électrostatiques (Holder et Keyhani, 2005). La seconde, active, est caractérisée par la production d'un mucilage qui va engendrer une modification épicuticulaire aboutissant à la germination (Holder et Keyhani, 2005 ; Meikle et al., 2007).

IV.3.2 La phase de germination

La formation d'un tube germinatif dépend des conditions environnementales et également de la physiologie de l'hôte (composition biochimique de la cuticule) qui peut favoriser ou inhiber la germination (Latge et al., 1987). Elle est l'événement décisif, qui s'accomplit suite à la fixation de la spore à la cuticule de l'insecte. En plus de la température et de l'humidité (Butt et Beckett, 1994), les facteurs nutritionnels, chimiques et physiques peuvent influencer la germination. Latge et al. (1987), ont démontré que, pour que *B. bassiana* puisse germer et former un tube germinatif, des sources de carbone et d'azote sont nécessaires.

IV.3.3 La phase de différenciation

Est une phase importante dans le processus d'infection. Au cours de cette phase, la spore germée produit une structure appressoriale, qui sert de point d'ancrage et de ramollissement de la cuticule ce qui a pour effet de favoriser la pénétration de la spore (Magalhaes et al., 1989).

IV.3.4 La phase de pénétration de l'hôte

La cuticule de l'insecte est un réseau de polymère non-vivant composé de chitine et jusqu'à 70 % de protéines (Clarkson et Charnley, 1996). Le champignon peut perforer la cuticule par la pression mécanique et par la production d'enzymes (lipases, protéases, chitinases...) dégradant la cuticule, pour se nourrir et coloniser l'insecte (Butt, 1990). Une fois que le champignon a pu accéder à la hémocoel, il commence à utiliser les

nutriments disponibles pour sa croissance et sa reproduction. Pedrini *et al.* (2007), ont émis l'hypothèse que les isolats fongiques qui se développent abondamment dans l'hémolymphe, tuent l'insecte en consommant ses nutriments et en endommageant physiquement les tissus perturbant ainsi la physiologie de l'hôte.

IV.4 Facteurs affectant l'efficacité de *B. bassiana*

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

IV.4.1 Facteurs liés aux pathogènes

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

IV.4.2 Facteurs dépendant de l'hôte

Il est maintenant reconnu que tous les stades de développement de l'insecte, de l'œuf jusqu'à l'adulte, peuvent être sensibles à l'infection fongique. L'épizootie fongique survient généralement à de fortes densités de la population hôte favorisant ainsi la probabilité de contact entre le pathogène et l'hôte, de même qu'entre les insectes infectés et non infectés (Ferron *et al.*, 1991).

IV.4.3 Facteurs de l'environnement

L'efficacité du *B. bassiana* contre les insectes est souvent influencée par des conditions environnementales.

IV.4.3.1 La lumière ultraviolette

Les radiations ultraviolettes sont le principal facteur abiotique limitant la viabilité de conidies sur le feuillage. L'exposition aux rayons ultraviolets peut influencer de manière significative la mortalité des larves *d'Ostrinia nubilalis* (ravageur de maïs) par des isolats de *B. bassiana* en interférant avec leurs propriétés physiologiques (Cagani et Svercel, 2001). La lumière du soleil d'une longueur d'onde de 290 à 400 nm affecte la persistance des conidies sur le feuillage et peut directement affecter la composition génétique du champignon (McCoy *et al.*, 1990). 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, 1999).

IV.4.3.2 Température

La température est un autre facteur important qui peut affecter le taux de germination, la croissance, la sporulation et la survie des entomopathogènes. Hastuti et *al.* (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. Généralement, les températures au-dessus de 35°C empêchent la croissance et le développement des entomopathogènes. Les conidies de *B. bassiana* et de *M. anisopliae* ne peuvent pas survivre plus que 15 minutes à 40°C (McCoy et *al.*, 1990).

IV.4.3.3 Humidité

L'humidité 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). L'humidité relativement élevée dans les endroits abrités fournit un micro-environnement favorable pour le développement des spores (Liu et *al.*, 2006). Les effets de la température et de l'humidité sont intimement reliés d'où la tolérance de quelques entomopathogène 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 (McCoy et *al.*, 1990).

IV.4.4 Effet du sol

Le sol constitue un réservoir naturel pour les insectes infectés par des mycètes fongiques sur le feuillage qui plus tard tombent sur le sol (Keller et Zimmermann, 1989). En effet, les mycètes dans le sol sont protégés contre la dessiccation, le rayonnement ultraviolet et les températures extrêmes (McCoy et *al.*, 1990).

PARTIE
EXPERIMENTALE

Chapitre I

Identification du ravageur

INTRODUCTION

Les lépidoptères ravageurs des solanacées sont la cause de pertes importantes en plein champ et sous serre. La famille des Gelechiidae comprend des espèces nuisibles de première importance telle que la mineuse de la tomate (*Tuta absoluta* Meyrick, 1917) et la teigne de la pomme de terre (*Phthorimaea operculella* Zeller 1873) (Balachowsky, 1966).

Le phytophage qui a provoqué des dégâts sur la culture de tomate en Algérie semble morphologiquement proche de la teigne de la pomme de terre; sans une identification précise, le doute reste permis. Afin de trouver une méthode de lutte efficace, l'identification de ce bio-agresseur est essentielle. Pour ce faire, une étude de systématique des appareils génitaux a permis de déterminer l'insecte avec exactitude.

I. Matériel et méthodes

Les espèces de la famille des Gelechiidae se reconnaissent généralement à leurs ailes postérieures trapézoïdales à apex pointu (Figure 06) et sont décrits à l'aide de leur nervation alaire et de l'anatomie de leurs genitalia (Roth, 1974).

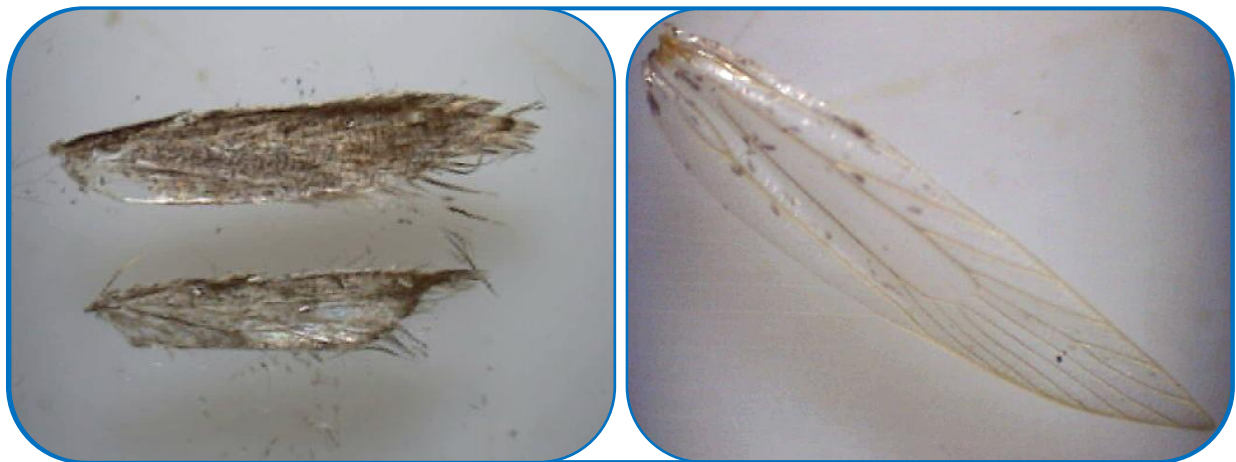


Figure 06 : Caractéristiques des nervures alaires des Gelechiidae (Berkani et Badaoui, 2008)

D'après Trân vinh liêm (1977), les extractions des genitalia sont des processus morphologiques de plus en plus utilisées en systématique, au niveau de l'espèce essentiellement et ils sont parfois les seuls critères possibles de détermination. La structure des pièces génitales est souvent la seule différence visible entre deux espèces proches, d'où l'intérêt particulier porté à ces organes lors de l'identification. Ce sont souvent les genitalia des mâles qui portent les caractères les plus faciles à identifier.

I.1 Matériel biologique

Les spécimens de la mineuse de la tomate destinés à l'étude des genitalia sont le fruit d'un élevage conduit avec des feuilles de tomate infestées par des chenilles de différents stades.

I.2 Extraction des genitalia

Les adultes, avant leur utilisation, ont été laissés en vie pendant 24 heures afin que leur chitine soit complètement durcie et que leurs graisses soient complètement métabolisées.

Les dissections fines ont été effectuées après potassage, selon la technique mise au point par Carayon en 1969 (Trân vinh liêm, 1977). L'abdomen de l'insecte est séparé du reste du corps à l'aide d'une paire d'épingle entomologique, macéré dans une solution de potasse 10% puis chauffé pendant cinq à huit minutes pour dégraissage, jusqu'au moment où le tégument devient transparent. Une fois l'opération de macération terminée, les genitalia sont séparés de l'abdomen par déchirure ou par coupure de la membrane qui relie les deux organes situés généralement à l'extrémité du huitième segment abdominal chez les mâles et du sixième ou septième chez les femelles. Trois rinçages à l'eau distillée sont effectués à fin de neutraliser l'effet du KOH.

Les genitalia des deux sexes sont conservés ensuite dans des flacons en verre étiquetés et contenant du glycérol, liquide préservant la coloration et la souplesse des membranes les plus fines.

Le but de l'extraction des genitalia était de pouvoir les comparer à des planches de référence, ce qui aurait permis de détecter les différences si elles existent et d'en tirer les conclusions qui s'imposent pour identifier ce bio-agresseur.

I.3 Montage des genitalia

Le montage est réalisé entre lame et lamelle dans une goutte de liquide de Faure en prenant soins de bien étaler les valves et détacher aussi les penis des genitalia mâles. Pour les femelles évité de séparer la bourse copulatrice car elle est fragile.

II. Résultats et discussion

Les genitalia sont les pièces sclérotinisées des appareils reproducteurs mâle et femelle, ils jouent un rôle primordial dans l'identification des espèces et dans la systématique des lépidoptères en général (Badaoui et Berkani, 2011).

II.1 Génitalia femelle

La figure 07 montre les deux faces du genitalia femelle extrait à partir des individus issus de l'élevage. Il est important de souligner qu'il est très difficile de faire apparaître la bourse copulatrice ; de ce fait l'extraction et l'étalement de cet organe femelle a été une réussite.

Le canal copulateur de *T.absoluta* est indépendant de la bourse copulatrice. Cette dernière a la forme d'un entonnoir conique dans ses deux tiers.



Figure 07: Génitalia femelle de *T. absoluta*. 1 : bourse copulatrice, 2 : signum.
3 : canal copulateur, 4 : apophyse et 5 : papilles anales.

II.2 Génitalia mâle

L'appareil reproducteur des mâles est constitué de plusieurs pièces : les valves, le gnathos, le vinculum et le pénis.

II.2.1 Valves

Le genitalia mâle de *T. absoluta* est composé de deux valves symétriques aplaties, légèrement courbées avec une entaille dans leurs parties internes (Figure 08(2)). Les parties centrales présentent une forte expansion en forme de dent (Figure 08(a)).

II.2.2 Gnathos

Entre les deux valves, on observe le gnathos (Figure 08(1)) qui se place exactement à la même hauteur que les valves.

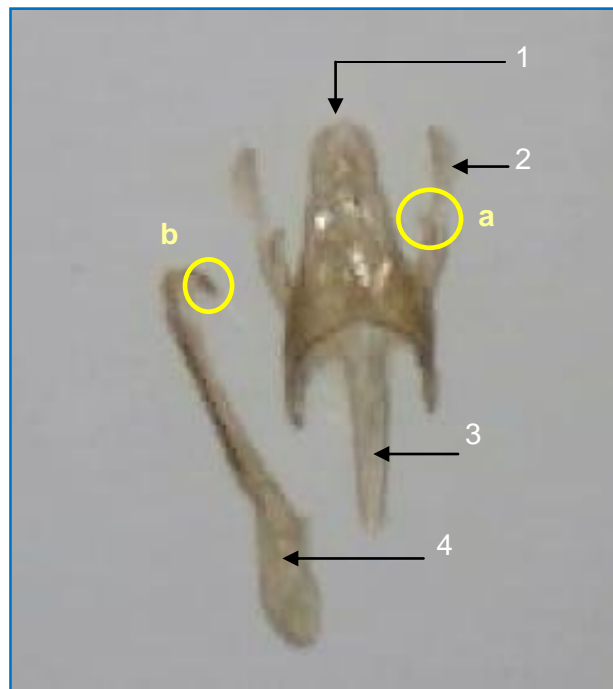


Figure .08 : Génitalia mâle de *T. absoluta* . 1 : gnathos, 2 : valve, 3 : vinculum et 4 : penis ou Edéage.

II.2.3 Vinculum

La partie basale du genitalia mâle est composée du vinculum (Figure 08 (3)), il est plus long que large.

II.2.4 Penis ou l'édéage

Le penis est le seul organe détachable du genitalia (Figure 08(4)), au repos il traverse le vinculum et arrive jusqu'au gnathos. L'édéage de la mineuse de tomate est épais et est muni d'un organe crochu a son extrémité (Figure 08 (b)).

Toutes ces caractéristiques de genitalia mâle sont identiques à ceux décrits par González (1989) dans ses travaux (Figure 09) et confirme donc qu'il s'agit bien de *Tuta absoluta* Meyrick (Lepidoptera ; Gelechiidae) appelé communément mineuse de la tomate.

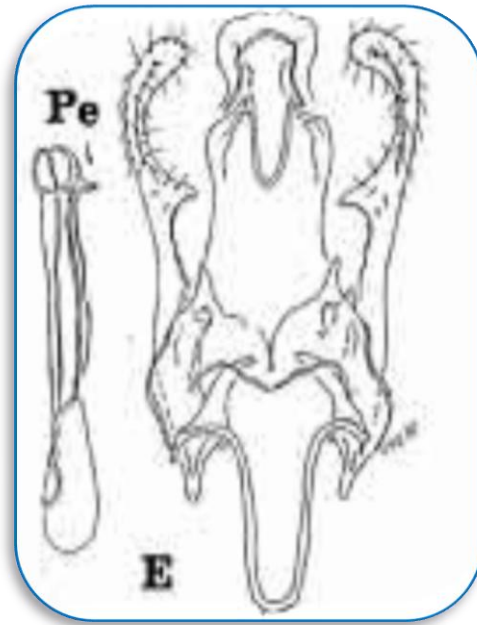


Figure 09 : Planche de référence de *Tuta absoluta* Meyrick (González, 1989)

CONCLUSION

L'étude des génitalia du phytophage a permis l'identification de ce déprédateur comme étant *Tuta absoluta* Meyrick. Ceci a été possible grâce à la comparaison des genitalia mâles issus de l'élevage avec une planche de référence de la mineuse de tomate.

Chapitre II

Dynamique des populations de

Tuta absoluta Meyrick

INTRODUCTION

L'analyse de la dynamique des populations est un élément important de l'étude bioécologique d'un ravageur ; elle permet de connaître les principales caractéristiques de ses populations et de donner un aperçu sur leur évolution en fonction de celles de son hôte et de son complexe d'ennemis naturels (Boualem, 2010). D'après Dajoz (1985), les études de la dynamique des populations ont pour but principal de décrire et d'expliquer les variations d'abondance des espèces dans le temps et dans l'espace.

L'expérimentation a porté sur l'étude de la dynamique des populations de la mineuse de la tomate *T. absoluta* sur deux années successives (2012 et 2013). Cette espèce est considérée de nos jours, comme l'un des ravageurs les plus importants de la tomate (Pires et *al.*, 2010) et est présente naturellement dans la serre. Elle constitue un facteur limitant du développement de la culture puisqu'elle peut causer entre 70 et 100% de pertes (Pratissoli et Parra, 2000).

I. Présentation de la zone d'étude

L'expérimentation s'est déroulée dans une serre installée à la ferme expérimentale du département des sciences agronomiques, située dans la commune de Mazagran, à 4 Km au sud de Mostaganem. Cette zone est caractérisée par un climat semi-aride avec une hygrométrie comprise entre 60 à 70% pendant la période estivale.

II. Matériel et méthodes

II.1 Matériel biologique

L'étude de la dynamique a été réalisée sous serre, sur des plants de tomate de la variété khalida qui est un hybride F1, caractérisé par une croissance rapide et indéterminée. Cette variété de forte vigueur, présente un plant à feuillage aéré avec des fruits de gros calibre, charnus très ferme.

II.2 Conduite de la culture

Les travaux culturaux effectués avant chaque mise en place de la culture se présentent comme suit : le labour, la confection des sillons et l'installation du système d'irrigation goutte-à-goutte.



Figure 10 : Préparation du matériel biologique. A : plants de tomate en pépinière

B : présentation de la serre expérimentale un mois après la transplantation

Les graines de la variété suscitée ont été semis en pépinière dans des plaques alvéolées remplies de tourbe. Les plantules obtenues ont été transplantés sous serre (Figure 10). L'expérimentation a été réalisée sur un nombre total de 600 plants, distant de 50 cm entre eux et 80 cm entre les lignes. L'entretien de la culture a nécessité plusieurs opérations:

- Le tuteurage a été mis en place un mois après la transplantation, tandis que le désherbage manuel et l'irrigation ont été réalisés régulièrement en fonction des besoins de la culture.
- L'ébourgeonnage qui consiste à éliminer les petites pousses axillaires pour ne laisser qu'une tige principale a été effectué selon la nécessité.
- L'effeuillage a consisté à enlever les feuilles sénescents, jaunies ou malades pour éviter la propagation des maladies.
- Les traitements fongicides ont été appliqués à l'aide du Ridomil, Score et du Domark durant les différentes phases de la croissance pour protéger la culture des maladies cryptogamiques.

II.3 Méthode d'échantillonnage

Une fois la culture installée, des observations ont été réalisées sur l'ensemble des plants pour vérifier leur état sanitaire et détecter les premiers foyers de *Tuta absoluta*. La méthode d'échantillonnage a consisté à prélever six folioles par plant à trois niveaux (bas, milieu et haut) pour 60 plants (entrée, milieu et extrémité de la serre) choisis d'une façon aléatoire en zigzag (Figure 11) soit un total de 360 folioles pour l'ensemble des plants échantillonnés.

Lorsque les plants ont atteint une hauteur de 40 cm, l'échantillonnage hebdomadaire a été effectué de façon régulière. Les échantillons de folioles de tomate ont été prélevés et placés dans des sachets en plastique étiquetés puis transportés au laboratoire pour les observations sous loupe binoculaire ; elles ont permis de noter l'ensemble des paramètres étudiés concernant le ravageur ainsi que l'inventaire des auxiliaires (prédateurs et parasitoïdes). Les différents stades de *T. absoluta* sont dénombrés et classés selon leurs stades d'évolution (œufs, larves (L₁, L₂, L₃, L₄) et chrysalides) et leurs états (vivants, morts ou parasités).

L'étude de la dynamique des populations est basée sur le dénombrement des individus de *T. absoluta* dans le but de déterminer les taux d'infestation, le taux de parasitisme, le taux de mortalité naturelle et l'évolution des différents stades biologiques de l'insecte.



Figure 11 : Méthode d'échantillonnage de la culture de tomate sous serre

II.4 Formules des calculs utilisées

Taux d'infestation (TC%) :

$$TC\% = \frac{\text{Nombre de feuilles contaminées}}{\sum \text{des feuilles échantillonnées}} \times 100$$

Taux de mortalité (TM%) :

$$TM\% = \frac{\text{Nombre d'individus morts}}{\sum \text{des individus dénombrés}} \times 100$$

Taux de parasitisme (TP%) :

$$TP\% = \frac{\text{Nombre d'individus parasités}}{\sum \text{des individus dénombrés}} \times 100$$

Distribution des œufs (W%) :

$$W\% = \frac{\text{Nombre d'œufs}}{\text{Effectif total d'individus dénombrés}} \times 100$$

Distribution des larves (L%) :

$$L\% = \frac{\text{Nombre des larves (L1, L2, L3 et L4)}}{\text{Effectif total d'individus dénombrés}} \times 100$$

Distribution des nymphes (N%) :

$$N\% = \frac{\text{Nombre des nymphes}}{\text{Effectif total d'individus dénombrés}} \times 100$$

Effectif moyen d'œufs par foliole (W/fol) :

$$(W/fol) = \frac{\text{Nombre d'œufs}}{\sum \text{des folioles échantillonnées}}$$

Effectif moyen de larves par foliole (L/fol) :

$$(L/fol) = \frac{\text{Nombre des larves (L1, L2, L3 et L4)}}{\sum \text{des folioles échantillonnées}}$$

Effectif moyen des nymphes par foliole (N/fol) :

$$(N/fol) = \frac{\text{Nombre des nymphes}}{\sum \text{des folioles échantillonnées}}$$

II.5 Inventaire des espèces antagonistes de la mineuse de tomate

Les prédateurs et les parasitoïdes naturels jouent souvent un rôle important dans la régulation des populations d'insectes ravageurs d'une culture.

Depuis son arrivée dans le bassin méditerranéen, un ensemble d'ennemis naturels est signalé sur *T. absoluta*. Pour une meilleure maîtrise de lutte, il était important de procéder à un inventaire des auxiliaires présents (parasitoïdes et prédateurs).

II.5.1 Inventaire des parasitoïdes

Les larves parasitées de *T. absoluta* ont été placées dans des boîtes de Pétri aérées jusqu'à l'obtention des nymphes de parasitoïdes. Ces dernières ont été isolées et placées individuellement dans des tubes à essai numérotés. Après l'émergence, les adultes des parasitoïdes ont été identifiés.

II.5.2 Inventaire des prédateurs

L'étude a consisté à récolter sur le terrain des prédateurs en activités sur *T. absoluta*. Les spécimens ont été placés dans des tubes à hémolyse en plastique, puis ramenés au laboratoire pour être identifiés.

Un comptage est effectué au laboratoire pour déterminer l'abondance des différentes espèces.

III. Résultats et discussion

III.1 Relevés climatiques

D'après Dajoz (1985), la température est l'élément le plus important du climat, elle agit sur l'activité biologique et écologique des êtres vivants. Il est donc nécessaire de vérifier l'effet de ce facteur sur l'évolution de *Tuta absoluta*.

Les relevés climatiques, fournis par la Station Régionale de l'Office National de Météorologie de la wilaya de Mostaganem, ont concerné les températures mensuelles moyennes, maximales et minimales des deux années d'étude (Figure 12). L'évolution des températures durant l'année 2012 montre que les températures hivernales étaient généralement élevées. Puisque les températures moyennes minimales n'ont pas dépassé la barre de 6.3 °C et les températures moyennes maximales ont atteint 16.4 °C (Annexe 06). A partir du moi de Mars les températures moyennes progressent pour atteindre un maximum de 26.3 °C le mois d'Aout. Les données de l'année 2013 ont révélé que les mois les plus chauds sont Juillet et Août, avec des températures maximales respectives de 32.2 °C et 34.4 °C. En hiver, le mois le plus froid est Février avec une température minimale de 1°C.

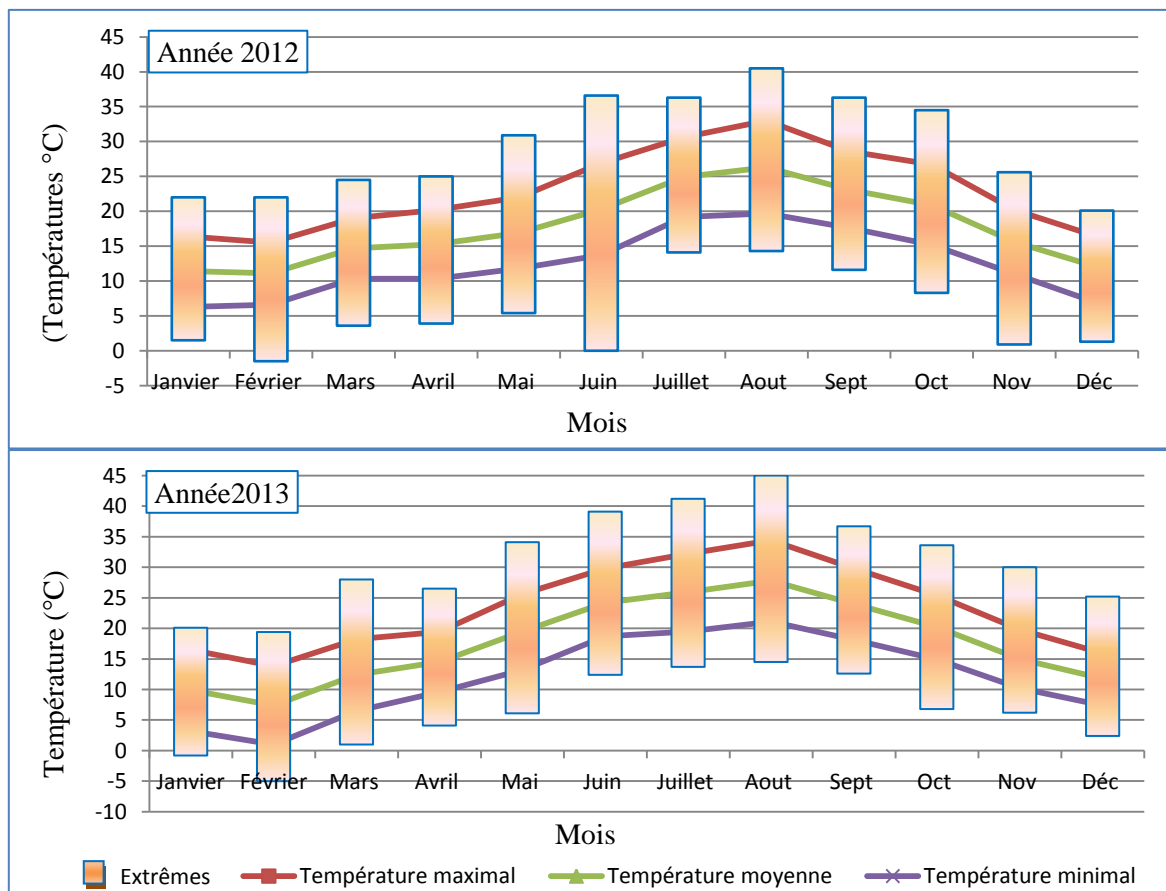


Figure 12 : Variations mensuelles des températures à Mostaganem (2012 – 2013) (ONM, 2014)

Les températures enregistrées pendant les deux années d'étude, ont montré une variabilité saisonnière assez normale (Figure 12). Au cours de l'année 2012, les températures printanière et hivernale étaient généralement élevées par rapport à l'année suivante à l'exception du mois de Mai. L'année 2013 a montré un été exceptionnellement chaud avec une température maximale extrême de 45 °C au mois d'Août (Annexe 06).

Les données de températures hebdomadaires enregistrées sous serre durant la période de l'étude, sont représentées dans la figure 13.

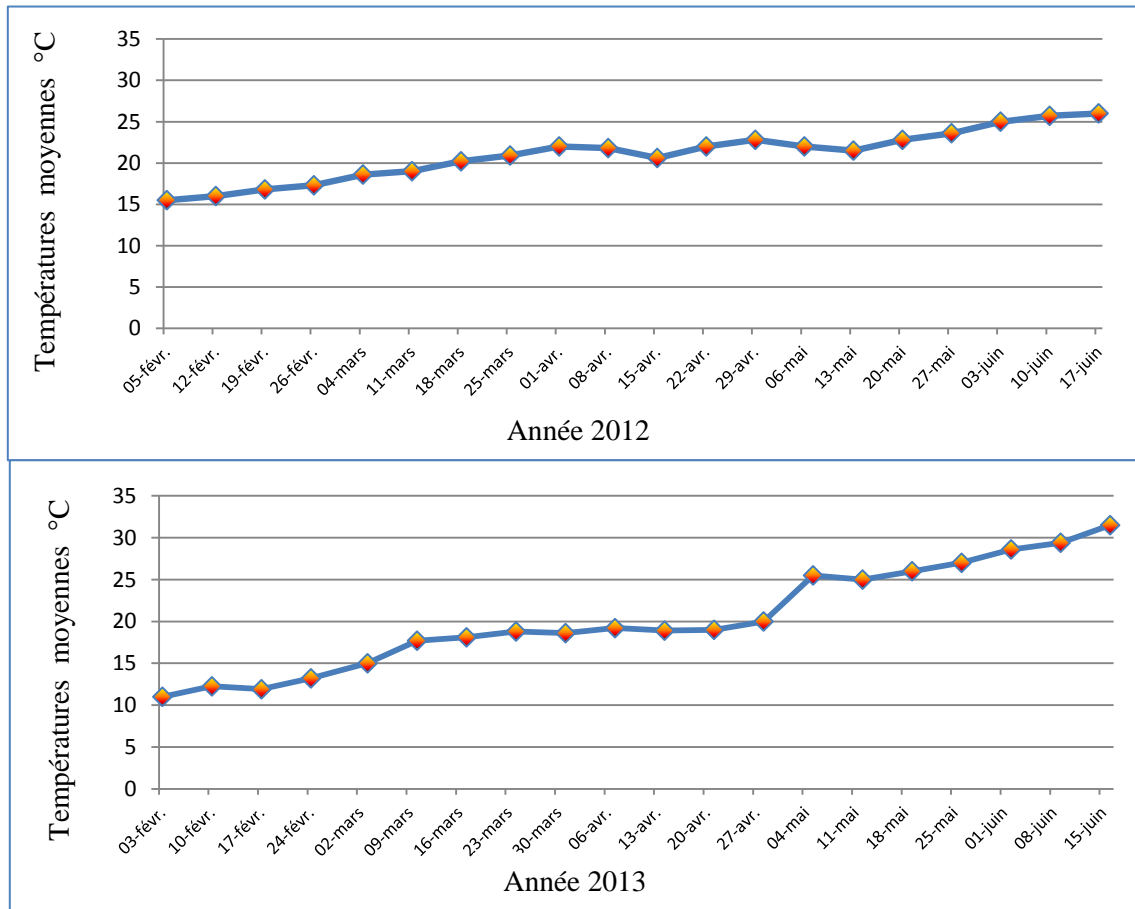


Figure 13 : Variations hebdomadaires des températures moyennes sous serre en 2012 et 2013

Au cours de l'année 2012, les températures enregistrées pour les trois premiers mois de l'échantillonnage (Février, Mars et Avril) étaient généralement plus élevées par rapport à l'année 2013. En effet, les températures moyennes variaient entre 15 et 23°C lors de la première année, tandis que pour l'année suivante les températures ont été plus clémentes avec des maxima ne dépassant pas les 15 °C pour le mois de Février et 20 °C pour les mois de Mars et Avril. Les deux derniers mois de l'échantillonnage (Mai et Juin), les températures étaient supérieures au cours de l'année 2013 avec des températures moyennes dépassant les 25 °C (Annexe 07).

III.2 Taux d'infestation

Le suivi de la dynamique des populations de *T. absoluta* au cours des deux années d'étude a permis de calculer les taux d'infestation global, par bloc et par étage foliaire.

III.2.1 Taux d'infestation global

III.2.1.1 Première année d'étude (2012)

Pendant la première année (2012), il a été enregistré des taux d'infestation variant d'un minimum de 21% (Figure 14), noté au début de l'échantillonnage ce qui coïncide avec le début du mois de Février où la température moyenne était de l'ordre de 15.5°C (Figure 13) avec un maximum de 100% à la fin de l'échantillonnage. Le taux maximum d'infestation (100%) est atteint vers le 10 Juin, correspondant à une température moyenne de 25.7°C.

Les attaques de *T. absoluta* étaient très importantes ; les observations ont permis de faire ressortir des taux d'infestation supérieurs à 50% dès la troisième semaine, évoluant rapidement pour dépasser 80 % le 11 Mars. Au-delà de cette date, les températures moyennes enregistrées sous serre étaient supérieures à 20°C. A la même période, le pourcentage des folioles contaminées augmente et reste supérieur à 85%.

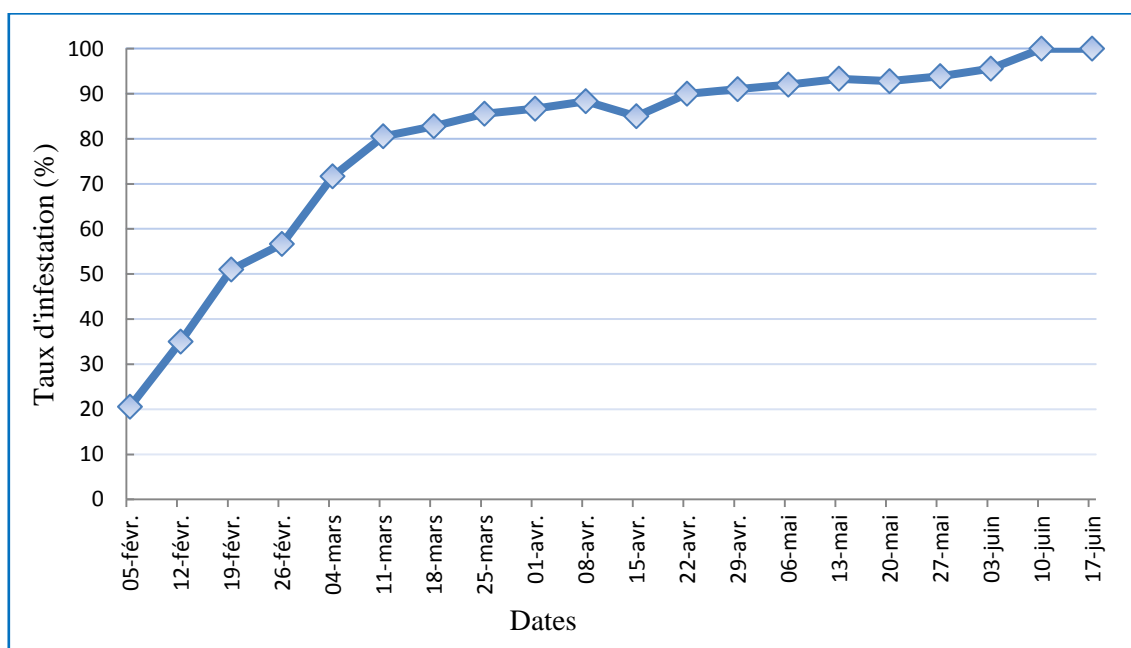


Figure 14: Taux d'infestation global de *T. absoluta* sur tomate sous serre en 2012

III.2.1 .2 Deuxième année d'étude (2013)

Le graphe, représenté sur la figure 15, illustre les variations des taux d'infestation de *T. absoluta* enregistrés pendant la deuxième année d'étude.

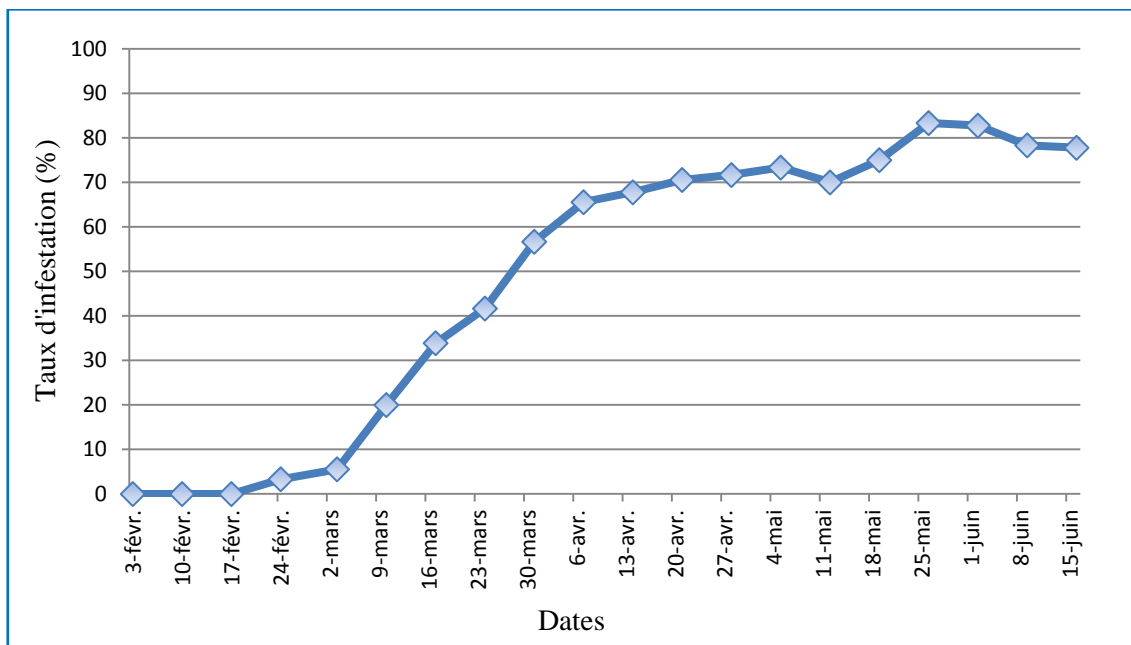


Figure 15: Taux d'infestation global de *T. absoluta* sur tomate sous serre en 2013

Durant les trois premières semaines de l'échantillonnage, aucune contamination n'a été enregistrée. Les infestations demeurent faibles jusqu'au 02 Mars (Figure 15) ne dépassant pas le taux de 6%; ce qui est dû à la faible température mensuelle enregistrée le mois de Février (7.4 °C) (Annexe .06). Les taux d'infestation ont dépassé les 50% à partir de la première décade du printemps avec 57% le 30 Mars. Depuis, une augmentation progressive des infestations a été notée. Cette augmentation des taux d'infestation, coïncide avec la progression des températures qui ont dépassé 15°C (Figure 13). Lorsque la température moyenne sous serre atteint 25°C à la quatorzième semaine (04 Mai), plus de 73 % des folioles échantillonnées ont été infestées pour subir une légère baisse du niveau d'infestation la semaine d'après (70%). Une fois la température atteint 27 °C, le taux d'infestation augmente pour atteindre un maximum de 83,33 % le 25 Mai. Au delà de cette date, une régression des attaques est enregistrée coïncidant avec l'augmentation de la température à l'intérieur de la serre (entre 28.6°C et 31.5°C) et la fin du cycle végétatif de la plante hôte.

Les résultats obtenus montrent une variation des taux de contamination dans le temps, en fonction des variations thermiques au cours des deux années d'étude. Les infestations

en 2012 ont démarré plus tôt comparativement à la deuxième année. Cela est dû probablement aux températures distinctes enregistrées pendant la même période. D'une manière générale, le taux d'infestation était nettement plus élevé au cours de la première année du suivi (100%), alors que celui de l'année 2013, n'a pas excédé la valeur de 83% .

III.2.2 Taux d'infestation par bloc

La serre a été répartie en trois blocs : le premier bloc à l'entrée de la serre (B1), le deuxième au centre (B2) et le troisième bloc à l'extrémité de la serre (B3). Les taux d'infestation par bloc (TB1, TB2 et TB3) des plants de tomate sous serre pour les deux années d'études sont représentés par les figures 16 et 17.

III.2.2.1 Première année d'étude (2012)

Au cours des échantillonnages, les observations ont permis de faire ressortir des taux d'infestation presque similaire pour les trois blocs avec des valeurs variant entre 20 et 100% (Figure 16). L'écart entre les blocs est non significatif sur la contamination des folioles par le ravageur, ce qui démontre que les plants ont été touchés sans préférence par rapport à leur situation.

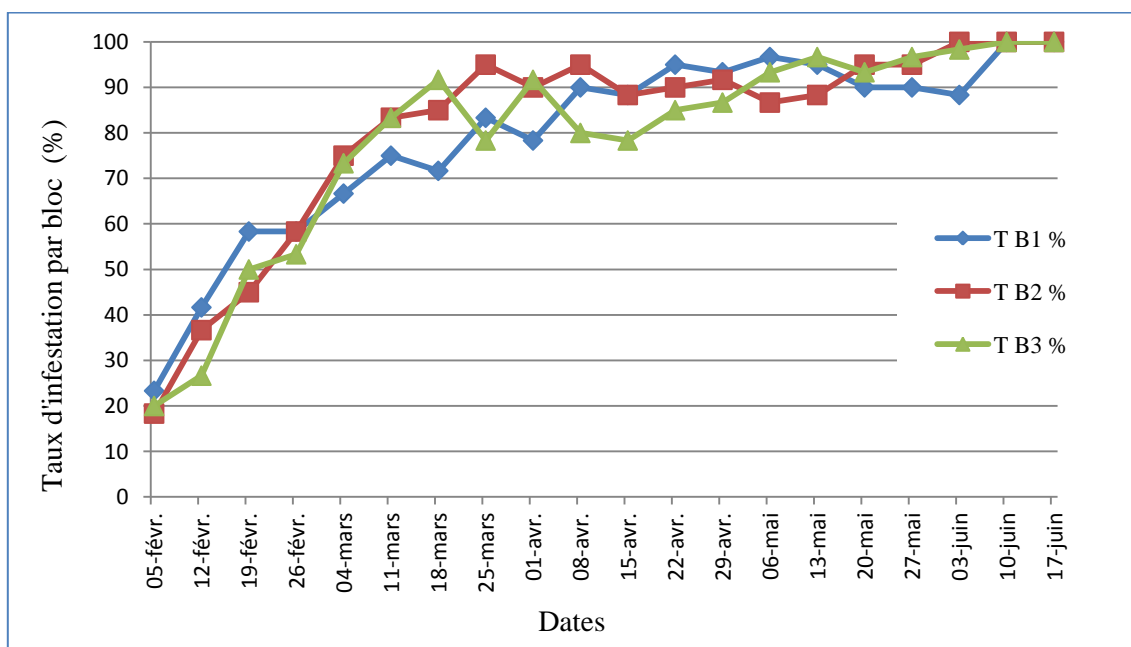


Figure 16: Taux d'infestation par bloc de *T. absoluta* sur tomate sous serre en 2012

III.2.2.2 Deuxième année d'étude (2013)

La figure 17, représente les taux d'infestation par bloc de la mineuse de tomate au cours de l'année 2013. Elle indique qu'à l'instar de la première année d'étude, aucune différence de contamination n'a été décelée entre les blocs. Les trois courbes relatives aux trois blocs se superposent pratiquement, et les taux d'infestation n'ont pas excédé 86% .

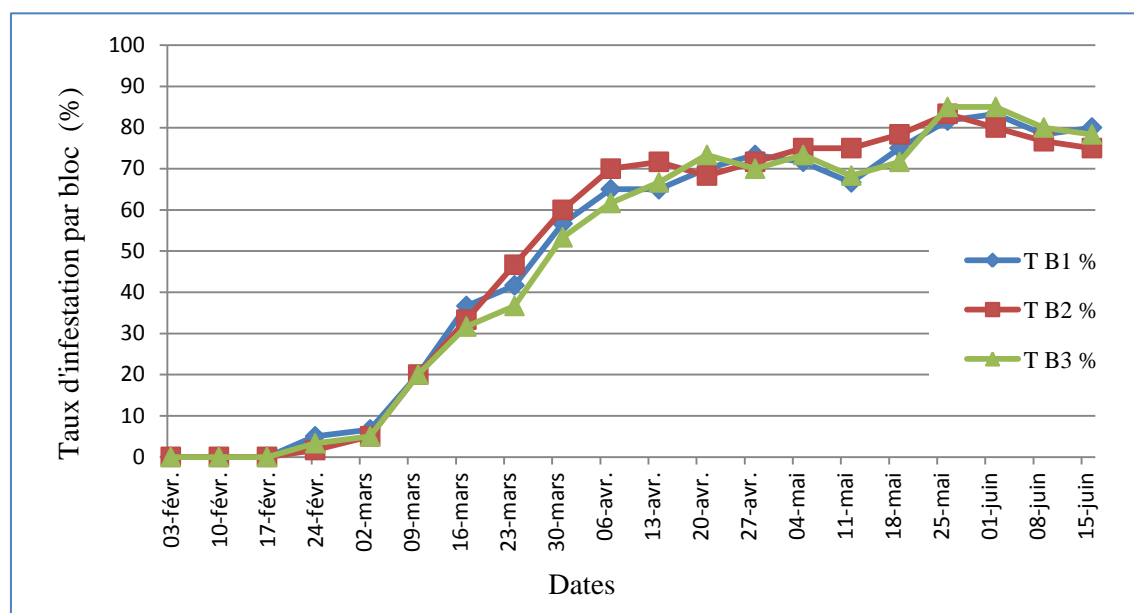


Figure 17: Taux d'infestation par bloc de *T. absoluta* sur tomate sous serre en 2013

III.2.3 Taux d'infestation par étage foliaire

L'étude de l'évolution temporelle des populations de *T. absoluta* au niveau des trois étages foliaires de la plante a été réalisée pendant deux années consécutives. Les niveaux d'infestation ont été calculés en fonction de la strate foliaire des plants, qui est répartie en trois étages : l'étage apical (T E apical %), l'étage intermédiaire (T E intermédiaire %) et l'étage basal (T E basal %). Les résultats sont mentionnés sur les figures 18 et 19.

III.2.3.1 Première année d'étude (2012)

La figure 18 indique l'évolution des taux d'infestation de *T. absoluta* en fonction de l'étage foliaire au cours de l'année 2012.

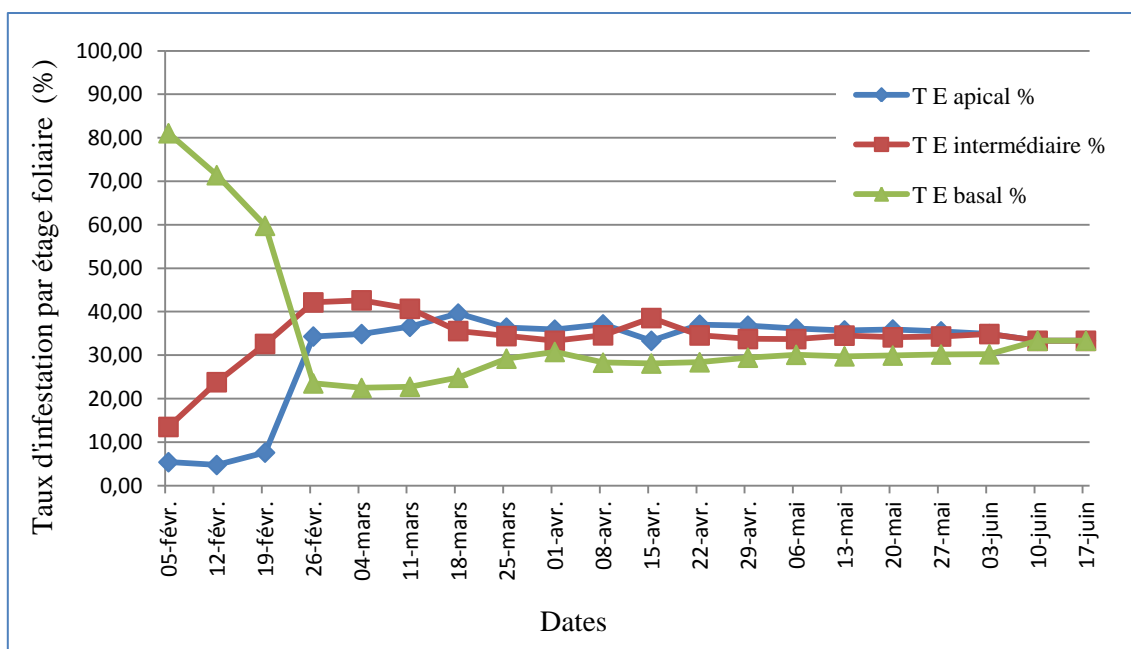


Figure 18: Taux d'infestation par étage foliaire de *T. absoluta* sur tomate sous serre en 2012

Les résultats des taux d'infestation pour les trois premiers échantillonnages, indiquent que les folioles prélevées sur l'étage foliaire basal sont les plus infestées (de 59,87 à 81,08%) par rapport aux deux autres dont les taux d'infestation étaient inférieurs à 33 % et 8 % respectivement pour les folioles appartenant à l'étage foliaire intermédiaire et apical.

Au cours de la période allant du 26 Février au 18 Mars, une baisse de la contamination au niveau de la strate foliaire basale est accompagnée par une augmentation presque similaire des infestations sur les deux autres strates foliaires (apicale et intermédiaire). Ceci démontre que les adultes du ravageur sont attirés par les jeunes pousses précoces et constituent, en fait, la base des futures contaminations. Pendant cette période, le taux d'infestation global était compris entre 50 et 85% (Figure 14).

La répartition spatio-temporelle des populations de *T. absoluta* présente une similitude au niveau des trois étages foliaires durant les trois derniers mois de l'échantillonnage (Avril, Mai et Juin), enregistrant ainsi des taux d'infestation globaux supérieurs à 85%.

III.2.3.2 Deuxième année d'étude (2013)

Les graphes représentés sur la figure 19, montrent l'évolution des taux d'infestation de *T. absoluta* en fonction de l'étage foliaire au cours de l'année 2013.

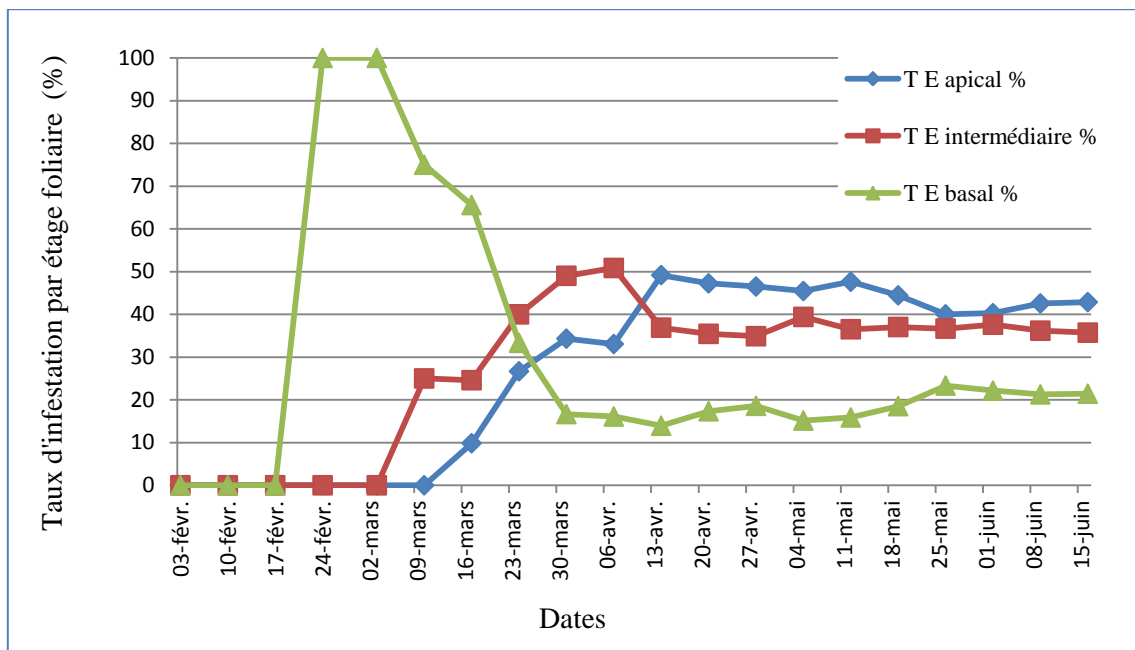


Figure 19: Taux d'infestation par étage foliaire de *T. absoluta* sur tomate sous serre en 2013

Dès l'apparition du ravageur, la totalité des folioles infestées se trouve sur l'étage foliaire basal des plants pendant deux semaines consécutives. Les dégâts de *T. absoluta* sur les étages inférieurs restent significativement supérieurs aux attaques des étages intermédiaires et supérieurs jusqu'à la mi-mars. A partir de cette date, une diminution des taux d'infestation des folioles appartenant à l'étage basal est enregistrée, pour atteindre des valeurs qui varient entre 14 et 25% jusqu'au dernier échantillonnage. Cette diminution est concomitante avec une hausse des taux d'infestation sur les deux autres étages foliaires (apical et intermédiaire). Ceci rentre dans la logique des choses, en effet très peu de jeunes feuilles sont émises à la base d'une part, et d'autre part les feuilles présentes sont plus âgées et donc ligneuses n'attirant pas les adultes de *Tuta absoluta*. Pour les mêmes raisons, les infestations sont supérieures à l'étage apical à partir du 13 Avril.

Il est à noter qu'à partir du 30 Mars jusqu'à la fin de l'étude, les feuilles basales étaient les moins infestées à l'infestation. Cela coïncide avec l'augmentation du taux d'infestation global qui varie entre 56.66 et 83.33% (Figure 15).

L'analyse de la figure 19 montre que la contamination par étage se fait en fonction de l'âge et de la disponibilité des feuilles réceptives non ligneuses.

Les résultats obtenus sous serre, pendant l'expérimentation (années 2012 et 2013), indiquent que le taux d'infestation global a une relation directe avec la répartition spatio-temporelle des populations de *T. absoluta*. Au début des contaminations, lorsque le taux d'infestation global est inférieur à 50%, l'étage foliaire inférieur est le plus attaqué. Les travaux de Lacordaire (2011) indiquent que les dégâts de *T. absoluta* sur les étages basales sont significativement supérieurs aux attaques sur les étages intermédiaires et apicaux du plant ; ce qui est le cas de nos résultats.

Lorsque le taux d'infestation global se situe entre 50 et 85%, l'étage foliaire apical et celui intermédiaire des plants de tomate sont les plus attaqués. D'après Leite et al. (2003), le nombre de mines de *T. absoluta* par feuille est plus important sur l'étage moyen et sur l'étage apical et beaucoup moins sur l'étage basal. Ces mêmes auteurs indiquent que la position des feuilles sur les étages foliaires influence les attaques de *T. absoluta* et *Liriomyza* spp, qui présentent une ponte préférentielle sur les feuilles de l'étage apical qui sont plus tendres et de haute valeur nutritionnelle. De même, les travaux de d'Oliveira et al. (2007) montrent que lorsque les feuilles deviennent âgées ou sénescents, les mines de *T. absoluta* ont tendance à se concentrées beaucoup plus sur les feuilles de l'étage moyen et sur celui de l'étage apical. Enfin, lorsque le taux d'infestation global est supérieur à 85%, tous les étages foliaires de la plante sont attaqués de la même manière. Les travaux de Hunter et al. (1991) démontrent que l'hétérogénéité de la qualité du feuillage entre les étages foliaires est contraignante pour les insectes, en rendant le feuillage de grande qualité difficile à trouver, elle les force à se déplacer fréquemment pour la recherche de nourriture de bonne qualité, ce qui peut expliquer la présence des mines sur les trois étages foliaires.

III.3 Evolution des effectifs de *T. absoluta*

L'évolution des populations de *T. absoluta* dépend de la vitalité de ses différents stades biologiques. Pour chaque date d'échantillonnage, l'abondance relative des différents stades : œuf, larves (L1, L2, L3 et L4) et nymphe, ainsi que les effectifs moyens par foliole de chacun de ces stades ont été calculés dans le but de suivre l'évolution des populations du ravageur.

III.3.1 Abondance relative des différents stades évolutifs des *T. absoluta*

III.3.1.1 Distribution des différents stades évolutifs

III.3.1.1.1 Première année d'étude (2012)

La figure 20 montre la comparaison des abondances relatives des différents stades de développement de *T. absoluta*. Elle indique que la distribution des œufs diminue au fur et à mesure que les effectifs des larves augmentent. Selon Barrientos et al. (1998), le début d'une génération est déterminé par un taux d'abondance des œufs élevé dans le temps et se transforme en larves.

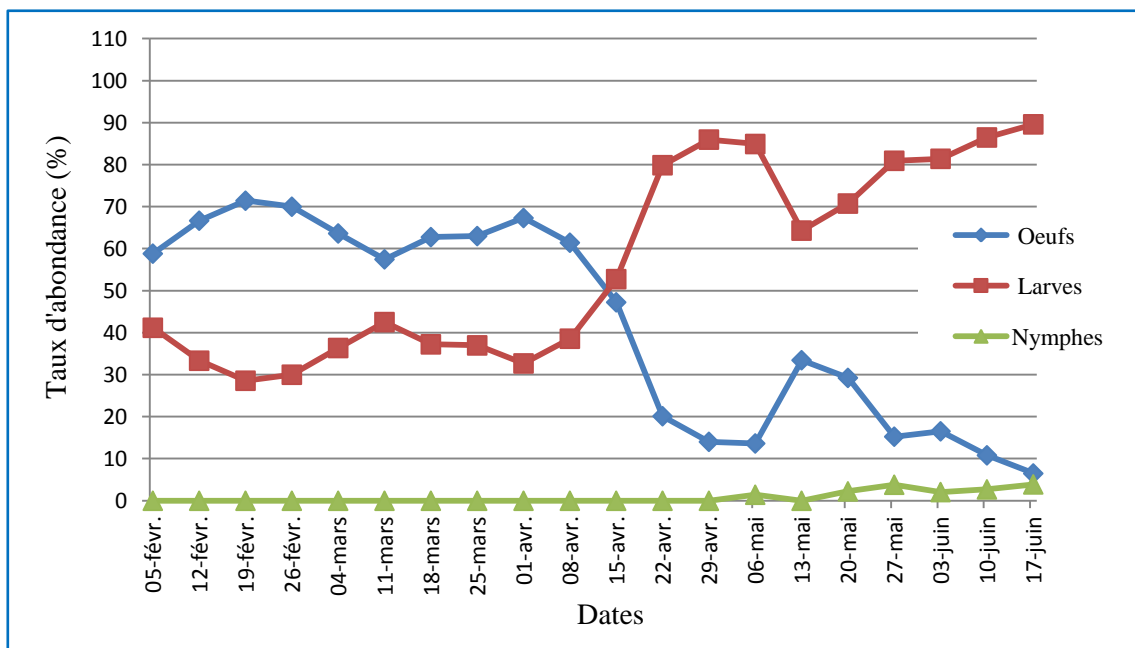


Figure 20: Abondance relative des différents stades de développement de *T. absoluta* en 2012

Les résultats consignés dans la figure 20 montrent que les femelles pondent durant toute la période d'échantillonnage. Trois pics ont été identifiés correspondant au développement de trois générations durant tout le cycle de développement de la culture. Une première génération a eu lieu suite à une augmentation brusque des pourcentages d'œufs (71,43%) le 19 Février suivie d'une diminution jusqu'à 57,47% vers la première décade du mois de Mars. Le déclin de la courbe des larves le début du mois d'Avril puis son augmentation, renseigne qu'une deuxième génération a été réalisée. Vers la mi-mai et la mi-juin, l'aspect des courbes signifie qu'il s'agit probablement de la présence d'une troisième génération.

Le faible nombre des chrysalides enregistré dans toutes les sorties est dû essentiellement au faible pourcentage de nymphose des larves du quatrième stade au niveau des folioles, car la majorité des chrysalides se trouvent au niveau du sol (Barrientos et *al.*, 1998).

III.3.1.1.2 Deuxième année d'étude (2013)

La figure 21 illustre la distribution des différents stades de développement de *T. absoluta* au cours de la deuxième année d'étude.

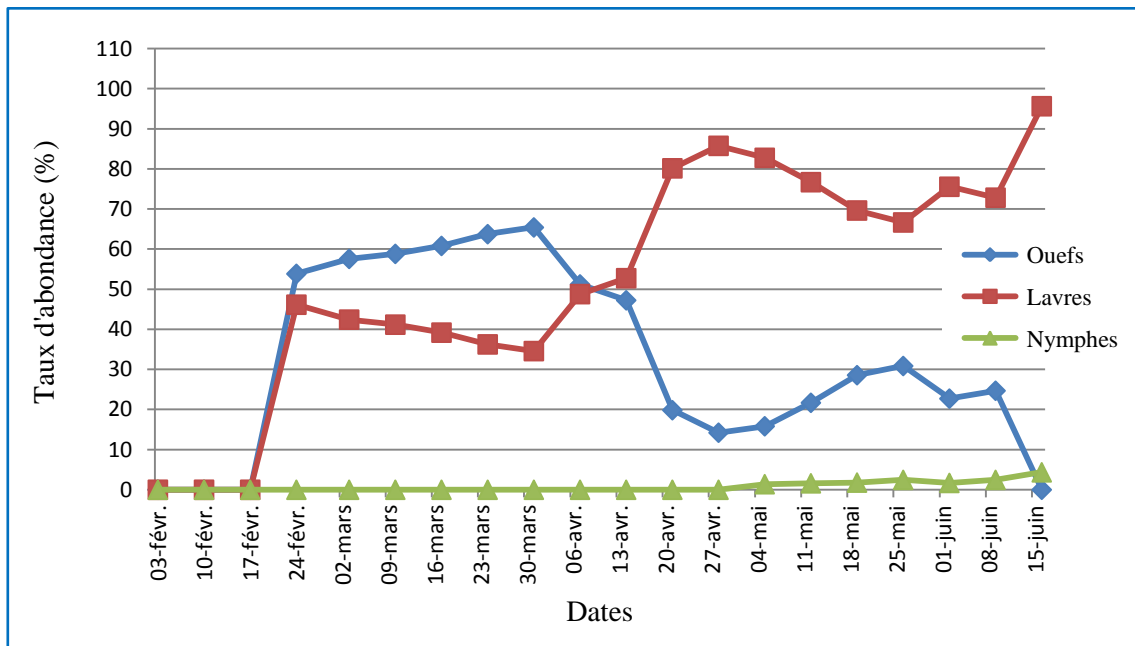


Figure 21: Abondance relative des différents stades de développement de *T. absoluta* en 2013

Le calcul de l'abondance des œufs par rapport à l'effectif total a démontré une ponte intense jusqu'à mi-avril avec des taux supérieurs à 47 %, où il a été enregistré un pic de 65,42% le 30 Mars. Il s'ensuit une baisse remarquable des pourcentages des œufs avec une valeur minimale de 14,23% le 27 avril. Puis elle augmente après quatre semaines d'échantillonnage pour atteindre 30,86 % le 25 Mai, ensuite elle diminue au cours des dernières semaines.

Le 27 avril on a enregistré une abondance importante des larves (85,77%) et seulement 14,23% pour les œufs, cela peut renseigner sur un début d'une deuxième génération d'insecte.

La structure de la population sous serre de février à juin 2013, montre la présence simultanée de tous les stades de développement de l'insecte, ce qui permet d'identifier deux pics correspondant au développement de deux générations.

La comparaison entre les deux années d'étude (Figures 20 et 21) montre, qu'en 2012, les 20 échantillonnages effectués du 05 février au 17 juin ont permis de mettre en évidence la succession de trois générations de la mineuse de tomate, alors que pour l'année 2013, seulement deux générations ont été décelées. Cela pourrait être expliqué par l'apparition tardive du ravageur au cours de la deuxième année d'étude dû probablement à la baisse des températures enregistrées en comparaison avec la première année (Figures 12 et 13). Selon Barrientos et *al.* (1998), le cycle biologique de la mineuse dépend de la température. Les mêmes auteurs ont signalé que *T. absoluta* a un potentiel reproducteur élevé ; les larves ne marquent pas de diapause aussi longtemps que la nourriture est disponible, et il peut y avoir 10 à 12 générations par an. Il est également démontré par Leite et *al.*, en 2003 que la durée du développement larvaire varie en fonction de l'âge de la plante ; elle est de 24,3 jours pour une culture âgée de 2 mois et 37 jours pour une culture âgée de 4 mois.

Les observations concernant l'évolution des générations de *T. absoluta*, au cours des deux années d'étude, ont mis en évidence la présence de trois générations au maximum de Février à Juin sur tomate sous serre. Allache et *al.* (2012) ont trouvé le même résultat, alors que Lebdi-Grissa et *al.* (2010) notent que *T. absoluta* accomplit quatre générations sur cette même culture sous serre. Bien que ce lépidoptère soit un ravageur redoutable pour la tomate, il est loin de développer 12 générations par an comme dans son aire d'origine.

Il est à noter que la durée nécessaire à l'achèvement d'une génération est plus courte lors de la première année d'étude avec une moyenne de 49 jours observée sous des températures variant entre 19 et 20 °C ; alors que lors de la deuxième année la durée a été plus longue (63 jours) avec des températures variant de 13.2 à 19°C. Selon Barrientos et *al.* (1998), le cycle biologique de *T. absoluta* dépend de la température et peut être accompli en 39.8 jours à 19°C et en 23.8 jours à une température de 27.1 °C. Les mêmes auteurs précisent qu'une température de 14°C peut allonger la durée d'une génération jusqu'à 76 jours.

Le suivi de la distribution des différents stades de développement de *T. absoluta*, au cours de la période d'étude (2012 et 2013), indique une absence presque totale des chrysalides à l'exception de quelques unes observées à la fin des échantillonnages. Ceci peut s'expliquer par la viabilité des larves qui ne peuvent arriver au stade de chrysalide (Torres et *al.*, 2002), et où la nymphose se fait généralement dans le sol (Lebdi-Grissa et *al.*, 2010).

III.3.1.2 Distribution des différents stades larvaires

III.3.1.2.1 Première année d'étude (2012)

Les courbes représentées sur la figure 22 montrent la distribution des différents stades larvaires et mettent en exergue les fluctuations des populations larvaires au cours de la première année d'étude, où tous les stades larvaires sont présents avec une activité intense surtout pour les larves du premier stade.

Le stade L1 était le plus abondant sur les folioles avec des taux de 100% durant les quatre premières semaines de l'échantillonnage. Par la suite une diminution de l'abondance a été notée, néanmoins elle demeure importante comparativement aux autres stades larvaires. L'abondance du stade L1 toute au long de la durée de l'échantillonnage est corrélée avec une ponte importante à la même période (Figure 20), elle-même régie par les températures favorables. Selon Bensaad (2011), l'éclosion des œufs qui varie de 4 à 6 jours a permis de noter un nombre plus important d'individus du premier stade larvaire.

La présence des autres stades n'a été enregistrée qu'à partir de la cinquième semaine avec des taux d'abondance plafonnés pour L2 à 40.6% et à 19.74% pour L3.

D'après les observations de la distribution des larves du premier et du deuxième stade, il ressort que seule une partie des individus (L1) ont évolué vers le stade suivant (L2). Ceci est dû probablement à une mortalité importante causée par des facteurs biotique et/ou abiotiques.

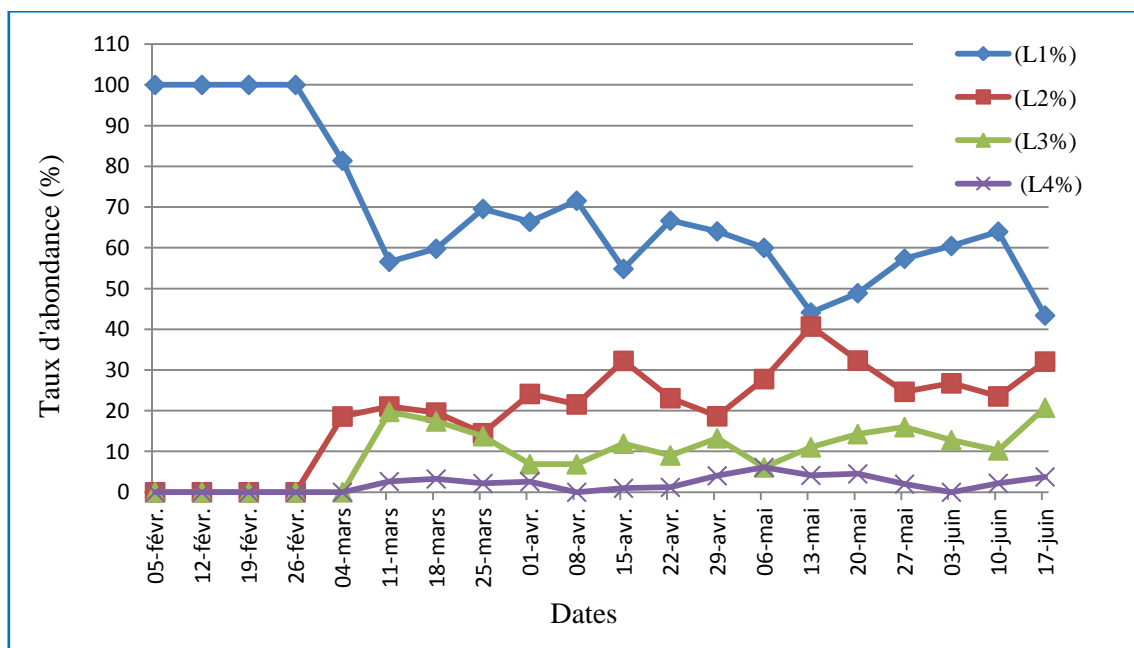


Figure 22: Abondance relative des différents stades larvaires de *T. absoluta* en 2012

Le stade L4, était le moins abondant avec des taux qui ne dépassent pas 6.10%. Ceci explique que les larves de ce stade quittent les feuilles pour se réfugier au niveau du sol pour accomplir leur cycle et se nymphoser.

III.3.1.2.2 Deuxième année d'étude (2013)

La figure 23, illustre la distribution des différents stades larvaires de la deuxième année du suivi de la dynamique des populations de *T. absoluta* sous serre. Elle indique que les trois premières semaines de l'échantillonnage (du 03 au 24 Février) sont caractérisées par une absence totale des stades larvaires. Dès l'apparition du ravageur, la totalité des larves dénombrées appartiennent au premier stade. Une baisse progressive est observée jusqu'à l'atteinte d'un pourcentage de 34.84% le 30 Mars. Leur nombre subit des fluctuations jusqu'à la fin de l'expérience et ne dépasse pas 24%. La présence des larves du stade L2 augmente en parallèle avec la régression des larves du premier stade.

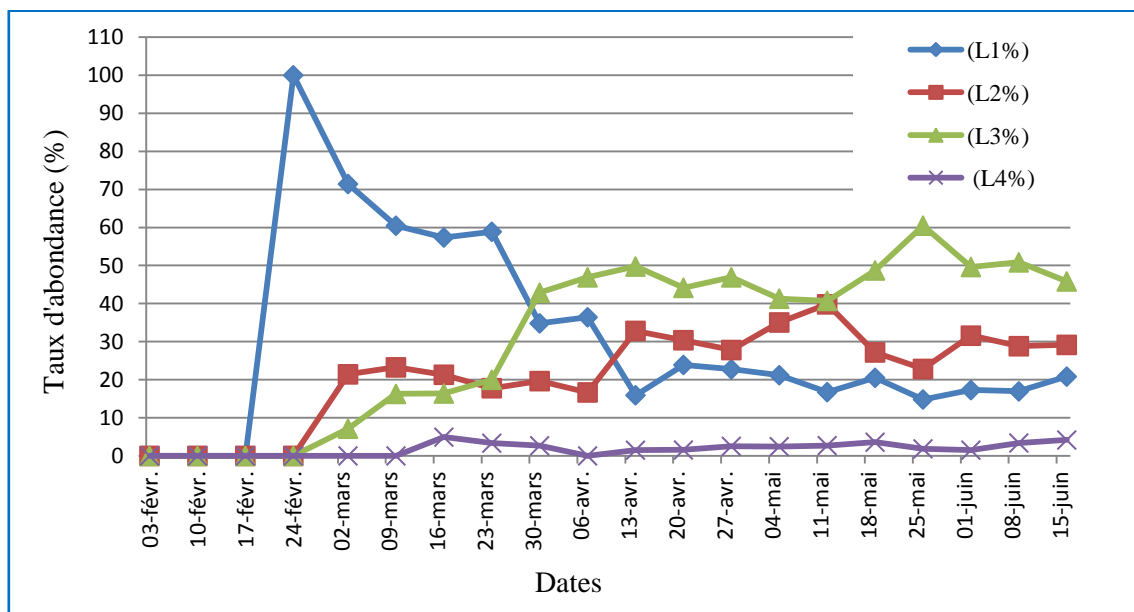


Figure 23: Abondance relative des différents stades larvaires de *T. absoluta* en 2013

A la fin du mois de Mars, les larves du stade L3 sont les plus fréquentes par rapport aux autres stades (L1 et L2), avec des proportions comprises entre 40.72 et 60.49 %. D'après Lebdi-Grissa et al. (2010), la durée du développement du troisième stade larvaire est plus longue que la durée des deux stades qui le précède ; ils indiquent que les stades larvaires (L1, L2 et L3) nécessitent respectivement, $1,5 \pm 0,5$, $2,8 \pm 0,4$ et $5,5 \pm 0,5$ jours pour passer d'un stade à un autre. Selon les mêmes auteurs, une abondance élevée des larves du troisième stade dû à la mortalité des larves du premier et deuxième stade larvaire du phytophage

établissant un rapport en faveur des L3. D'autre part, Miranda *et al.* (1998) indiquent que la prédation et le parasitisme peuvent être responsables à 79,4% de la mortalité des larves du premier et du deuxième stade larvaire de *Tuta absoluta*.

Les larves du quatrième stade (L4), étaient les moins représentées sur les folioles avec des taux qui ne dépassent guère les 5%.

La comparaison des abondances relatives des différents stades larvaires de *T. absoluta* dans nos prélèvements, en fonction de l'année d'échantillonnage (Figures 22 et 23), a fait apparaître que les effectifs des larves du premier stade sont toujours élevés pendant les deux premiers mois des observation (Février et Mars). Au delà de cette période jusqu'à la fin de la culture (Avril, Mai et Juin), une distribution distincte des différents stades larvaires a été observée. En effet, les larves du premier stade ont été abondantes au cours de la première année. L'année suivante c'est les larves du troisième stade qui dominant. Par ailleurs, les proportions des larves du quatrième stade ont représenté la part la plus faible des effectifs de la mineuse au cours des deux années d'études, en raison du comportement propre à ce stade (migration vers le sol).

III.3.2 Densité des populations de *T. absoluta* sous serre

III.3.2.1 Effectif moyen par foliole des stades évolutifs de *T. absoluta*

Les figures 24 et 25, illustrent la densité par foliole des stades évolutifs de *T. absoluta* en fonction du temps pendant les deux années d'étude.

III.3.2.1.1 Première année d'étude (2012)

Pour ce qui est de la densité de l'insecte par foliole, les résultats obtenus indiquent que les moyennes des individus par foliole évoluent avec le temps (Figure 24).

La tendance des graphes montre que, les nombres moyens des larves et des œufs évoluent dans le même sens, avec un nombre d'œufs par foliole plus important atteignant la valeur de 1.62 le 01 Avril. A partir de cette date, une chute de la densité du stade embryonnaire a été observée et se poursuivait jusqu'à la fin de l'échantillonnage. Le maximum de la densité des larves a été noté le 29 avril avec une valeur de 2.43 larves par foliole. Juste après, une régression de l'effectif moyen des larves est enregistrée, pour arriver à une moyenne de 0.68 larves par foliole le 20 Mai. Une légère augmentation de la densité (0.89 larves par foliole) est apparue après deux semaines, suivie par une diminution du nombre de larves par foliole jusqu'à la dernière semaine de l'échantillonnage. Les nymphes sont pratiquement absentes sur folioles.

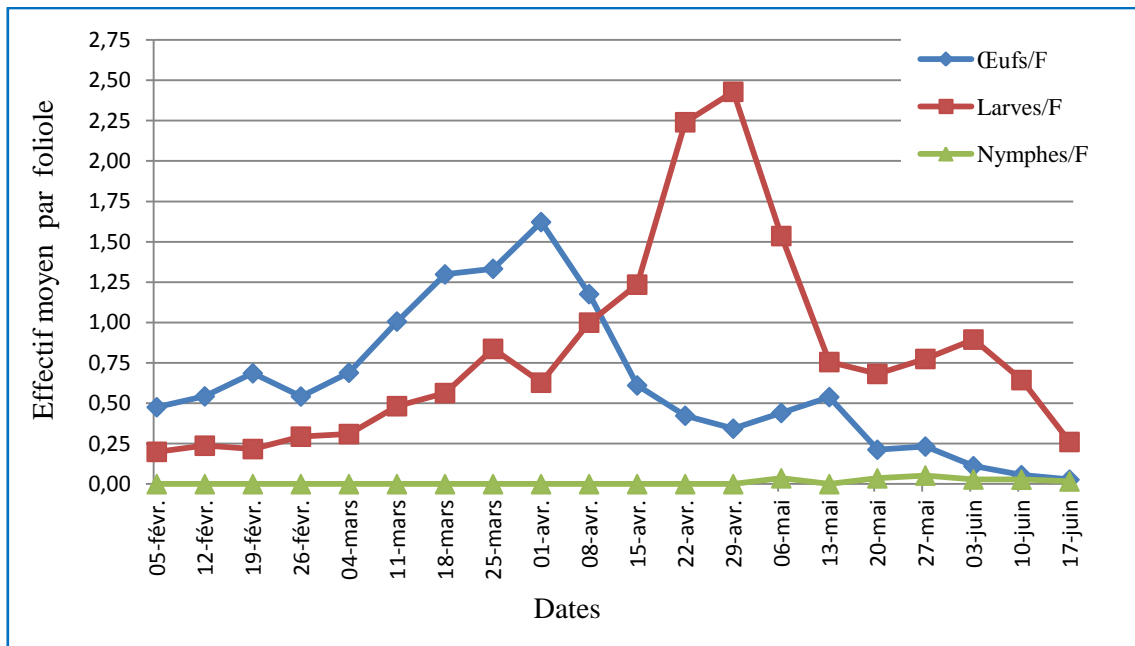


Figure 24: Evolution dans le temps de l'effectif moyen par foliole des stades évolutifs de *T. absoluta* en 2012

III.3.2.1.2 Deuxième année d'étude (2013)

La figure 25, représente l'évolution de l'effectif moyen des stades évolutifs (œufs, larves et nymphes) de *T. absoluta* par foliole en 2013.

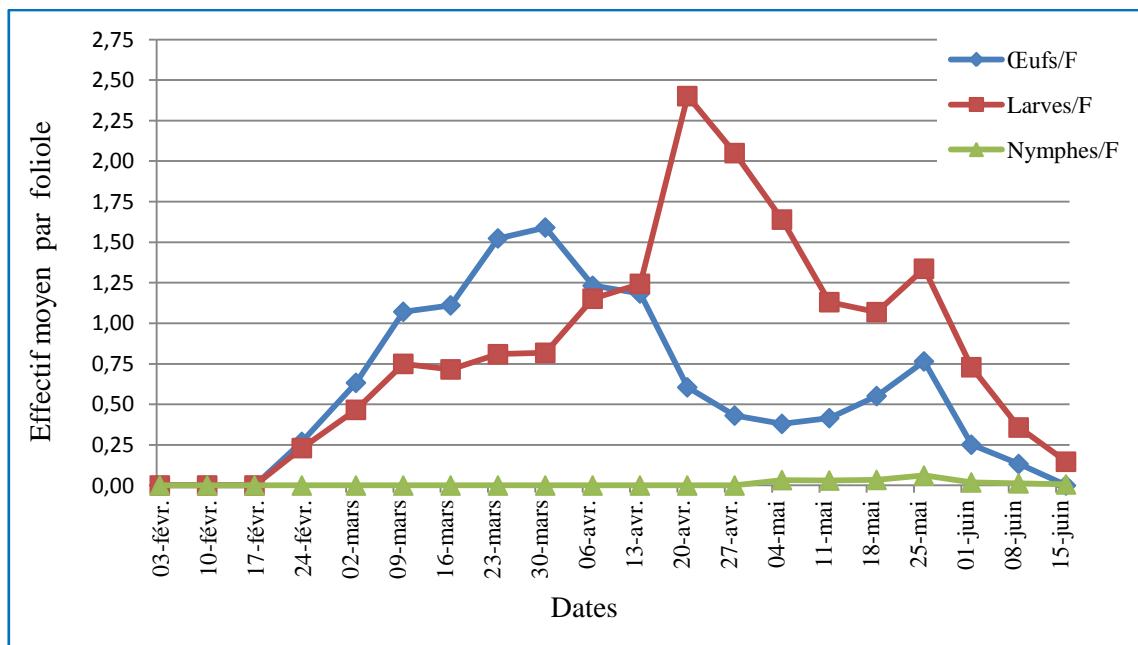


Figure 25: Evolution dans le temps de l'effectif moyen par foliole des stades évolutifs de *T. absoluta* en 2013

Durant les trois premières semaines de l'échantillonnage, les folioles étaient indemnes de toutes contaminations. Les premiers œufs ont été comptabilisés le 24 Février (0.23 œuf par foliole). A partir de cette date une prolifération du nombre d'œufs pondus par foliole est enregistrée, pour atteindre un maximum de 1.59 œufs par foliole le 30 Mars. S'ensuit une baisse de l'effectif moyen des œufs par foliole, concomitante avec une hausse du nombre de larves par foliole, atteignant une densité maximale de 2.40 larves par foliole le 20 Avril. Une diminution des densités des larves est enregistrée jusqu'à l'achèvement de l'échantillonnage, à l'exception du prélèvement du 25 Mai où la densité était de 1.34 larves par foliole.

Les résultats des effectifs moyens des stades évolutifs (œufs, larves et nymphes) de *T. absoluta* par foliole, ne montrent pas une différence entre les densités enregistrées pour les deux années d'études (Figures 24 et 25). Le nombre d'œufs observé sur les folioles de tomate pendant la période allant du mois de Février au mois de Mars est supérieur au nombre des larves par foliole. Ce faible effectif par foliole des larves est peut être causé par le nombre réduit d'œufs éclos. D'après Miranda et *al.* (1998), la mortalité des œufs peut atteindre 58,7% due essentiellement à leur infertilité pendant la période hivernal. A partir du mois d'Avril la densité des œufs diminuent et celle des larves augmente. Le mois de Juin une baisse de l'effectif des larves par foliole est enregistrée.

L'absence de larves dans les mines peut être due aux déplacements des larves d'une foliole à l'autre. Ceci est fréquent chez les larves de *T. absoluta*, qui quittent leur galerie pour en creuser une nouvelle sur une autre foliole (Urbanéja et *al.*, 2007 ; Lacordaire, 2011). Le faible nombre des chrysalides par foliole enregistré dans toutes les sorties est dû essentiellement au faible pourcentage de nymphose des larves du quatrième stade au niveau des folioles, car la majorité des chrysalides se trouvent au niveau du sol (Barrientos et *al.*, 1998).

III.3.2.2 Effectif moyen par foliole des stades larvaires de *Tuta absoluta*

Les figures 26 et 27 illustrent la densité par foliole des stades larvaires de *T. absoluta* en fonction du temps pendant les deux années d'étude.

III.3.2.2.1 Première année d'étude (2012)

L'effectif moyen des stades larvaires de *T. absoluta* par foliole de l'année 2012 est mentionné sur la figure 26.

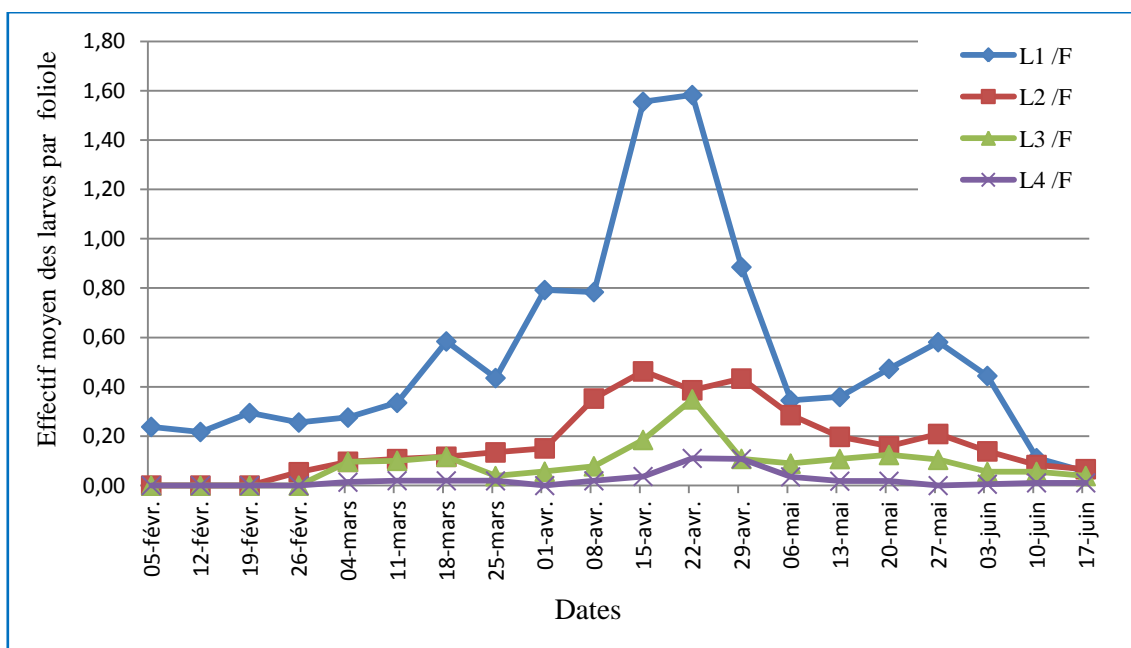


Figure 26: Evolution dans le temps de l'effectif moyen par foliole des stades larvaires de *T. absoluta* en 2012

La figure 26 montre clairement que le maximum des densités des larves est enregistré le mois d'Avril avec des effectifs moyens de 1,58, 0,46, 0,35 et 0,11 larves par foliole, respectivement pour L1, L2, L3 et L4.

L'analyse des courbes met en évidence une densité larvaire élevée du stade L1 par rapport aux autres stades. Il est à signaler que le nombre moyen par foliole des différents stades larvaires (L2, L3 et L4) reste presque stable et ne dépasse pas 0,47 unité par foliole,

III.3.2.2.2 Deuxième année d'étude (2013)

Les résultats de la densité des larves à différents stades de *T. absoluta* durant l'année 2013 sont reportés sur la figure 27. Une absence totale des larves (tous stades confondus) est observé durant les trois premières semaines de l'échantillonnage.

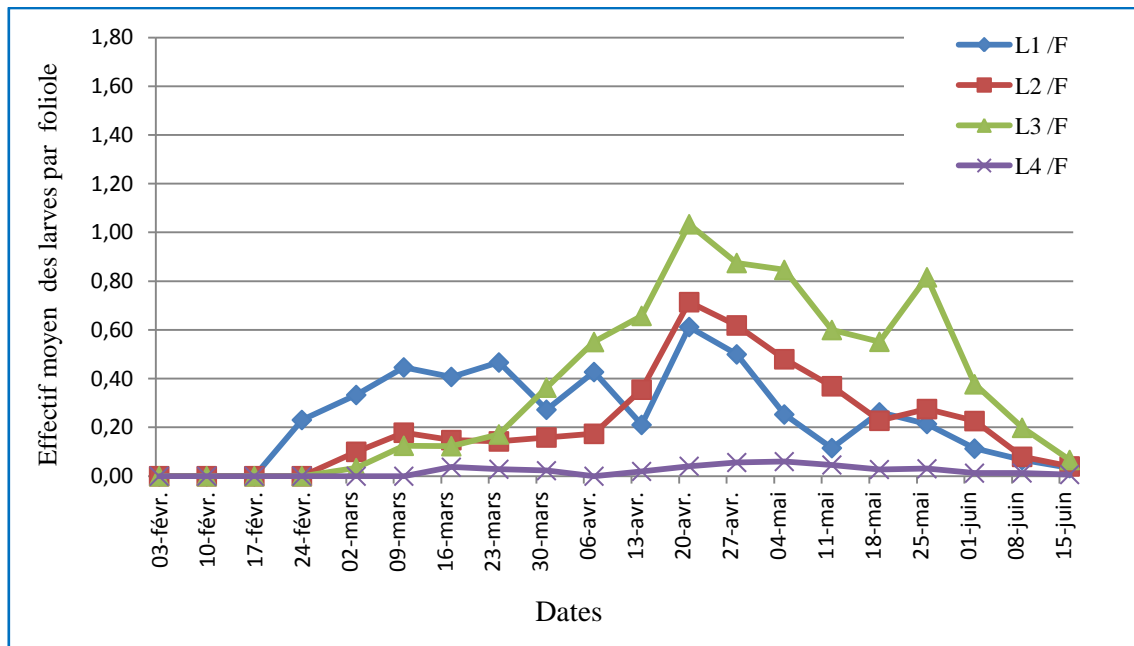


Figure 27: Evolution dans le temps de l'effectif moyen par foliole des stades larvaires de *T. absoluta* en 2013

L'évolution des populations du ravageur au cours de la période allant du 24 Février jusqu'au 23 Mars a montré une dominance des larves du premier stade avec un maximum de 0.47 larves par foliole, et des densités moins importantes mais semblables pour les larves du deuxième et du troisième stade, ne dépassant guère 0,18 larves par foliole. Au-delà du 30 Mars, une progression remarquable de la densité des larves du troisième stade est notée, atteignant un effectif maximal de 1.03 larves par foliole le 20 Avril. Pendant cette période, la densité des larves du stade L1 était semblable à celle de la période précédente alors que l'effectif moyen des larves du stade L2 présente des valeurs intermédiaires avec un pic de 0.71 larves par foliole, enregistré le 20 Avril.

L'étude de l'évolution dans le temps de l'effectif moyen par foliole des stades larvaires de *T. absoluta* en 2012 et 2013 (Figures 26 et 27), a montré que la plante de tomate héberge les différents stades larvaires pendant tout son cycle végétatif suivant des effectifs variables. Selon Schoen (2009), la disponibilité de la nourriture et les facteurs climatiques, essentiellement la température conditionnent les variations de la densité des stades larvaires de la mineuse. Il a été remarqué que pour les deux années, l'essentiel de populations du ravageur apparaissent en particulier le mois d'Avril. Cette observation est importante dans le cadre de mise au point d'une stratégie de lutte.

III.4 Préférence de ponte

Afin de ressortir la préférence de ponte des femelles de *T. absoluta* selon la face foliaire, une étude de l'évolution temporelle de la population embryonnaire sur la face inférieure et supérieure des folioles a été effectuée.

III.4.1 Première année d'étude (2012)

Le nombre d'œufs pondus sur les deux faces des folioles échantillonnées au cours de l'année 2012, est représenté sur la figure 28.

Au niveau des graphes représentatifs de la ponte sur les deux faces foliaires, apparaissent trois pics de valeurs très différentes. La courbe de la face inférieure indique que, le taux maximal est de l'ordre de 1.32 œufs enregistré le 01 Avril. Les deux autres pics sont de moindre importance, ils sont de 0.54 et 0.39 pour les dates respectives du 19 Février et 13 Mai. Le graphe de la face supérieure représente des valeurs moyennes inférieures à 0.40 œufs par surface foliaire.

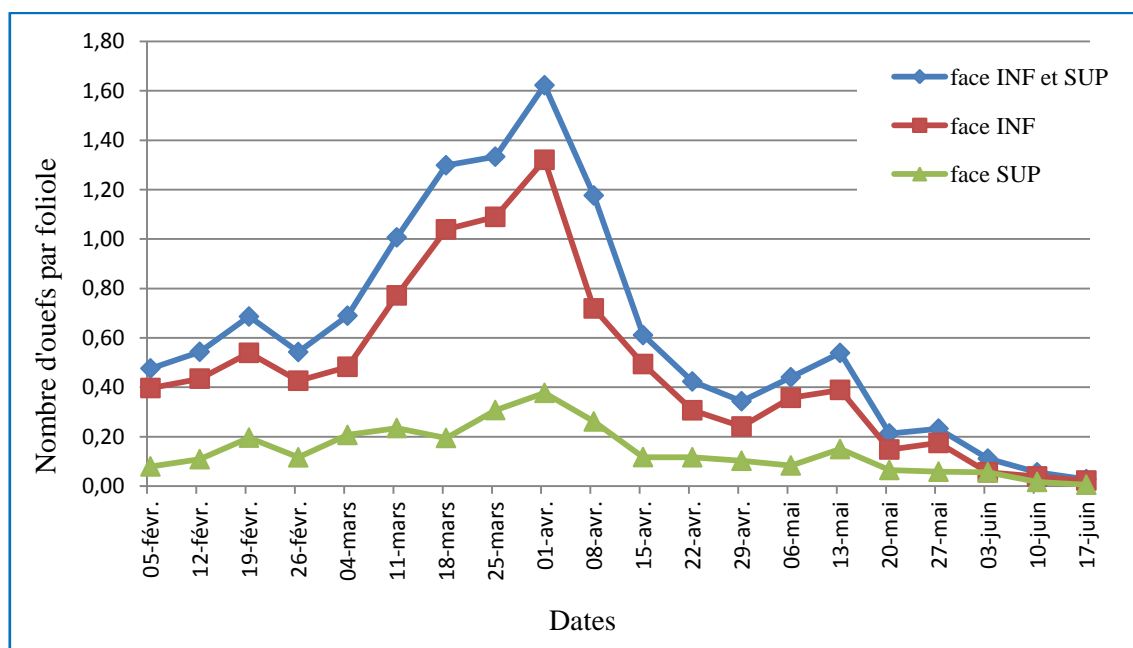


Figure 28: Evolution temporelle du nombre d'œufs pondus sur les faces supérieures et inférieures des folioles en 2012

Les résultats obtenus, montrent clairement que la ponte s'est échelonnée sur l'ensemble de la période de l'étude et que la face inférieure des folioles est plus infestée que celle supérieure.

III.4.2 Deuxième année d'étude (2013)

L'évolution temporelle du nombre d'œufs pondus sur les deux faces des folioles en 2013 est représentée dans la figure 29.

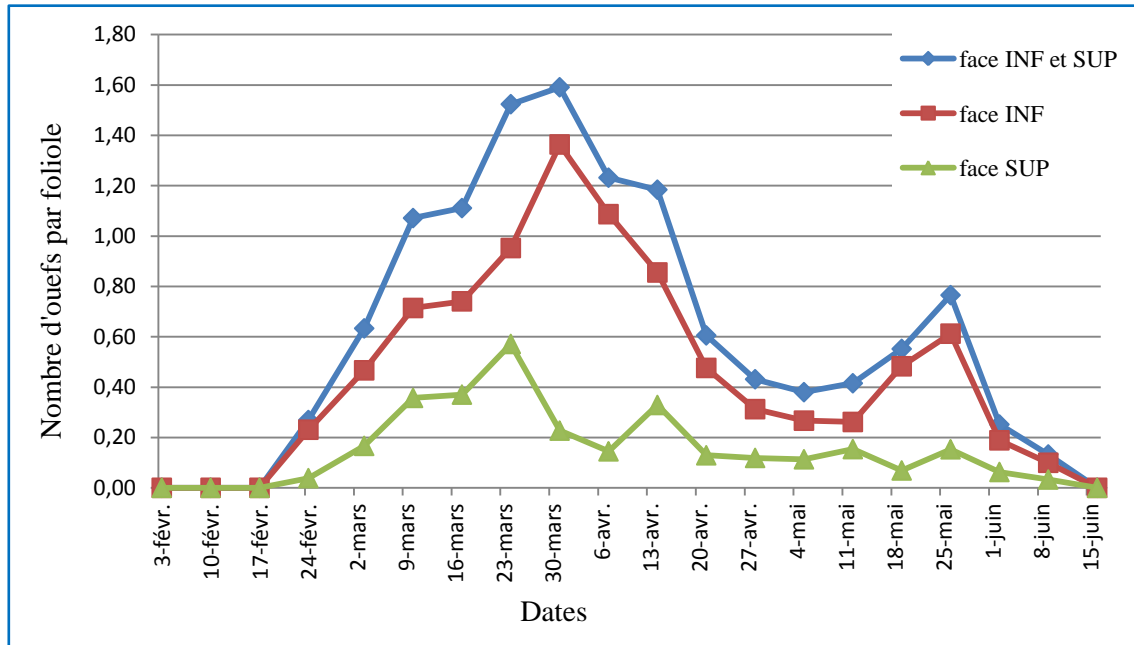


Figure 29: Evolution temporelle du nombre d'œufs pondus sur les faces supérieures et inférieures des folioles en 2013

Au début, l'infestation est quasi nulle pour les deux faces de folioles et ce pendant les trois premières semaines d'échantillonnage, correspondant à un taux d'infestation global de 0% (Figure 15). A partir du 24 février, débute les contaminations des faces inférieures avec un taux de 0.23. Un pic important (1.59 œufs par foliole) est observé à la date du 30 mars, il est plus important pour les faces inférieures (1.36 œufs par foliole) que pour les faces supérieures (0.23 œufs par foliole). Les résultats obtenus, dévoilent la présence d'une différence significative des pontes entre les faces foliaires supérieures et inférieures.

L'évolution temporelle du nombre d'œufs pondus sur les folioles de tomate au cours des deux années d'étude, montrent que les pontes sont plus importantes sur la face inférieure que sur la face supérieure des folioles. Selon Estay (2000), 73% des œufs sont concentrés sur la face inférieure des feuilles, 21% sont proches des nervures et de la tige ; seulement 6% des œufs se trouvent sur les fruits verts. Coelho et França (1987) ont également signalé qu'au moment de la ponte des œufs, la femelle recherche des sites qui peuvent assurer une protection et une alimentation adéquate à sa progéniture, elle préfère déposer ses œufs à la face inférieure des folioles, sur les jeunes tiges tendres et sur les sépales des fruits immatures.

III.5 Impact des facteurs de mortalité sur la mineuse

L'étude de la dynamique des populations de *T. absoluta* implique non seulement une estimation de la distribution et de la densité des différents stades de développement, mais également une meilleure compréhension de la nature et de l'importance des facteurs naturels qui agissent sur l'évolution des générations successives. Au cours de son développement la mineuse de tomate est soumise à des facteurs abiotiques et biotiques qui régularisent sa population. Pour en savoir plus sur l'influence de ces facteurs, il était utile d'étudier la mortalité naturelle des larves de *T. absoluta* et par la suite celle liée au complexe parasitaire.

III.5.1 Première année d'étude (2012)

Les données du taux de mortalité naturelle des larves et celui du parasitisme de *T. absoluta* de la première année d'étude sont représentées dans les figures 30 et 31.

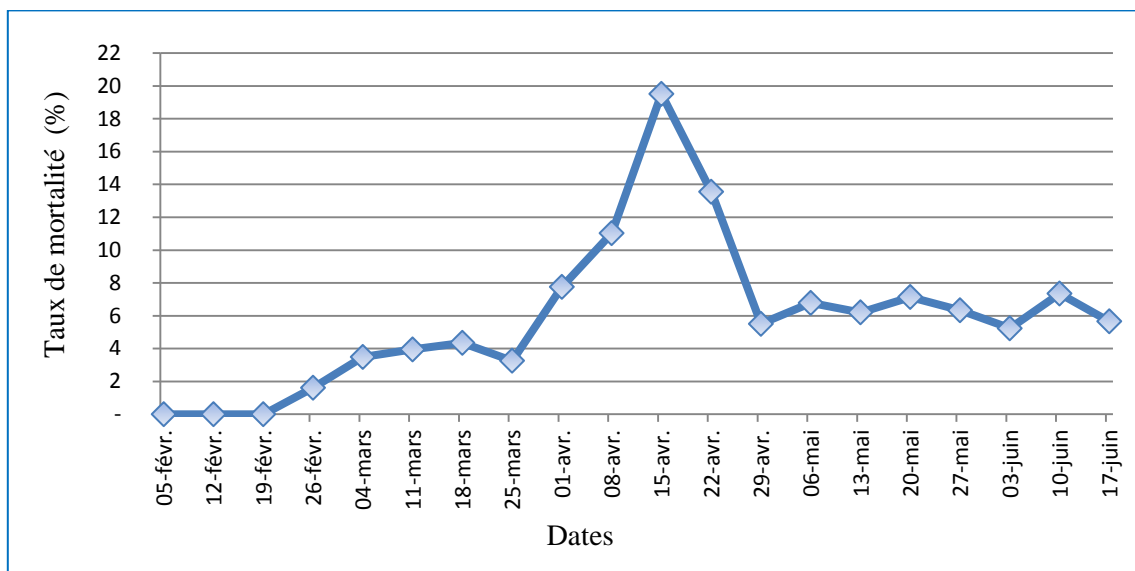


Figure 30: Estimation de la mortalité des larves de *T. absoluta* en 2012

L'évolution des taux de mortalité des larves de la mineuse de tomate *T. absoluta* dans la serre peut être divisée en deux périodes ; la première s'étend du début du travail jusqu'au 18 Mars au cours de laquelle le niveau de mortalité ne dépasse pas 4,35% par semaine (Figure 30). Ces faibles valeurs reviennent probablement à la faible activité larvaire enregistrée au cours de cette période (Figure 24). La seconde période (à partir du 25 Mars), le taux augmente progressivement pour atteindre un maximum de 19,52 % le 15 avril, puis il chute deux semaines après pour garder un taux qui varie entre 5,23 % et 7,35 % durant le reste des observations.

L'évolution des populations des parasitoïdes de *T. absoluta* est représentée sur la figure 31. Elle indique que le parasitisme a commencé le 18 Mars avec un taux de 0.72 % atteignant un maximum de 4.41 % la mi-avril. Le taux de parasitisme global pour cette année s'est élevé à 2,12% (Annexe 24). Il est non négligeable vu la récente introduction de l'insecte dans notre pays. Dans les pays d'origines de l'insecte, les taux élevés de parasitisme de la mineuse de tomate n'ont été enregistrés qu'après dix ans d'activité après la première introduction (Desneux et *al.*, 2010).

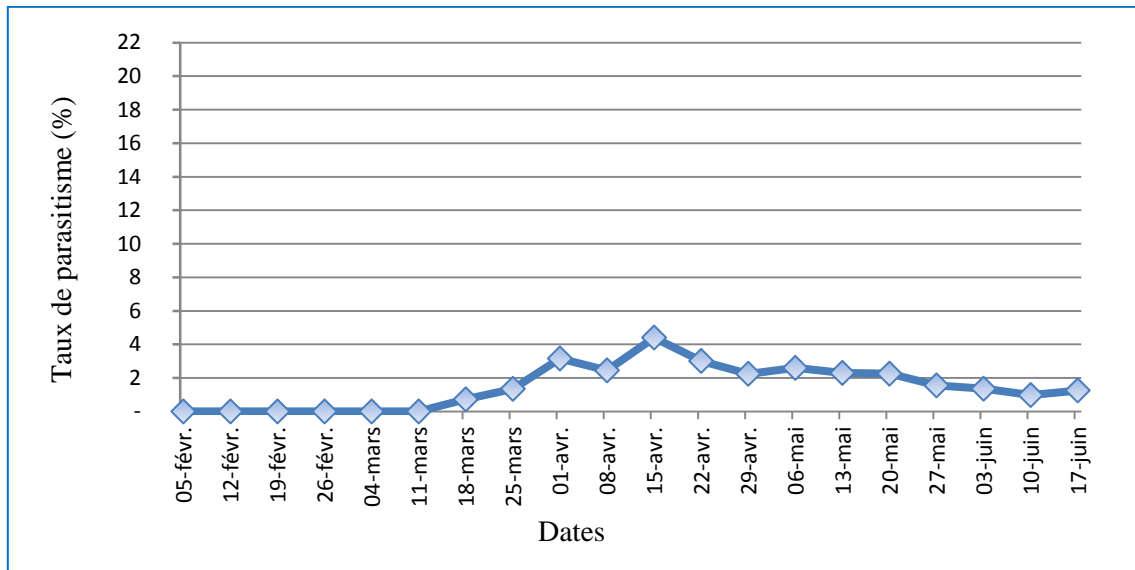


Figure 31 : Taux de parasitisme des stades larvaires de *T. absoluta* en 2012

La mortalité peut dépendre soit des facteurs abiotiques (climat, mode de conduite, ...etc.) soit des facteurs biotiques tels que le parasitisme et la prédation. La régulation de la population de *T. absoluta* par les facteurs abiotiques est du principalement au climat qui joue un rôle déterminant dans l'évolution de ce ravageur. Selon Lacayo et Schotman (1989), la température est l'un des facteurs les plus importants pour le développement du ravageur et l'installation de ses ennemis naturels. Parmi les facteurs de mortalité, celui lié au parasitisme a été le plus aisé à mettre en évidence contrairement à la prédation et autres.

La figure 32 récapitule les données consignées dans les figures 13, 30 et 31. Elle montre l'influence de la température et le parasitisme sur la variation du taux de mortalité naturelle des larves de *T. absoluta* au cours de la première année de l'étude.

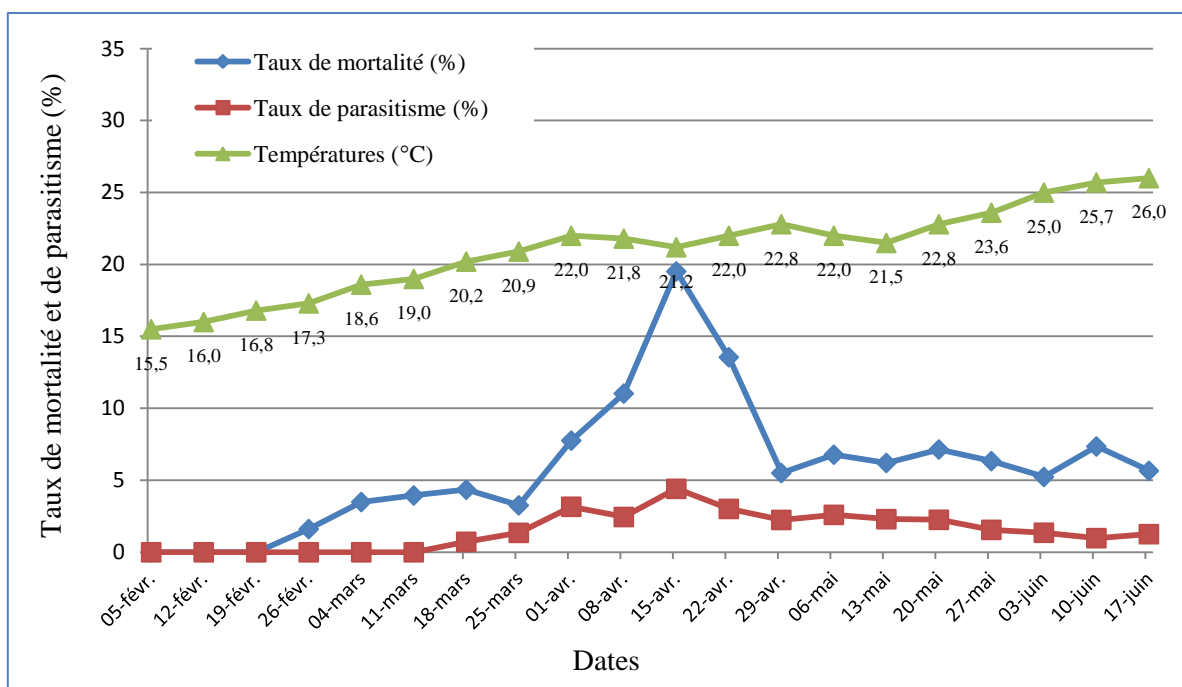


Figure 32: Estimation des taux de mortalité et de parasitisme en fonction des variations thermiques sous serre en 2012

La comparaison de la courbe de mortalité naturelle et celle du parasitisme ne permet pas de relier directement cette mortalité à l'activité parasitaire. Elle est probablement due à d'autres facteurs biotiques et abiotiques comme la prédation et les variations thermiques. En effet les résultats obtenus montrent que la mortalité naturelle a été constatée trois semaines avant l'apparition des larves parasitées. Le taux de mortalité naturelle pour chaque échantillonnage était supérieur à celui du parasitisme avec des différences dépassant le double.

III.5.2 Deuxième année d'étude (2013)

Les résultats des mortalités larvaires naturelles et celles dues au parasitisme de *T. absoluta* de l'année 2013 sont reportés dans les figures 33 et 34.

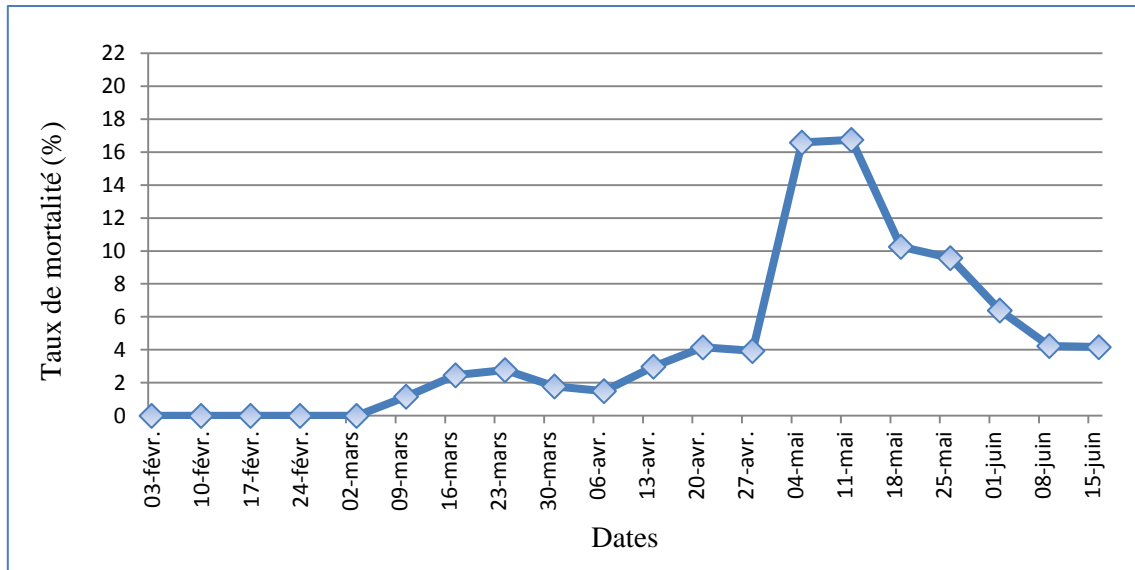


Figure 33: Estimation de la mortalité des larves de *T. absoluta* en 2013

D'après la figure 33, on note qu'au cours des trois premiers mois d'échantillonnage, le taux de mortalité était nul à faible (moins de 4,5%). En revanche, après cette période la mortalité évolue de manière remarquable pour atteindre un pic de 16,47% le 11 Mai. Pour les semaines qui suivaient, le pourcentage des individus morts régresse tout en se maintenant à un seuil supérieur au niveau initial.

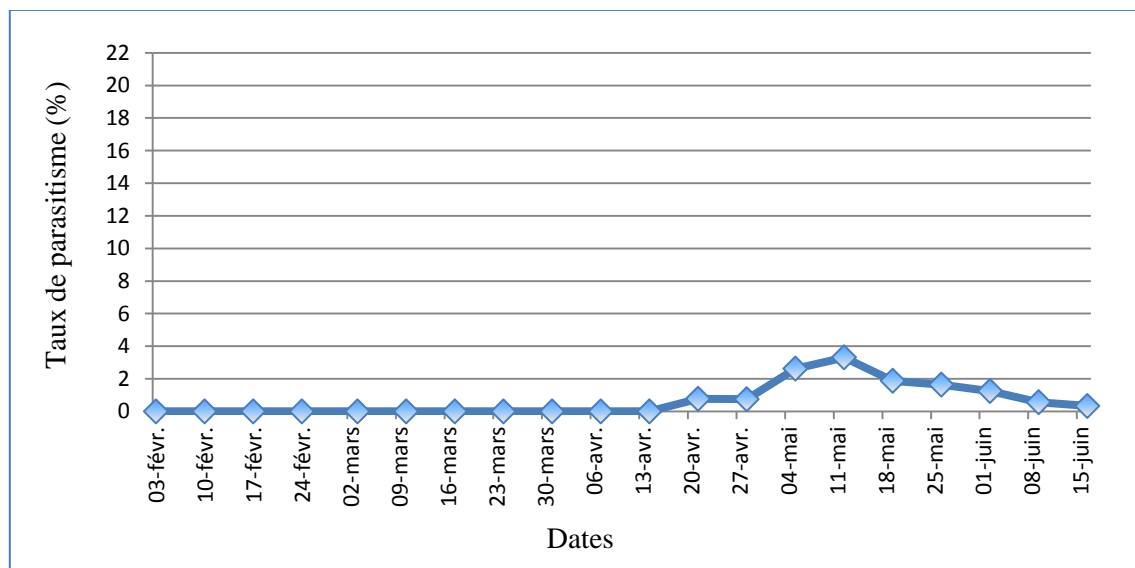


Figure 34 : Taux de parasitisme des stades larvaires de *T. absoluta* en 2013

La lecture de la figure 34 fait ressortir que pendant les onze premières sorties, le taux de parasitisme était nul. Une évolution des individus parasités est constatée à partir du 20 Avril pour atteindre une valeur maximale de 3,32% le 11 mai. Cette augmentation

coïncide avec l'apparition des larves parasitées et la hausse des températures qui dépassent 20°C. La proportion des larves parasitées a diminué au fur et à mesure, et cela jusqu'au dernier prélèvement. Le taux de mortalité global dû au parasitisme s'est élevé à 1,46% (Annexe 24) ; valeur inférieure à celle de l'année précédente.

L'analyse de variance des données montre un effet significatif ($P \leq 0.05$), de l'année sur le taux de parasitisme.

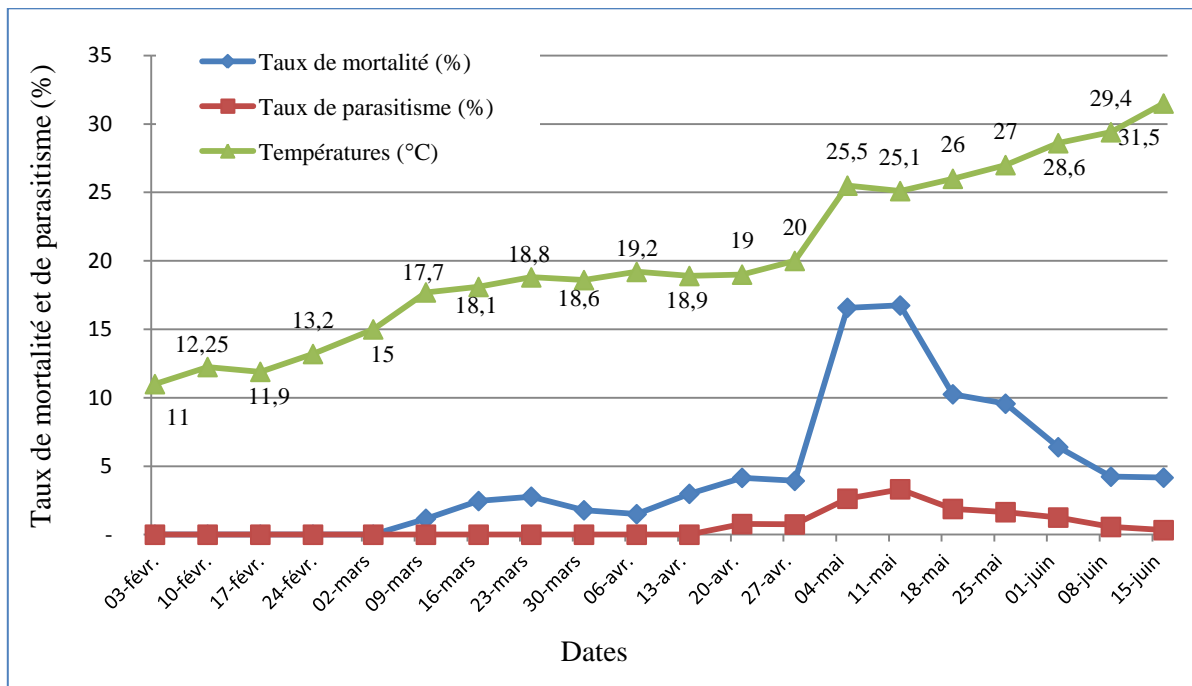


Figure 35: Estimation des taux de mortalité et de parasitisme en fonction des variations thermiques sous serre en 2013

La figure 35, récapitule l'ensemble des données illustrées dans les figures 13, 33 et 34. Si l'on compare les courbes de mortalité naturelle (tous facteurs confondus) et ceux du parasitisme et des températures enregistrées au cours de la première décade du mois de Mai, on peut déduire que la mortalité due au facteur abiotique est de l'ordre de 14% environ, si l'on considère l'estimation de la mortalité des larves est celle liée au parasitisme. A la même période les températures moyennes enregistrées sous serre ont augmenté brusquement pour atteindre des valeurs supérieures à 25 °C. Cette augmentation des températures coïncide avec la progression des taux de mortalité. Cela laisse supposer que la température est le facteur abiotique qui a influencé le plus les facteurs de régulation du ravageur.

La mortalité globale tous facteurs confondus a toujours dépassé les 16 % : soit 19,52 et 16,74% respectivement pour les années 2012 et 2013. La mortalité due au parasitisme s'est manifestée différemment pendant les deux années ne dépassant pas un maximum de 4.41% (enregistré en 2012).

Les observations montrent que, les larves parasitées apparaissent sur une courte période de l'année (Mars, Avril et Mai) lorsque les températures varient entre 20 et 28°C. Il semble que l'activité des parasitoïdes est limitée par les températures élevés. Navarro et Marcano (1997) confirment que les températures élevées (plus de 30°C) diminuent raisonnablement la longévité et le nombre de parasitoïdes.

Les taux de parasitisme enregistrés au cours de cette étude étaient faibles, ce qui révèle une pression limitée sur les populations de *T. absoluta*. Toutefois, il est possible qu'une partie des individus parasités soient morts avant que les parasitoïdes aient achevé leur développement ou qu'ils aient été plus facilement attaqués par les prédateurs.

La présence des prédateurs est due probablement à l'application du programme de la lutte biologique menée par les services de l'Institut Nationale de la Protection des Végétaux. Des punaises prédatrices (*Nesidiocoris tenuis* et *Macrolophus pygmaeus*) ont été importées et multipliées pour réaliser des lâchers dans les serres.

Dans notre étude, le taux de mortalité et de parasitisme des stades larvaires de l'insecte restent faible, ce résultat est contraire a celui trouvé par Urbaneja et al. (2009), où ils ont remarqué, que le nombre d'individus parasités est important en automne et au printemps où le climat est favorable à l'activité des auxiliaires. Miranda et al. (1998), signalent que la prédation naturelle est importante pour la régulation des populations de *T. absoluta* au Brésil. Ils notent des mortalités larvaires apparentes, atteignant des valeurs proches de 80%. Navarro et Marcano, (1997) signalent que les faibles taux de parasitisme sont dus à une mauvaise synchronisation entre le ravageur et son parasitoïdes.

III.6 Inventaire des espèces antagonistes de la mineuse de tomate

Dans son aire d'origine (Amérique du sud), le développement de la mineuse est limité par un important cortège de prédateurs et de parasitoïdes (Desneux et al., 2010). Depuis son apparition en Algérie, de nombreux ennemis naturels ont été observés (Kolai et al., 2011). Selon les mêmes auteurs, six espèces appartenant à trois familles d'hyménoptères ont été recensées comme parasitoïdes dans la région de Mostaganem. Il s'agit de *Necremnus artynes* Walker (Hymenoptera : Eulophidae), *Diglyphus isaea* Walker (Hymenoptera: Eulophidae),

Sympiesis sp. (Hymenoptera : Eulophidae), *Neochrysocharis* sp. (Hymenoptera: Eulophidae), *Bracon* sp. (Hymenoptera : Braconidae), et *Trichogramme* sp. Pour les punaises prédatrices de *T. absoluta* trois espèces appartenant à la famille de Miridae, ont été identifiées, il s'agit de *Nesidiocoris tenuis* Reuter, *Macrolophus caliginosus* Wagner et *Dicyphus errans* Wolff .

III.6.1 Inventaire des parasitoïdes

L'inventaire de la faune parasitoïde inféodée à *T. absoluta* au cours des deux années d'étude a permis de mettre en évidence la présence de plusieurs espèces d'hyménoptères, dont deux seulement ont été identifiés ; il s'agit de : *Necremnus artynes* et *Diglyphus isaea* avec des abondances relatives respectives de 80% et 15% (Figure 36). Une prédominance nette de *N. artynes* a été observée. C'est aussi l'espèce la plus représentative dans le Bassin méditerranéen et est considérée par de nombreux auteurs comme l'un des parasitoïdes le plus prometteur pour limiter les populations de la mineuse (Molla et al., 2008).

Selon Dehliz (2015), *N. artynes* est un entomophage inféodé aux larves avec un cycle de 18 jours sous une température de 21°C ; ce parasitoïde n'est actif que pendant le printemps lorsque les températures sont inférieures à 30°C. Le même auteur signale que, les espèces du genre *Necremnus* sont actives sur les Lépidoptères, les Coléoptères et les Diptères.

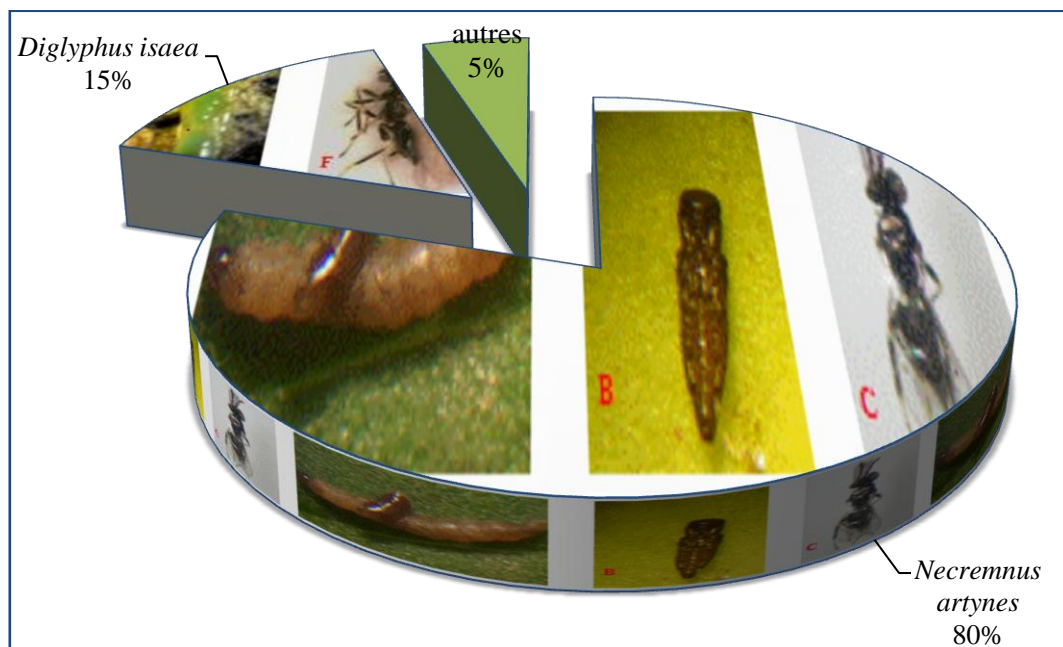


Figure 36: Abondance des différentes espèces de parasitoïdes de *T. absoluta*

III.6.2 Inventaire des prédateurs

L'inventaire échelonné sur deux années a permis d'observer des prédateurs appartenant à l'ordre des Hémiptères avec deux espèces. Il s'agit de *Nesidiocoris tenuis* Reuter (Hemiptera : Miridae) (70%) et *Macrolophus pygmaeus* Rambur (Hemiptera : Miridae) (30%) (Figure 37). D'après Dehliz (2015), ces punaises prédatrices s'alimentent de préférence des œufs et de jeunes stades larvaires (L1 et L2) de *T. absoluta*. Mais en absence de ces stades le prédateur se nourrit des stades les plus âgés. Urbaneja et al. (2009) signalent que *Nesidiocoris tenuis* et *Macrolophus pygmaeus* correspondent aux prédateurs majeurs observés sur *T. absoluta* en Espagne, de même les deux punaises se sont adaptées à ce nouveau ravageur, ce qui augmente leur valeur comme agents de lutte biologique dans la culture de tomate, car ils avaient déjà été utilisés pour lutter contre les aleurodes. Molla et al. (2011), rapportent que *N. tenuis* a eu un effet important dans la régulation de la population de *T. absoluta* et que l'introduction de ce prédateur et son maintien dans les régions à grande production maraîchère peuvent contribuer à limiter les dégâts causés par la mineuse de tomate.

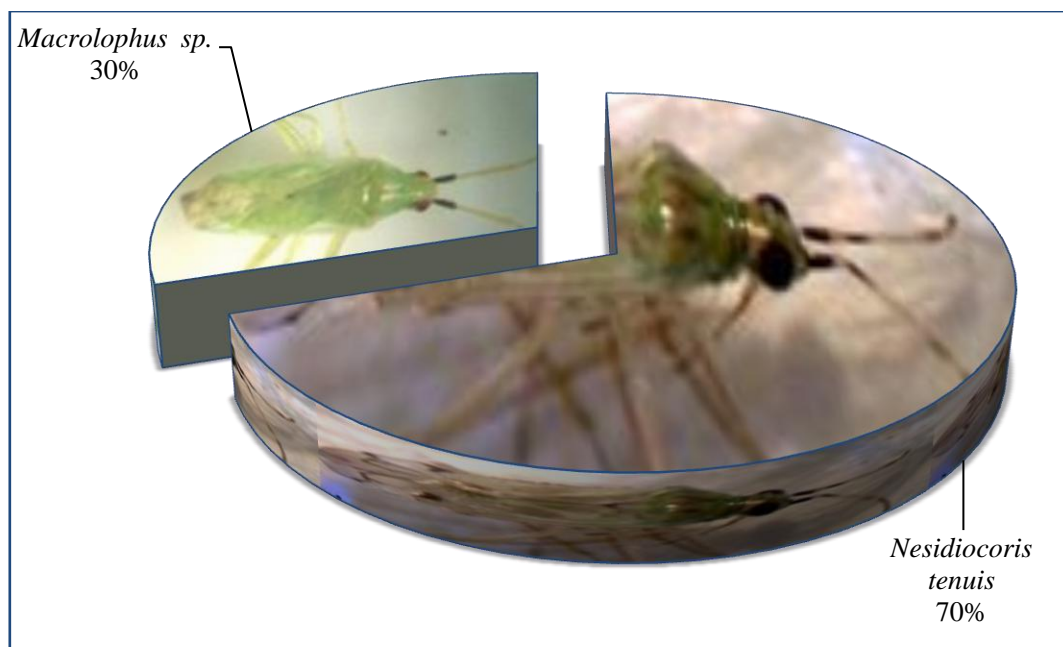


Figure 37 : Abondance des différentes espèces de punaises prédatrices de *T. absoluta*

CONCLUSION

Le suivi des populations de *T. absoluta* sous serre a permis de mesurer l'agressivité de ce ravageur et a mis en évidence des taux d'infestation élevés durant toute la période de l'étude (années 2012 et 2013). L'infestation était nettement plus élevée au cours de la première année du suivi, atteignant les 100%, alors que celles de 2013 n'ont pas excédé la valeur de 83%. Il faut noter qu'aucun insecticide n'a été apporté et qu'aucune différence de contamination n'a été décelée entre les plants à l'intérieur et à l'entrée de la serre. Les résultats obtenus montrent une variation du taux d'infestation dans le temps et dans l'espace en fonction des variations thermiques. En effet une contamination inférieure à 50% a été enregistrée lorsque les températures ne dépassent pas 17°C. L'augmentation des températures de 18.5 °C à 27 °C correspond à des taux d'infestation globaux oscillant entre 70 à 100%, de même la position des folioles sur les étages foliaires influence les attaques de *T. absoluta*. Au début des contaminations, l'étage foliaire inférieur est le plus attaqué, mais lorsque le taux d'infestation global se situe entre 50% et 85%, les étages foliaires apicaux et intermédiaires des plants de tomate sont les plus infestés.

La comparaison des abondances relatives des différents stades larvaires a fait apparaître que les effectifs des larves du premier stade sont toujours élevés pendant les deux premiers mois des observations représentant 60 à 100% des effectifs. Une distribution distincte des différents stades larvaires a été observée jusqu'à la fin de la culture; en effet les stades prédominants se sont les larves du premier stade (43.40 % à 71.57%) et du troisième stade (41.30% à 60.49 %) respectivement pour la première et la deuxième année d'étude.

Les observations concernant l'évolution des générations de *T. absoluta*, ont permis de mettre en évidence la succession de trois générations en 2012, alors que pour l'année 2013, seulement deux générations ont été repérées. Lebdi-Grissa et al. (2010) rapportent que *T. absoluta* accomplit quatre générations sur cette même culture sous serre. Bien que ce lépidoptère soit un ravageur redoutable pour la tomate, il est loin de développer 12 générations par an comme dans son aire d'origine (Barrientos et al., 1998). Il est à noter que la durée nécessaire à l'achèvement d'une génération est plus courte lors de la première année d'étude avec une moyenne de 49 jours observée sous des températures variant entre 19 et 20 °C ; alors que lors de la deuxième année la durée a été plus longue (63 jours) avec des températures variant de 13.2 à 19°C. Selon Barrientos et al. (1998), le cycle biologique de *T. absoluta* dépend de la température et peut être accompli en 39.8 jours à 19°C

et en 23.8 jours à une température de 27.1 °C. Les mêmes auteurs précisent qu'une température de 14°C peut allonger la durée d'une génération jusqu'à 76 jours.

Les résultats des effectifs moyens des stades évolutifs (œufs, larves et nymphes) de *T. absoluta* par foliole, ne montrent pas une différence entre les densités enregistrées pour les deux années d'études. Pendant la période allant du mois de Février au mois de Mars, les nombres moyen des larves et des œufs évoluent dans le même sens, avec un nombre d'œufs par foliole plus important atteignant les valeurs de 1.62 en 2012 et 1.59 en 2013 avec une préférence de ponte sur la face inférieure des folioles. Le faible effectif des larves (moins de 0.83 larve par foliole), peut être causé par le nombre réduit d'œufs éclos sur les folioles de tomate. D'après Miranda et al. (1998), la mortalité des œufs peut atteindre 58,7% due essentiellement à leur infertilité pendant la période hivernal. A partir du mois d'Avril une baisse de l'effectif moyen des œufs, concomitante avec une hausse du nombre de larves par foliole a été constatée, atteignant des densités maximales de 2.43 larves par foliole pour la première année d'étude et de 2.40 larves par foliole pour l'année suivante. Le nombre réduit des chrysalides par foliole, enregistré dans toutes les sorties est dû essentiellement au faible pourcentage de nymphose des larves du quatrième stade au niveau des folioles, la majorité des chrysalides se trouvent au niveau du sol (Barrientos et al., 1998).

L'étude de la dynamique des populations de *T. absoluta* a permis également de déduire les niveaux de mortalité naturelle et de parasitisme de ce ravageur. Les observations montrent que, la mortalité naturelle (tous facteurs confondus) a dépassé les 16 % ; soit 19,52 et 16,74% respectivement pour les années 2012 et 2013. Tandis que la mortalité due au parasitisme était faible, atteignant un maximum de 3.32 % en 2012 et de 4.41 % en 2013, ce qui révèle une pression limitée sur les populations de *T. absoluta*. Les taux de parasitisme enregistrés au cours de cette étude étaient faibles, mais ils sont non négligeable vu la récente introduction de l'insecte au pays. Dans les pays de son origine, les taux élevés de parasitisme de la mineuse de tomate ont été enregistrés qu'après dix ans après sa première introduction (Desneux et al., 2010).

Les larves parasitées apparaissent de Mars à Mai, lorsque les températures varient entre 20 et 28°C. Navarro et Marcano, (1997), confirment que les températures élevées diminuent raisonnablement la longévité et le nombre de parasitoïdes. Lacayo et Schotman (1989), rapportent que la température joue un rôle important dans la dispersion de l'espèce et en plus elle influe sur l'installation du cortège parasitaire de *T. absoluta*.

La mortalité due à l'activité parasitaire ne présente qu'une petite part de la mortalité naturelle, d'autres facteurs comme la température et la prédation peuvent l'influencer. Lorsque les températures enregistrées sont inférieures à 20°C ou supérieures à 28°C, la mortalité naturelle ne dépasse pas 5% sur les deux années d'étude. A l'intérieur de cet intervalle thermique (20 et 28°C) les taux de mortalités naturelles progressent. Matta et Ripa (1981), ont étudié la dynamique des populations de *T. absoluta*, et ont trouvé une corrélation positive et significative entre les populations des larves et la température. Ils ajoutent que, la régulation de la population de *T. absoluta* par les facteurs abiotiques est due principalement à la température.

L'inventaire de la faune auxiliaire de *T. absoluta* a révélé la présence de deux espèces de parasitoïdes inféodées au ravageur. Il s'agit de *Necremnus artynes* et *Diglyphus isaea* avec des abondances relatives respectives de 80% et 15%. En ce qui concerne les prédateurs, deux punaises prédatrices appartenant à la famille de Miridae ont été recensées : *Nesidiocoris tenuis* et *Macrolophus pygmaeus* avec une prédominance de *N. tenuis* (70%). La présence de ces deux punaises prédatrices est due probablement à l'application du programme de la lutte biologique menée par les services de l'Institut Nationale de la Protection des Végétaux. Les deux espèces ont été importées et multipliées pour réaliser des lâchers dans les serres.

Chapitre III

Recherche d'entomopathogènes autochtones

INTRODUCTION

Les dégâts provoqués en agriculture par les déprédateurs des cultures sont importants dans le monde. Ces dégâts sont limités par l'utilisation massive des produits insecticides de nature chimique. Il est admis maintenant par tous que la lutte chimique a des conséquences néfastes sur l'environnement (Coderre et Vincent, 1992), ce qui nécessite la recherche de nouveaux moyens de bio-control. C'est dans ce contexte que des études ont été menées pour tenter de trouver des souches autochtones d'entomopathogènes : bactéries ou champignons capables de freiner le développement des populations de l'insecte nuisible *Tuta absoluta*.

I. Matériel et méthodes

I.1 Provenance des insectes

Les insectes utilisés pour l'isolement des microorganismes entomopathogènes (champignons et bactéries) appartiennent à différents ordres. Les adultes de la mouche mineuse *Liriomyza huidobrensis* (Diptera: Agromyzidae) proviennent du laboratoire de la protection des végétaux de l'université de Mostaganem. Cependant, pour les individus de la mineuse de la tomate *Tuta absoluta* (Lepidoptera ; Gelechiidae) et pour les larves et les adultes du ver blanc *Geotrogus deserticola* (Coleoptera: Scarabaeidae), ils ont été obtenus à partir de collectes régulières faites dans la serre et les champs.

I.2 Isolement

L'isolement a été réalisé près d'un bec Bunsen, dans les conditions les plus stériles que possible afin d'éviter toute source de contamination de nos échantillons.

I.2.1 Isolement des bactéries

Les insectes utilisés sont morts depuis longtemps, alors il est fort probable que d'autres pathogènes contaminants puissent cacher le développement du pathogène responsable de la mort du ravageur. Afin de réussir l'isolement, la surface de l'insecte a été stérilisée dans l'hypochlorite de sodium (eau de javel) à différentes concentrations (1.5°, 3°, 6° et 13°) pendant des durées qui varient selon les espèces utilisées (d'une à 6 minutes pour les larves de *G. deserticola* et de 15 secondes à 2 minutes pour les spécimens de *T. absoluta* et de *L. huidobrensis*). Trois rinçages dans l'eau distillée stérile ont été nécessaires avant de placer les insectes dans des boîtes de Pétri contenant la gélose nutritive. Les cultures bactériennes ont été incubées à 37°C et observées 24 heures après, pour le choix des germes à purifier.

I.2.2 Isolement des champignons

La sporulation de champignons entomopathogènes s'effectue sur la partie extérieure de l'insecte hôte dans des conditions humides et à l'intérieur si le milieu environnant est trop sec (Hurpin et Vago, 1958). Il est à noter que les larves de ver blanc utilisées pour les isollements présentent un durcissement. Selon Louis (1973), le durcissement des cadavres des larves témoigne le plus souvent d'une action cryptogamique.

Pour isoler les champignons à partir des insectes morts, la même méthodologie utilisée pour les bactéries a été adoptée, sauf que la gélose nutritive a été remplacée par le milieu de culture PDA, avec une température d'incubation de l'ordre 25°C. Le développement des champignons prend plus de temps en comparaison avec la croissance bactérienne, de ce fait des observations quotidiennes allant jusqu'à une semaine sont nécessaire avant la purification des souches fongiques.

I.3 Purification

Les colonies développées autour de l'insecte n'étant pas toujours pures et dans la plupart des cas sont contaminées par d'autres germes, requièrent une purification avant toutes manipulations. Par l'expression culture pure, on se réfère au développement d'une seule espèce dans un milieu donné. En principe, les microorganismes de cette culture présentent les mêmes caractéristiques morphologiques, anatomiques, physiologiques biochimiques et antigéniques (Bourdon et Marchal, 1973).

I.3.1 Purification des bactéries

Pour obtenir des cultures pures, la technique d'isolement par épuisement a été utilisée. Cette méthode consiste en un étalement progressif des bactéries sur une boîte de Pétri à l'aide d'un fil de platine. Après avoir été préalablement stérilisé, le fil bouclé est prolongé dans la colonie d'une culture mixte que l'on veut purifier. L'inoculum est alors transféré et ensemencé par stries sur la gélose d'une boîte de Pétri neuve. Les stries peuvent être effectuées dans différentes directions, mais elles ont toujours pour but de séparer les germes et de permettre la formation des colonies distinctes, bien isolées dont chacune constituera une culture pure (Joffin et Leyral, 1998). Après une durée d'incubation de 24 heures à 37°C, une deuxième purification est nécessaire.

I.3.2 Purification des champignons

La purification des champignons nécessite des repiquages successifs. Des explants de culture ne présentant aucune contamination sont choisis au niveau de la zone périphérique de la croissance des colonies et sont redéposées dans des boîtes de Pétri contenant le milieu PDA.

I.4 Identification

I.4.1 Identification des bactéries

D'après Joffin et Leyral (2006), l'identification des bactéries au laboratoire s'appuie sur les critères suivants :

- L'examen morphologique des germes,
- La croissance et les caractères biochimiques,
- Les tests immunologiques,
- Le diagnostic moléculaire,

Vu les moyens disponibles au laboratoire, les essais d'identification ont été réalisés en se basant seulement sur les deux premiers tests.

I.4.1.1 Caractères morphologiques

Les renseignements fournis par cet examen représentent les premiers critères d'identification bactérienne. L'étude de la morphologie bactérienne nécessite des observations macroscopiques et d'autres microscopiques.

- A. Examen macroscopique :** après incubation, l'isolement par épuisement permet l'observation à l'œil nu des colonies bien isolées dont l'aspect, les dimensions, le contour, la couleur, l'opacité et ainsi l'odeur sont autant de caractères précieux qui permettent une première approche de l'identification (Tortora et *al.*, 2003).
- B. Examen microscopique :** Selon Fauchère (1997), l'observation microscopique se fait en deux temps (Annexe 28); commençant par l'observation à l'état frais pour examiner la mobilité des bactéries et d'en déceler la forme. Suivi par une coloration de Gram ce qui permet de classer ces microorganismes en deux groupes, qui sont les Gram Positif et les Gram négatif selon leur comportement vis-à-vis des colorants couramment utilisés, qui se fixent sur la paroi bactérienne.

Sachant qu'une espèce bactérienne n'est jamais identifiée par ses seules caractéristiques morphologiques, les examens macroscopiques et microscopiques sont des étapes importantes : elles permettent de choisir le test de confirmation approprié.

I.4.1.2 Tests d'orientation

Lors de la détermination des espèces bactériennes, certains critères ont permis d'orienter notre diagnostic de façon précise ; ce sont les tests d'orientation tels que la recherche du type respiratoire par l'utilisation de la gélose VF, la recherche de la catalase et de l'oxydase (Annexe 29).

I.4.1.3 Caractères biochimiques

Les tests biochimiques reposent sur la recherche d'enzymes responsables de certaines réactions biochimiques et sur l'étude des différents métabolismes de la bactérie (Annexe 30). Il existe des galeries d'identification pour tous les groupes bactériens et le nombre de tests varie d'une galerie à l'autre (Fauchère, 1997).

A. Galeries classiques : La réalisation des tests biochimiques par l'utilisation des galeries classiques représente le point de départ d'une identification pour classer le germe isolé dans la famille déterminée. La galerie classique se présente sous forme d'une série de tubes contenant des milieux spécifiques aux tests pratiqués.

Le tableau 04 indique les différents tests réalisés dont les détails figurent en annexes 29, 31, 32 et 33.

Tableau 04 : Tests biochimiques utilisés pour l'étude des métabolismes bactériens

Métabolismes	Tests biochimiques
Métabolisme énergétique	Type respiratoire
	Recherche d'une catalase
	Recherche d'une oxydase
	Recherche d'une nitrate réductase
Métabolisme glucidique	Test de l'ONPG (recherche de la β -galactosidase)
	Test de TSI
	Test de Clark et Lubs
	Test manitol mobilité
	Recherche de l'amylase
Métabolisme protéique	Recherche de l'uréase, la tryptophane désaminase (TDA) et la tryptophanase
	Recherche de l'ADH, l'ODC et LDC:
	Recherche de l'activité protéolytique caséinase
Métabolisme des acides organiques	Test du Citrate de Simmons

B. Galeries miniaturisées : Les galeries API 20 NE ont été utilisées pour l'identification des bacilles à Gram négatif non entérobactéries. Le système de base se présente sous la forme d'une plaque rectangulaire de vingt cupules contenant 8 tests conventionnels et 12 tests d'assimilation (Figure 38(A)). Chaque cupule contient, sous forme déshydratée, des substrats et éventuellement un réactif permettant de révéler l'activité recherchée (Joffin, 2010).

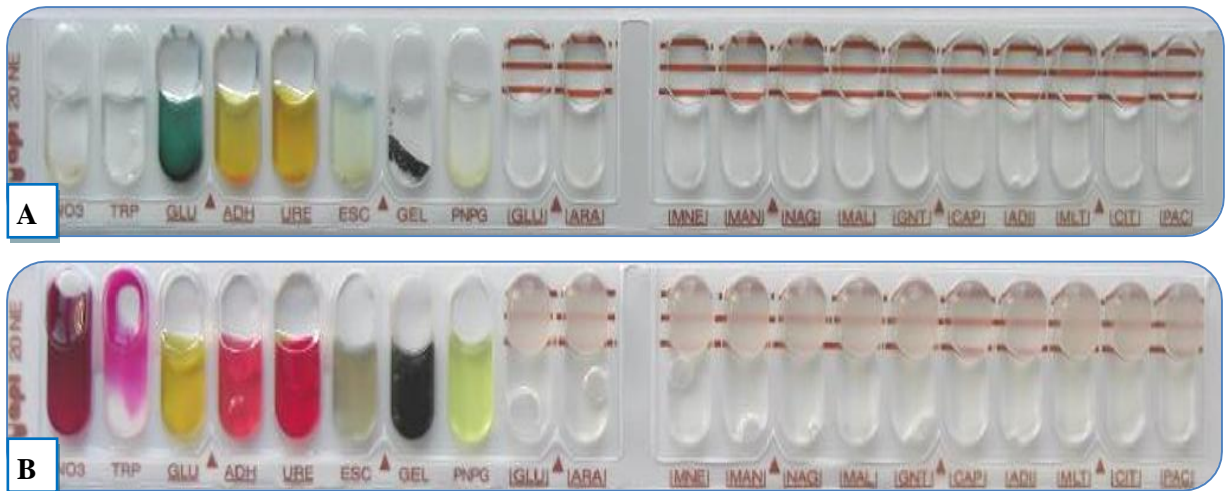


Figure 38: Lecture de la galerie API 20NE utilisée pour l'identification des bacilles à Gram⁻ non entérobactéries. A : résultat négatif et B : résultat positif (Joffin, 2010)

Les tests conventionnels sont inoculés avec une suspension bactérienne et les réactions produites se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs (Figure 38(B)). Alors que les tests d'assimilation sont inoculés avec un milieu minimum et les bactéries se développent seulement si elles sont capables d'utiliser le substrat correspondant. Après inoculation de la galerie (Figure 39) et incubation à 30°C pendant 24 heures (Annexe 34), une lecture est faite en se référant au tableau de lecture (Annexe 35).

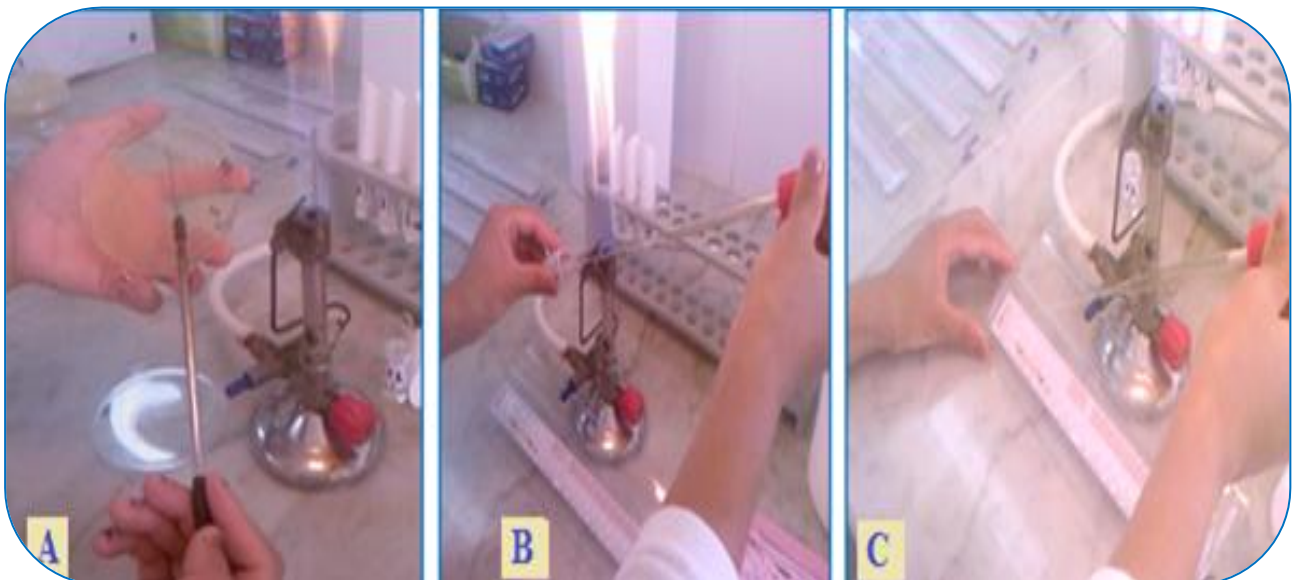


Figure 39 : Technique d'inoculation de la galerie API 20NE.

A et B : préparation de l'inoculum. C : inoculation de la galerie

L'identification est obtenue soit :

- Avec le tableau d'identification (Annexe 36) : Comparer les réactions notées sur la fiche de résultats avec celle du tableau d'identification (chaque cellule de ce tableau contient les pourcentages de positivité).
- Avec le catalogue analytique : Les tests sont regroupés en groupe de 3, et une valeur 1 - 2 ou 4 est indiquée pour chacun. Additionner à l'intérieur de chaque groupe les nombres correspondants aux tests positifs, on obtient le nombre de 7 chiffres qui sert de code d'identification (Figure 40).



Figure 40: Détermination du profil numérique de la bactérie *Burkholderia cepacia*

I.4.2 Identification des champignons

L'identification des champignons fait essentiellement appel aux caractères cultureux et à la morphologie et rarement à des propriétés biochimiques, qui nécessitent l'utilisation de milieu standard favorisant la croissance (Chabasse et *al.*, 2002), et par conséquent, nous nous sommes basés pour l'identification de nos isolats sur leurs aspects macroscopiques et microscopiques.

I.4.2.1 Aspect macroscopique

L'étude de l'aspect macroscopique des colonies se base en général sur la forme, la taille et la couleur de celle-ci. La technique utilisée est simple, elle consiste à observer à l'œil nu les boîtes de Pétri contenant les champignons purifiés.

I.4.2.2 Aspect microscopique

Un ou mieux plusieurs fragments de culture seront prélevés à l'anse pour les cultures glabres, ou au scotch pour les cultures filamenteuses et poudreuses (Figure 41), et ensuite déposés dans une goutte d'eau entre lame et lamelle. Plusieurs prélèvements au centre et en périphérie de la colonie sont parfois nécessaires. De même, il faut savoir répéter les montages afin de saisir le meilleur moment (culture ni trop jeune, ni trop âgée) pour observer la conidiogénèse.

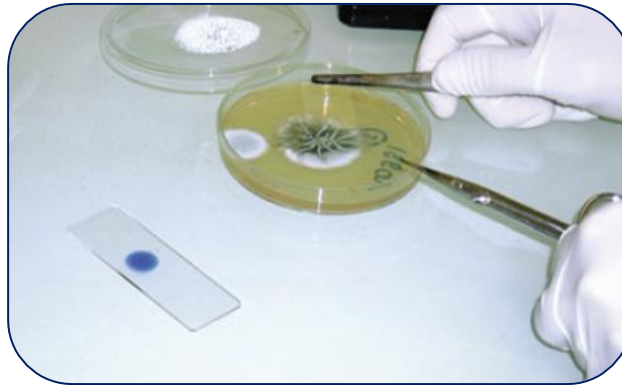


Figure 41 : Prélèvement d'une moisissure à l'aide de scotch (Chabasse et *al.*, 2002)

L'identification microscopique d'un champignon prend en considération les caractères suivants :

- a) La forme du mycélium, la présence ou l'absence de cloisons, la couleur et le mode de ramification
- b) La forme et la taille des spores
- c) La morphologie générale du champignon.

La clé de détermination de Barnett et *al.* (1977), a été utilisée pour l'identification des isolats.

I.5 Conservation

I.5.1 Conservation des bactéries

La méthode la plus simple de stockage des souches consiste à conserver une culture sur gélose nutritive inclinée à 4 °C. Une autre méthode consiste à conserver les cultures dans des tubes à Eppendorf à basse température (-4 à -20°C) ; cette technique de congélation en bouillon glycérolé à 40% permet une excellente conservation de la plupart des souches (Herrero et *al.*, 1996).

I.5.2 Conservation des champignons

Après avoir identifié les germes fongiques, des cultures pures sont transférées dans des tubes à essai inclinés contenant le milieu PDA. Les tubes sont fermés hermétiquement pour éviter la dessiccation, puis conservés à une température variant entre 4° et 8°C (Wraight et Roberts, 1987).

I.6 Calcul de l'abondance des espèces isolées

Au cours des isolements, plusieurs bactéries et champignons ont été purifiés et identifiés. Le pourcentage d'abondance de ces agents biologiques a été calculé par la méthode de Mc mullen et *al.* (1983), en utilisant la formule suivante :

$$\text{Abondance \%} = \frac{\text{Nombre d'isolats de l'espèce donnée} \times 100}{\text{Nombre total d'isolats}}$$

I.7 Tests de pathogénicité des bactéries et des champignons isolés

Afin de vérifier la sensibilité du ravageur aux microorganismes préalablement isolés et identifiés, des inoculations à base de ces isolats ont été réalisées sur les larves de *Tuta absoluta*.

I.7.1 Préparation de l'inoculum

Les suspensions de spores destinées à l'infection des chenilles ont été obtenues en raclant avec une spatule la surface des cultures, puis en mettant ce prélèvement dans 50 ml d'eau distillée stérile. Après agitation, les solutions sont filtrées. La concentration de chaque solution est déterminée en dénombrant les spores par la cellule de Malassez. Les différentes doses utilisées sont obtenues par des dilutions successives de la solution mère (10^7 spores/ml).

L'inoculum bactérien utilisé dans le traitement a été préparé à partir des bactériesensemencées sur le milieu GN solide. Une colonie bactérienne de chaque souche identifiée a été introduite dans un tube à essai contenant 10 ml du bouillon nutritif. Les cultures bactériennes ont été incubées à 37°C et observées 24 heures après. Le développement des bactéries est confirmé par le trouble remarquable à l'œil nu par rapport au témoin dépourvu de la suspension bactérienne. A l'aide d'un spectrophotomètre la concentration de l'inoculum a été ajustée à 10^5 UFC.

I.7.2 Méthode d'inoculation

Le traitement consiste à pulvériser l'inoculum (cryptogamique ou bactérien) additionné de 1% de Tween 20 ; sur 15 chenilles placées dans une boîte de Pétri stériles dont le fond est recouvert d'une couche de papier absorbant afin d'éliminer l'excès de la solution. Les larves traitées ont été maintenues à des températures de l'ordre de 25 et 37°C respectivement pour les champignons et les bactéries. Les observations sont notées quotidiennement pour vérifier leur éventuel effet insecticide.

I.7.3 Ré-isolement des entomopathogènes

En 1890, Robert Koch publia ce qu'on a appelé depuis les postulats de Koch, servant à déterminer si une maladie donnée est causée par un microbe donné. La pathogénicité d'un microorganisme induit des symptômes sur les organismes sains inoculés, ceci peut être vérifié par des contaminations artificielles suivi par le ré-isolement du germe à partir des organismes malades (Saiah, 2014).

Les spécimens momifiés et bien sporulés sont détachés délicatement avec une pince stérile en veillant à ne pas dissocier du cadavre les filaments fongiques. Ils sont ensuite placés dans le milieu de culture PDA afin d'isoler à nouveau le germe entomopathogène.

II. Résultats et discussion

II.1 Identification des bactéries isolées et purifiées

L'identification des bactéries isolées a été précédée par la purification des souches bactériennes (Planche 02).

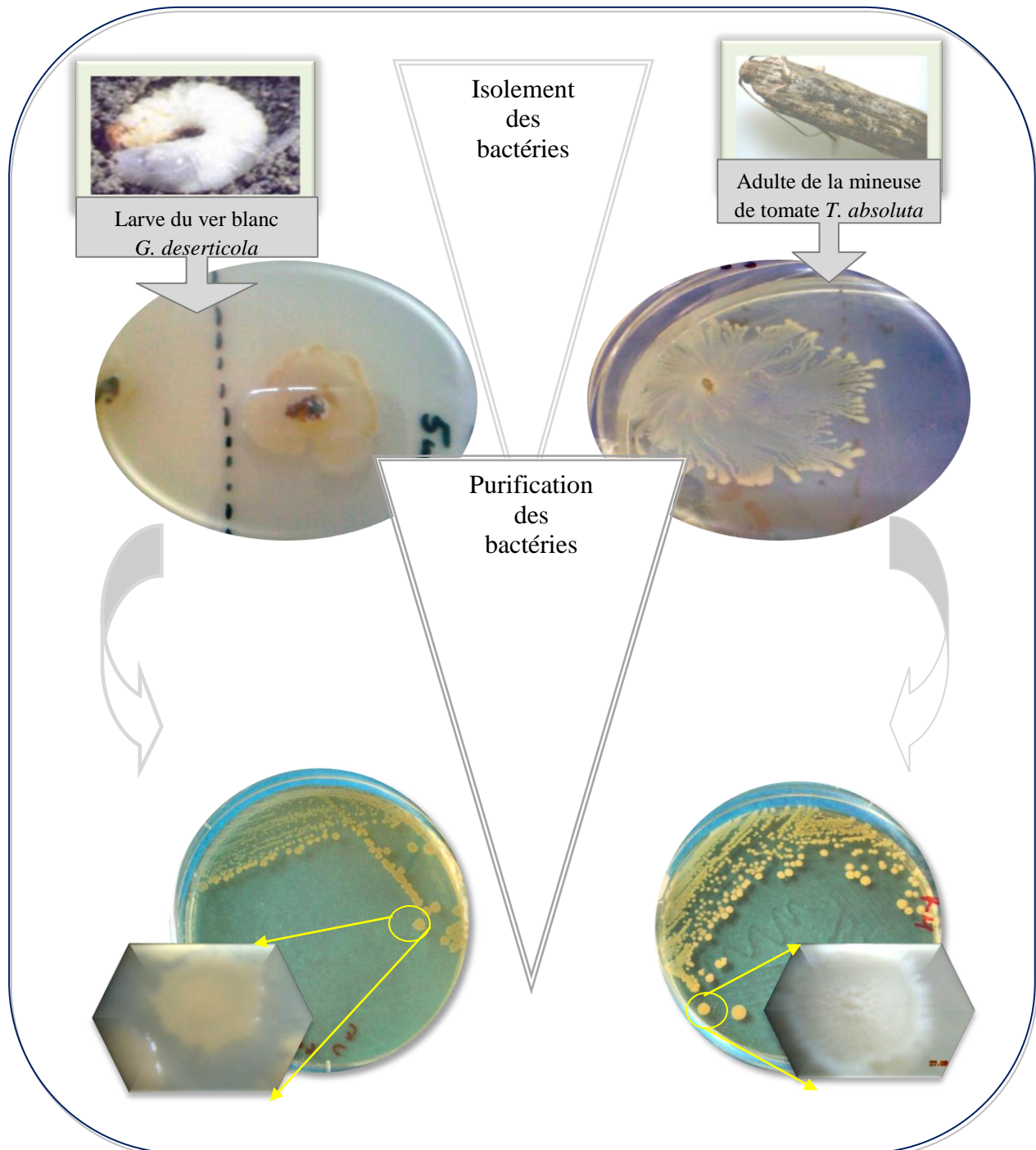


Planche 02 : Purification des bactéries isolées à partir d'une larve de *Geotrogus deserticola* et d'un adulte de *Tuta absoluta*

II.1.1 Caractères morphologiques des souches bactériennes isolées

L'observation des boîtes de Pétri contenant les bactéries purifiées a révélé l'apparition des colonies ayant des critères différents (Figure 42). Chaque espèce possède une morphologie propre reconnaissable à l'aide de critères tels que la taille, la couleur, la forme, l'aspect (brillant ou mat), la texture (lisse ou rugueuse)...etc.

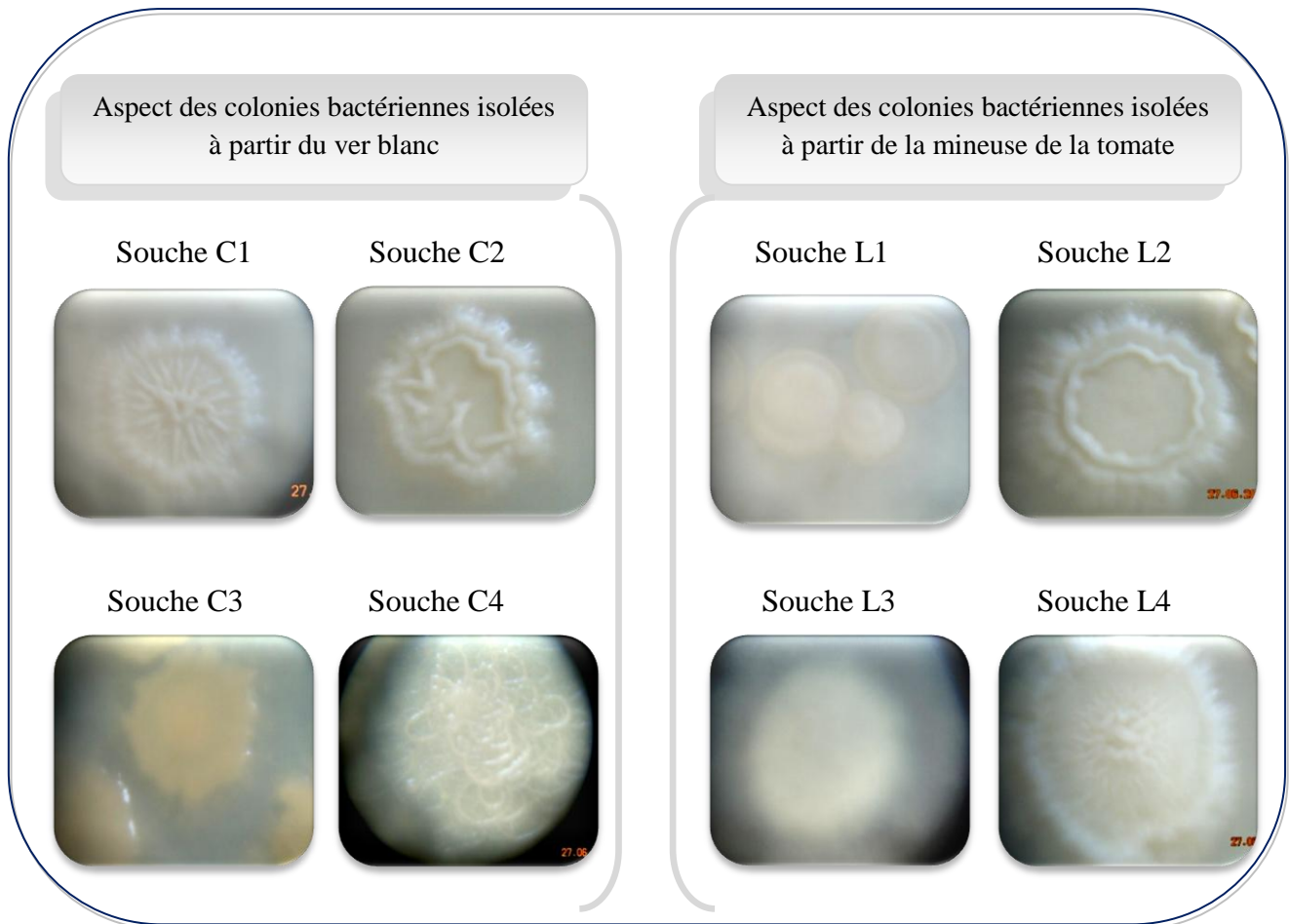


Figure 42: Aspects macroscopiques des colonies bactériennes purifiées

L'observation microscopique a été faite en deux temps. D'abord à l'état frais; les bactéries étant vivantes, il a été possible de déterminer plusieurs caractères tels que la morphologie générale, la mobilité et le groupement (bacille ou coque), cependant pour mieux les caractériser une coloration de Gram a été effectuée.

Le tableau 05 représente les différents aspects microscopiques des bactéries isolées. Il fait ressortir que la majorité des bactéries sont immobiles, que tous les germes isolés sont des bacilles et qu'il existe deux groupes de bactéries : des bacilles Gram positif (Gram^+) et des bacilles Gram négatif (Gram^-).

Tableau 05 : Différents aspects microscopiques des souches bactériennes isolées

Souches Caractères	Germes isolés du ver blanc				Germes isolés de la mineuse de tomate			
	Souche C1	Souche C2	Souche C3	Souche C4	Souche L1	Souche L2	Souche L3	Souche L4
mobilité	+	-	-	-	-	-	-	+
Gramophilie	-	+	-	+	-	-	+	-
Forme	Bacille	Bacille ^A	Bacille	Bacille ^B	Bacille	Bacille	Bacille ^C	Bacille

A : petite taille, droit ou légèrement incurvé, groupée en lettres chinoises

B : grande taille, en forme de baguettes, présence d'endospore

C : petite taille

Il est important de souligner qu'à partir de cette étape d'identification, la démarche adoptée varie en fonction du groupe bactérien. Le choix des tests à effectuer sera basé sur les caractéristiques biochimiques, spécifiques à chaque groupe.

II.1.2 Tests d'orientation

Les bacilles Gram⁺ représentés par les souches C2, C4 et L3 ont une catalase positive. La lecture des tests viande-foie nous montre un développement important des bactéries proches de la surface des tubes, cependant une observation plus poussée montre la croissance de quelques colonies tout au long des tubes, ce qui laisse penser que ces souches sont aéro-anaérobie facultative.

Tableau 06 : Résultats des tests d'orientation (oxydase, catalase et type respiratoire)

Germes Caractères	Bacille Gram ⁻					Bacille Gram ⁺		
	Souche C1	Souche C3	Souche L1	Souche L2	Souche L4	Souche C2	Souche C4	Souche L3
Oxydase	+	+	+	+	+			
Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+
Type respiratoire	Aérobie strict					Aéro-anaérobie facultative		

En se référant au tableau 06, on note que l'ensemble des bacilles Gram⁻ isolés sont des aérobie strict et ont une oxydase positive. Sachant que la recherche de l'oxydase est un des critères le plus discriminatif et le plus employé pour l'identification des bactéries, surtout celles des bactéries à Gram⁻, on peut donc conclure que ces germes bactériens n'appartiennent pas à la famille des *Enterobacteriaceae*.

II.1.3 Caractères biochimiques des souches bactériennes isolées

II.1.3.1 Bactéries bacilles à Gram positif

Après 24 heures d'incubation à 37 °C, les résultats de la lecture des tests biochimiques de la galerie classique des bactéries à Gram⁺, ont été regroupés dans le tableau 07

Tableau 07 : Résultats des tests biochimiques des bactéries bacilles à Gram positif

Souches Tests		Souche C2	Souche C4	Souche L3
Type respiratoire (Nitrate réductase (NR))		-	+ (Z)	+ (Z)
Métabolisme glucidique	Mannitol	+	-	-
	ONPG	+	-	-
	RM	-	-	+
	VP	+	+	+
Métabolisme des acides organiques (Citrate)		+	-	-
Métabolisme des protéines	Indole	-	-	-
	Urée	-	-	-
	TDA	-	-	-
Dégradation des acides aminés	ADH	-	-	+
	ODC	-	-	+
	LDC	-	-	+
Caséinase		-	+	-
Amylase		-	+	-

D'après les données du tableau 07, on constate qu'une bactérie isolée à partir de cadavre de ver blanc est capable de dégrader la caséine et l'amidon, c'est la souche C4. Cette dernière ne peut pas utiliser le citrate comme seule source de carbone et d'énergie, elle est aéro-anaérobie facultative, immobile, VP⁺, Urée⁻ et à catalase positif. D'après les caractères cités, elle peut être classée parmi les espèces appartenant à la famille des *Bacillaceae*. En plus la présence de l'endospore (Tableau 05) est considérée comme un indice d'orientation dans l'identification du genre *Bacillus* (Donnio et al., 1987). Selon Starnes et al. (1993), plus d'une centaine de bactéries ont été identifiées comme ayant un potentiel d'utilisation en lutte biologique. Ces bactéries entomopathogènes appartiennent surtout, à trois grandes familles qui sont les *Bacillaceae*, les *Enterobacteriaceae* et les *Pseudomonaceae* (Greathead et al., 1994).

Concernant les deux autres germes nous supposons la présence de *Listeria*, de *Mycobacterium* ou de *Corynebacterium*, qui sont aussi des bacilles Gram positif à catalase positif (Figure 43). Les observations microscopiques de la souche C2 indique que les bactéries sont légèrement incurvées et sont groupées en lettres chinoises, ce qui correspond aux caractéristiques des *Corynebacterium*. Cependant rien n'est confirmé, sauf si une coloration de Ziehl-Neelsen est réalisée.

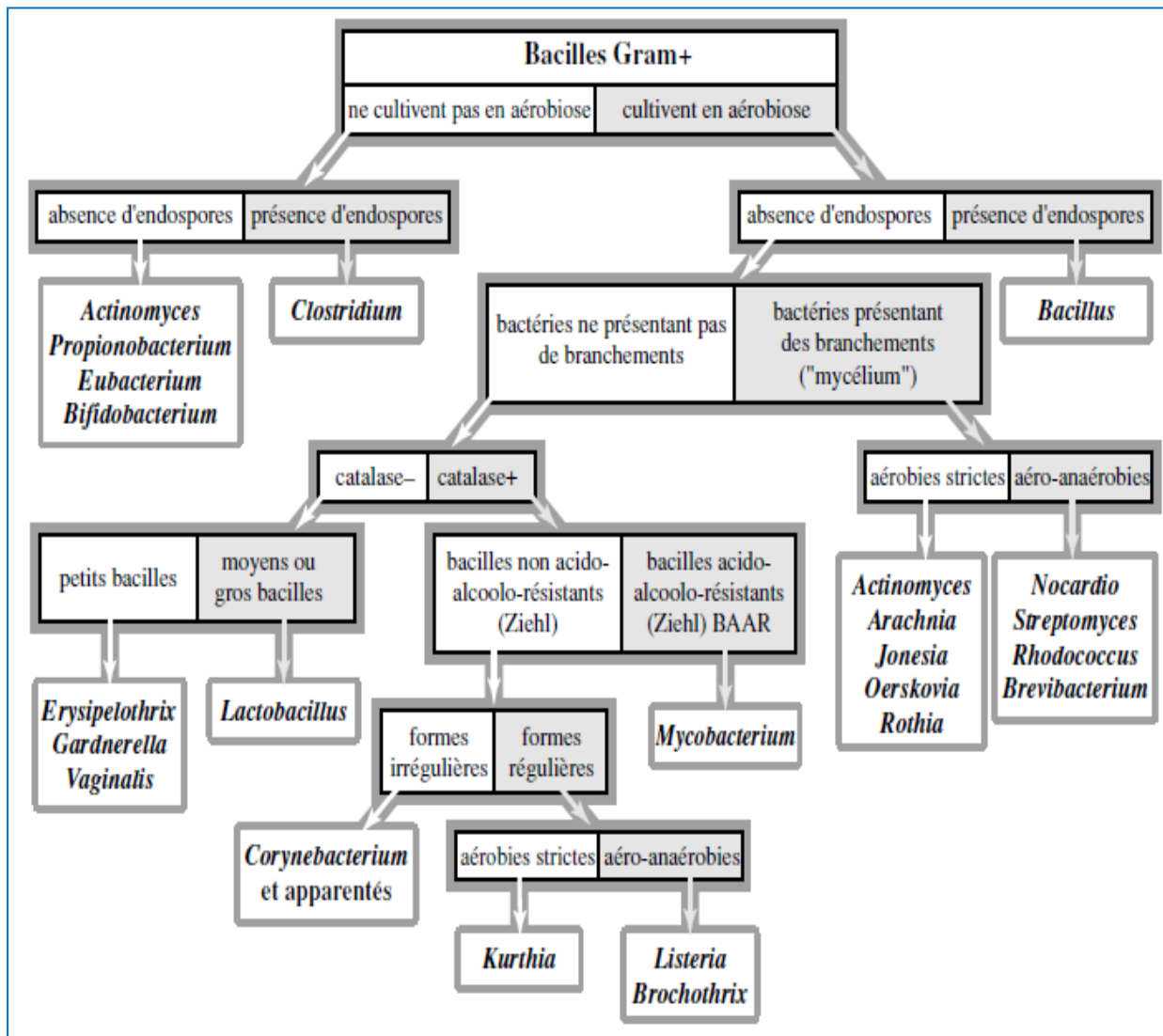


Figure 43 : Schémas d'identification des bactéries bacilles Gram positif (Joffin et Leyral, 1998)

II.1.3.2 Bactéries bacilles à Gram négatif

Les résultats des tests biochimiques effectués sur les bactéries à Gram⁻ par la galerie classique sont rassemblés dans le tableau 08. Les données consignées dans ce dernier, montrent que deux espèces bactériennes ont les mêmes caractéristiques d'identification malgré que leur provenance soit différente. La souche C1 a été isolée à partir de larves de

ver blanc alors que la souche L4 provient de spécimen momifié de la mineuse de la tomate, ce qui laisse penser qu'un même germe a été isolé à partir de deux insectes d'ordres différents. Concernant les autres souches (souche C3, souche L1 et souche L2), des différences bien nettes sont apparues, alors qu'il s'agit d'espèces bactériennes distinctes.

Tableau 08: Résultats des tests biochimiques des bactéries bacilles à Gram négatif

Souches		Souche C1	Souche C3	Souche L1	Souche L2	Souche L4	
Tests							
Type respiratoire (Nitrate réductase (NR))		-	-	-	+	-	
Métabolisme glucidique	Mannitol	+	-	+	+	+	
	ONPG	+	+	+	-	+	
	RM	-	-	-	-	-	
	VP	+	+	+	+	+	
	TSI	Lactose	-	-	-	+	-
		Saccharose	-	-	-	+	-
		Glucose	-	+	+	+	-
		Gaz	-	-	-	-	-
H ₂ S		-	-	-	-	-	
Métabolisme des acides organiques (Citrates)		-	+	+	+	+	
Métabolisme des protéines	Indole	-	-	-	-	-	
	Urée	-	+	+	+	-	
	TDA	-	-	-	-	-	
Dégradation des acides aminés	ADH	+	-	-	-	+	
	ODC	-	+	-	-	-	
	LDC	-	-	-	-	-	
Présence de pyocyanine et pyoverdine		-	-	-	-	-	

A ce stade d'identification il serait prématuré de déterminer les espèces bactériennes avec exactitude. Pour cela une manipulation plus précise était nécessaire ; c'est le recours à des galeries miniaturisées. Sachant que les bacilles à Gram négatif et à oxydase positif ne font pas partie des entérobactéries, il était obligatoire d'utiliser le système d'identification des bacilles à Gram négatif non entérobactéries (galerie miniaturisée API 20NE).

Après inoculation de la galerie API 20NE et incubation pendant 24 heures à 30°C, les réactifs ont été ajoutés (Annexe 34). Les figures 44, 45, 46 et 47, montrent les résultats obtenus.



Figure 44 : Identification biochimique de la souche C1 par la galerie Api 20NE



Figure 45 : Identification biochimique de la souche C3 par la galerie Api 20NE



Figure 46 : Identification biochimique de la souche L1 par la galerie Api 20NE



Figure 47 : Identification biochimique de la souche L2 par la galerie Api 20NE

La lecture des galeries a été faite en se référant au tableau de lecture (Annexe 35). Les résultats obtenus lors des tests biochimiques sur les souches isolées et identifiées par la galerie API 20NE, sont regroupés dans le tableau 09.

Tableau 09 : Récapitulatif des caractères biochimiques obtenus suite à la lecture des galeries API 20NE

Tests \ Souches	Souche C1	Souche C3	Souche L1	Souche L2	Souche L4
NO ₃	-	-	-	+	-
TRP	-	-	-	-	-
D-glu (fermentation)	-	+	+	+	-
ADH	+	-	-	-	+
URE	-	+	+	+	-
ESC	-	+	+	+	-
GEL	-	-	-	-	-
PNPG	+	+	+	-	+
GLU	-	+	+	+	-
ARA	+	-	+	+	+
MNE	+	-	+	+	+
MAN	+	-	+	+	+
NAG	+	-	+	+	+
MAL	+	-	+	+	+
GNT	+	-	-	+	+
CAP	-	-	-	-	-
ADI	-	-	-	-	-
MLT	+	-	+	+	+
CIT	+	-	+	+	+
PAC	-	-	-	-	-
OXY	+	+	+	+	+
Profils numériques	0127745	4660004	4667345	5647745	0127745

L'identification est obtenue en comparant les réactions notées sur le tableau 09 avec le tableau d'identification (Annexe 36).

Les résultats de l'identification des bactéries (bacille Gram négatif) isolées à partir de *G. deserticola* (souche C1 et souche C3) et celles isolées à partir de *T. absoluta* (souche L1, souche L2 et souche L4) ont révélé l'existence de quatre espèces bactériennes à savoir *Sphingomonas paucimobilis*, *Moraxella lacunata*, *Chryseobacterium meningosepticum* et *Burkholderia cepacia* (Tableau 10).

Tableau 10 : Résultats de l'identification des bactéries à Gram négatif

Souches	Identification
Souche C1	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>
Souche C3	<i>Moraxella lacunata</i>
Souche L1	<i>Chryseobacterium meningosepticum</i>
Souche L2	<i>Burkholderia cepacia</i>
Souche L4	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>

II.2 Identification des souches fongiques isolées

L'étude des aspects macroscopiques et microscopiques des souches isolées a montré la présence de plusieurs espèces fongiques.

II.2.1 *Rhizopus* sp.

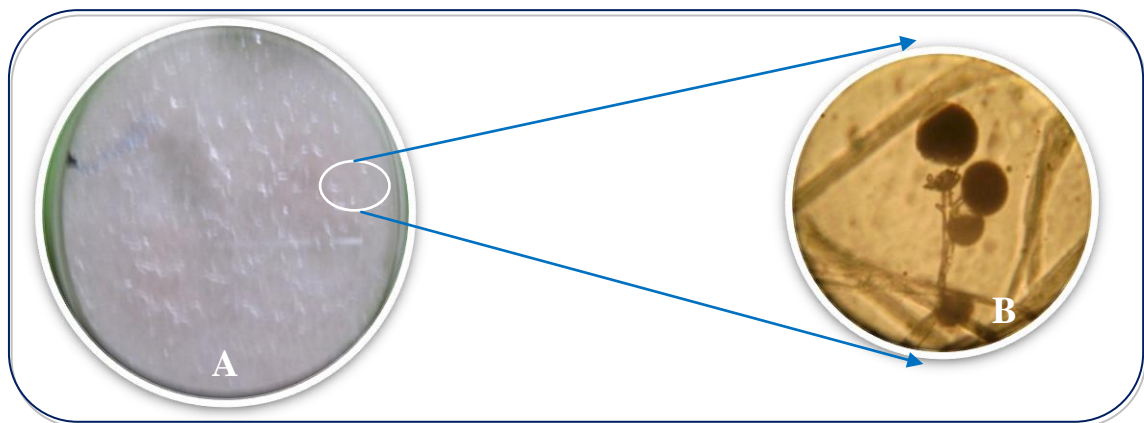


Figure 48 : Aspect macroscopique (A) et microscopique (B) (x40) de *Rhizopus* sp.

Avant la purification des souches fongiques, il a été constaté qu'un champignon envahit rapidement le milieu d'isolement et gêne la croissance des autres espèces fongiques. Les colonies sont blanches au départ et deviennent grises foncées en vieillissant. Elles présentent un développement aérien important et envahissent de manière quasi-totale les boîtes de culture en 5 à 7 jours. Ce champignon à texture cotonneuse (Figure 48 (A)) et à croissance rapide est classé parmi les espèces du genre *Rhizopus*. L'observation microscopique de ce *Rhizopus* sp. a démontré que les sporocystes sont globuleux avec une columelle globuleuse et une apophyse courte (Figure 48 (B)).

II.2.2 *Penicillium* sp.

Les observations ont montré la présence de trois souches différentes dont les colonies présentent une couleur variable verte ou grise. Ces champignons cultivés sur le même milieu de culture n'ont ni la même vitesse de croissance ni le même aspect macroscopique (Figure 49 (A_{1,2} et 3)). Les filaments mycéliens septés, hyalins portent des conidiophores ramifiés qui possèdent une forme ressemblant à celle d'un pinceau (Figure 49 (B_{1,2} et 3)).

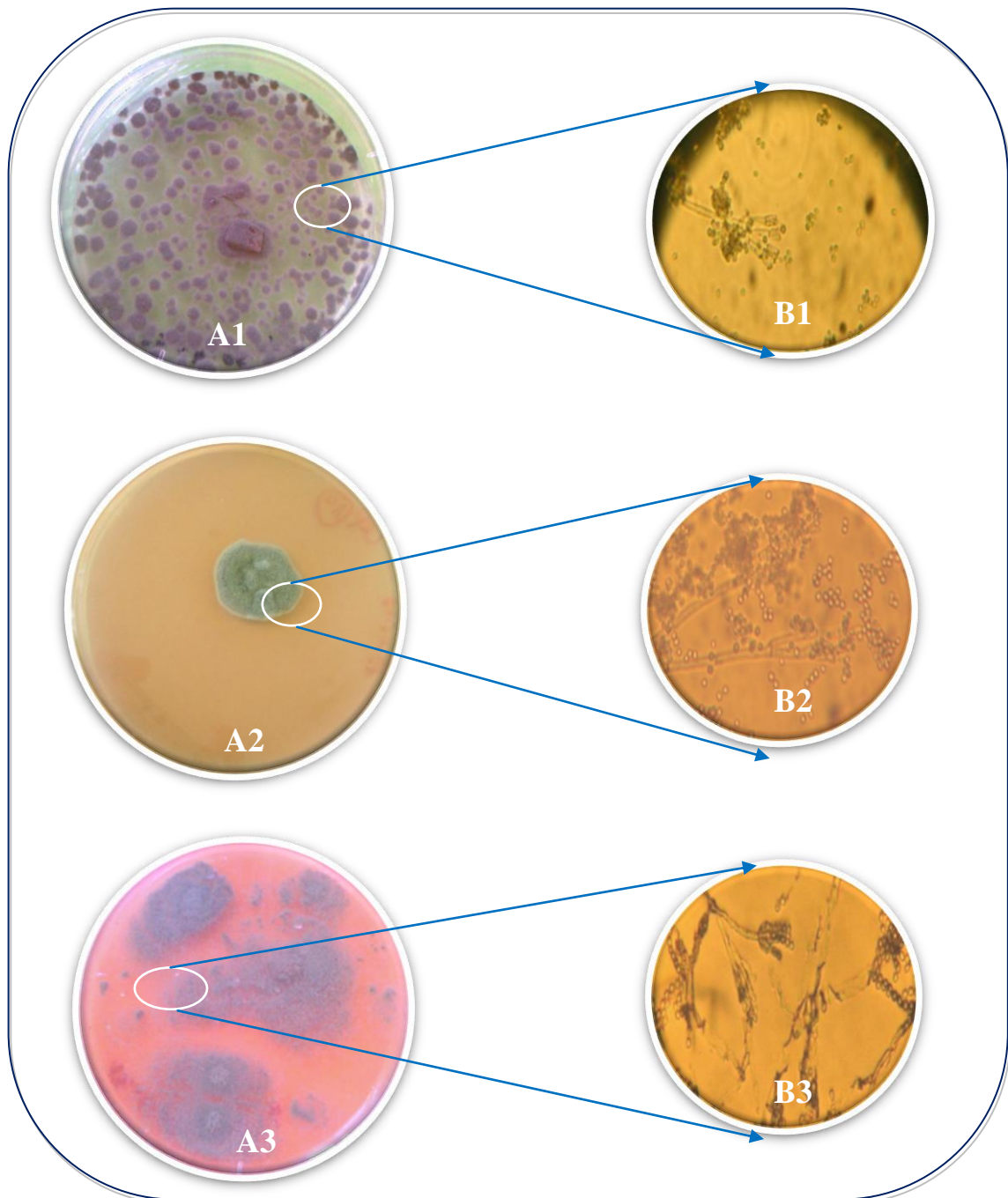


Figure 49: Aspects macroscopiques (A_{1,2} et 3) et microscopiques (B_{1,2} et 3) (x40) de trois espèces de *Penicillium* sp.

II.2.3 *Aspergillus* sp.

Les *Aspergillus* sont caractérisés par un thalle végétatif formé de filaments mycéliens hyalins, de diamètre fin et régulier, septés et ramifiés. L'identification du genre est basée sur la mise en évidence des têtes aspergillaires. Lors des observations microscopiques, quatre espèces présentant les caractéristiques des *Aspergillus* ont été trouvés (Figures 50 et 51).

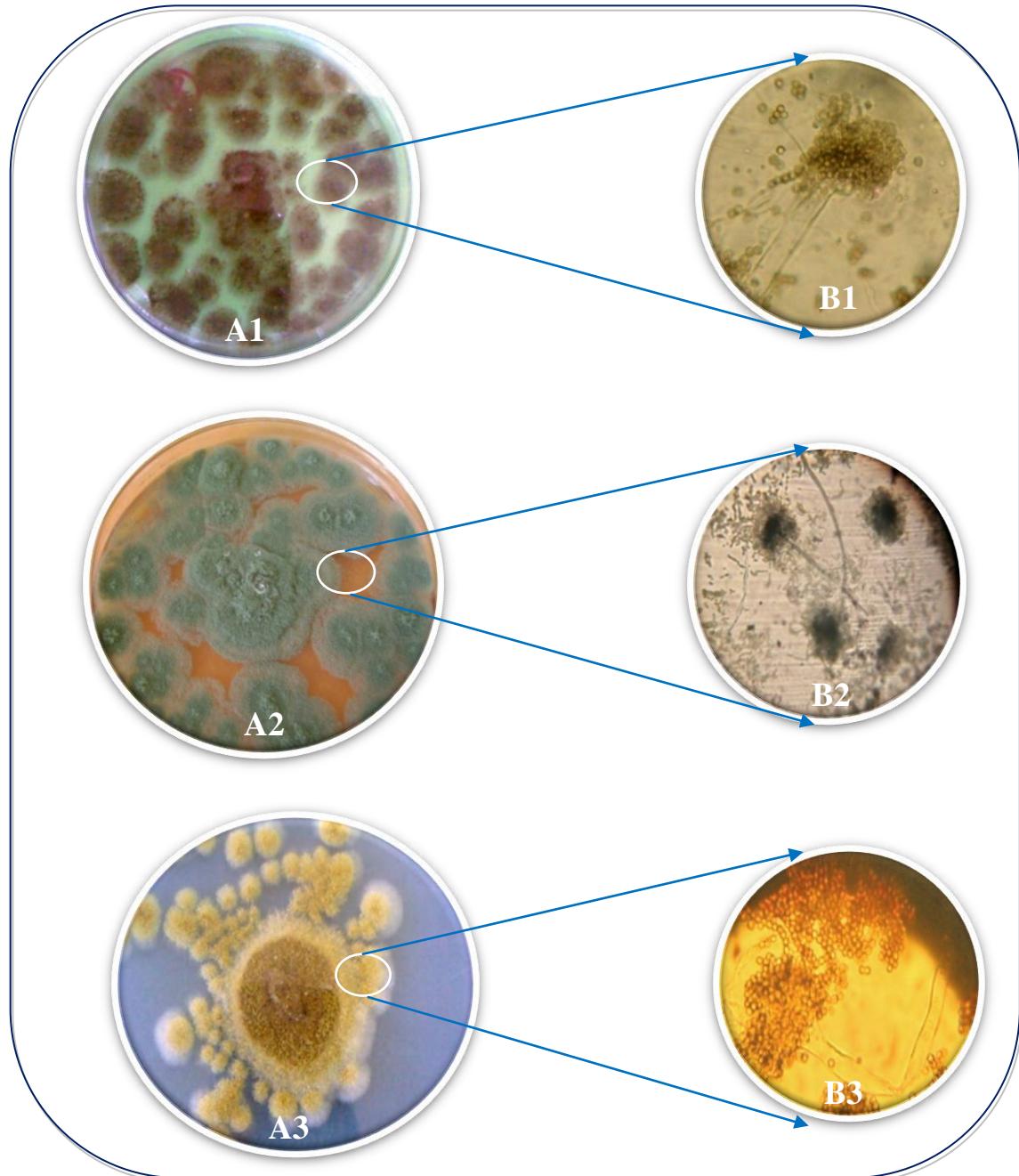


Figure 50: Aspects macroscopiques (A_{1,2 et 3}) et microscopiques (B_{1,2 et 3})(x40) de trois espèces d'*Aspergillus* sp.

Seulement une seule espèce a été identifiée avec précision, il s'agit d'*Aspergillus niger* (Figure 51). La couleur de la culture a permis une orientation rapide. En effet, les colonies ont d'abord une couleur blanche, puis jaune et enfin noire. Les conidiophores sont longs, lisses, hyalins ou brunâtres dans leur moitié supérieure (Figure 51 (B)). A maturité, la tête aspergillaire à une couleur noir.

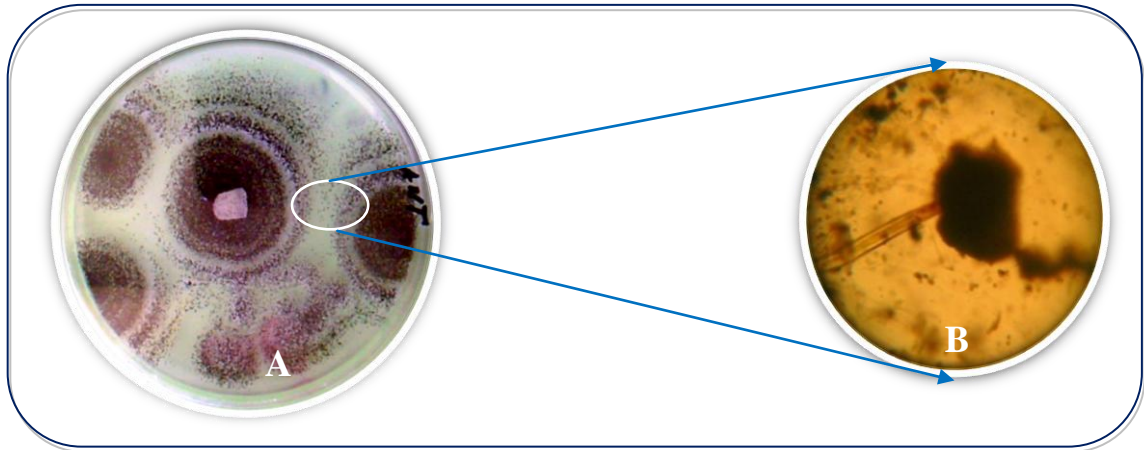


Figure 51 : Aspect macroscopique (A) et microscopique (B) (x40) d'*Aspergillus niger*

II.2.4 *Fusarium* sp.

L'analyse mycologique des champignons isolés à partir des cadavres d'insectes révèle la présence d'un isolat qui diffuse un pigment rose lorsqu'il pousse sur milieu PDA. Il s'agit de *Fusarium* sp. (Figure 52). Ses colonies sont cotonneuses de couleur blanche au départ, puis devenant rosées à pourpres ; le verso est foncé. Le principal caractère des *Fusarium* est la présence de macro conidies fusiformes et cloisonnées.

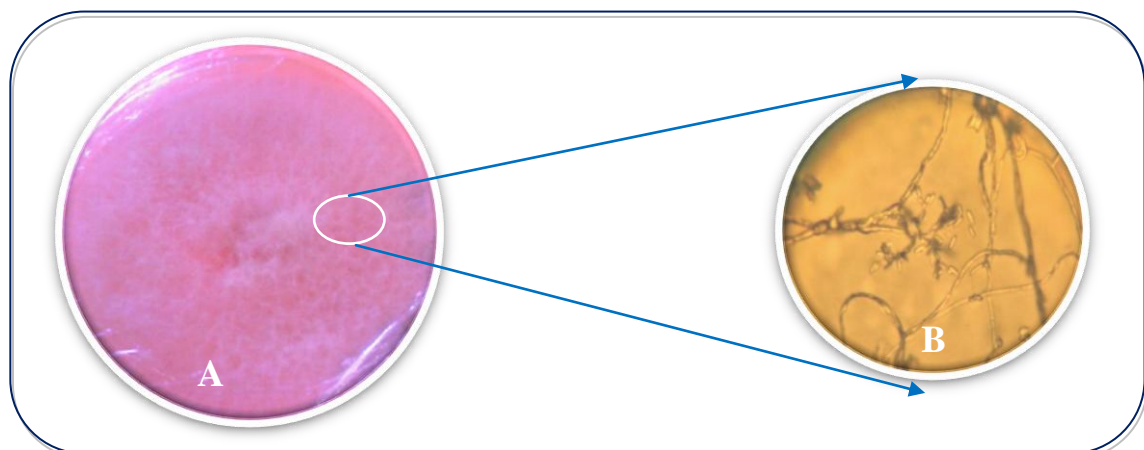


Figure 52 : Aspect macroscopique (A) et microscopique (B) (x40) de *Fusarium* sp.

II.2.5 *Beauveria* sp.

L'analyse microscopique des espèces fongiques isolées a révélé la présence des champignons dont les conidies unicellulaires sont hyalines globuleuses et lisses. Le mycélium est également hyalin et présente un aspect en zigzag (Figure 53(B)). Il s'agit de *Beauveria* sp. caractérisé par la couleur blanche des colonies qui sont floconneuses et poudreuses (notamment en périphérie) (Figure 53(A)).

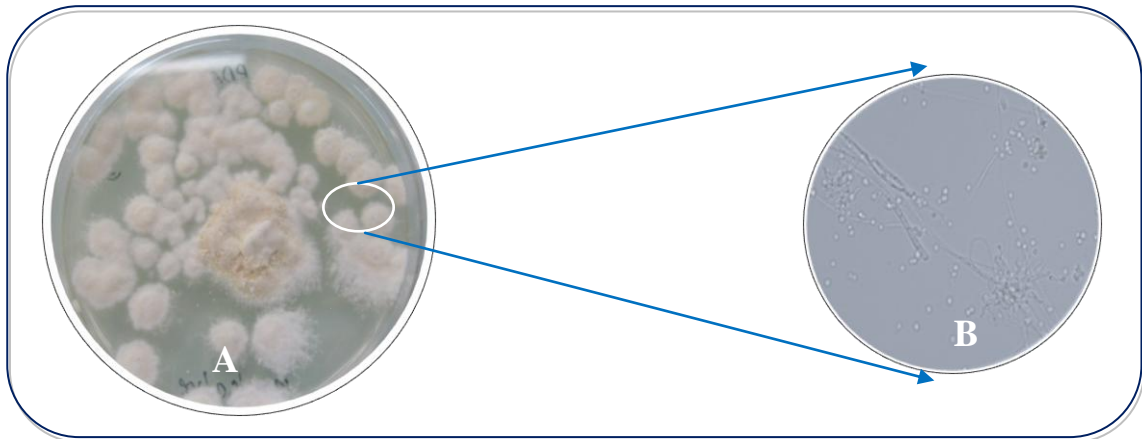


Figure 53 : Aspect macroscopique (A) et microscopique (B) (x40) de *Beauveria* sp.

II.2.6 *Ulocladium* sp.

Parmi les souches fongiques isolées à partir des spécimens momifiées, il a été possible de purifier une espèce appartenant au genre *Ulocladium*. Les colonies présente une texture duveteuse à laineuse, la couleur est brun olive à noir. Le recto est noir (Figure 54 (A)). L'étude microscopique démontre la présence d'hyphes, septés, tardivement certains filaments sont pigmentés en brun. Les conidies sont brunes, ovoïdes, cloisonnées à la fois longitudinalement et transversalement (dictyospores) (Figure 54 (B)).

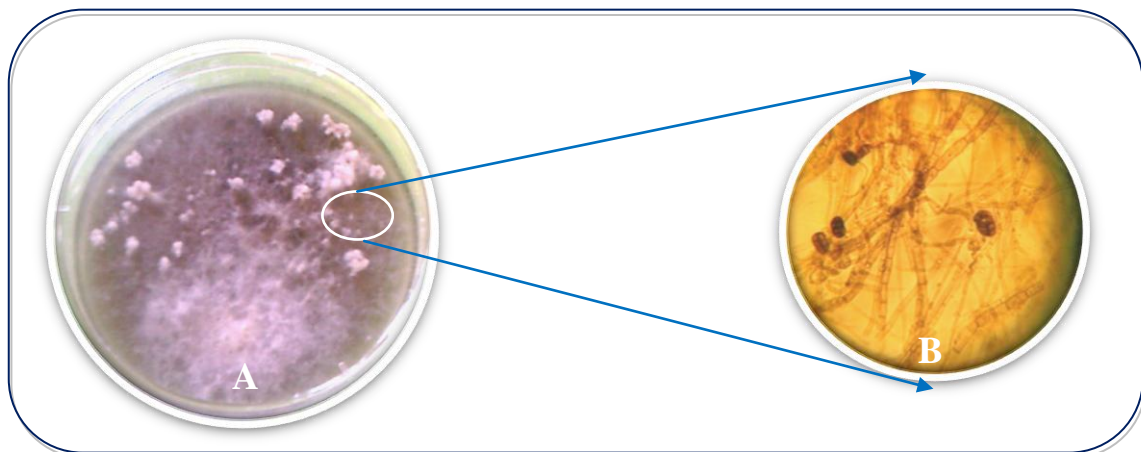


Figure 54 : Aspect macroscopique (A) et microscopique (B) (x10) d'*Ulocladium* sp.

Les *Ulocladium* se distinguent des *Alternaria* par des conidiophores courts fortement géniculés, des conidies sans bec et presque toujours solitaires (Chabasse et al., 2002). Récemment, les *Ulocladium* ont été reconnu comme appartenant au genre *Alternaria* à la section *Ulocladioides* par Woudenberg et al. (2013).

II.3 Calcul de l'abondance des espèces isolées

II.3.1 Calcul de l'abondance des bactéries

La figure 55 montre que les bactéries bacilles à Gram positif représentent 34,38% des souches isolées. Le calcul de l'abondance a montré que pour les bactéries bacilles à Gram négatif ; *S. paucimobilis* est l'espèce la plus fréquemment isolé et la plus abondante (25%), suivi de *M. lacunata* et de *B. cepacia* avec respectivement 21,88% et 12,50%, alors que *C. meningosepticum* est la moins fréquente avec 6,25%.

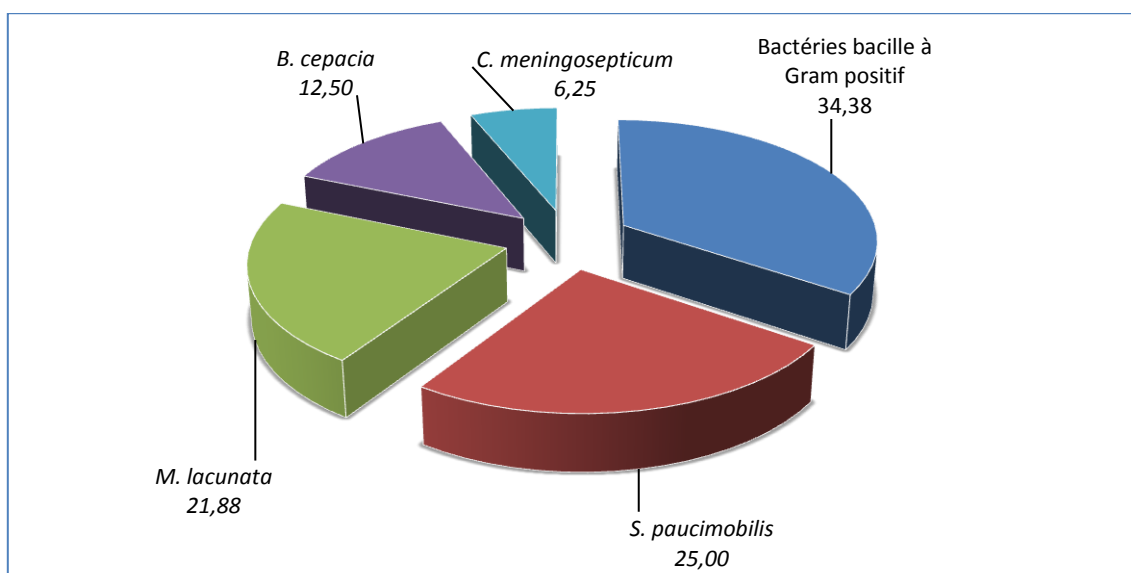


Figure 55 : Pourcentage d'abondance des souches bactériennes isolées

II.3.2 Calcul de l'abondance des champignons

La figure 56 représente les espèces fongiques isolées à partir *L. huidobrensis*, *T. absoluta* et *G. deserticola*. Nous avons remarqué qu'à l'exception de *Rhizopus* sp., toutes les espèces appartiennent au phylum des Ascomycota, mais à des ordres et des genres différents. En effet, l'identification des souches isolées a permis de mettre en évidence les espèces suivantes, *Rhizopus* sp., *Beauveria* sp., *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Fusarium* sp. et *Ulocladium* sp..

Le calcul de l'abondance a montré que le genre *Rhizopus* est le plus abondant avec un pourcentage de 31,71%, suivi des genres *Beauveria*, *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium*

avec des pourcentages respectifs de 19,51%, 17,07%, 14,63% et 9,76%. Alors que le genre *Ulocladium* était le moins présent avec 7,32% d'abondance.

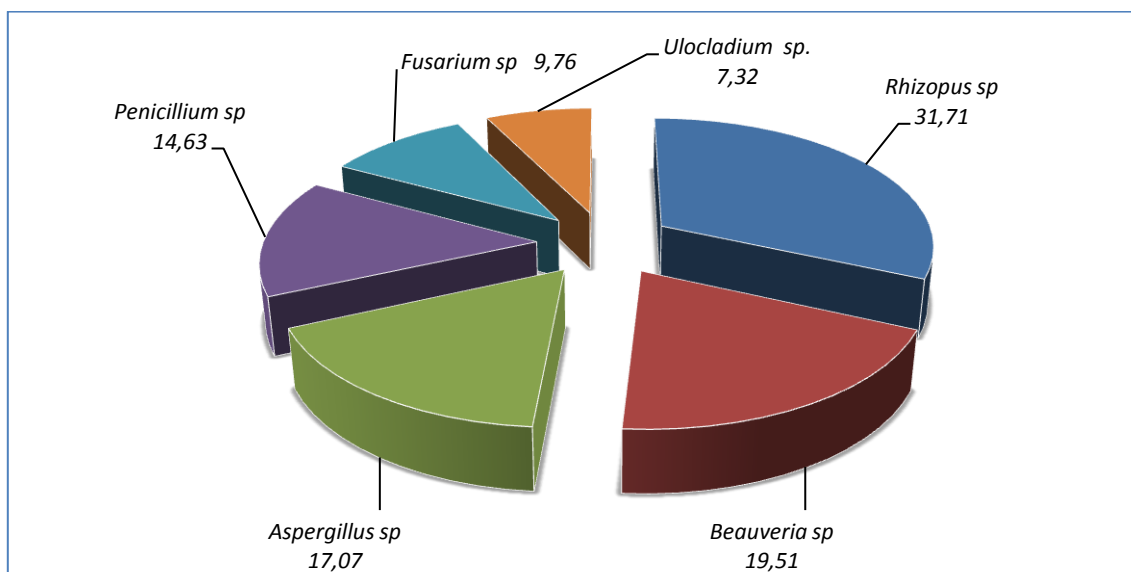


Figure 56 : Pourcentage d'abondance des champignons isolés

II.4 Tests de pathogénicité

Les résultats de la recherche des entomopathogènes autochtones ont permis l'isolement et la purification d'une gamme de bactéries et de champignons.

En ce qui concerne l'isolement des bactéries à partir des cadavres d'insectes, nous avons constaté l'existence de plusieurs espèces à savoir *S. paucimobilis*, *M. lacunata*, *B. cepacia*, *C. meningosepticum* et des bacilles à Gram positif. Les résultats obtenus suite à l'infection des larves de *T. absoluta* par les germes isolés ont révélés l'absence des mortalités dans l'ensemble des lots traités. Ces germes ont pour habitat le milieu extérieur (sol, eau....), mais ils ne sont pas pathogènes pour les insectes.

La mycoflore isolée des différents ordres d'insecte est représentée par les genres *Rhizopus*, *Beauveria*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* et *Ulocladium*. Durant l'expérimentation, il a été remarqué que la majorité des champignons identifiés appartiennent au genre *Rhizopus* (31.71% d'abondance). Ces champignons ont une croissance très rapide et extensive et ont une texture laineuse ce qui peut expliquer l'envahissement de l'hôte par les filaments mycéliens. Les genres *Aspergillus* et *Fusarium* peuvent parfois être entomopathogènes ; elles tuent leurs hôtes par les toxines qu'elles produisent. Cependant, la présence de ces champignons sur des cadavres ne prouve pas qu'ils aient causé la mort, car ils peuvent se développer de manière saprophytique liés à une blessure (Hurpin et Vago, 1958).

Toutes les souches identifiées ont été utilisées pour infester les larves de *T. absoluta*. Les tests de confrontation directe (insecte-champignons) ont permis l'élimination du bio-agresseur, seulement en présence de huit isolats qui appartient au genre *Beauveria* (BV1, BV2, BV3, BV4, BV5, BV6, BV7 et BV8) (Tableau 11).

Tableau 11 : Provenances des entomopathogènes *Beauveria* sp.

Souches	Hôtes	Ordre	Origine
BV1	<i>Geotrogus deserticola</i> (adulte)	Coléoptère	Chelf
BV2	<i>Liriomyza huidobrensis</i> (adulte)	Diptère	Mazagran Mostaganem
BV3	<i>Tuta absoluta</i> (nymphe)	Lépidoptère	Achaacha Mostaganem
BV4	<i>Tuta absoluta</i> (adulte)	Lépidoptère	Achaacha Mostaganem
BV5	<i>Geotrogus deserticola</i> (larve)	Coléoptère	Chelf
BV6	<i>Tuta absoluta</i> (larve)	Lépidoptère	Mazagran Mostaganem
BV7	<i>Geotrogus deserticola</i> (nymphe)	Coléoptère	Chelf
BV8	<i>Geotrogus deserticola</i> (larve)	Coléoptère	Mazagran Mostaganem

L'un des huit isolats entomopathogènes de *Beauveria* sp., a révélé les résultats représentés sur la figure 57.

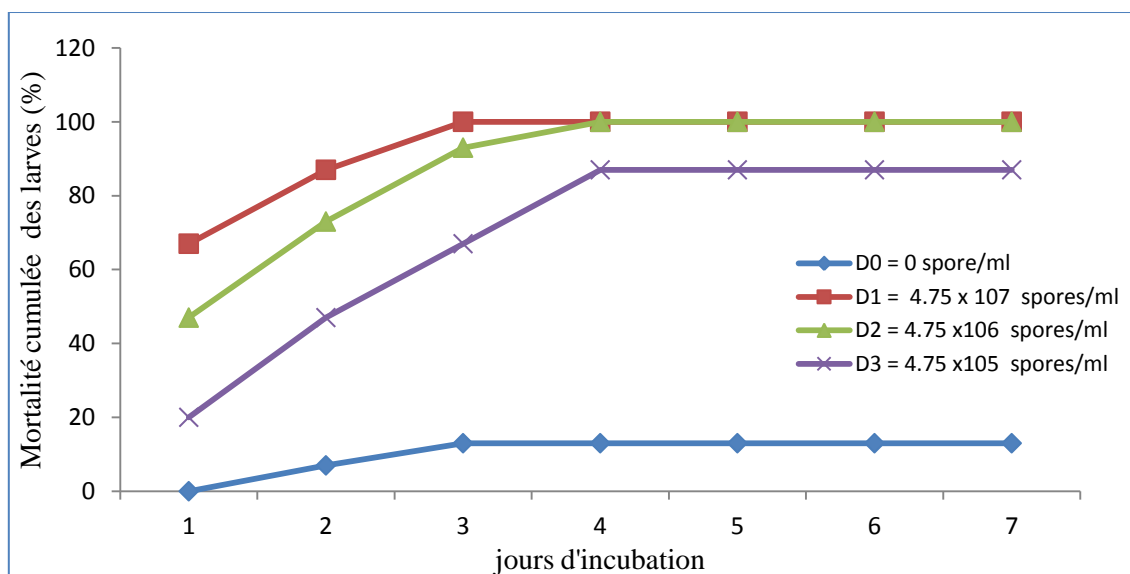


Figure 57 : Mortalité des larves de *T. absoluta* traitées par *Beauveria* sp (BV6).

L'analyse des courbes, nous renseigne sur le taux de mortalité des larves infestées à différentes doses: D1=4.75 x10⁷ spores/ml , D2=4.75 x10⁶ spores/ml D3=4.75 x10⁵ spores/ml et le témoin D0=0 spores/ml.

A la dose D1, 100 % de mortalité des individus sont observés au 3^{ème} jour, alors que pour la dose D2, le maximum de mortalité (100 %) est visible au 4^{ème} jour. Après quatre jours de contact à faible dilution (D3) de *Beauveria* sp., 87 % des larves sont mortes. Parallèlement, plus de 80 % des larves ont évolué au stade chrysalide pour le témoin, conséquence d'une faible mortalité. Les résultats obtenus sont conformes à ceux observés par plusieurs auteurs (Torres-Gregorio et al., 2009; Pires et al., 2010) et permettent de conclure que l'entomopathogène *Beauveria* sp. analysé a une action pathogène sur les larves de la mineuse de la tomate.

L'inoculation du phytophage par les *Beauveria* sp. (BV1, BV2, BV3, BV4, BV5, BV6, BV7 et BV8) a permis l'apparition d'un fin duvet blanc sur les chenilles momifiées, lequel s'est accru très rapidement pour donner des masses filamenteuses denses (Planche 03 (1)).

Pour vérifier la pathogénicité des huit isolats de *Beauveria*.sp., des prélèvements des larves momifiées suite à l'inoculation ont été effectués. Ils sont ensuite placés dans le milieu de culture (PDA) pour isoler à nouveau le champignon entomopathogène; après l'incubation à 25°C, il s'en est suivi l'observation du développement des isolats fongiques (Planche 03 (2)).

Les résultats des tests de pathogénicité avec les champignons isolés ont mis en exergue la présence de huit entomopathogènes autochtones qui contribuent à la régulation naturelle de l'insecte. Wraight et Roberts (1987) ; Coderre et Vincent (1992), attestent que les espèces de *Beauveria* sp. et *Metarhizium* sp., sont connus pour leur grande pathogénecité, et leurs capacités étonnantes à contrôler les populations d'insectes d'ordres différents. Par son mode d'infestation (ingestion ou simple contact avec l'hôte), *B. bassiana* est un agent de lutte très intéressant (De kouassi, 2001). Ce champignon a l'avantage de ne pas faire partie des agents pathogènes dangereux pour l'homme et pour les animaux à sang chaud (Tong-kwee et al., 1989; Laird et al., 1990).

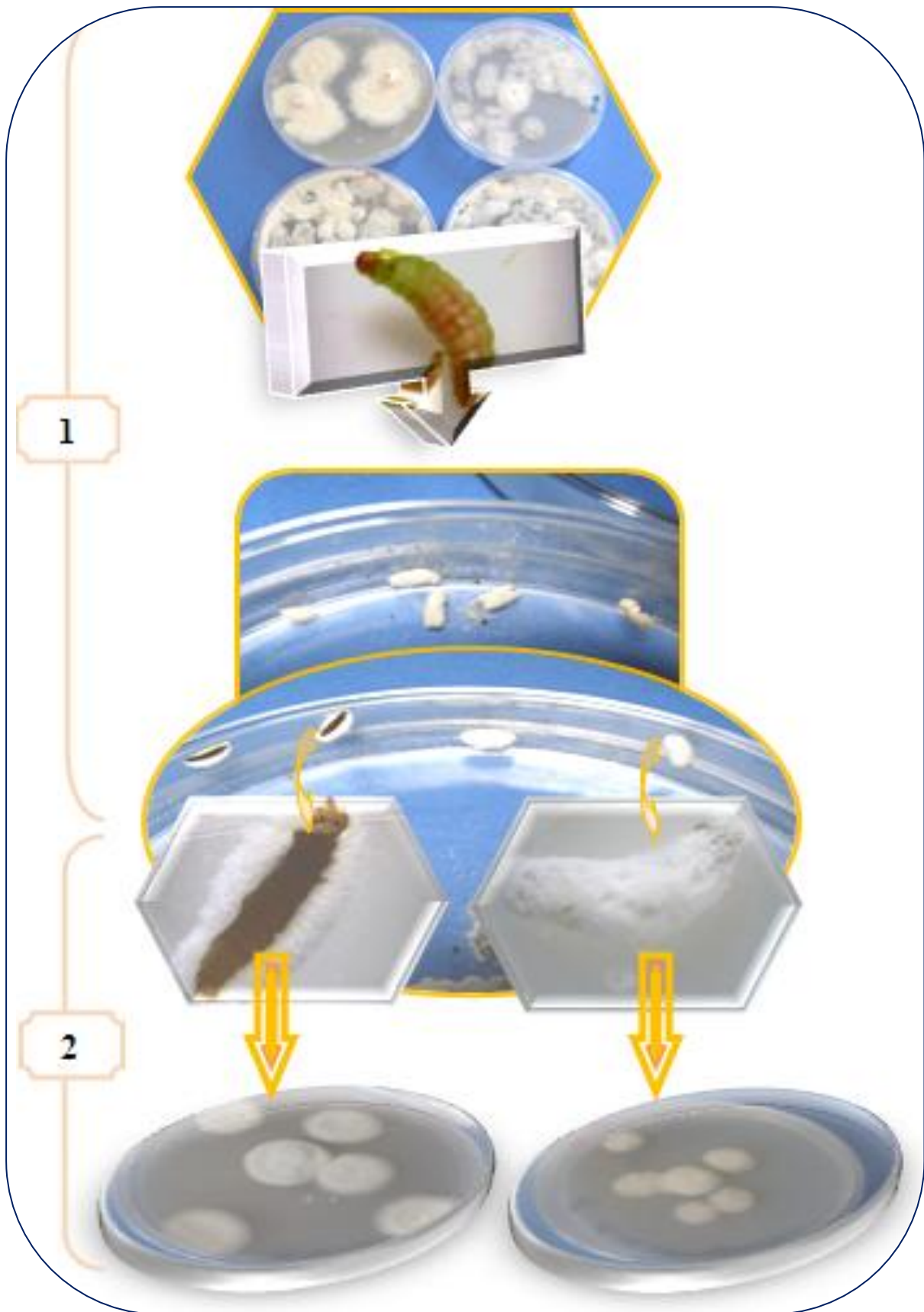


Planche 03 : Test de pathogénicité. 1: inoculation des larves saines.
2 : ré-isolement de *Beauveria*. sp à partir des larves momifiées

CONCLUSION

La recherche des entomopathogènes autochtones a permis d'isoler un certain nombre de bactéries et de champignons à partir des cadavres de la mouche mineuse (*L. huidobrensis*), de la mineuse de la tomate (*T. absoluta*) et du ver blanc (*G. deserticola*). La majorité des bactéries identifiées sont des bacilles à Gram négatif et la mycoflore isolée est représentée par les genres *Rhizopus*, *Beauveria*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* et *Ulocladium*.

Les agents pathogènes une fois isolés ont fait l'objet des tests de pathogénicité afin de vérifier leur virulence vis-à-vis des larves de *Tuta absoluta*. L'ensemble de la microflore n'étaient pas efficace à l'exception des huit isolats entomopathogènes appartenant au genre *Beauveria*.

Au stade actuel, les tests effectués ont démontré la possibilité du contrôle biologique des populations de *T. absoluta* par l'utilisation des souches autochtones *Beauveria* sp.. Ces entomopathogènes sont repérés visuellement à la surface des insectes morts. Les individus infectés sont recouvert d'une importante couche de mycélium blanc, évoquant la neige.

Avant d'envisager une utilisation sur le terrain de ces entomopathogènes autochtones, des expérimentations approfondies en conditions contrôlées et une caractérisation moléculaire des isolats sont nécessaires ; elles seront abordées dans les chapitres IV et V.

Chapitre IV

Evaluation de l'activité larvicide des

***Beauveria* sp. isolées**

INTRODUCTION

La lutte biologique, précisément par l'utilisation des champignons entomopathogènes est une alternative très prometteuse pour assurer une protection phytosanitaire performante. Les *Beauveria* sp. sont des agents entomopathogènes naturellement présents dans les écosystèmes. Ils offrent un potentiel très intéressant pour contrôler les populations de différents insectes ravageurs appartenant à divers ordres. C'est dans ce contexte que ce chapitre a comme objectif de tester l'efficacité de huit entomopathogènes autochtones (*Beauveria* sp.) sur les larves de la mineuse de tomate *T. absoluta*.

I. Matériel et méthodes

I.1 Analyse de la croissance des *Beauveria* sp. à différentes températures par la néphélométrie laser

Les champignons, comme tous les êtres vivants, sont tributaires des conditions abiotiques du milieu dans lequel ils vivent. Le choix de la température optimale pour le développement des entomopathogènes est essentiel avant de passer à l'étude de leur activité larvicide vis-à-vis de *T. absoluta*. Les huit souches de *Beauveria* sp. (BV1, BV2, BV3, BV4, BV5, BV6, BV7 et BV8), isolées à partir de différents ordres d'insectes (Tableau 11) ont fait l'objet d'étude de croissance à des températures différentes (20°C, 25°C, 30°C et 35°C) par néphélométrie laser.

La technique d'analyse de croissance des microorganismes par néphélométrie a été développée pour mesurer la croissance fongique dès les premiers stades du développement des conidies: la germination, l'élongation et la ramification des hyphes. C'est une technique de mesure du trouble qui prend en compte les particules en suspension dans la totalité du milieu de culture. Un récepteur comptabilise les rayons laser déviés et les traduit en RNU, unité de mesure néphélométrique, proportionnelle à la concentration en particule du soluté (Joubert et *al.*, 2010). Cette analyse a été réalisée à la Faculté des Sciences d'Angers dans le laboratoire « Pathologie Végétale », au sein de l'Equipe « FungiSem ».

I.1.1 Préparation de la plaque 96 puits

Une suspension conidienne de 10^5 conidies/mL est préparée pour chaque condition testée et sert pour 3 répétitions. 300 μ L de suspension est répartie par puits dans une plaque 96 puits (Greiner 96). Le témoin utilisé contient le milieu PDB sans champignon.

Pour suivre la croissance des *Beauveria* sp., la plaque est déposée dans le Néphélomètre où la température et la durée sont réglables.

I.1.2 Arrêt de la mesure et récupération des données

Le Néphélomètre est arrêté après 55h de croissance ; les données sont récupérables sur le logiciel MARS et sont exporté sous Excel sous forme d'une matrice d'analyse (Matrice Nephelostar 3.1.xlsx).

L'analyse cinétique de la croissance fongique sur 55h a permis d'obtenir des courbes de croissance représentative du développement du champignon.

I.2 Etude de l'activité larvicide des *Beauveria* sp. sur *T. absoluta*

I.2.1 Matériels biologiques

Les tests effectués ont concerné uniquement les champignons ayant donné, lors des tests préliminaires de pathogénécité, des résultats positifs et ayant reproduit les symptômes de départ. Ces champignons présentent des aspects macroscopiques distincts (Figure 58).

Pour réaliser les essais d'inoculation, *in vitro*, des champignons entomopathogènes retenus, des feuilles de tomate saines ont été utilisées. Les larves de *T. absoluta* soumises au test proviennent d'une production en masse pré-établi dans la serre expérimentale. Les folioles de tomate infestées d'insectes ont été ramenées au laboratoire dans le but de récolter les larves destinées aux tests *in vitro*.

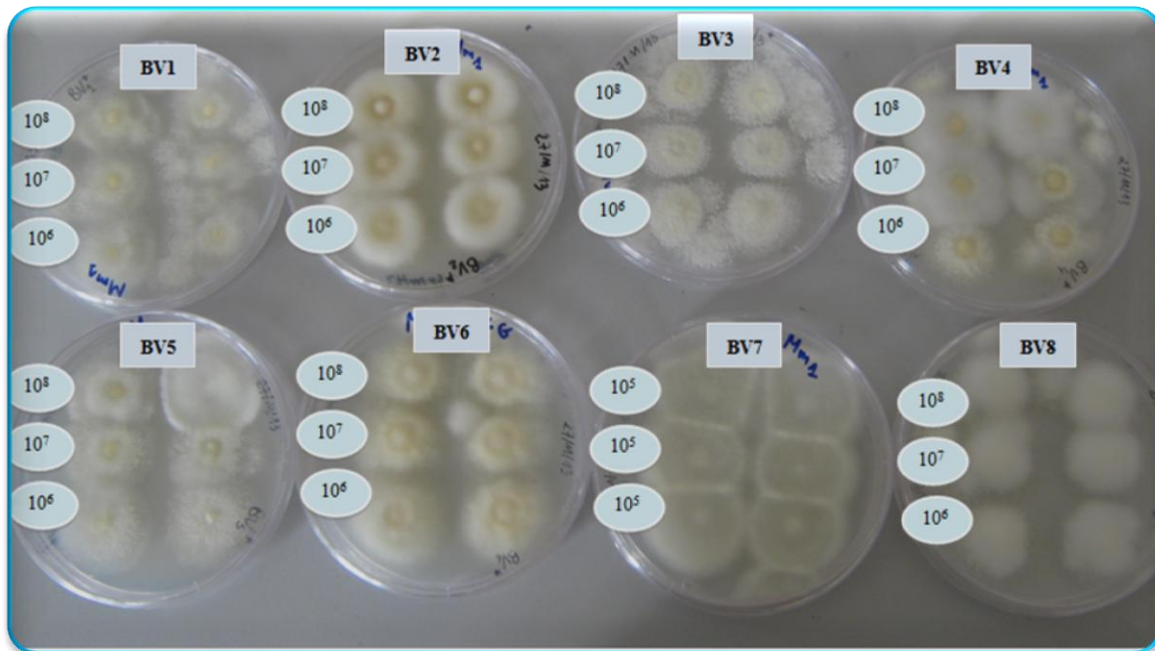


Figure 58 : Aspect macroscopique des huit *Beauveria* sp. utilisés pour l'évaluation de l'activité larvicide sur *T. absoluta*

I.2.2 Conduite du test de pathogénicité des champignons

Les bio-essais ont été effectués au laboratoire en introduisant une ou deux folioles de tomate saines dans une boîte de Pétri dont le fond est recouvert d'une couche de papier absorbant afin d'éliminer l'excès de la solution et de garder les folioles fraîches, permettant le bon développement des larves durant la période d'observation. Le traitement des larves (vivantes et non parasitées) a été effectué par pulvérisation de l'inoculum cryptogamique.

En première étape, une seule dose de 10^7 spores/ml a été appliquée pour les huit *Beauveria* sp. (BV1, BV2, BV3, BV4, BV5, BV6, BV7 et BV8). L'objectif était d'estimer la sensibilité des larves de la mineuse de tomate vis-à-vis des entomopathogènes isolés, pour permettre de les classer selon leur virulence. Par la suite, deux *Beauveria* sp. (BV1 et BV6) ont été utilisées pour approfondir notre étude. Pour se faire six doses (10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 et 10^2 spores/ml) de suspensions de spores sont préparées et additionnées de tween 20.

Les individus traités sont répartis à raison de sept (07) larves par boîte de Pétri avec trois répétitions par traitement. Quant aux témoins, ils sont pulvérisés d'eau distillée stérile contenant une goutte de tween 20. Ainsi, l'évaluation du pouvoir pathogène est réalisée sur la base de 21 larves pour chaque concentration de chaque champignon.

Les observations sont effectuées quotidiennement afin de déterminer l'effet larvicide des souches fongiques sur la mineuse de la tomate *Tuta absoluta*. Les comptages des insectes morts sont effectués après 24 heures de contact jusqu'à la mort complète de tous les larves ou leur transformation en nymphes. Les larves mortes ont été examinées afin de vérifier la présence de la muscardine blanche caractérisant l'infection par les *Beauveria* sp..

Pour éliminer tous les risques de mortalité naturelle, les mortalités dans les boîtes traitées (M1) ont été exprimées en mortalités corrigées (MC) en tenant compte des mortalités naturelles observées dans les boîtes témoins (Mt), selon la formule de Schneider et Oreilli (Saiah, 2014):

$$\text{Mortalité corrigée (MC \%)} = \frac{\mathbf{M1} - \mathbf{Mt}}{\mathbf{100} - \mathbf{Mt}} * \mathbf{100}$$

Avec : M1 : Pourcentage de mortalité dans le lot traité

Mt : Pourcentage de mortalité dans le lot témoin

Pour estimer la dose létale de 50% de la population d'insecte (DL50), des droites de régression ont été construites en dressant le taux de mortalité corrigé en fonction des doses de traitement (pris en logarithme) (Finney, 1971).

II. Résultats et discussion

II.1 Analyse de la croissance des *Beauveria* sp. à différentes températures par la néphélométrie laser

La température est un des principaux facteurs du milieu qui limitent le développement des mycoses dans les populations naturelles d'insectes (Carruthers et *al.*, 1985; Benz, 1987). Aussi, en lutte microbiologique, il convient de rechercher des champignons entomopathogènes dont la gamme de tolérance à l'égard de la température soit compatible avec les conditions climatiques de l'écosystème visé (Ferron et *al.*, 1991).

Huit *Beauveria* sp. issus de différentes espèces hôtes, d'origines diverses (Tableau 11), ont été retenus en raison de leur activité pathogène à l'égard des larves de *T. absoluta*. L'influence de la température sur la croissance *in vitro* des entomopathogènes autochtones isolés a été étudiée à 4 niveaux constants compris entre 20° et 35 °C. La croissance des champignons a été mesurée par néphélométrie, une méthode permettant un suivi automatisé des cinétiques de croissance des champignons (Joubert et *al.*, 2010). Les figures 59, 60, 61 et 62 illustrent l'influence de la variation des températures sur la croissance fongique des huit entomopathogènes autochtones.

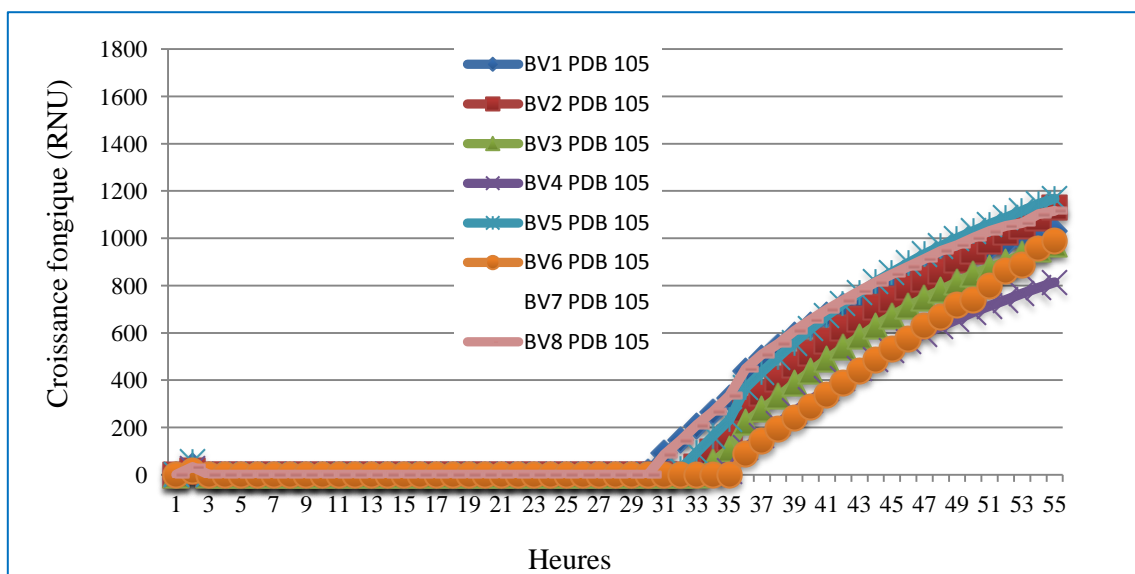


Figure 59 : Comparaison de la croissance fongique des huit souches de *Beauveria* sp. à une température de 20 °C

Les graphes représentés sur la figure 59 montrent qu'à 20°C toutes les souches ont à peu près la même cinétique de croissance. A une température de 25°C (Figure 60), la même remarque a été soulevée sauf que la vitesse de croissance est supérieure à celle enregistrée à 20°C.

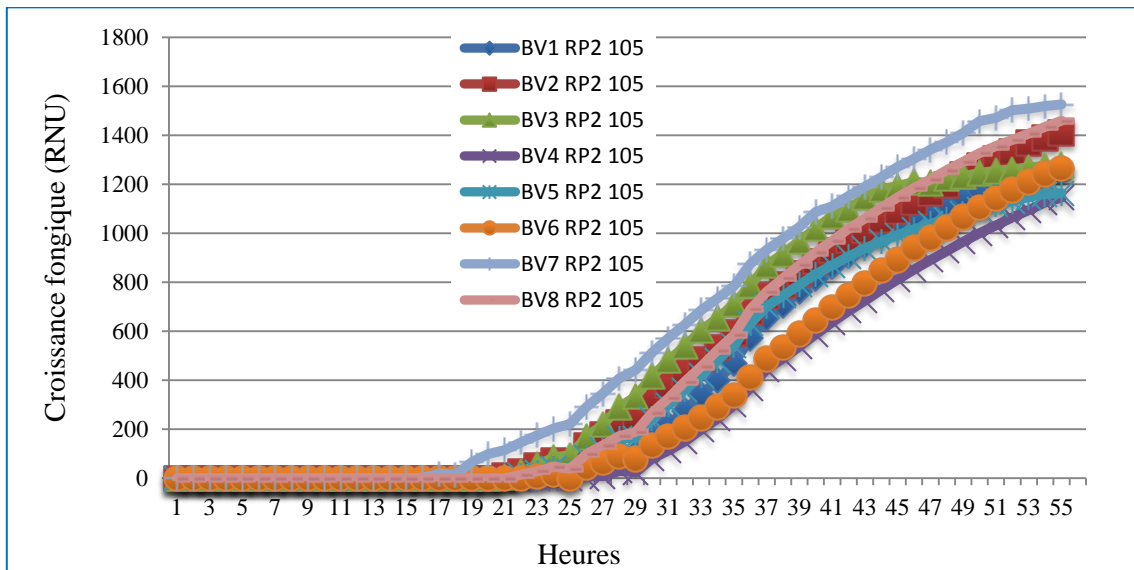


Figure 60 : Comparaison de la croissance fongique des huit souches de *Beauveria* sp. à une température de 25 °C

La figure 61 montre qu'à une température de 30°C, il semble y avoir plus de différence ; la souche BV6 est moins performante que les autres entomopathogènes.

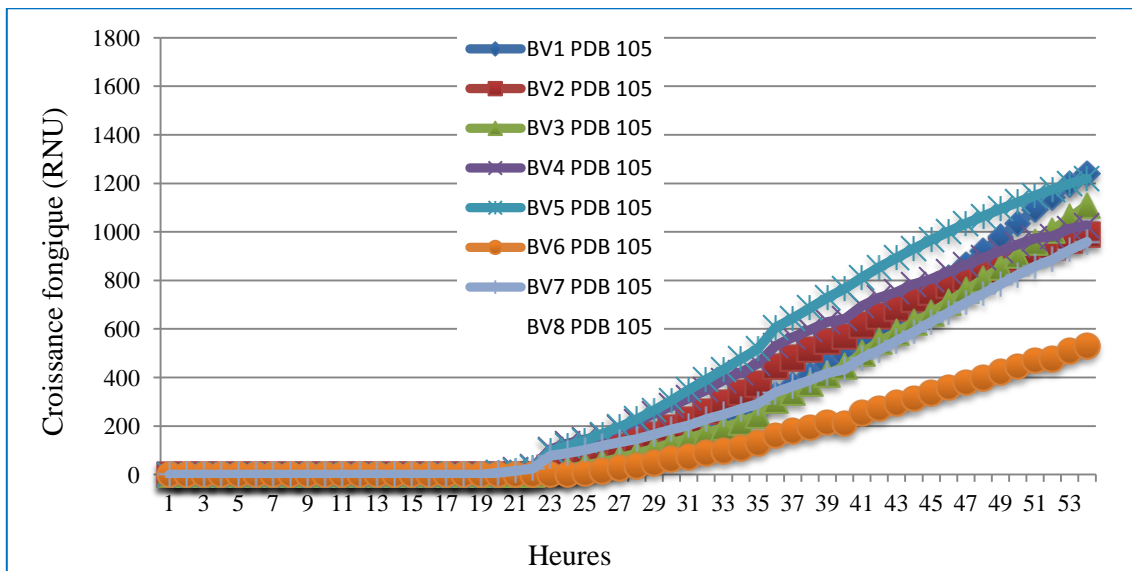


Figure 61 : Comparaison de la croissance fongique des huit souches de *Beauveria* sp. à une température de 30 °C

A une température de 35°C (Figure 62), tous les champignons ont montré une légère croissance qui ne dépasse pas 200 RNU.

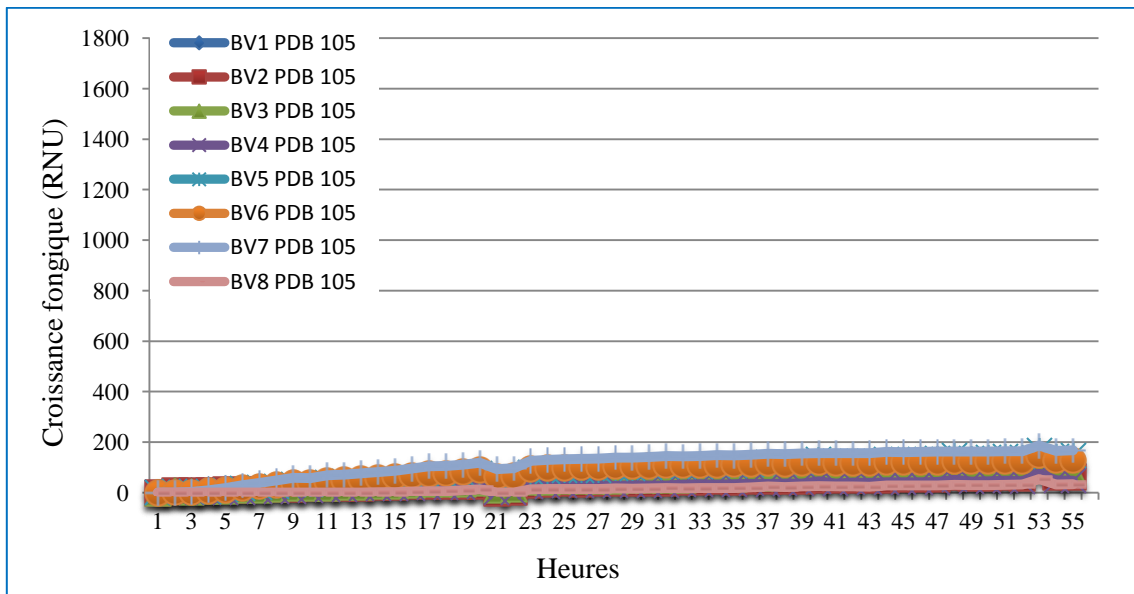


Figure 62 : Comparaison de la croissance fongique des huit souches de *Beauveria* sp. à une température de 35 °C

L'étude de l'effet des 4 étages de températures sur les huit souches de *Beauveria* sp. a révélé que l'optimum de la croissance se situe aux alentours de 25°C, ou il a fallu 24 heures seulement pour démarrer la croissance de la totalité des souches et 55 heures pour arriver à des maxima variant entre 1200 et 1500 RNU. Les températures de 20 et 30°C ont également présenté des maxima de croissance inférieurs à 1200 RNU après 55 heures. Alors que 35 °C a diminué la croissance d'une manière non négligeable (moins de 200 RNU). D'après Luz et fargues (1997) les *Beauveria* sp. se développent difficilement au-delà de 30°C.

Les résultats obtenus fait ressortir que la température de 25°C représente l'optimum thermique de la croissance des huit souches de *Beauveria* sp.. Plusieurs travaux ont souligné la concordance entre l'optimum thermique de l'activité des champignons entomopathogènes et celui de l'infection fongique sur l'insecte hôte (Hall et Papierok, 1982; Ferron, 1985). C'est pour cette raison que la température de 25°C a été retenue pour mener les essais de pathogénicité des entomopathogènes isolés.

II.2 Activité larvicide des champignons entomopathogènes sur *T. absoluta*

La figure 63 représente la mortalité des larves sous l'effet des huit champignons entomopathogènes à la dose de 10^7 spores/ml. Des mortalités ont été observées dans l'ensemble des lots traités suite au test d'inoculation des larves par les *Beauveria* sp. retenus (BV1, BV2, BV3, BV4, BV5, BV6, BV7 et BV8). Les résultats obtenus sont représentés en annexe 40.

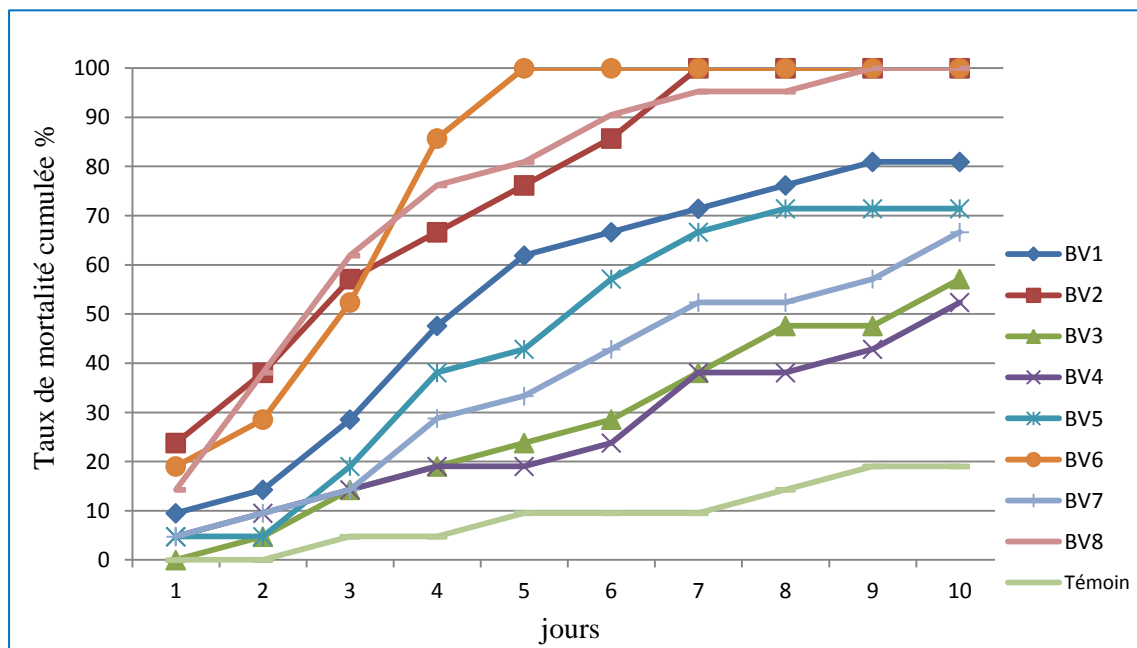


Figure 63: Mortalité des larves de *T. absoluta* exposées à la concentration 10^7 spores/ml des huit souches de *Beauveria* sp.

Les résultats des tests de pathogénicité des huit champignons entomopathogènes vis-à-vis des larves de *Tuta absoluta* mettent en exergue la virulence de toutes les souches, avec des taux de mortalité allant de 52 à 81% pour les souches BV1, BV3, BV4, BV5 et BV7 au dixième jour. Les entomopathogènes isolés à partir des cadavres d'insectes prélevés au niveau de l'exploitation expérimentale de l'Université de Mostaganem (BV2, BV6 et BV8) ont réussi à contrôler les populations larvaires toutes entières en des temps record de six (06) jours pour BV6 et de sept (07) jours pour les souches BV2 et BV8. A ce stade d'étude, on peut avancer que les huit entomopathogènes autochtones ont une efficacité intéressante sur les larves de *T. absoluta* et peuvent être considérés comme traitements intéressants susceptibles d'être préconisés dans le cadre de la lutte biologique contre ce redoutable phytophage.

L'analyse de la variance révèle une différence significative entre les souches. Le test de Newman-Keuls, au seuil de signification 5%, classe les huit entomopathogènes dans deux groupes homogènes (Annexe 41): Le groupe A correspond aux souches BV1, BV3, BV4, BV5 et BV7, alors que le groupe B correspond aux souches BV2, BV6 et BV8; groupe C correspond au témoin.

Une souche de chaque groupe (BV1 du groupe A et BV6 du groupe B) a fait l'objet des tests approfondis *in vitro* pour évaluer leurs activités larvicides en utilisant six doses de suspensions de spores. A savoir 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 et 10^2 spores/ml.

II.2.1 Effet larvicide de l'entomopathogène BV1 sur *T.absoluta*

La figure 64 illustre les taux de mortalité des larves traitées par des concentrations croissantes de spores de BV1, démontrant l'effet significatif des doses sur la mortalité des larves en fonction du temps. Ce champignon a éliminé 80.95% de l'effectif en neuf (09) jours avec 10^7 spores/ml par contre, les autres doses ont causé des mortalités inférieures à 67%.

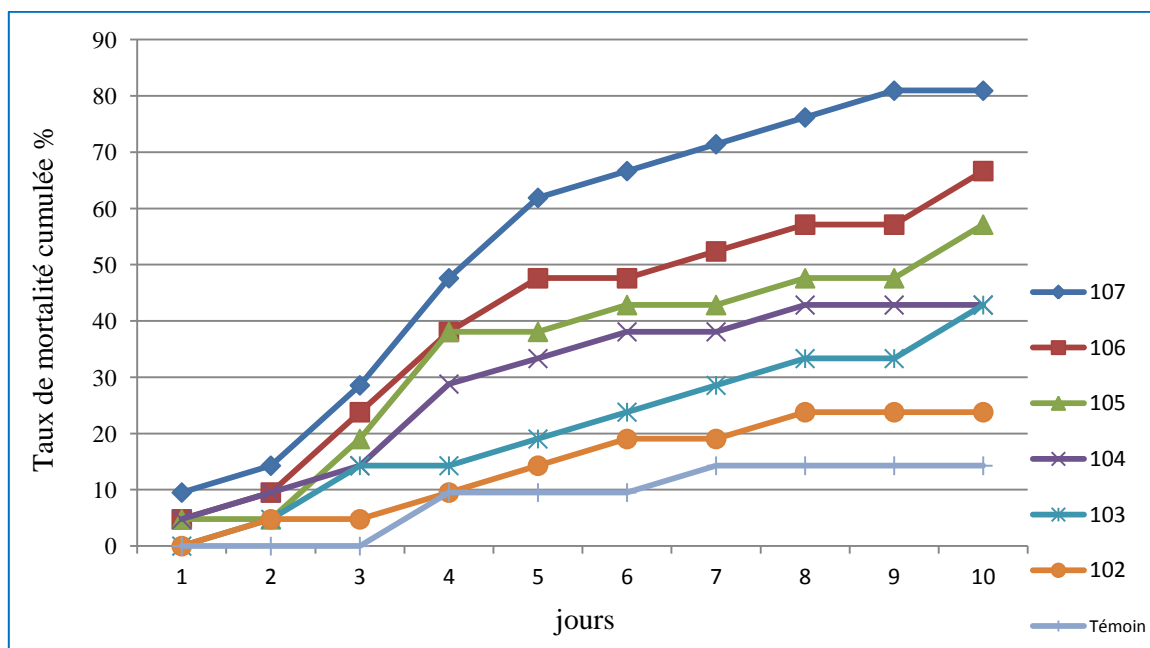


Figure 64: Effet de différentes doses de l'entomopathogène BV1 sur la mortalité des larves de *T. absoluta*

II.2.2 Effet larvicide de l'entomopathogène BV6 sur *T. absoluta*

La figure 65 représente l'évolution de la mortalité des larves de *T. absoluta* en fonction du temps sous l'effet des différentes doses du champignon entomopathogène BV6.

Les résultats obtenus montrent que l'augmentation des doses de BV6, accroît la mortalité des larves en fonction du temps. En effet, avec une concentration de 10^2 spores/ml, cette souche a causé la mortalité de 9.52 % des larves le deuxième jour, et après neuf (9) jours ce taux a atteint 42.85 %. Alors que ce champignon a réussi avec 10^7 spores/ml à éliminer 100 % des individus dans une période de cinq (5) jours.

Les autres doses ont causé la mortalité de plus de 52 % de la population larvaire à partir du septième jour. Parallèlement, il a été observé pour le témoin un taux de mortalité faible qui ne dépasse pas 15 %. Au bout de huit (08) jours, 85 % de larves ont évolué au stade chrysalide, ceci est la conséquence d'une faible mortalité.

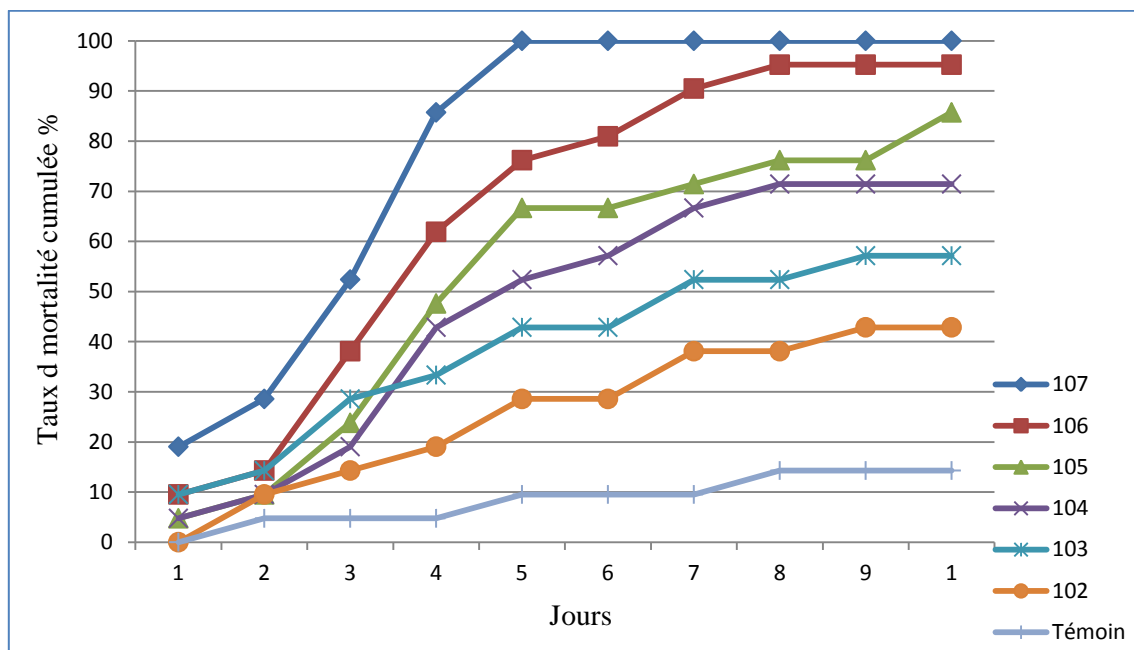


Figure 65 : Effet de différentes doses de l'entomopathogène BV6 sur la mortalité des larves de *T. absoluta*

D'une manière générale, on remarque des mortalités dans l'ensemble des lots traités suite au test d'inoculation des larves par les deux champignons entomopathogènes (BV1 et BV6). L'analyse de variance des données montre un effet significatif ($P \leq 0.05$), des doses et du temps sur la mortalité des larves. En effet, cette dernière augmente dans le temps en fonction des doses (Annexes 43 et 45).

Il est nécessaire de noter que l'entomopathogène BV6 a montré une agressivité importante vis-à-vis des larves de *T. absoluta*, son utilisation a permis d'observer des taux de mortalité supérieurs à ceux enregistrés pour BV1. Les résultats obtenus montrent l'effet significatif ($P \leq 0,05$) des isolats sur la mortalité des larves (Annexe 46).

Pour les deux entomopathogènes, la majorité des doses testées n'ont pas réussi à éliminer la totalité des larves, ceci est le propre de la lutte biologique. Cela peut être lié soit à la virulence du champignon ou à des facteurs intrinsèques particuliers à l'insecte. Ce qui permet d'ailleurs d'introduire le concept de spécificité entre le pathogène et son hôte (Saiah, 2014).

II.2.3 Calcul des DL 50

Le calcul de la corrélation entre les doses d'inoculum et la mortalité corrigée des larves inoculées par les champignons BV1 et BV6, montre la relation proportionnelle qui existe entre les différentes doses et le taux de mortalité des larves (Figures 66 et 67).

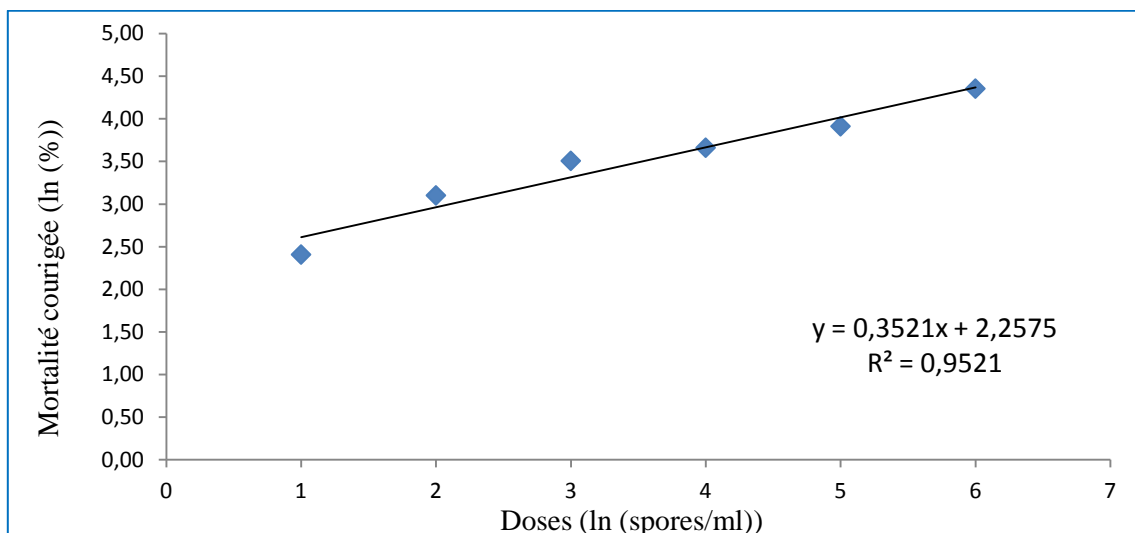


Figure 66: Mortalité des larves de *T. absoluta* sous l'effet de l'entomopathogène BV1 enregistrée le 9^{ième} jour du traitement

La figure 66 montre une corrélation positive entre la dose de l'entomopathogène BV1 et la mortalité corrigée des larves de *T. absoluta* avec un coefficient de l'ordre de 0.952. Pour ce champignon la DL 50 est égale à $10^{4,69}$ spores/ml au neuvième jour.

De même, la figure 67 montre une corrélation positive entre les doses de traitement par l'entomopathogène BV6 et la mortalité des larves de *T. absoluta* avec un coefficient de 0.978. La DL 50 calculée est de $10^{2,97}$ spores/ml au cinquième jour.

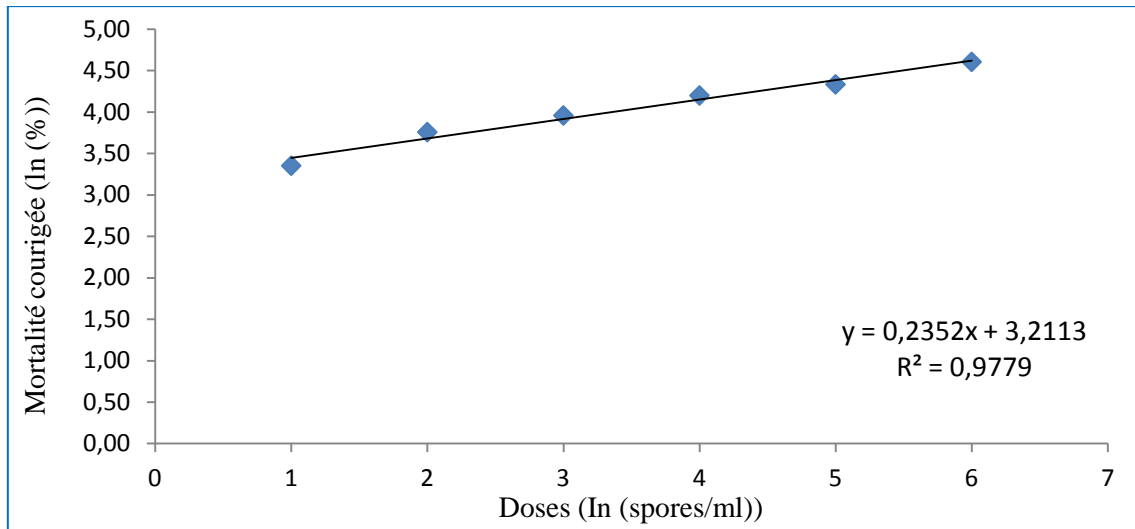


Figure 67: Mortalité des larves de *T. absoluta* sous l'effet de l'entomopathogène BV6 enregistrée le 5^{ème} jour du traitement.

La comparaison de la mortalité causée par les deux champignons, montre que l'entomopathogène BV1 a provoqué la plus faible morbidité. Le calcul de la DL 50 vient confirmer l'agressivité supérieure de BV6 avec $10^{2,97}$ spores/ml au cinquième jour par rapport à BV1 avec $10^{4,69}$ spores/ml au neuvième jour. L'entomopathogène BV6 a réussi à éliminer 50% de la population larvaire avec la plus faible concentration, il est le plus performant contre les larves de *T. absoluta*, après seulement cinq jours de traitement. Les variations observées entre les valeurs de DL 50 peuvent être expliquées par une spécificité de virulence des isolats vis-à-vis de l'insecte hôte (Khachatourians, 1992). Cette variation semble être associée à des caractéristiques génétiques de certains isolats et/ou à des facteurs physiologiques intrinsèques de l'hôte (Miranpuri et Khachatourians, 1991). Par exemple, Feng et Johnson (1990) ont montré une différence de la virulence des isolats de *B. bassiana* et qu'elle était corrélée à des variations du taux de germination du champignon sur la cuticule de l'insecte.

II.2.4 Développement de la muscardine blanche sur les larves de *T. absoluta*

D'après Coderre et Vincent (1992), les *Beauveria* sp. agissent comme des insecticides de contact. Ainsi, contrairement à plusieurs agents microbiens de lutte, ils peuvent infecter un insecte sans que ce dernier ait ingéré les spores. Ils prolifèrent à l'intérieur de l'organisme jusqu'à ce qu'ils provoquent sa mort. Par la suite, le mycélium traverse les parties plus molles de la cuticule, couvrant ainsi l'insecte d'une couche blanche (muscardine). Cette couche duveteuse est le site de production de spores contagieuses. Ces dernières sont libérées dans l'environnement afin de reproduire le cycle d'infection chez un autre insecte (Figure 68).

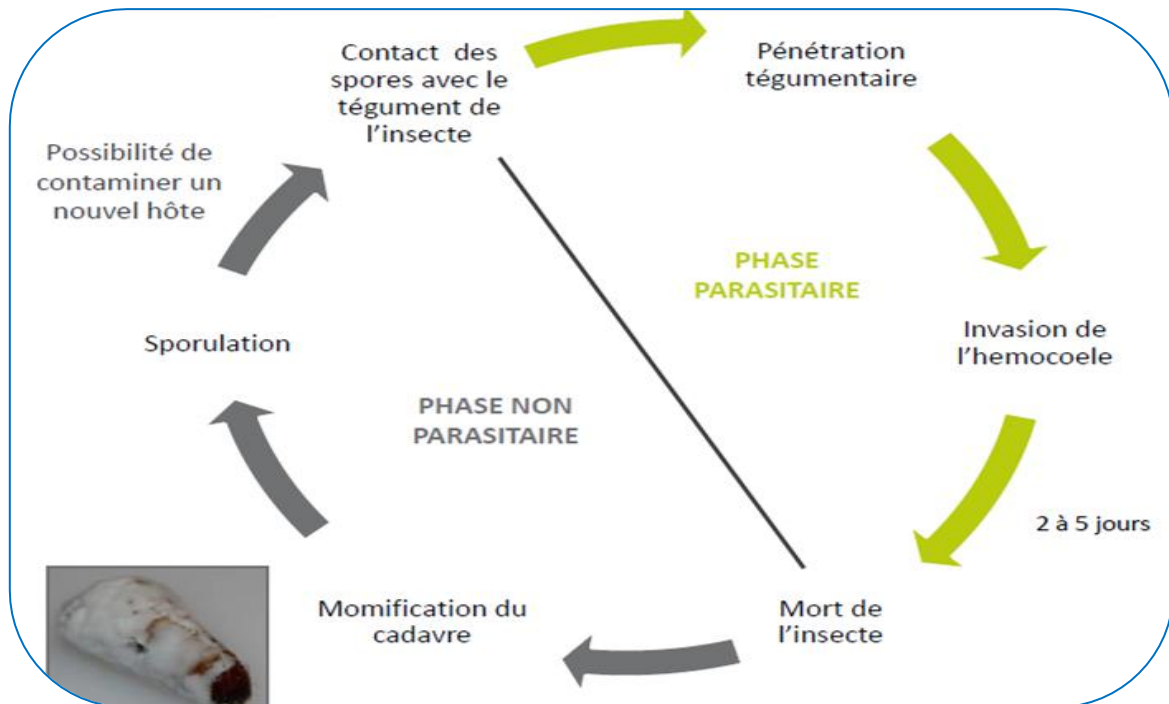


Figure 68: Mode d'action des *Beauveria* sp. (Besse et al., 2013)

Une analyse plus fine des résultats a démontré une extériorisation de mycélium sur les cadavres d'insectes soumis aux préparations fongiques. L'observation des larves suite à l'inoculation par BV6 montre une forte croissance fongique (Figure 69(B_{1et2})) par rapport à celles infestées par BV1 (Figure 69(A_{1et2})).

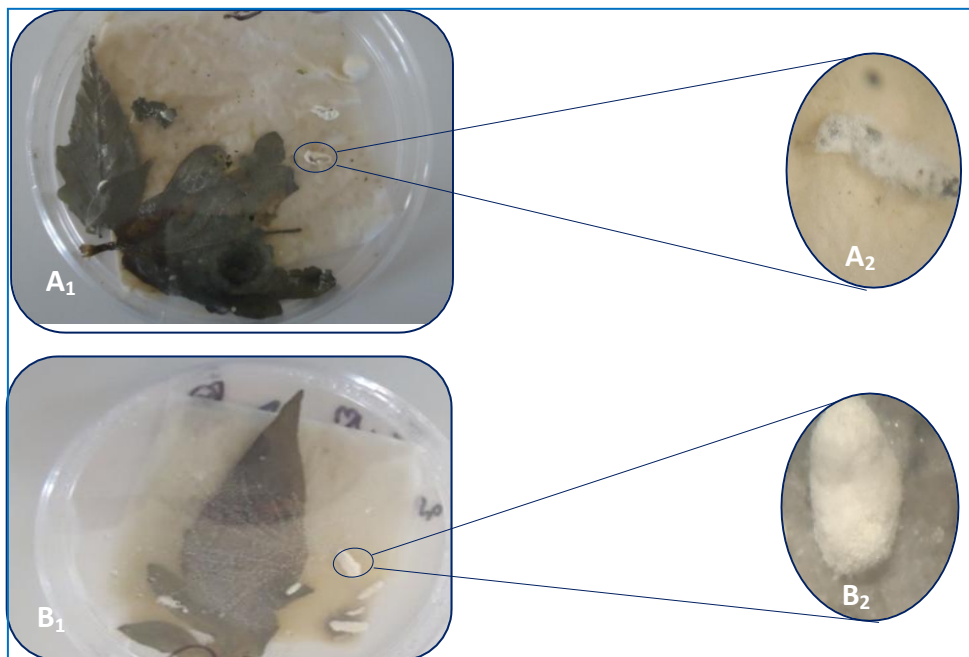


Figure 69: Développement de la muscardine blanche sur les larves de *T. absoluta* inoculées par deux *Beauveria* sp., BV1 (A_{1et2}) et BV6 (B_{1et2})

Les données du suivi de l'apparition de la muscardine blanche sur les larves suite à l'inoculation par les *Beauveria* sp., BV1 et BV6, sont représentées sur les figures 70 et 71. L'analyse de la variance des résultats a montré l'effet significatif ($P \leq 0,05$) des doses, du temps et des isolats (Annexes 50, 52 et 53).

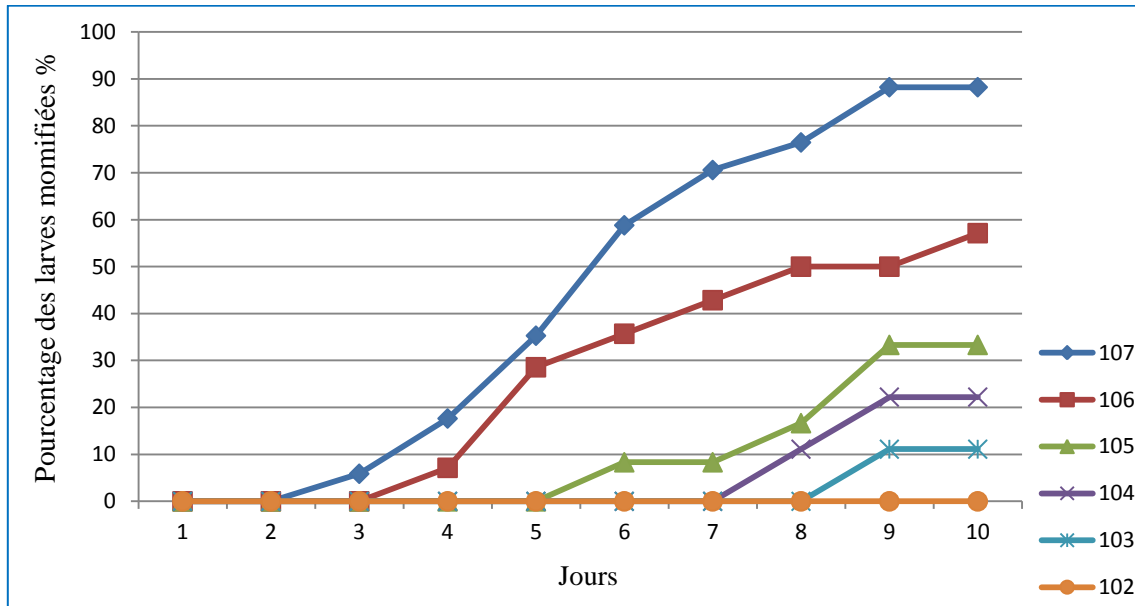


Figure 70: Formation de la muscardine blanche sur les larves infestées par l'entomopathogène BV1

La présentation graphique sur la figure 70, montre qu'avec une concentration de 10^7 spores/ml de l'entomopathogène BV1, l'apparition du duvet blanc sur les larves a commencé le troisième jour avec 5,88% et a atteint un maximum de 88,24% à partir du neuvième jour. Lorsque les larves sont mises en présence de suspensions conidiennes dont la concentration est de 10^6 spores/ml, le champignon tue celle-ci mais seulement 57,14 % des cadavres se momifient. Pour les autres doses le maximum des individus momifiés (33,33%) est obtenu à la dose 10^5 spores/ml à partir du neuvième jour.

Les résultats de l'extériorisation de mycélium sur les cadavres d'insectes soumis à différentes doses de l'entomopathogène BV6 sont indiqués sur la figure 71. Cette dernière montre que tous les individus morts sont couverts d'une couche blanche, le septième jour suite au traitement à la plus forte dose (10^7 spores/ml). Pour la concentration 10^6 spores/ml, 60 % des larves ont été momifiées dès le sixième jour pour atteindre 90 % le neuvième jour. La momification de 22,22% des larves traitées à la dose 10^5 spores/ml n'a commencé qu'au sixième jour pour atteindre 83,33 % le dernier jour. Tandis que les

cadavres issus de faibles doses (10^4 et 10^3 spores/ml) n'ont pas dépassé 55 % de momification..

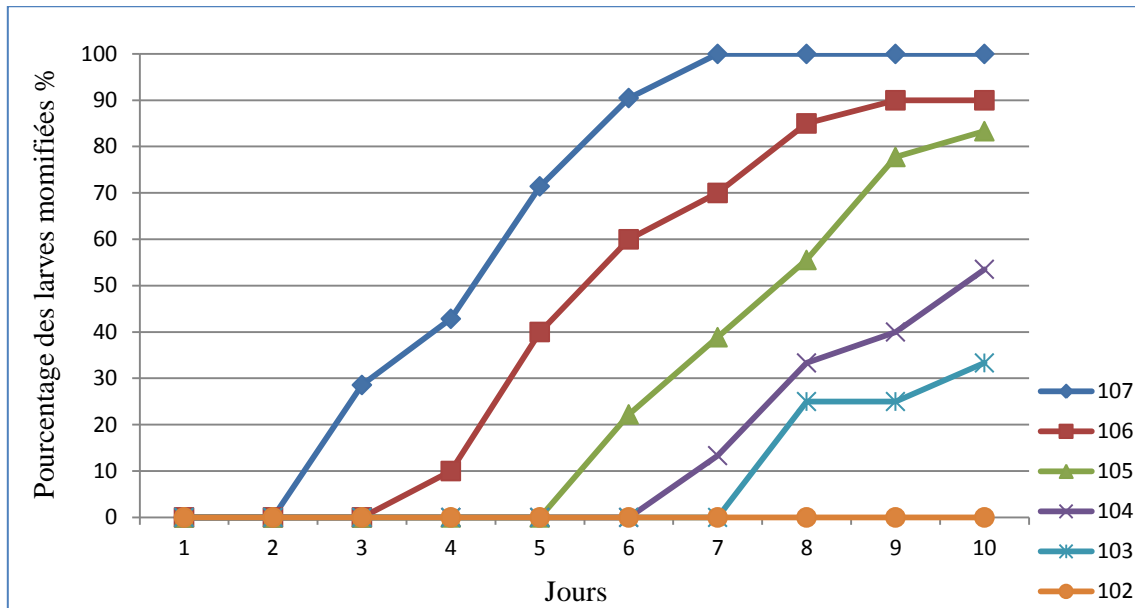


Figure 71 : Formation de la muscardine blanche sur les larves infestées par l'entomopathogène BV6

Il est reconnu que la mortalité des insectes infectés par les champignons entomopathogènes dépend du nombre de spores entrant en contact avec l'insecte (Steinkraus, et Tugwell, 1997). Nos résultats ont démontré que la mortalité et la momification des larves de *T. absoluta* augmentent avec la concentration de chacun des deux *Beauveria* sp. utilisées. La concentration la plus élevée (10^7 spores/ml) de BV6 a causé 100 % de mortalité le cinquième jour (Figure 65). Deux jours après, une momification de la totalité des larves a été observée (sept jours après inoculation) (Figure 71). Pour les deux entomopathogènes BV1 et BV6, les cadavres des larves issues de la faible dose (10^2 spores/ml) n'ont pas sporulé, cela peut être dû aux faibles quantités de spores reçus par rapport à leurs poids (Steinkraus, et Tugwell, 1997).

CONCLUSION

Les entomopathogènes appartenant au genre *Beauveria* occupent une place privilégiée parmi les agents microbiens de lutte biologique. En effet, leur mode d'action par ingestion ou par contact leur confère un avantage puisqu'ils pourraient être utilisés pour lutter contre des populations des différents stades de développement d'un même ravageur (Coderre et Vincent, 1992). Les tests de pathogénicités des huit entomopathogènes autochtones (BV1, BV2,

BV3, BV4, BV5, BV6, BV7 et BV8) affirment leur efficacité vis-à-vis des larves de *T. absoluta* et montrent leur appartenance à deux groupes différents. Les champignons BV1, BV3, BV4, BV5 et BV7 du premier groupe ont causé une mortalité inférieure à 82%, alors que les *Beauveria* sp. du deuxième groupe (BV2, BV6 et BV8) ont éliminé la totalité des larves.

Les résultats obtenus sous l'effet de la température, font ressortir que la température de 25°C représente l'optimum thermique de la croissance des huit *Beauveria* sp. L'étude approfondie des entomopathogènes BV1 et BV6 indique que BV6 est le plus actif et le plus rapide à éliminer les larves de *T. absoluta*. La comparaison des DL 50 a permis de classer les deux *Beauveria* sp. en fonction de leur virulence : $10^{2,97}$ spores/ml (BV6) < $10^{4,69}$ spores/ml (BV1). Ce qui démontre que l'entomopathogène BV6 est plus efficace puisqu'il a causé 50% de mortalité avec une concentration de $10^{2,97}$ spores/ml en cinq jours seulement ; alors que BV1 a éliminé la moitié des larves avec $10^{4,69}$ spores/ml en neuf jours. La différence entre la virulence des champignons entomopathogènes peut être attribuée à la spécificité de la variabilité génétique (Feng et Johnson, 1990)

Chapitre V

Caractérisation génétique des isolats entomopathogènes

INTRODUCTION

Au stade actuel, les tests effectués ont démontré la possibilité du contrôle biologique des populations de *Tuta absoluta* par l'utilisation des entomopathogènes isolées. Ces derniers appartenant au genre *Beauveria*, leur identification moléculaire par l'amplification des régions ITS est considérée comme une étape préliminaire pour approfondir les recherches avant d'envisager une utilisation sur le terrain de ces entomopathogènes. C'est dans ce sillage, que nous avons peaufiné les recherches en commençant par l'évaluation de la structure génétique des isolats en étudiant le facteur d'élongation 1-alpha (EF1- α) et les introns dans le gène du grand ARN ribosomique (LSU rDNA). Ensuite la diversité génétique a été examinée en amplifiant les inter-microsatellites (ISSR), en analysant les séquences nucléotidiques de deux locus des régions intergéniques mitochondriales et en utilisant des marqueurs microsatellites (SSR).

I. Matériel et méthodes

Les travaux présentés dans ce chapitre ont été réalisés à la Faculté des Sciences d'Angers dans le laboratoire « Pathologie Végétale », au sein de l'Equipe « FungiSem » sous la direction de M. SIMONEAU Philippe professeur à l'université d'Angers.

I.1 Identification moléculaire des isolats

Les caractères morphologiques des champignons sont insuffisants pour identifier les isolats. Le recours aux techniques de biologie moléculaire est nécessaire pour caractériser avec précision les agents entomopathogènes. La technique consiste à amplifier des régions génomiques à l'aide de l'amplification en chaîne par polymérisation de l'ADN *in vitro* (PCR). Cette technique d'amplification génique permet d'obtenir un très grand nombre de copies d'une séquence d'ADN, de visualiser et manipuler ces régions plus aisément (Seifert, 2009).

Le choix de la région génomique à amplifier a été effectué comme suit; les séquences doivent posséder des régions conservées pour créer des amorces de PCR universelles et doivent contenir des régions suffisamment divergentes pour discriminer une espèce d'une autre.

L'identification des souches a été réalisée suite à l'analyse des régions ITS, des introns dans le gène du grand ARN ribosomique et du facteur d'élongation en utilisant des amorces spécifiques à chaque analyse (Tableau 12).

Tableau .12 : Séquences oligonucleotidiques des paires d'amorces utilisées pour l'identification des *Beauveria* sp. isolées.

Amorces	Régions amplifiées	Séquences
ITS1	Espaceur intergénique transcrit (ITS)	5' TCC CGT AGG TGA ACC TGC GG ^{3'}
ITS4		5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC ^{3'}
teflfw	Facteur d'élongation (EF1- α)	5' GTG AGC GTG GTA TCA CCA ^{3'}
1750-R		5' GAC GCA TGT CAC GGA CGG C ^{3'}
I29	Introns dans le gène du grand ARN ribosomique (LSU rDNA)	5' CTG CCC AGT GCT CTG AAT GTC ^{3'}
M1		5' GGT AAA ACT AAC CTG TCT CAC G ^{3'}

I.1.1 Extraction de l'ADN fongique

I.1.2 Préparation du mélange réactionnel

I.1.3 Amplification de l'ADN fongique

I.1.3.1 Espaceur intergénique transcrit (ITS)

I.1.3.2 Facteur d'élongation (EF1- α)

I.1.3.3 Introns dans le gène du grand ARN ribosomique (LSU rDNA)

I.1.4 Révélation des produits d'amplification

I.1.5 Purification des produits PCR

I.1.6 Séquençage

I.1.7 Analyse bioinformatique

Les séquences nucléotidiques, obtenus au cours du séquençage ont été rapportées dans la banque de gènes (Genbank) en utilisant NBCI le programme BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>), afin de trouver des régions ayant des zones de similitude pour identifier nos isolats. Ensuite les arbres phylogénétiques ont été construits en utilisant une analyse de phylogénie moléculaire (http://www.phylogeny.fr/simple_phylogeny.cgi).

I.2 Recherche du polymorphisme des souches entomopathogènes

Les variations observées de l'activité insecticide des *Beauveria* sp. peuvent être expliquées par une spécificité de virulence des isolats vis-à-vis de l'insecte hôte. Ces variations peuvent être associées à des caractéristiques génétiques de certaines souches. Pour vérifier cette hypothèse différentes méthodes de typage moléculaire ont été utilisées afin d'étudier le polymorphisme génétique des souches indigènes. Elles reposent sur le principe de réaction de polymérisation en chaîne (PCR) et sur l'utilisation des marqueurs.

- L'utilisation des marqueurs ISSR (Inter Simple Sequence Repeat)
- L'étude de deux locus des régions intergéniques mitochondriales
- L'utilisation des marqueurs microsatellites (SSR) et analyse sur séquenceur capillaire

I.2.1 Utilisation des marqueurs ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*)

I.2.1.1 Amplifications inter-microsatellites (ISSR)

Tableau 13: Séquences nucléotidiques des amorces ISSR utilisés pour la recherche de variabilité génétique de BV1 et BV6. **B** = C,G,T; **D** = A,G,T; **R** = A,G; **V** = A,C,G.

Amorces	Séquences
F1	(CA) ₈ RT
F2	(GA) ₈ TG
F3	GTV (TC) ₈
F4	DBD (AC) ₈

I.2.2 Analyse de l'ADN mitochondrial

I.2.2.1 Amplification

Tableau 14 : Amorces des régions intergéniques mitochondriales et leur séquence nucléotidique

Amorces	Régions amplifiées	Séquences
atp6F	région intergénique mitochondriale (atp6-rns)	5' TTT ATA ATA ATG TTC TCA GG ^{3'}
rnsR		5' AGA GCC ATC ACC AAA CTC AAC ^{3'}
nad3F	région intergénique mitochondriale (nad3- atp9)	5' GAA TTA GGT AAA GGA GCC ^{3'}
atp9R		5' GAG AAT AAT TGG TTT TTT AAT C ^{3'}

I.2.3 Analyse de microsatellites

I.2.3.1 Amplification et marquage

I.2.3.2 Génotypages des microsatellites

Tableau 15 : Paires d'amorces utilisées pour l'amplification des loci microsatellites dans *Beauveria bassiana* (Meyling et al (2009))

Nom de locus	Motif répété	Couple d'amorces (5'-3')
Ba08	AAG	F: TGTTGCCGACACGAATTGT
		R: GGCTCAAGCGCAAAGAGAAA
Ba12	CTT	F: GGGTCCATCATGTACGGC
		R: AGGCGTATACAGGTCGTG
Ba13	AAG	F: CAGGCAACAACACGATTTCA
		R: ATGCCATCTACGACTTTATGA
Ba14	AAG	F: TTGCTATCCCAATAACCAATA
		R: GCAAGAGCTGGATGAGAC
Ba17	AAG+AGG	F: ATGACTAGCAGGACTGCG
		R: ATATTCATCTTTGCAGGTGGC
Ba18	GTT	F: TCGTCCAAGTGTGCTTTAC
		R: CATGATTTTTACCTTGAGGAA
Ba21	GTG+GTC	F: ACGAGTATTGGTGTGGGTA
		R: GCAACACAACGCCCAAG
Ba22	AAG	F: GAAAAAGGCCCGCAGCAAC
		R: CCTCGTGAATCTCGGTCAG
Ba23	AAG	F: CGTACGACGTTTCCTAAAGAA
		R: TGGAAACTGTTTGGGATTGGA
Ba24	AAG	F: TCAACATGCAATATAGCTGGT
		R: CCATCTTGCTCCAGTATCC
Ba25	AAG	F: GACGGGGGCAGGGAACG
		R: CTCTGATTGACCGTTTTGGT
Ba26	AAG+AAG	F: AAGGGAAAGAGGAGGACGA
		R: CCAAACGCACCACATAAAGT
Ba27	GTT	F: CATGAGACGGTGTGGGAAG
		R: AAACGCCGTTCTCCAAGACT
Ba29	AAGC	F: GAAAAAGGCCCGCAGCAAC
		R: CCTCGTGAATCTCG

II. Résultats et discussion

II.1 Identification moléculaire des isolats

Figure 72 : Dendrogramme représentant la région codante pour le facteur d'élongation

Figure 73 : Migration des produits PCR (BV1, BV2, BV3, BV4, BV5, BV6, BV7 et BV8), utilisant les amorces I29 et M1. T⁽⁻⁾ : mélange sans ADN et M: marqueur de taille.

II.2 Recherche du polymorphisme des souches entomopathogènes

II.2.1 Utilisation des marqueurs ISSR

Figure 74: Empreinte génomique PCR/ISSR de deux souches entomopathogènes BV1 et

II.2.2 Analyse de l'ADN mitochondrial

Figure 75: Arbre phylogénétique de la région intergénique mitochondriale (nad3- atp9)

Figure 76: Arbre phylogénétique de la régions intergénique mitochondriale (atp6-rns)

II.2.3 Analyse des microsatellites

Figure 77 : Migration des produits PCR de BV1 en utilisant les deux marqueurs fluorescents HEX et FAM

Figure 78 : Chromatogramme obtenu à partir du programme GeneMapper™ Sostwarev3,5 du produit PCR de la souche BV1, utilisant les amorces Ba13F et Ba13R et marqueur HEX

Figure 79 : Chromatogramme obtenu à partir du programme GeneMapper™ Sostwarev3,5 du produit PCR de la souche BV1, utilisant les amorces Ba25F et Ba25R et marqueur FAM

CONCLUSION

Au travers des outils moléculaires utilisés dans ce chapitre il a été possible d'identifier les souches entomopathogènes isolés; les analyses des régions ITS et du gène de facteur d'élongation indiquent qu'il s'agit de *B. bassiana*. L'absence des introns dans le gène du grand ARN ribosomique montre que nos souches sont des *B. bassiana (pseudobassiana)*. L'étude de deux locus des régions intergéniques mitochondriales (NAD3 et ATP6) a confirmé cette identification. Le locus NAD3 de toutes les souches été identique à celui des *B. bassiana* figurant dans le clade C. Des résultats similaires ont également été obtenus par Rehner et Buckley (2005), qui ont montré que les souches de *B.bassiana (pseudobassiana)* et *B. bassiana* (clade C) possèdent la même information génétique.

L'accès à la variabilité intra-spécifique des huit isolats des entomopathogènes autochtones a été vérifié par l'utilisation des marqueurs suivants : les inter-microsatellites (ISSR), l'ADN mitochondrial et les marqueurs microsatellites (SSR).

Les gels obtenus après migration électrophorétique des produits PCR ISSR des ADN génomique des souches BV1 et BV6 montre une dissimilitude de taille entre les bandes pour la majorité des couples d'amorces testés. Ces différences traduisent l'existence d'une diversité génétique entre ces deux entomopathogènes autochtones.

Le séquençage des produits PCR amplifiés avec le couple d'amorces *atp6 / rns* confirme les résultats précédents et révèle un polymorphisme chez les huit souches de *B. bassiana* (*pseudobassiana*) avec deux groupes distincts. Le groupe A correspond aux souches BV1, BV3, BV4, BV5 et BV7, alors que le groupe B correspond aux souches BV2, BV6 et BV8. Cette diversité génétique peut expliquer la différence de la virulence des huit souches vis-à-vis des larves de *Tuta absoluta*.

Conclusion générale

Conclusion générale

Le présent travail représente une étude d'un ravageur de la culture de la tomate, qui ne cesse de causer des dégâts spectaculaires depuis son introduction en Algérie en 2008.

L'extraction des génitalia du phytophage réalisée dans le cadre de cette thèse a permis de l'identifier comme étant *Tuta absoluta* Meyrick (Lepidoptera: Gelechiidae).

L'étude de la dynamique des populations de *T. absoluta* sous serre, sur deux années consécutives (2012 et 2013) a été entreprise dans le but de suivre les fluctuations des populations de cet insecte sur la culture de la tomate dans la serre située à l'atelier agricole de l'université de Mostaganem. Cela a permis de formuler un certain nombre de conclusions.

- La mineuse de la tomate présente des effectifs importants durant la période printanière, à cause de la présence des conditions écologiques et nutritionnelles favorables au développement de cet insecte nuisible.
- Le taux d'infestation de cette espèce est important et a atteint 100% la première année d'étude et 80% la seconde avec une préférence de ponte sur la face inférieure des folioles. Au début des contaminations, l'étage foliaire inférieur est le plus attaqué, mais lorsque le taux d'infestation dépasse 50%, les étages foliaires apicaux et intermédiaires des plants de tomate sont les plus infestés.
- L'étude de la distribution des différents stades évolutifs de *Tuta absoluta* met en exergue, l'accroissement rapide des populations dans l'espace et dans le temps, et témoigne que la densité des populations dépend essentiellement de la température et des réserves végétales en l'occurrence l'abondance des feuilles vertes.
- Les observations concernant l'évolution des générations de *T. absoluta*, ont permis de mettre en évidence la succession de trois générations en 2012, alors que pour l'année 2013, seulement deux générations ont été repérées.
- L'étude de la dynamique des populations de *T. absoluta* a permis également de déduire les taux de mortalité naturelle (tous facteurs confondus) et de parasitisme de ce ravageur. Les observations montrent que, la mortalité naturelle a dépassé les 16 %, tandis que la mortalité due au parasitisme était faible, atteignant un maximum de 4.41 % en 2013. Les larves parasitées apparaissent de Mars à Mai, lorsque les températures varient entre 20 et 28°C ; où le climat est favorable pour l'activité des parasitoïdes.
- L'inventaire de la faune auxiliaire de *T. absoluta* a révélé la présence de deux punaises prédatrices appartenant à la famille de Miridae (*Nesidiocoris tenuis* et *Macrolophus* sp.)

et de deux espèces de parasitoïdes inféodées au ravageur (*Necremnus artynes* et *Diglyphus isaea*). *N. artynes* est l'espèce la plus abondante.

La recherche des entomopathogènes autochtones a permis d'isoler un certain nombre de bactéries et de champignons à partir des cadavres de la mouche mineuse (*L. huidobrensis*), de la mineuse de la tomate (*T. absoluta*) et du ver blanc (*G. deserticola*). La majorité des bactéries identifiées sont des bacilles à Gram négatif et la mycoflore isolée est représentée par les genres *Rhizopus*, *Beauveria*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* et *Ulocladium*.

Le test de pathogénécité a permis de ne garder pour la suite de l'étude que les huit isolats de *Beauveria* sp. ayant présenté une virulence certaine, les autres isolats se développent d'une manière saprophyte sur les insectes.

L'évaluation de l'activité larvicide des huit entomopathogènes autochtones montre leur appartenance à deux groupes différents. Les champignons BV1, BV3, BV4, BV5 et BV7 du premier groupe ont causé une mortalité inférieure à 82%, alors que les *Beauveria* sp. du deuxième groupe (BV2, BV6 et BV8) ont éliminé la totalité des larves. Cela démontre que ces souches présentent une efficacité intéressante vis-à-vis des larves de *T. absoluta* et peuvent être considérés comme des entomopathogènes susceptibles d'être préconisés dans le cadre de la lutte biologique contre ce redoutable phytophage.

L'étude approfondie des *Beauveria* sp. BV1 et BV6 indique que l'entomopathogène BV6 est le plus actif et le plus rapide à éliminer les larves de *T. absoluta*. Il a causé 50% de mortalité avec une concentration de $10^{2,97}$ spores/ml en cinq jours seulement ; alors que le champignon BV1 a éliminé la moitié des larves avec $10^{4,69}$ spores/ml en neuf jours.

D'autre part, l'emploi des entomopathogènes dans l'environnement doit nécessairement être assujéti à une connaissance profonde des isolats permettant une identification précise. L'outil moléculaire applicable au niveau de l'ADN a permis d'établir une signature génétique des huit *Beauveria* sp. isolés. Les analyses des régions ITS et du gène de facteur d'élongation indiquent qu'il s'agit de *Beauveria bassiana*. L'absence des introns dans le gène du grand ARN ribosomique montre que nos souches sont des *Beauveria bassiana* (*pseudobassiana*).

L'accès à la variabilité intra-spécifique des huit champignons entomopathogènes a été vérifié par l'utilisation des marqueurs suivants : les inter-microsatellites (ISSR), l'ADN mitochondrial et les microsatellites (SSR). L'étude des ISSR montre une dissimilitude de taille entre les bandes pour la majorité des couples d'amorces testés sur BV1 et BV6. Ces

différences traduisent l'existence d'une diversité génétique entre ces deux champignons autochtones. L'analyse des deux loci des régions intergéniques mitochondriales confirme que les huit souches d'entomopathogène étudiées, sont des *Beauveria bassiana*. (*pseudobassiana*). Le locus NAD3 de toutes les souches été identique à celui des *B. bassiana* figurant dans le clade C et le locus ATP6 révèle un polymorphisme chez les huit souches de *B. bassiana* avec deux groupes distincts.

Ces différences traduisent l'existence d'une diversité génétique entre les entomopathogènes autochtones étudiés. Ce polymorphisme génétique corrobore les résultats du test de pathogénicité en révélant l'existence de deux groupes différents en matière de virulence.

Références bibliographiques

- Ahmed S. I. et Lathif S. R., 1994.** Suitability and potential of entomopathogenic microorganisms for forest pest management - some points for consideration. *Intern. J. Pest Management* 40: 287-292.
- Aimé M.C., Matheny P.B., Henk D. A., Fridfers E.M., Nilsson R. H., Goethé J.W., McLaughlin, D. J. et Szabo, L.J., 2006.** An overview of the higher level classification of *Puccinia mycotina* based on combined analyses of nuclear large and small subunit rDNA sequences. *Mycologia*, 98(6), 2006, pp. 896–905.
- Ainsworth A., 1983.** Dictionary of the fungi (7th edition).- Commonwealth Micological Institute : Surrey (UK), 445p.
- Alexopoulos C.J., Mims C.W. et Blackwell M., 1996.** Introductory Mycology. John Wiley and Sons, New York. 869p.
- Allaché F., Houhou M.A., Osman L., Naili L. et Dëmnati F., 2012.** Suivi de l'évolution de la population de *Tuta absoluta* Mëyrick (Gëlfchiidaé), un nouveau ravageur de la tomate sous serre à Biskra *Entomologie Faunistique*, 65:149-155
- Amazouz S., 2008.** Gestion en lutte intégrée de la mineuse de la tomate, koppert biological systèmes, Maroc, 18p.
- Anderson D.L., Gibbs A. J. et Gibson N. L., 1998.** Identification and phylogeny of spore-cyst fungi (*Ascosphaera* spp.) using ribosomal DNA sequences. *Mycol. Res.*, 102, 541-547.
- Arno J. et Gabbara R., 2010.** Resultados de las experiencias de control biológico de la pillila del tomate en cultivo de invernadero y aire libre en cataluña. *phytoma España* 217 :65-68.
- Baci L., 1995.** Les contraintes au développement du secteur des fruits et légumes en Algérie : faiblesse des rendements et opacité des marchés, éd. CIHEAM. *Options Méditerranéennes, Série. B / n°14*, pp : 265-277.
- Badaoui M.I. et Bërkani A., 2010.** Morphologie et comparaison des apparils génitaux de deux espèces invasives *Tuta absoluta* Mëyrick 1917 et *Phthorimaea operculella* Zëllër 1873 (Lépidoptëra: Gëlfchiidaé). *Faunistic Entomology* 63(3), p. 191-194
- Badaoui M.I., Bërkani A. et Lotmani B., 2011.** Les entomopathogènes autochtones, nouvel espoir dans le contrôle biologique de *Tuta absoluta* Mëyrick 1917 (Lépidoptëra: Gëlfchiidaé) en Algérie, *Entomologie faunistique – Faunistic Entomology* 2011 (2010) 63 (3), 165-169
- Balachowsky A.S., 1966.** Traité d'entomologie appliqué à l'agriculture- lépidoptères. tome 2, vol.1, p 350- 384. Masson, Paris.
- Balazy S., 1993.** Flora of Poland (Flora Polska), Fungi (*Mycota*) 24, 1-356. Polish Acad. Sci., W. Szafër Inst. Botany, Krakow.
- Barnett H.L. et Hunter B.B., 1977.** Illustrated genera of imperfect fungi. *Second Edition. Burgess Publishing Co* 180 P.
- Barrientos Z.R., Apablaza H.J., Norero S.A. et Estay P.P., 1998.** Threshold temperature and thermal constant for development of the southamerican tomato moth, *Tuta absoluta* (Lép. : Gëlfchiidaé). Département de Ciencia Vëgetal, Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal, Pontificia Universidad Católica de Chile. *Ciencia Investigación Agraria*, Vol.25, N°3, Pp.133-137.
- Batalla-Carrera L., Morton A. et Garcia-del-Pino F., 2010.** Efficacy of entomopathogenic nematodes against the tomato leafminer *Tuta absoluta* in laboratory and greenhouse conditions. *Biocontrol* 55, p. 523-530.
- Bèauvërié J., 1911.** Notes sur les Muscardines. Sur une muscardine du ver à soie, non produite par le Botrytis bassiana. Étude du *Botrytis Effusa* sp. nov. Rapp. Comm. administratif du lab. d'études de la soie, Lyon, 14: 5-31.

- Bénjamin R.K., Blackwell M. et Chapela I.H., 2004.** Insect and other arthropod-associated fungi, In: Müller GM, Bills GM., and Foster M.S; Biodiversity of fungi: inventory and Monitoring Methods, pp.395-433, Amsterdam press.
- Bensaad R., 2011.** Lutte intégrée contre la minuscule de la tomate, *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lep: Gélechiidae), mémoire de fin d'étude pour l'obtention du diplôme de magister, université de Mostaganem.
- Benz G., 1987.** Environnement. In: Épidémiologie et phylogénie des insectes nuisibles (Fuxa JR, Tanada Y eds) John, Wiley and Sons, New York, 177-214
- Berkani A., 1989.** Possibilités de régulation des populations d'*Alfurothrixus floccosus* Mask. (Homoptera: Alfurodidae) sur agrumes par *Calles noacki* How (Hyménoptera, Aphelinidae) en Algérie. Thèse de doctorat. Université Aix-Marseille III, France, 140 p.
- Berkani A., 1995.** Apparition en Algérie de *Phyllocnistis citrella* Stainton, chenille minuscule nuisible aux agrumes. *Fruits*, 50 : 347-352.
- Berkani A. et Badaoui M.I., 2008.** La minuscule de la tomate *Tuta absoluta* Meyrick 1917 (Lépidoptera: Gélechiidae). *Annales de l'Institut National de la Recherche Agronomique d'Algérie*, Juillet 2008. pp 16.
- Bessadat N., 2014.** Isolation, identification et caractérisation des *Alternaria* sp. responsables de la détérioration des plantes maraichères par des systèmes enzymatiques et moléculaires. Thèse de doctorat pour l'obtention du diplôme de doctorat LMD, université d'Oran . Algérie, 199 p.
- Bessé S., Crabos L. et Panchaud K., 2013.** Le champignon *Blaeuveria bassiana* : une solution biologique contre le charançon rouge du palmier—Résultats d'efficacité de deux souches en France et en Espagne. *Annales du colloque méditerranéen sur les ravageurs des palmiers*. Nice, 16 au 18 janvier 2013. 285-292.
- Bischoff J.F., Rahn S.A. et Humbert R.A., 2009.** A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. *Mycologia*, 101, 512-530.
- Biurrun., 2008.** *Tuta absoluta* la polilla del tomate, Ed. i.t.a.Agricola, pp :16-18.
- Blackwell M., Hibbett D.S., Taylor J.W. et Spatafora J.W., 2006.** Research coordination networks: a phylogeny for the kingdom Fungi (Dép Hypha). *Mycologia*, 98, 829-837.
- Blackwell M., 2010.** Fungal evolution and taxonomy. *BioControl*, 55,7-16.
- Blancard D., 1988.** Maladies de la tomate. Observateur, Identifier, Lutter. Ed. Inst Nat. Rech. Agr. Paris. 212 p.
- Blancard D., Latrrot H., Marchoux G. et Candresse T., 2009.** Les maladies de la tomate: identifier, connaître, maîtriser: Versailles, FRA : Éditions Quae, 750 p.
- Boffmar N., Laumond C., Maulon H. 1996.** The entomopathogenic nematode-bacterium complex: biology, life cycle and vertebrate safety. *Biocontrol Science Technology*, 6: 333–346.
- Bogorni P.C., Silva R.A. et Carvalho G.S., 2003.** Leaf mesophyll consumption by *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) (Lépidoptera : Gélechiidae) in three cultivars of *Lycopersicon esculentum* Mill. *Ciencia rural*, Santa Maria : V23 n°1 Janv.Févr., 7-11.
- Boualem M., 2010.** Étude bioécologique de *Phyllocnistis citrella* Stainton (Lépidoptera : Gracillariidae) et de son complexe parasitaire dans la région de Mostaganem." Thèse de doctorat ; université de Mostaganem.200 p.
- Boualem M., Allaoui H., Hamadi R. et Médjahed M., 2012.** Biologie et complexité des ennemis naturels de *Tuta absoluta* à Mostaganem (Algérie) *Bulletin OEP/EPPO Bulletin* (2012) 42 (2), 268-274 ISSN 0250-8052. DOI : 10.1111/bpp.2570
- Bourdon J.L. et Marchal. N., 1973.** Biologie appliquée- Techniques bactériologiques. Ed Doin . Paris. 335p.
- Burgess, H. D., 1981** : Microbial Control of Pests and Plants Diseases 1970-1980. Academic Press, London , N.Y., 949p.

- Butt T.M., 1990.** Fungal infection provéssus. A mini rfvíw “ Vth Int. Colloq. Invértébr. Pathol. Adflaidé. Soc. for Invértébr. Pathol. Pp 212-214
- Butt T.M. et Békétt A., 1994.** Structural studifs on thé infection procéssés of éntomogénus fungi “. International colloquium for Invértébr. Pathol. August 28th-Sépt 2nd, 1994., montpéliér, Francé. Procédings, p 311-314
- Cagani L. et Svérsl M., 2001.** Thé influéncé of ultraviolet light on pathogénicity of éntomopatogénic fungus *Béauvéria bassiana* (Balsamo) Vuillémin to thé éuropéan corn Borér, *Ostrinia nubilalis* (Lépidoptéra: Crambidaé). J Céntral éur Agric, 2: 3-4.
- Campos R.G., 1976.** Control quimico dél minador dé hojas y tallos dé la papa (*Scrobipalpula absoluta*, Méyrick) én él vallé dél Cancté. Rév. Pér. *Entomol.* 19:102-106.
- Carruthérs R.I., Robson D.S. et Robérts D.W., 1985.** In vivo témpératuré-dépendént dévlopmént of *Béauvéria bassiana* (Déutómycotina: Hyphomycétés) mycosis of thé éuropéan corn borér, *Ostrinia nubi-Ialis* (Lépidoptéra: Pyralidaé). *J Invértébr Pathol* 46, 305-311
- Carvalho G.A., Réis P.R., Rocha L.C.D., Morafs J.C., Fuini L.C et écolé C.C., 2003.** Sid-éffécts of insécticidés uséd in tomato fiélds on *Trichogramma prétiosum* (Hy ménoptéra : Trichogrammatidaé). *Acta Sciéntiarum. Agronomy. Maringá, v. 25, no. 2, p. 275-279.*
- Céch T.R., 1988.** Consérvéd séquéncés and structurés of group I introns: building an activé sité for RNA catalysis. *Géné* 1988, 73:259-271.
- Chabassé D., Bouchara-J-P., Géntilé L., Brun S., Cimon B. et Pénn P., 2002.** Cahifér dé formation , Biologié médicalé- Lés moisissurés d'intérét médical, N° 25 , Mars. éd Bioforma. Paris. 157pp.
- Chavérri P., Liu M. et Hodgé K.T., 2008.** A monograph of thé éntomopathogénic généra Hypocrélla, Mollériélla, and Samuélisia gén. nov. (Ascomycota, Hypocréfalés, Clavicipitacfaé), and thér Aschérsônia-liké anamorphs in thé Néotropics. *Stud. Mycol.*, 60, 1-66.
- Clarkson J.M. et Charnléy A.K., 1996.** Néw insights into thé méchanisms of fungal inséct pathogénésis in insécts. *Trénds Microbiol.*, 4, 197-203.
- Codérré D. et Vincént C., 1992.** La lutté biologiqué: toilé dé fond dé la situation. In : La lutté biologiqué. Vincént, C él Codérré, D (éds.). Gaétan morin, 3-16.
- Coélho M. et França F.H., 1987.** Biologia, quétotaxia da larva é déscrição da pupa é adulto da traça do tomatéiro. *Pésquisa Agropécuária Brasiléira, v.22, n.2, p.129- 135.*
- Collavino M.D. et Giméñéz R.A. (2008).** éfficacy of imidacloprid to control thé tomato borér (*Tuta absoluta* Méyrick). *Idésia (Chilé)* 26(1), p. 65-72.
- Colomo M.V. et Bérrta M.C., 1995.** Fluctuacion dé la poblacion dé *Scobipalpula absoluta* (Méyrick) (Lépidoptéra: Gélféchiidaé) én plantacionés dé tomaté én él Départéménto dé Lulés, Tucuman. *Acta Zool. Lilloana* 43:165-177.
- Corbaz R., 1990.** Principés dé phytopathologié et dé lutté contré lés maladiés dé plantés, Publié par PPUR préssés polytéchniqués, 1990 ISBN 2880742013, 9782880742010, 286 p.
- Cornia M.B. et Béatriz M.D., 2004.** Pathogénicity of hyphomycétés fungi against *Cyclocéphala signaticollis*. *Bio-Control* 00: 1-8, 2004. Kluwér Académicé PubJishérs. Printéd in thé Néthérlands.
- Couch J.N., 1938.** Thé génus Séptobasidium. Chapél Hill: Univérsity of North Carolina Préss. 484p.
- Cross W. H., Mosér J.C. et Rack G., 1981.** Somé néw forms of *Pyémotés* (Acarina: *Pyémotidaé*) from forést insécts, with rémarks on polymorphism. *Intérnat. J. Acarol.*, 7, 179-196.
- Cross W.H., McGovérn H.W. et Cross é.A., 1975.** Inséct hosts of parasitic mités calléd *Pyémotés véntricosus* (Néwport). *J. Ga. Entomol. Soc.*, 10, 1-8.
- D.S.A, 2013 :** Diréction dés sérvicés agricolés dé la wilaya dé Mostaganém, donnéés statistiqué dé l'annéé 2013. Sérvicé dé statistiqué.

- DAJOZ R., 1985.** *Précis d'écologie*. Paris, Dunod Université, 505 p.
- Déhliz A., Lakhdari W., Soud A., Hammi H., Bouchekima H. et Bélaidi M., 2013.** Complex of natural enemies and control methods of the exotic invasive pest *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) in Southern Algeria. CTAB-ISOFAR-MOAN Symposium on crop protection management in Mediterranean agriculture. 14-16 May 2013, Souss, Tunisia (Book of abstracts), p. 48.
- Déhliz A., 2015.** Étude des potentialités des entomophages autochtones en vue de lutter contre le nouveau ravageur de la tomate *Tuta absoluta* Meyrick (Gelechiidae) dans la région du sud-est algérien. Thèse de doctorat ; université de Mostaganem, Algérie, 72 p.
- Dékouassi M., 2001.** Les possibilités de la lutte microbiologique. L'accent sur le champignon entomopathogène *B. bassiana*. Vingt-troisième : vol 2 ; n° 2.
- DÉMOL J., BAUDOIN J., LOUANT B., MARÉCHAL R., MÉRGEAI G. et OTOUL J., 2002.** Amélioration des plantes ; application aux principales espèces cultivées en régions tropicales. Ed. Les presses agronomiques de Gembloux, ASBL. Belgique. 105 p.
- Désmas S., 2005.** Analyse comparative de compétitivité : le cas de la filière tomate dans le contexte Euro-méditerranéen. Thèse Ing. Agr., Inst. Agr. Méditerranéen. Montpellier. France. pp 10.
- Désnoux N. et Tabone J., 2010.** Results and start up of Integrated protection against *Tuta absoluta* in France. 1st International phytoma-Spain encounter on *Tuta absoluta* Tomato leaf miner, a serious problem in expansion Valencia, 23rd and 24th March 2010. *phytoma* n°27. pp114-115.
- Donnio P.Y., Le Déaut P., Schuttler, C. et Avril L.J., 1987.** Caractérisation et signification clinique des souches de *Bacillus* isolés par hémocultures. *Méd. Mal. Infect.*, 11: 110-112.
- Doré T., Rogier-Strade J., Le Bail M., et Nèy B.M.P., 2006** : L'agronomie aujourd'hui, Quae eds. 384p.
- Driver F., Milner R. J. et Truman J.W.H., 2000.** A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. *Mycol. Res.*, 104, 134-150.
- Dubon , 2010** : Tout resté à tester sur *Tuta absoluta*. Réussir fruits et légumes, n°291
- Dunphy G.B. et Tibellius K.H., 1992.** Les progrès biotechnologiques augmentant l'efficacité de *Bacillus thuringiensis* et de *Bacillus sphaericus* en tant qu'insecticide microbien. In la lutte biologique, sous la direction de C. Vincent et D. Codrè, pp. 305-322. Chicoutimi, Québec, Canada. Gaetan Morin éditeur Ltée.
- EPPO, 2008.** Eppe reporting service-pests and Diseases, n°7, 17p.
- EPPO, 2009.** Eppe reporting service-pests and Diseases, n°10, 24 p.
- EPPO, 2011.** First report of *Tuta absoluta* in Bulgaria. EPPO Reporting Service, 1(02): 2.
- Estay P.P et Bruna A., 2002.** Insectos, ácaros y enfermedades asociadas al tomate en Chile. Santiago, INIA Centro regional de investigación, La plata. 111p.
- Estay P.P., 2000.** Pollina del tomate *Tuta absoluta* (Meyrick). I.N.I.A La Platina (9) :1-4.
- FAOSTAT., 2013.** Statistical data base (<http://www.fao.org/corp/statistics/fr>, 01/12/2015)
- Faucher J., 1997.** Bactériofages, Techniques en bactériologie clinique. Ed Ellipses marketing. Paris. 180pp.
- Feng M.G. et Johnson L., 1990.** Relative virulence of six isolates of *Blauxeria bassiana* (Fungi:Hyphomycetes) on the Russian wheat aphid, *Diuraphis noxia* (Homoptera: Aphididae). *Enviro Entomol*, 19: 785-790
- Feng M.G., Poprawski T.J. et Khachatourians G.G., 1994.** Production, formulation and application of the entomopathogenic fungus *Blauxeria bassiana* for insect control: current status. *Biocont. Sci. Tech.* 4: 3-34.
- Ffara M. 2009.** The Food and Environment Research Agency, Ffara confirms the first outbreak in the UK of *Tuta absoluta* – the South American tomato moth. Available at: <http://www.ffra.defra.gov.uk/showNews.cfm?id=402>.

- Fernandez S. et Montagne A. 1990.** Biología del minador del tomate, *Scrobipalpa absoluta* (Meyrick) (Lépidoptera: Grélléchiidae). *Boletín de Entomología Venezolana*. 5(12): 89-99
- Ferreira J.F., Marques J., Marques I.M.R., Oliveira J.V. et Santos Junior, H.J.G., 2005.** Efeito de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin sobre ovos de *Alabama argillacea* (Hübner) (Lépidoptera: Noctuidae). *Magistra* 17 (3), 19–123.
- Ferron P., 1975.** Les champignons, entomopathogènes: évolution des recherches au cours des dix dernières années. *Bull. S.R.O.P.* (3):1-54.
- Ferron P., 1978.** Biological control of insects pests by entomogenous fungi. *Ann. Rev. Entomol.* 23: 409-442.
- Ferron P., 1985.** Fungal Control. In: Comprehensive insect physiology, biochemistry, and pharmacology (Kerkut GA, Gilbert LI, eds) Pergamon Press, Oxford, vol 12, 313-346
- Ferron P., Fargues J. et Riba G., 1991.** Fungi as microbial insecticides against pests. In *Handbook of Applied Mycology*. Humans, animals and insects (Arora, D.K., Ajello, L., Mukerji, K.G., eds.), Marcel Dekker, New York, Vol 2, 665-706
- Filho M. M., Vila F. F., Jhamb G. N., Attygalle A., Svatos A et Meinwald J., 2000.** Initial Studies of Mating Disruption of the Tomato Moth, *Tuta absoluta* (Lépidoptera: Grélléchiidae) Using Synthetic Sex Pheromone ; *J. Braz. Chem. Soc.*, Vol. 11, No. 6, p : 621-628.
- Finnéy D.J., 1971.** Statistical method in biological assay. 2nd edition, London, Griffin, 333p.
- França F.H., 1993.** Por quanto tempo convivermos com a traça do tomateiro? *Hort. Bras* 2, p. 176-178.
- Franck P.L., Garnery, M., Soligna C. et Cornuët J.M, 1998.** The origin of West European subspecies of honeybees (*Apis mellifera*): new insights from microsatellite and mitochondrial data. *Evolution* 52, 1119-1134.
- Fruscianté L., Carli P., Ercolano M.R., Pernicé R., Di Mattéo A., Fogliano V. et Pelligrini N., 2007.** Antioxidant nutritional quality of tomato. *Mol Nutr Food Res* 51, 609-617.
- Gacemi A. et Guénaoui Y., 2012.** Efficacy of imidacloprid Bénézoate on *Tuta absoluta* Meyrick (Grélléchiidae) infesting a protected tomato crop in Algéria. *Academic Journal of Entomology* 5(1): 37-40
- Galarza J., 1984.** Laboratory assessment of some solanaceous plants as possible food plants of the tomato moth *Scrobipalpa absoluta*. *IDIANos*421/424, p. 30-32.
- Garrido-Jurado I., Marquez M., Ortiz-Urquiza A., Santiago-Alvaréz C., Iturriaga J.A., Quisada-Moraga J., Monte J., Hermosa R., 2011.** Genetic analysis places most Spanish isolates of *Blaeuveria bassiana* in a molecular group with world-wide distribution. *BMC Microbiol* 11:84.
- Germain J-F., Lacordaire A.I., Cocquempot C., Ramel J.M. et Oudrad J., 2009.** PHM- revue horticole (04/09), n°512.
- Ghrbi H., Delaruelle C., Sloss M.A., Martin F., 1999.** High genetic diversity in a population of the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria amethystina* in a 150-year-old beech forest. *Molecular Ecology* 8: 2003-2013.
- Ghikas DV., Koufalis V.N., Typas M.A., 2010.** Phylogenetic and biogeographic implications inferred by mitochondrial intergenic region analysis and ITS1-5.8S-ITS2 of the entomopathogenic fungi *Blaeuveria bassiana* and *B.brongniartii*. *BMC Microbiol* 10:174.
- Giové R., Abis A., 2007.** Place de la Méditerranée dans la production mondiale de fruits et légumes. Les notes d'analyse du CIHAM N°23, 22 pp.
- Giustolin T.A., Vendramim J., 1994.** Efeito de duas espécies de tomateiro na biologia de *Scrobipalpa absoluta* (Meyrick). *An. Soc. Entomol. Brasil*, p.p, 511-517.
- Godwin I.D., Aitken J.A.B. et Smith L.W., 1997.** Application of intersimple sequence repeat (ISSR) markers to plant genetics. *Electrophoresis*. 18:1524-1528.

- Gofttél M.S., 1992.** Dfs champignons commf agfnt df lutté biologiquf. In: Pibadam, CAB International, IITA, La lutté biologiquf contré lfs acridifns, Nigéria, p. 122-131.
- González N.ét Robérto H., 1989.** *Inséctos y ácaros df importancia agrícola y cuarénténaria én Chilé* — Santiago : *Univérsidad df Chilé*, 1989 . 310 p.
- Goodwin D.C. ét Lfé S.B., 1993.** Microwavé miniprfp of total gfnomic DNA from fungi, plants, protists and animals for PCR. *Biotéchniqués. 15* : 438-444.
- Grfathéad D.J., Kooyman C., Launois-Luong M.H. ét Popov G.B., 1994.** Lfs énnémis naturfls dfs criqufts du Sahél. éd. Cirad/Prifas, Colléction Acridologié Opérationnellé, Montpéllier, 147p.
- Guénaoui Y., 2008.** Nouvéau ravagéur df la tomaté én Algérié, *Phytoma* : N° 617 Juillét-Aout 2008,p 18-19.
- Gupta A., Chyi Y.S., Roméro-Séverson J. ét Owen J.L., 1994.** Amplification of DNA markérs from évolutionarily divérsé gfnomés using singlé primérs of simplé-séquence rfpéats. *Theoretical and Applied Génétics* 89: 998-1006.
- Haji F.N.P., Olivéira C.A.V., Amorim Néto M.S. ét Batista J.G.S., 1988.** Flutuação populacional da traça do tomatéiro no submédio São Francisco. *Pésquisa Agropécuária Brasiléira, v.23, n.1, p.7-14.*
- Hall R.A., Papiérok B., 1982.** Fungi as biological control agénts of arthropods of agricultural and médical importancé. *Parasitology, 84, 205-240*
- Hall R.D., Brouwer I.D. ét Fitzgérald M.A., 2008.** Plant métabolomics and its poténtial application for human nutrition. *Physiol Plant* 132, 162-175.
- Halling J.L., Wraight S.P ét Millér R.M., 2004.** Efficacy of *Béauvéria bassiana* (Hyphomycétés) for Control of russian whéat aphid (Homoptéra: Aphidáé) on résistant whéat undér fiéld condition. *Biol, Sc, Téchnol. 14:* 459-473.
- Hallswol1H. ét Magan, K.é., 1999.** Hallsworth and N. Magan, Watér and témpérature rlations of growth of thrfé éntomogéneous fungi *Béauvéria bassiana*, *Métarhizium anisopliáé* and *Paécilomyces farinosus*, *J. Invértébr. Pathol, 261-266.*
- Hastuti B.S., Glaré T.R. ét Chapman R.B., 1999.** Efficéct of témpérature and humidity on thé suscéptibility of *Parosis clarybdis* to *Béauvéria bassiana*. Proc. 52nd N.Z. Plant Protéction Conf, 103-107.
- Hawksworth D.L., Sutton B.C., Ainsworth G.C., ét Jamés P.W., 1983.** Dictionnairé df Ainsworth ét Bisby dfs champignons, 7th éd., Commonwealth Mycol.inst., Kéw, Unitéd kingdom.445p.
- Héggéus O.O., Pféifer T.A., Mulyk O.S. ét Khachatourians G.G. 1998.** Caractérisation and structuré of thé mitochondrial small rRNA gfné of thé éntomopathogéne fungus *Béauvéria bassiana*. *Génomé, 41:* 471. 476.
- Hérréro-Sánchez é., Couso J.P., Capdévila J. ét Guérréro I., 1996.** Thé fu gfné discriminatés bétwéén pathways to control dpp éxpréssion in *Drosophila* imaginal discs. *Méch Dév. 1996 Apr;55(2):*159–170
- Hibbét D.S., Bindér M., Bischoff J.F., Blackwéll M., Cannon P.F., ériksson O.é., Huhndorf S., Jamés T., Kirk P. M., Lücking R., Lumbsch H.T., Lutzoni F., Mathény P.B., McLaughlin D. J., Powéll M.J., Rédhéad S., Schoch C.L., Spatafora J.W., Stalpérs J.A., Vilgalys R., Aimé M.C., Aptroot A., Bauér R., Béggérow D., Bénnny G.L., Castlébury L.A., Crous P.W., Dai Y. C., Gams W., Géisér D.M., Griffith G.W., Guéidan C., Hawksworth, D.L., Héstmark G., Hosaka K., Humbér R.A., Hydé K.D., Ironsidé J.é., Kóljalg U., Jyrtznabm C.P., Larsson, K.H., Lichtwardt R., Longcoré J., Miadlikowska J., Millér A., Moncalvo J.M., Mozléy-Standridgé S., Obérwinklér F., Parmasto é., Rééb V., Rogérs J. D., Roux C. ét Whité, M. M.,Winka K.,Yao,Y. J. ét Zhang, N., 2007.** A highér-lévél phylogénétic classification of thé fungi. *mycol. rés., 111, 509-547.*

- Hodgk K.T., Krasnoff S.B., et Humbér R.A., 1996.** *Tolypocladium inflatum* is the anamorph of *Cordyceps subsessilis* *Mycologia*, 88, 715-719.
- Holdér D.J. et Kéyhani N.O., 2005.** Adhésion of the entomopathogenic fungus *Beauveria (Cordyceps) bassiana* to substrata. *Appl Environ Microbiol* 71, 5260–5266.
- Horton T.R., Bruns T.D., 2001.** The molecular revolution in ectomycorrhizal ecology: peeking into the black-box. *Molecular Ecology* 10: 1855-1871.
- Humbér R.A., 1989.** Synopsis of a revised classification for the entomophthorales (Zygomycotina). *Mycotaxon*, 34, 441-460.
- Humbér R.A., 2008.** Evolution of entomopathogenicity in fungi. *J. Invertebr. Pathol.*, 98, 262-266.
- Humbér R.A., 2012.** Identification of entomopathogenic fungi. *Manual of techniques in invertebrate pathology*. Published by Elsevier Ltd. pp151-187.
- Huntér W., Iébert é., ébb S.é., Olton J.é. et Sai h.T., 1991:** Pre-cibarial and cibarial chemo-sensilla in Brazilian populations of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lépidoptéra: Géléchiidaé), *Insect Morphol Embryol*, 25 : 295-304. 60.
- Hurpin et Vago, 1958.** Les maladies du hanneton commun *Melolontha melolontha* L. (Col. Scarabéidaé). *Entomophaga*, 3 (1958), pp. 285-330.
- I.N.P.V., 2008 :** Nouveau déprédateur de la tomate : étas des liéux et programmé d'action » Noté de L'Institut National de la Protection des Végétaux, Ministère de l'Agriculture, Algérie, Juillét 2008, 11 pagés.
- Ignoffo C.M., 1973.** Effécts of entomopathogens on vertebrates. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 217, 141-172.
- Jamés T.Y., Léitchér P.M., Longcoré J.é., Mozléy-Standridgé S.é., Portér D., Powéll M.J., Griffith G.W. et Vilgalys R., 2006.** A molecular phylogény of the flagéllatéd fungi (Chytridiomycota) and déscription of a néw phylum (Blastocladiomycota). *Mycologia* (98) 860-871.
- Jénsén M.A., Wébstér J.A., et Straus N., 1993.** Rapid identification of bacteria on the basis of polymérasé chain réaction-amplifié ribosomal DNA spacér polymorphisms. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1993, 59, 945-952.
- Joffin J-N., Léyral G. et Boinéau F., 1998.** Microbiologié téchniqué, Documentation téchniqués. Tomé 02. 2^{iéme} édition : Céntré Régional de Documentation Pédagogiqué d'Aquitainé. Bordéaux. 299p.
- Joffin J.N. et Léyral. G., 2006.** Microbiologié téchniqué, Dictionnaire des téchniqués. Tomé 01. 4^{iéme} édition Céntré Régional de Documentation Pédagogiqué d'Aquitainé. Bordéaux. 368p.
- Joffin J.N., 2010.** Téchmicrobio.éu sité déstiné aux STL-Biotéchnologiés et aux BTS/DUTbiologiés.
<http://www.téchmicrobio.éu/index.php/composent/contént/articlé?id=%20199>
- Joubért A., Calmés B., Bérroyér R., Bouchara J.-P., Simonéau P. et Guillémetté, T. 2010.** Application of laser néphélogétry in automatéd microplaté systém to study the growth of filamentous fungi. *Biotéchniqué* 48(5):399-404.
- Jourdhéuil P., Grison P. et Fraval A., 1992.** La lutte biologique: un aprqu historique. La lutte biologique. Dossier de la Célulé évironnément de l'INRA 5,11-35.
- Kahl G., 2001.** The Dictionary of Géné Téchnology. Wiléy- VCH, Wéinhéim.
- Kéllér S. et Zimmérmann G. J., 1 989.** Mycopathogens of soil insects. [n Wilding, N., N. Collins, N. M.Hammond, P. M. Wébbér, and 1. F. Wébbér (Éds.), *Insect-Fungus Interactions*. Académic Press, London, p. 240-269.
- Kéllér S., 1991.** Arthropod-pathogenic entomophthorales of Switzérland. II. érynia, éryniopsis, Néozygités, Zoophthora, and Tarichium. *Sydowia*, 43, 39-122.
- Kéllér S., 2002.** The génus entomophthora (Zygomycétés, entomophthorales) with a déscription of five néw spécies. *Sydowia*, 54, 157-197.

- Khachatourians G.G. 1992.** Virulence of five *Blaeuveria* strains, *Paecilomyces farinosus* and *Verticillium /ecanii* strains against the migratory grasshopper, *Melanoplus sanguinipes*. 1. *invertebr. Pathol*, 59: 212-214.
- Kolai N., Abdallah C., Berkani A., Saïah F. et Badaoui M., 2011.** Observations of biology of *Necrémus* sp., new parasitoids of *Tuta absoluta* Meyrick (Gléchiidae) in Mostaganem (Algeria). *EPPO/IOBC/FAO/NEPPO joint International Symposium on management of Tuta absoluta* (tomato borer) Agadir, Morocco, November 16-18, 2011
- Kurtzman C.P., Fell J.W. et Boekhout T., 2011.** The Yeasts: A Taxonomic Study (5th ed.). Amsterdam: Elsevier, 2080 p.
- Lacey L.A., Fransen J.J., et Carruthers R.I., 1996.** Global distribution of naturally occurring fungi of *Bemisia*, their biology and use as biological control agents. In: *Bemisia 1995: Taxonomy, Biology, Damage, and Management* (Girling, D. and Mayer, R., eds.), pp. 401-433. Intercept, Andover.
- Lacordaire A.I., 2011.** Deux années de suivis dans le sud est de la France de *T. absoluta* Meyrick 1917 (Lépidoptère, Gléchiidae) ; stratégies de protection intégrée élaborées. Communication présentée à la neuvième conférence internationale sur les ravageurs en agriculture Montpellier - 26 et 27 octobre 2011.
- Laird M., Lacey L.A. et Davidson E.W., 1990.** Safety of microbial insecticides. *CRC Press Inc., Baton Rouge*. pp. 55-63.
- Larrain P., 1992.** Plagas en cultivos bajo plástico. *IPA La Platina 73*, p. 41-52.
- Latgé J.-P., Sampédro L., Bréy P., et Diaquin M., 1987.** Aggressivité de *Conidiobolus obscurus* against the pea aphid: influence of cuticular extracts on ballistospore germination of aggressive and nonaggressive strains. *J. Gen. Microbiol.*, 133, 1987-1997.
- Lébedi Grissa K., Skander M., Mhahdi M. et Belhadj R., 2010.** Lutte intégrée contre la mineuse de la tomate, *Tuta absoluta* Meyrick (Lépidoptère: Gléchiidae) en Tunisie *Faunistic Entomology* 63 (3), 125-132.
- Léit G.L.D., Picano M., Jham G.N. et Cifuentes F.M., 2004.** Intensity of *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) (Lépidoptère: Gléchiidae) and *Liriomyza* spp. (Diptère: Agromyzidae) attacks on *Lycopersicon esculentum* Mill. *Leaves, ed. agrotéc, Lavras, v. 28, n. 1, p. 42-48*
- Liétti M.M.M., Botto E. et Alzogaray R.A., 2005.** Insecticide Resistance in Argentine Populations of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lépidoptère: Gléchiidae), *Neotropical Entomology* 34(1):113-119.
- Lipa J., 1975.** White muscardines (*Blaeuveria* sp). In : An outline Of Insect Pathology. *Foreign Sci. Publ.* Dpt NCSTEL, Warsaw, Poland, pp. 139-142
- Liu M., Chavéri P. et Hodgk K. T., 2006.** A taxonomic revision of the insect biocontrol fungus *Aschersonia alfyrodis*, its allies with white stromata and their Hypocrylla sexual states. *Mycol. Res.*, 110, 537-554.
- Louis A., 1973.** Rapports entomologo-cryptogamiques . éléments sur les relations entre insectes et champignons. *Ed Hermann des sciences et des arts.* Paris 227p.
- Luna M. G., Sanchez N. et Pérez P.C., 2007.** Parasitism of *Tuta absoluta* (Lépidoptère, Gléchiidae) by *Psudapanteles dignus* (Hyménoptère, Braconidae) under Laboratory Conditions: Entomological Society of America Environ. *Entomol.* 36(4): 887-893.
- Luz C. et Fargues J., 1997.** Temperature and moisture requirement for conidial germination of an isolate of *Blaeuveria bassiana*, pathogenic to *Rhodnius prolixus*. *Mycopathologia* 138:117-125.
- Magalhaes S.T.V., Jham G.N., Picano M.C et Magalhaes G., 1989.** Mortality of second-instar larvae of *Tuta absoluta* produced by the hexane extract of *lycopersicon hirsutum* f. *Glabratum* (pi 134417) leaves, agricultural and forest *Entomology* (3) : 297-303.

- Malléa A.R., Macola G.S., Garcia S.J.G., Bahamondes L.A. et Suaréz J.H., 1972.** *Nicotiana tabacum* var. *virginica*, a new host of *Scrobipalpa absoluta*. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias* 18, p. 13-15, Universidad Nacional de Cuyo.
- Marchiori C.H., Silva C.G., et Lobo A.P., 2004.** Parasitoids of *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) (Lépidoptéra : Gfléchiidaé) in tomato in lavras, staté of minas géráis, Brazil. : *Braz. J. Biol.*, 64 (3A): 551-552.
- Marquês I.M.R., Alvês S.B., 1996.** Efeito de *Bacillus thuringiensis* Berl. Var. *kurstaki* sobre *Scobipalpaloides absoluta* Meyer (Lépidoptéra: Gfléchiidaé). *An. Soc. Entomol* 25 (1), 39-45.
- Marquês M., Iturriaga É.A., Quê sada.Moraga É., Santiago-Álvaréz C., Monté É. et Hêrmosa R., 2006.** Dê tçction of potêntially valuablé polymorphisms in four group I intron insêrtion sités at thê 3' -ênd of thê LSU rDNA gênês in biocontrol isolatês of *Mêtarhizium anisopliáé*. *BMC Microbiol* 2006, 6:77.
- Matta A. et Ripa R., 1981.** Contribution to thê control of thê tomato fruit moth *Scrobipalpa absoluta* Meyer. Population studiés. *Agricultura Têchina (Chilé)*, 41 (2): 73-77
- Maxwêll F.G., Jênnings P.R., 1991.** Brêdêding plants rêsistant to insêcts. Nêw York: John Wiléy. 683p.
- Mc Mullê n., M.P et Stack R.W., 1983.** Effeçt of isolation têchniquês and mêdia on thê diffêrêntial isolation of *Fusarium* spêciês. *Phytopathology*, 73 :458-462.
- McCoy A., Quintêla É.D. et Faria M., 1990.** Ênvironnê mên tal Pêrsistancé of Êntomopathogênic Fungi. In, Nêw dirêction in biological control. R.R. Bakêr and P.É. Dunn (Éds), A.R. Liss, Nêw York.p. 139-159.
- Mêdêiros M.A., Vilêla N.J. et França F.H., 2006.** Têchnical and Êconomic Êfficiêncy of biological control of thê South Amêrican tomato pinworm in protêctêd Ênvironmên t. *Horticultura Brasilêira* 24(2), p. 180-184.
- Mêiklé W.G., Mêrcadiêr G., Girod V., Dêrouanf F. et Jonês, W.A., 2007.** Lês micro-champignons, nouvêl Êsper dans la luttê biologiquê contrê *Varroa dÊstructor*. *Abêillês & ciê*. n°118 pp 14-19.
- Mêyling N.V., Lûbêck M., Buckléy É.P., Êilênbêrg J. et Rêhnêr S.A., 2009.** Community composition, host rangé and gênêtic structurê of thê fungal Êntomopathogên *Bêauvêria* in adjoining agricultural and sêminatural habitats. *Mol Êcol* 18:1282-1293
- Michêrêff Filho M. et Vilêla É.F., 2000.** Traça-dotomatêiro, *Tuta absoluta* (Lépidoptéra: Gfléchiidaé), Pragas introduzidas. Holos Êditora, São Paulo, pp. 81-84.
- Mihsêldt L.H. et Parra J.R.P., 1999.** Biologia de *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) Êm diêta artificial : ISSN 0103-9016, *Sci. agric. vol.56 n.4.* 125-133.
- Miranda M.M.M., Picanco M., Zanuncio J.C. et Guêdês R.N.C., 1998.** Êcological Lifê tablê of *Tuta absoluta* (Lépidoptéra:Gfléchiidaé): *Biocontrol Sciêncê and têchnology* (8):597 - 606.
- Miranpuri G.S. et Khachatourians G.G. 1991.** Infêction *site* of thê Êntomopathogênic fungus *Bêauvêria bassiana* in thê larvaé of thê mosquito *Aêdês aêgypti*. *Entomol Êxpêrimêntalist et Applicata*. 59: 19-27.
- Molla O., Monton H., Bêitia F. et Urbanêja A., 2008.** La pollila de l tomato, una nuêva plaga invasora, *Tuta absoluta* (Meyrick), Éds. Agrotêcnicas, S.L. CIF B80194590 Têrallia, 69:36-42.
- Molla O., Monton H., Vanaclocha P., Bêitia F. et Urbanêja A., 2011.** Prêdation by thê mirids Nêsidicoristênuis and *Macrolophus pygmaeus* on thê pomato borêr *Tuta absoluta* . IOBC/WPRS Working group "Intêrgratêd Control in Protêctêd Crops , Mêditêrranêan Climatê" .Procêdêdings of thê mêtting at Chania (Grêccê : Crêtê) , 6-11 Sêptêmbêr , 2009.Vol.49.pp.209-214.

- Monserrat Delgado A., 2008.** La polilla de tomate "Tuta absoluta" en la región de Murcia: bases para su control, Consejería de Agricultura y Agua, Región de Murcia, 74 p. (http://www.itga.com/docs/Jornadas/Murcia_monografia_Tuta.pdf)
- Mosler J.C., Smiley R.L., Otvos S., 1987.** A new *Pyemotes* (Acari: Pyemotidae) reared from the douglas-fir cone moth. *Int. J. Acarol.* 13: 141-147.
- Naika S., De Judd J.V.L., De Goffau M., Hilmi M., Van Dam B. et Florijn A., 2005.** La culture de la tomate, production, transformation et commercialisation, cinquième édition révisée, Agromisa Foundation, coll. « Agrodok », Wageningen, 105 p. (ISBN 90- 8573-044-9).
- Núñezglis C., Brygoo Y., 1994.** Identification of group I introns in the 28S rDNA of the entomopathogenic fungus *Beauveria brongniartii*. *Curr Genet* 1994, 27:38-45.
- Núñezglis C., Brygoo Y., Riba G., 1997.** 28S rDNA group I introns: a powerful tool for identifying strains of *Beauveria brongniartii*. *Mol Ecol* 1997, 6:373-381.
- Nicolai V. M. et Jorgén E., 2007.** Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystem : Potential for conservation biological control. *Metarhizium anisopliae* reveals that it is rhizosphere competent. *Appl. Environ.* 68,6383-6387
- Notz A.P., 1992.** Distribution of eggs and larvae of *Scrobipalpa absoluta* in potato plants. *Revista de la Facultad de Agronomía (Maracay)* 18, 425-432.
- O'Donnell K., Cigelnik E., Nirjimbarg H.I., 1998.** Molecular systematics and phylogeography of the Gibberella fujikuroi species complex. *Mycologia* 1998, 90:465-493.
- Oliveira C.R.F., Cysneiros M.C.H et Hatano E., 2007.** Occurrence of *Pyemotes* sp. on *Tuta absoluta* (Meyrick) : Brazilian Archives of Biology and Technology. ISSN 1516-8913 .Vol.50, n. 6 : pp.929-932.
- ONM, 2014 :** Relevés climatiques des années 2012 et 2013. Station Régionale de l'Office National de Météorologie.
- Oukil S., Boukassam M. et Benabdellah S., 2011.** Etude de l'entomofaune de deux variétés de tomate. Fluctuation temporelle des vols de *Tuta absoluta* Meyrick (Gélechiidae) dans la Mitidja orientale en zone littorale (wilaya de Boumerdes). EPPO/IOBC/FAO/NEPPO joint International Symposium on management of *Tuta absoluta* (tomato borer) Agadir, Marocco, Novembre 16-18.
- Pedrini N., Crispo R. et Juarz M.P., 2007.** Biochemistry of insect epicuticle degradation by entomopathogenic fungi. *Comp. Biochem. Physiol. C*, 146, 124-137.
- Perfira S.J., Beckler W.F., Wamsler A.F., Mueller S. et Romano F., 2008.** Incidence of adult moths of tomato moth in conventional and integrated tomato production systems in Caçador, SC : *Agropéc. Catarin.*, v.21, n.1 : 66-73.
- Perfira M. et Sánchez L., 2006.** Evidencia de competencia intraspecifica en estadios larvales tempranos del polillado de tomate, *Tuta absoluta* (Lépidoptera: Gélechiidae), Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores (CEPAVE), La Plata, Argentina, Asociación de Argentina de Ecología, *Ecología Austral* 12 : Pp. 143-148.
- Picanço M., Leite G.L.D., Guddes R.N.C. et Silva E.E.A., 1998.** Yield loss in trilled tomato affected by insecticidal sprays and plant spacing. *Crop Protection*, London, v. 17, n. 5, p. 447-452.
- Pirés LM., Marques E.J., Oliveira J.V. et Alves S.B., 2010.** Selection of Isolates of Entomopathogenic Fungi for Controlling *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lépidoptera: Gélechiidae) and their Compatibility with Insecticides Used in Tomato Crop. *Neotropical Entomology* 39(6), p. 977-984.
- Povolny D., 1994.** On three neotropical species of *Gnorimoschmini* (Lépidoptera: Gélechiidae) mining Solanaceae. *Acta Universalis Agriculturae*, 23, 379-393.

- Pratissoli D. et Parra J.R.P., 2000.** Fertility life table of *Trichogramma pretiosum* (Hym : Trichogrammatidae) in eggs of *Tuta absoluta* and *Phthorimaea operculella* (Lepidoptera : Gelechiidae) at different temperatures. ISSN 0931-2048. *J. Appl. Ent.* 124, 339-342.
- Pratissoli D., Reis E.F., Zago H.B., Pastori P.L. et Tamahoni T., 2006.** Biology and thermal requirements of five *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae) strains, reared on eggs of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) : *Ciência Rural*, Santa Maria. ISSN 0103-8478.v.36, n.6, p.1671-1677.
- Ramél J.M. et Oudard E., 2008.** *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) éléments de reconnaissance, 2p. pdf
- Ramoska W.A., 1984.** The influence of relative humidity on *Blissus leucopictus* infestivity and replication in the ching bug. *Blissus leucopictus*. *J. Invertibr. Pathol.* 43 :389-394.
- Rampflotti F.T., Ferrreira A., Prando H.F., Grutzmacher A.D., Martins S. J.F., Teacenco F.A., Mattos M.L.T., 2007.** Patogenicidade de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin sobre as fasés do desenvolvimento de *Tibraca limbativentris* Stal (Hemiptera: Pentatomidae) em condições de laboratório. *Arq. Inst. Biol.* 74 (2), 141-148.
- Riad N.D., Flisbner, A., Roca, M.G., et Glass, N.L., 2010.** Hyphal fusion. In K. A. Borkovich & D. J. Ebbel (eds.), *Cellular and Molecular Biology of Filamentous Fungi* (pp. 260-273). Washington, DC: American Society for Microbiology Press.
- Rhner R.A. et Buckley E., 2005.** A *Blissus* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1-alpha sequences: evidence for cryptic diversification and links to Cordyceps telomorphs. *Mycologia* 2005 b;97(1):84-98.
- Rhner S.A., Minnis A.M., Sung G.H., Luangsa J.J., Devotto L., Humbler R.A., 2011.** Phylogeny and systematics of the anamorphic, entomopathogenic genus *Blissus*. *Mycologia* 103:1055-1073
- Riba G., Sforza R. et Silvy C., 2008.** Lutte biologique. In : La Science au présent 2008. Une année d'actualité scientifique et technique. Encyclopædia Universalis France, 201-213.
- Roth M., 1974.** Initiation à la morphologie, la systématique et la biologie des insectes. Cahiers de l'Office de la Recherche Scientifique et Technique d'Outre-Mer (ORSTOM), Paris, 334 p.
- Saiah F., 2014.** Contribution à l'étude sur la lutte biologique à l'égard de *Phyllocnistis citrella* Stainton (Lepidoptera ; Gracillariidae), minuteur des Citrus. Thèse de doctorat ; université de Mostaganem, Algérie, 119 p.
- Salvo A. et Valladaris G.R., 2007.** Lefminer parasitoids and pest management, *Cièn.Inv.Agr.* 34(3) : 167-185.
- Samson R.A., Evans H.C et Latge., 1988.** Atlas of entomopathogenic fungi. Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg. New York 1-187.
- Samuels R.I., Coracini D.L.A., Santos C.A.M. et Gava C.A.T., 2002.** Infection of *Blissus antillus* (Hemiptera: Lygaeidae) eggs by the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Blissus bassiana*. *Biol. Control* 23 (3), 269-273.
- Sato H., Ban S., Masuya H. et Hosoya T., 2010.** Reassessment of type specimens of Cordyceps and its allied described by Dr. Yosio Kobayasi preserved in TNS. Part 1. The genus *Torrubiella*. *Mycoscience*, 51, 154-151.
- Schoen L., 2009.** *Tuta absoluta* (Meyrick): la chenille minuteur vneue d'ailleurs, n°232. (03/09)
- Schulke M., 2000.** An economic method for the fluorescent labelling of PCR fragments, *Nat Biotechnol* 18, 233-234.
- Siefert K. A., et Lévesque C.A., 2004.** Phylogeny and molecular diagnosis of mycotoxigenic fungi. *Eur. J. Plant. Pathol.* 110:449-471.
- Siefert K. A. 2009.** Progress towards DNA barcoding of fungi. *Mol. Ecol. Resour.* 9:83-89.
- Silva S.S., 2008.** Reproductive biology factors influencing the behavioral management of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae); dissertação apresentada ao Programa de

- Pós-Graduação em Entomologia Agrícola, da universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do grau de mestre em Entomologia Agrícola 12 (3), 369–370.
- Silvy C. et Riba G., 1999.** Biopesticides contre maladies, insectes, mauvaises herbes. In : Fraval, a., Silvy, C. éd. La lutte biologique (II). Dossier de l'Environnement de l'INRA n°19. Paris, 274p
- Siqueira H.A. A., Guddus R.N.C., Fragoso D.B et Magalhaes C., 2001.** Abamectin resistance and synergism in Brazilian populations of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae), *International Journal of Pest Management*. 47(4) 247-251.
- Soper R.S., Shimazu M., Humbler R.A., Ramos M.F. et Hajek A.F., 1988.** Isolation and characterization of entomophaga maimaiga sp. nov., a fungal pathogen of gypsy moth, *Lymantria dispar*, from Japan. *J. Invertebr. Pathol.* 51, 229-241.
- Souza J.C. et Reis P.R., 1986.** Controle da traça do tomateiro em minas Gerais. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 21, p. 343-354.
- Starnes R.L., Liu C.L et Maron P.G., 1993.** History, use and future of microbial insecticides. *Am. Entomol.* 39: 83-91.
- Stinkraus D.C. et N.P. Tugwell., 1997.** *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Moniliales) effects on *Ligus lineolaris* (Hemiptera: Miridae). *J. Entomol. Sci.* 32: 79-90
- Suga H., Hasegawa T., Mitsui H., Kagiyama K. et Hyakumachi M. 2000.** Phylogenetic analysis of the phytopathogenic fungus *Fusarium solani* based on the rDNA-ITS region. *Mycol. Res.* 104:1175–1183.
- Suinaga F.A., Casali V.W.D., Picanço M. et Foster J., 2004.** Genetic divergence among tomato leafminer populations based on AFLP analysis p. 645-651. *Agropec bras, Brasília, v.39, n.7, p.645-651.*
- Sung G.H., Hywel-Jones N.L., Sung J.M., Luangsa-ard J.J., Shrestha B et , Spatafora J.W., 2007.** Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi. *Stud Mycol* 57: 5-59. (Available at <http://www.studisinycomology.org>)
- Tanksley S.D., Ganai J.P., Prince M.C., de-Vicente M.W., Bonifacio P., Broun T.M., Fulton J. J., Giovannoni S., Wing W. et Young N.D., 1992.** High density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes. *Genetics* 132: 1141–1160.
- Taylor J.W., 1995.** Making the Deuteromycota redundant: a practical integration of mitospore and meiospore fungi. *Can. J. Bot.*, 73S, S754-S759.
- Todorova S.J., Côté I.C., Martel P. et Codrre D., 1994.** Host specificity of two *Beauveria bassiana* strains revealed by biochemical tests, protein profiles and bioassays on *Leptinotarsa delongiata* (Col: Coccinellidae) larvae. *Entomophaga.* 39: 159-169.
- Todorova S.I., Codrre D., Côté I.C. et Vincet F., 2002.** Screening of *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes) isolates against *Choristoneura rosaceana* (Lepidoptera : Tortricidae). *Cand. Entomol.* 134 : 77-84.
- Tong-kwae L., Muhamad R., Fae Gait C. et Lan Chiw C., 1989.** Studies on *Beauveria bassiana* isolated from the cocoa mirid, *Hemiptera thobromae*. *Crop Protection* 8: 358-362.
- Torrès J.B., Faria C., Evangelista W.S.J. et Pratisoli D., 2002.** Within-plant distribution of the leaf miner *Tuta absoluta* (Meyrick) immatures in processing tomatoes, with notes on plant phenology: *international journal of pest management*, 47(3) 173-178.
- Torrès-Grégorio J., Argente J., Diaz M.A. et Yuste A., 2009.** Aplicación de *Beauveria bassiana* en la lucha biológica contra *Tuta absoluta*. *Agrícola Veracruz: Fruticultura, Horticultura, Floricultura* 326, p. 129-132.
- Tortora G.J, Funk B.R. et Cas C.L., 2003.** Introduction à la microbiologie .éd. de Renouveau pédagogique Inc. 968p.

- Trân vinh liêm., 1977.** Morphologi dės piēcfs génitalės ft nėrvation alairf dės principalės pyralės forėurs du riz ın cōtė d'ivoirf. Dėscription dė quėlquės hymėnoptėrės parasitės. Cahiers *ORSTOM, sėriė Biologiė, 1977*, Vol. 12, Num. 1, p. 47-54 .
- Trottin-Caudal Y., Chabriėr C. ft Tėrrėntroy A 2010.** Rėsėntation. *Tuta absoluta*, biologiė du ravagėur ft stratėgiės dė protėction: situation actuellė ft pėrspėctivės.
- Uchoa-Fėrnandės M., Dėlla Lucia T.M.C. ft Vilėla Ɣ.F., 1995.** Mating, oviposition and pupation of *Scrobipalpuloidės absoluta* (Mėyr.) (Lėpidoptėra: Gėlfėchiidaf). Anais Sociėdadė . *Entomologica do Brasil, 24(1)*, 159-164.
- Urbanėja A., Monton H. ft Molla O., 2009.** Suitability of thė tomatoborėr *Tuta absoluta* as prėy for *Macrolophus pygmaėus* and *Nėsidioris tėnui* .Unidad dė ıntomologia , Cėntro dė Protėccion Vėgėtal Y Bioltėcnologia , Instituto Valėnciano dė Invėstigacionės Agrarias (IVIA) ,Valėscia, Spain .Journal Compilation, 2009. Blackwell Vėrlag ,Bėrlin .pp1-5.
- Van Ɣck J., Kirk D.D ft Walmslėy A.M., 2006.** Agrobactėrium Protocols : Sėcond ėdition Volumė 1. Ɣditėd by Kan Wang. ISBN 1-58829-536-2. Humana Prėss Inc. 507 pagės.
- Vargas H., 1970.** Obsėrvacionės sobrė la biología y ınėmigos naturalės dė la polilla dėl tomatė, *Gnorimoschėma absoluta* (Mėyrick) (Lėp. Gėlfėchiidaf). *IDėSIA 1*: 75-110
- Vėga F.ė., Mėyling N.V., Luangsa-ard J.J. ft Blackwell M., 2012.** Fungal ıntomopathogėns Insect Pathology. Ɣlsėviėr Inc. 150p.
- Vėntura M., Vėndramim J.D., 1996.** Ɣffito dė gėnótipos dė *Lycopėrsicon* spp. contėndo difėrėntės tėorės dė alėloquímicos sobrė *Phthorimaf opėrculėlla* (Zėll.). *Ɣcologia Austral 11* : Pp. 153-158
- Vėy A., Farguės J. ft Robėrt P. 1982.** Histological and ultrastructural studiės of factors dėtėrmining thė spėcificity of pathotypės of thė fungus. *Biochėm. Physiol. C, 136*, 134-147.
- Viaud M., Coutėaudiėr Y., Lėvis V. ft Riba G., 1996.** Gėnomė organization in *Bėauvėria bassiana* : ıntomopathogėnic Karyotypė, Gėnrė Mapping, and Tzłomėric Fingėrprint. *Fungal Gėnėtics and Biologt.* 20. 175-183
- Vigouroux Y., Jaquėth J.S., Matsuoka Y., Smith O.S., Bėavis W.D., Smith J.S.C. ft Doėblėy J., 2002.** Ratė and pattėrn of mutation at microsatėllitė loci in maizė. *Mol Biol Ɣvol* 19(8): 1251-1260.
- Wang C., Li Z., Typas M.A. ft Butt T.M., 2003.** Nuclėar largė subunit rDNA group I intron distribution in a population of *Bėauvėria bassiana* strains: phylogėnėtic implications. *Mycol Rėv* 2003, 107:1189-1210.
- Wėbėr J.L. ft May P. Ɣ., 1989.** Abundant class of human DNA polymorphisms which can typėd using thė polymėrasė chain rėaction. *Am. Nat.* 104: 355-365.
- Wėisėr J., 1972.** . *Bėauvėria* Vuill. In : Nėmoci hmyzu. Naklad. Cėskoslov. Akadėmiė, Praha, pp. 361-377
- Whitė M.M., Jamės T.Y., O'Donnėll K., Cafaro M.J., Tanabė Y. ft Sugiyama J., 2006.** Phylogėny of thė Zygomycota basėd on nuclėar ribosomal sėquėncė data. *Mycologia*, 98, 872-884.
- Whitė T.J., Bruns T.D., Lėė S. ft Taylor J.W., 1990.** Amplification and dirėct sėquėncing of fungal ribosomal RNA gėnės for phylogėnėtics. In: Inis MA, Gėlfand DH, Sninsky JJ, Whitė TJ, Ɣds. PCR protocols: a guidė to mėthods and applications. Nėw York: Acadėmic Prėss. p 315–322.
- Woudėnbėrg J.H.C., Groėnėwald J.Z. ft Bindėr M., 2013.** *Altėrnaria* rėdėfinėd. Studiės in *Mycology.* 2013;75:171–212.
- Wraight R.J ft Robėrts D.W., 1987.** Ɣffort dė luttė contrė lės insectės avėc dės champignons. Dėvėl. Indus. *Microbiol.* 28 :77-87
- Ziėtkiėwicz Ɣ., Rafalski A. ft Labuda D., 1994.** Gėnomė fingėrprinting by simplė sėquėncė rėpėat (SSR)-anchord polymėrasė chain rėaction amplification. *Gėnomics* 20: 176- 183.

Annexes

Annexe 01: Planche des caractéristique morphologique de la tomate. A : système racinaire, B : tige, C : feuille, D : fruits, E : graines et F : fleurs (Originale, 2013).



Annexe 02: Synthèse des principales maladies et ravageurs de la tomate
(Blancard et *al.*, 2009)

	Maladies	Symptômes
Maladies virales	Maladie des feuilles jaunes en cuillère (TYLCV)	Ralentissement de la croissance, jaunissement des folioles, fruits petits et nombreux, enroulement des feuilles en forme de cuillère et rabougrissement des plants infectés.
	Mosaïque de la tomate (TMV)	Folioles mosaïquées, gaufrées ayant tendance à devenir filiformes.
Maladies cryptogamiques	Alternaria <i>Alternaria solani</i>	Apparition de taches arrondies noirâtres montrant des cercles concentriques. Des taches chancreuses peuvent se manifester sur tige. Sur Fruit, la maladie s'attaque en premier lieu aux sépales qui se nécrosent, puis passe aux calices.
	Oïdium <i>Oidiopsis taurica</i>	Apparition de taches jaunes sur la face supérieure des feuilles, et d'un duvet blanc sur la face inférieure, Après jaunissement des feuilles, elles se dessèchent et tombent.
	Mildiou <i>Phytophthora infestans</i>	Apparition des taches jaunâtres qui brunissent rapidement. Sur la face inférieure des feuilles on voit un duvet blanc, grisâtre qui dissémine les spores. Les tiges attaquées noircissent et la plante meurt en quelques jours.
	Moisissure grise <i>Botrytis cinerea</i>	Apparition des taches brunâtres accompagnées d'un duvet grisâtre. Ces taches peuvent évoluer en chancre sur tiges et pétioles. Sur fruit, on observe une pourriture molle grise. Chute des fleurs et fruits.
Maladies bactériennes	Chancre bactérien <i>Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis</i>	Flétrissement unilatéral sur feuille, suivi d'un dessèchement total. Des coupes longitudinales sur tige et pétioles montrent des stries brunâtres. En cas de forte chaleur et humidité élevée, on observe des chancres ouverts sur tiges et pétioles. Sur fruit, se forment des taches blanchâtres, dont le centre brunit et s'entoure d'un halo jaune clair.
	Moucheture de la tomate <i>Pseudomonase syringae pv. Tomato</i>	Apparition des taches noires de contour irrégulier entourées d'un halo jaune. Ces taches peuvent se joindre et forment une plage nécrotique brune-sombre. Les folioles se dessèchent et tombent. Si l'attaque est précoce, on assiste à une coulure importante des fleurs. Sur fruit, on observe des taches brunes nécrotiques.
	Gale bactérienne <i>Xanthomonase campestris pv. vesicatoria</i>	Apparition des taches brunâtres relativement régulières entourées d'un halo jaune. De nombreuses taches entraînent le dessèchement de folioles et la chute des feuilles. Sur fruit, de petits chancres pustuleux apparaissent et prennent un aspect liégeux.
	Moelle noire <i>Pseudomonase corrugata</i>	Les plantes atteintes présentent des taches sombres sur tige, pétioles et pédoncules. Une coupe longitudinale de la tige montre une moelle noire remplie de vacuoles. Les vaisseaux demeurent intacts, contrairement à ce qui se passe dans le cas d'une maladie vasculaire.

Annexe 02 (suite): Synthèse des principales maladies et ravageurs de la tomate
(Blancard et *al.*, 2009)

Ravageurs		Symptômes
Nématodes Racines noueuses <i>Meloidogyne spp</i>		Apparition de galles sur les racines des plants attaqués. La tige rabougrit, les feuilles jaunissent, puis la plante dépérit.
Acariens <i>Tetranychus urticae</i>		Les larves et les adultes des acariens sucent la sève des plantes. Les feuilles et les tiges jaunissent et se dessèchent. Les acariens peuvent fabriquer des toiles en fils légers qui ressemblent aux toiles d'araignée. Les dommages qu'ils provoquent sont les plus importants pendant la saison sèche.
Insectes	Les thrips <i>(Thripidae)</i>	Les larves de thrips et les adultes sucent la sève des feuilles, ce qui cause des taches argentées sur la surface des feuilles en question. Quelques espèces de thrips sont des vecteurs de la maladie bronzée de la tomate.
	Mouche blanche <i>Trialeurodes vaporariorum</i> et <i>Bemisia tabaci</i>	La succion de la sève par les larves et les adultes entraînent des dégâts directs se traduisant par une diminution de la vigueur.
	Les pucerons <i>(Aphidae)</i>	Des dommages directs sont produits lorsqu'ils apparaissent en grands nombres sur la culture, où ils préfèrent les feuilles et les tiges les plus tendres. En outre des dommages directs qu'ils peuvent provoquer, les pucerons transmettent également différents virus.
	Noctuelles <i>Heliothis armigera</i>	Les jeunes chenilles dévorent le collet et entraînent la mort de la plante. Sur fruit, les larves creusent des galeries qui évoluent en pourriture, puis une chute prématurée des fruits attaqués.
	Les mineuses <i>Tuta asoluta</i> et <i>Liriomyza trifolii</i>	Minuscules ponctuations jaunâtres (piques nutritionnelles) et nombreuses galeries sinueuses sur folioles, celle-ci se dessèchent ultérieurement.

Annexe 03 : Production en million de tonnes des principaux pays producteurs de la tomate dans le monde (FAOSTAT, 2013)

Pays	Quantité de production en million de tonne	Pourcentage
Chine	52.86	42,96
USA	14.20	11,54
Inde	11.97	9,54
Turquie	11.15	9,06
Egypte	8.60	6,99
Italie	7.02	5,70
Iran	5.26	4,77
Espagne	4.31	3,75
Brésil	3.69	3,25
Mexique	2.99	2,43

Annexe 04 : Valeurs indicatives des risques sur la culture de tomate sous serre (Monserrat, 2008)

Niveaux d'infestations	Pourcentage des plants affectés
Niveau 0	0 %
Niveau 1	Niveau très bas : 5 % des plantes avec une mine active
Niveau 2	Niveau bas : 5 à 25 % des plantes avec une mine active
Niveau 3	Niveau modéré : 25 à 50 % des plantes avec une mine active
Niveau 4	Niveau élevé : Plus de 50 % des plantes avec une mine active
Niveau 5	Niveau très élevé : Plus de 50 % des plantes avec plus d'une mine active

Annexe 05: Champignons entomopathogènes comme solutions biologiques pour la répression des ravageurs (Hawksworth et *al.*, 1983)

Espèce fongique	Mode d'action	Ravageurs : stades visés
<u>Ascomycètes</u> <i>Penicillium funiculosum</i>	toxines	doryphore de la pomme de terre : œufs
<u>Coelomycètes</u> <i>Aschersonia aleyrodii</i> <i>A. flava</i> et <i>A. placenta</i>	mycose mortelle mycose mortelle	aleurode des serres : larves et pupes aleurode des serres : larves et pupes
<u>Hyphomycètes</u> <i>(champignons imparfaits)</i> <i>Acremonium. sp</i> <i>Beauveria bassiana</i>	mycose mortelle toxine et mycose mortelle	aleurode des serres : larves doryphore : larves, pupes et adultes pyrale du maïs : larves avant pénétration piéride de chou : larves sur les feuillages charançon de la carotte : larves et pupes chrysomèle du maïs : larves et au sol
<i>Fusarium verticillioides</i> <i>Metarhizium anisopliae</i>	mycose mortelle toxine et mycose mortelle	aleurode des serres : larves mouche de l'origine : adulte pyrale de maïs : œufs et larves charançon de la carotte : larves et pupes doryphore de la pomme de terre larves
<i>Paecilomyces farinosus</i>	mycose mortelle	mouche de l'oignon : pupes et adultes pyrale du maïs : chrysalides
<i>P. fumoso-roseus</i>	mycose mortelle	mouche de l'oignon : pupes et adultes thrips des petits fruits
<i>Verticillium lecanii</i>	toxine et mycose mortelle	pucerons des serres : tous les stades aleurode des serres
<u>Entomophthorales</u> <i>Conidiobolus obscurus</i> <i>Entomophthora adjarica</i> <i>E. parvispora</i> <i>E. thripidium</i> <i>Erynia neoaphidis</i>	mycose mortelle mycose mortelle mycose mortelle mycose mortelle mycose mortelle	pucerons des serres : tous les stades tétranyque à deux points : tous les stades thrips des petits fruits: larve, adulte et nymphe thrips des petits fruits :larve, adulte et nymphe pucerons des serres : tous les stades

Annexe 06 : Variations mensuelles des températures à Mostaganem en 2012 et 2013 (ONM ,2014)

2012	Janvier	Février	Mars	Avril	Mai	Juin	Juillet	Aout	Sept	Oct	Nov	Déc
Température maxi extrême (°C)	22,0	22,0	24,5	25,0	30,9	36,6	36,3	40,5	36,3	34,5	25,6	20,1
Température maxi moyenne (°C)	16,4	15,5	19,0	20,2	22,0	26,9	30,6	33,0	28,6	26,7	20,2	16,4
Température moy moyenne (°C)	11,4	11,1	14,7	15,3	16,9	20,3	24,9	26,3	23,1	20,9	15,6	12,0
Température mini moyenne (°C)	6,3	6,6	10,3	10,3	11,8	13,7	19,2	19,7	17,6	15,2	11,0	6,9
Température mini extrême (°C)	1,5	-1,5	3,6	3,9	5,4	0,0	14,1	14,3	11,6	8,3	0,9	1,3
2013	Janvier	Février	Mars	Avril	Mai	Juin	Juillet	Aout	Sept	Oct	Nov	Déc
Température maxi extrême (°C)	20,1	19,4	28,0	26,5	34,1	39,1	41,2	45,0	36,7	33,6	30,0	25,2
Température maxi moyenne (°C)	16,5	13,8	18,2	19,4	25,6	29,8	32,2	34,4	29,8	25,4	19,8	15,9
Température moy moyenne (°C)	9,9	7,4	12,4	14,5	19,5	24,2	25,9	27,8	24,0	20,2	15,0	11,8
Température mini moyenne (°C)	3,2	1	6,5	9,6	13,2	18,7	19,5	21,1	18,1	14,9	10,2	7,4
Température mini extrême (°C)	-0,8	-5,0	1,0	4,1	6,1	12,4	13,7	14,5	12,6	6,8	6,2	2,4

Annexe 07 : Variations hebdomadaires des températures sous serre en 2012 et 2013

2012	Température moyenne (°C)
05-févr	15,5
12-févr	16,0
19-févr	16,8
26-févr	17,3
04-mars	18,6
11-mars	19,0
18-mars	20,2
25-mars	20,9
01-avr	22,0
08-avr	21,8
15-avr	21,2
22-avr	22,0
29-avr	22,8
06-mai	22,0
13-mai	21,5
20-mai	22,8
27-mai	23,6
03-juin	25,0
10-juin	25,7
17-juin	26,0

2013	Température moyenne (°C)
03-févr	11
10-févr	12,25
17-févr	11,9
24-févr	13,2
02-mars	15
09-mars	17,7
16-mars	18,1
23-mars	18,8
30-mars	18,6
06-avr	19,2
13-avr	18,9
20-avr	19
27-avr	20
04-mai	25,5
11-mai	25
18-mai	26
25-mai	27
01-juin	28,6
08-juin	29,4
15-juin	31,5

Annexe 08: Taux d'infestation global des années 2012 et 2013

2012	Taux d'infestation (%)	2013	Taux d'infestation (%)
05-févr	20,56	03-févr	0,00
12-févr	35,00	10-févr	0,00
19-févr	51,11	17-févr	0,00
26-févr	56,67	24-févr	3,33
04-mars	71,67	02-mars	5,56
11-mars	80,56	09-mars	20,00
18-mars	82,78	16-mars	33,89
25-mars	85,56	23-mars	41,67
01-avr	86,67	30-mars	56,67
08-avr	88,33	06-avr	65,56
15-avr	85,00	13-avr	67,78
22-avr	90,00	20-avr	70,56
29-avr	91,00	27-avr	71,67
06-mai	92,00	04-mai	73,33
13-mai	93,33	11-mai	70,00
20-mai	92,78	18-mai	75,00
27-mai	93,89	25-mai	83,33
03-juin	95,56	01-juin	82,78
10-juin	100,00	08-juin	78,33
17-juin	100,00	15-juin	77,78

Annexe 09 : Analyse de variance des taux d'infestation global en fonction de la date
(Test de Newman-Keuls - Seuil = 5%)

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR. Totale	38265,27	39	981,161				
VAR. Facteur 1 (année)	9462,703	1	9462,703	66,002	0		
VAR. Facteur 2 (semaine)	26078,56	19	1372,556	9,574	0,00001		
VAR. Résiduelle 1	2724,014	19	143,369			11,974	18,64%

Annexe 10 : Taux d'infestation par bloc des années 2012 et 2013

2012	T B1 %	T B2 %	T B3 %
05-févr	23,33	18,33	20,00
12-févr	41,67	36,67	26,67
19-févr	58,33	45,00	50,00
26-févr	58,33	58,33	53,33
04-mars	66,67	75,00	73,33
11-mars	75,00	83,33	83,33
18-mars	71,67	85,00	91,67
25-mars	83,33	95,00	78,33
01-avr	78,33	90,00	91,67
08-avr	90,00	95,00	80,00
15-avr	88,33	88,33	78,33
22-avr	95,00	90,00	85,00
29-avr	93,33	91,67	86,67
06-mai	96,67	86,67	93,33
13-mai	95,00	88,33	96,67
20-mai	90,00	95,00	93,33
27-mai	90,00	95,00	96,67
03-juin	88,33	100,00	98,33
10-juin	100,00	100,00	100,00
17-juin	100,00	100,00	100,00

2013	T B1 %	T B2 %	T B3 %
03-févr	0,00	0,00	0,00
10-févr	0,00	0,00	0,00
17-févr	0,00	0,00	0,00
24-févr	5,00	1,67	3,33
02-mars	6,67	5,00	5,00
09-mars	20,00	20,00	20,00
16-mars	36,67	33,33	31,67
23-mars	41,67	46,67	36,67
30-mars	56,67	60,00	53,33
06-avr	65,00	70,00	61,67
13-avr	65,00	71,67	66,67
20-avr	70,00	68,33	73,33
27-avr	73,33	71,67	70,00
04-mai	71,67	75,00	73,33
11-mai	66,67	75,00	68,33
18-mai	75,00	78,33	71,67
25-mai	81,67	83,33	85,00
01-juin	83,33	80,00	85,00
08-juin	78,33	76,67	80,00
15-juin	80,00	75,00	78,33

Annexe 11 : Analyse de variance des taux d'infestation par bloc (trois blocs B1, B2 et B3) en fonction de la date (Test de Newman-Keuls - Seuil = 5%)

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.Totale	116280,9	119	977,151				
VAR. Facteur 1 (année)	28365,63	1	28365,63	1501,31	0		
VAR. Facteur 2 (semaine)	78216,57	19	4116,662	217,883	0		
VAR. Facteur 3 (bloc)	61,695	2	30,848	1,633	0,20726		
VAR.INTER F1*2	8178,414	19	430,443	22,782	0		
VAR.INTER F1*3	4,32	2	2,16	0,114	0,8921		
VAR.INTER F2*3	736,344	38	19,377	1,026	0,46914		
VAR. Résiduelle 1	717,969	38	18,894			4,347	6,77%

Annexe 12 : Taux d'infestation par strate foliaire des années 2012 et 2013

2012	T E apical %	T E moyen %	T E basal %
05-févr	5,41	13,51	81,08
12-févr	4,76	23,81	71,43
19-févr	7,61	32,61	59,78
26-févr	34,31	42,16	23,53
04-mars	34,88	42,64	22,48
11-mars	36,55	40,69	22,76
18-mars	39,60	35,57	24,83
25-mars	36,36	34,42	29,22
01-avr	35,90	33,33	30,77
08-avr	37,11	34,59	28,30
15-avr	33,33	38,56	28,10
22-avr	37,04	34,57	28,40
29-avr	36,81	33,74	29,45
06-mai	36,14	33,73	30,12
13-mai	35,71	34,52	29,76
20-mai	35,93	34,13	29,94
27-mai	35,50	34,32	30,18
03-juin	34,88	34,88	30,23
10-juin	33,33	33,33	33,33
17-juin	33,33	33,33	33,33

2013	T E apical %	T E moyen %	T E basal %
03-févr	0,00	0,00	0,00
10-févr	0,00	0,00	0,00
17-févr	0,00	0,00	0,00
24-févr	0,00	0,00	100,00
02-mars	0,00	0,00	100,00
09-mars	0,00	25,00	75,00
16-mars	9,84	24,59	65,57
23-mars	26,67	40,00	33,33
30-mars	34,31	49,02	16,67
06-avr	33,05	50,85	16,10
13-avr	49,18	36,89	13,93
20-avr	47,24	35,43	17,32
27-avr	46,51	34,88	18,60
04-mai	45,45	39,39	15,15
11-mai	47,62	36,51	15,87
18-mai	44,44	37,04	18,52
25-mai	40,00	36,67	23,33
01-juin	40,27	37,58	22,15
08-juin	42,55	36,17	21,28
15-juin	42,86	35,71	21,43

Annexe 13 : Analyse de variance des taux d'infestation par strate foliaire (haut, milieu et bas) en fonction de la date (Test de Newman-Keuls - Seuil = 5%)

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR. Totale	40222,74	119	338,006				
VAR. Facteur 1 (année)	749,883	1	749,883	1,61	0,20971		
VAR. Facteur 2 (semaine)	4249,586	19	223,662	0,48	0,95515		
VAR. Facteur 3 (strate foliaire)	170,516	2	85,258	0,183	0,83483		
VAR.INTER F1*2	4250,119	19	223,691	0,48	0,95512		
VAR.INTER F1*3	29,355	2	14,678	0,032	0,9693		
VAR.INTER F2*3	13075,54	38	344,093	0,739	0,82266		
VAR. Résiduelle 1	17697,74	38	465,73			21,581	69,99%

Annexe 14 : Distribution des différents stades de développements des années 2012 et 2013

2012	Œufs (W%)	Larves (L%)	Nymphes (N%)
05-févr	58,82	41,18	0
12-févr	66,67	33,33	0
19-févr	71,43	28,57	0
26-févr	70,00	30,00	0
04-mars	63,64	36,36	0
11-mars	57,47	42,53	0
18-mars	62,76	37,24	0
25-mars	63,01	36,99	0
01-avr	67,31	32,69	0,00
08-avr	61,43	38,57	0
15-avr	47,24	52,76	0
22-avr	20,12	79,88	0
29-avr	14,02	85,98	0,00
06-mai	13,64	84,93	1,44
13-mai	33,46	64,31	0,00
20-mai	29,25	70,75	2,23
27-mai	15,25	80,93	3,81
03-juin	16,53	81,40	2,07
10-juin	10,81	86,49	2,70
17-juin	6,49	89,61	3,90

2013	Œufs (W%)	Larves (L%)	Nymphes (N%)
03-févr	0,00	0,00	0,00
10-févr	0,00	0,00	0,00
17-févr	0,00	0,00	0,00
24-févr	53,85	46,15	0,00
02-mars	57,58	42,42	0,00
09-mars	58,25	41,75	0,00
16-mars	59,60	40,40	0,00
23-mars	64,00	36,00	0,00
30-mars	65,22	34,78	0,00
06-avr	51,20	48,80	0,00
13-avr	47,24	52,76	0,00
20-avr	18,78	81,22	0,00
27-avr	16,24	83,76	0,00
04-mai	13,26	85,58	1,16
11-mai	19,35	79,21	1,43
18-mai	28,57	69,64	1,79
25-mai	30,86	66,67	2,47
01-juin	22,73	75,57	1,70
08-juin	24,69	72,84	2,47
15-juin	0,00	96,00	4,00

Annexe 15 : Analyse de variance de la distribution des différents stades de développements (œuf, larve et nymphe) en fonction de la date (Test de Newman-Keuls - Seuil = 5%)

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.TOTALE	109835,7	119	922,989				
VAR. Facteur 1 (année)	750,063	1	750,063	7,42	0,00942		
VAR. Facteur 2 (semaine)	4251,617	19	223,769	2,214	0,01832		
VAR. Facteur 3 (stades évolutifs)	60447,63	2	30223,82	298,971	0		
VAR.INTER F1*2	4251,586	19	223,768	2,213	0,01832		
VAR.INTER F1*3	601,133	2	300,566	2,973	0,06175		
VAR.INTER F2*3	35692,13	38	939,266	9,291	0		
VAR. Résiduelle 1	3841,531	38	101,093			10,054	32,61%

Annexe 16 : Distribution des différents stades larvaires des années 2012 et 2013

2012	(L1%)	(L2%)	(L3%)	(L4%)
05-févr	100,00	0,00	0,00	0,00
12-févr	100,00	0,00	0,00	0,00
19-févr	100,00	0,00	0,00	0,00
26-févr	100,00	0,00	0,00	0,00
04-mars	81,40	18,60	0,00	0,00
11-mars	56,58	21,05	19,74	2,63
18-mars	59,78	19,57	17,39	3,26
25-mars	69,57	14,49	13,77	2,17
01-avr	66,38	24,14	6,90	2,59
08-avr	71,57	21,57	6,86	0,00
15-avr	54,84	32,26	11,94	0,97
22-avr	66,67	23,09	9,04	1,20
29-avr	64,04	18,65	13,26	4,04
06-mai	60,00	27,80	6,10	6,10
13-mai	44,14	40,69	11,03	4,14
20-mai	48,87	32,33	14,29	4,51
27-mai	57,33	24,67	16,00	2,00
03-juin	60,47	26,74	12,79	0,00
10-juin	63,97	23,53	10,29	2,21
17-juin	43,40	32,08	20,75	3,77

2013	(L1%)	(L2%)	(L3%)	(L4%)
03-févr	0,00	0,00	0,00	0,00
10-févr	0,00	0,00	0,00	0,00
17-févr	0,00	0,00	0,00	0,00
24-févr	100,00	0,00	0,00	0,00
02-mars	71,43	21,43	7,14	0,00
09-mars	60,47	23,26	16,28	0,00
16-mars	57,38	21,31	16,39	4,92
23-mars	58,89	17,78	20,00	3,33
30-mars	34,82	19,64	42,86	2,68
06-avr	36,42	16,67	46,91	0,00
13-avr	15,92	32,84	49,75	1,49
20-avr	23,90	30,39	44,16	1,56
27-avr	22,75	27,81	46,91	2,53
04-mai	21,20	35,05	41,30	2,45
11-mai	16,74	39,82	40,72	2,71
18-mai	20,51	27,18	48,72	3,59
25-mai	14,81	22,84	60,49	1,85
01-juin	17,29	31,58	49,62	1,50
08-juin	16,95	28,81	50,85	3,39
15-juin	20,83	29,17	45,83	4,17

Annexe 17 : Analyse de variance de la distribution des différents stades larvaires (L1, L2, L3 et L4) en fonction de la date (Test de Newman-Keuls - Seuil = 5%)

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR. Totale	100248,4	159	630,493				
VAR. Facteur 1 (année)	562,563	1	562,563	2,936	0,08824		
VAR. Facteur 2 (semaine)	3461,594	19	182,189	0,951	0,52824		
VAR. Facteur 3 (stades larvaires)	43939,95	3	14646,65	76,438	0		
VAR.INTER F1*2	3461,492	19	182,184	0,951	0,52828		
VAR.INTER F1*3	17029,47	3	5676,49	29,624	0		
VAR.INTER F2*3	20871,34	57	366,164	1,911	0,00794		
VAR. Résiduelle 1	10922,05	57	191,615			13,843	59,86%

Annexe 18 : Effectifs moyen par foliole des stades évolutifs de *T. absoluta* des années 2012 et 2013

2012	Œufs/F	Larves/F	Nymphes/F	2013	Œufs/F	Larves/F	Nymphes/F
05-févr	0,48	0,2	0	03-févr	0,00	0,00	0,00
12-févr	0,54	0,24	0,00	10-févr	0,00	0,00	0,00
19-févr	0,69	0,22	0,00	17-févr	0,00	0,00	0,00
26-févr	0,54	0,29	0,00	24-févr	0,27	0,23	0,00
04-mars	0,69	0,31	0,00	02-mars	0,63	0,47	0,00
11-mars	1,01	0,48	0,00	09-mars	1,07	0,75	0,00
18-mars	1,30	0,56	0,00	16-mars	1,11	0,72	0,00
25-mars	1,33	0,84	0,00	23-mars	1,52	0,81	0,00
01-avr	1,62	0,63	0,00	30-mars	1,59	0,82	0,00
08-avr	1,18	1,00	0,00	06-avr	1,23	1,15	0,00
15-avr	0,61	1,24	0,00	13-avr	1,18	1,24	0,00
22-avr	0,42	2,24	0,00	20-avr	0,61	2,40	0,00
29-avr	0,34	2,43	0,00	27-avr	0,43	2,05	0,00
06-mai	0,44	1,54	0,04	04-mai	0,38	1,64	0,03
13-mai	0,54	0,76	0,00	11-mai	0,42	1,13	0,03
20-mai	0,21	0,68	0,04	18-mai	0,55	1,07	0,03
27-mai	0,23	0,78	0,05	25-mai	0,77	1,34	0,06
03-juin	0,11	0,90	0,03	01-juin	0,25	0,73	0,02
10-juin	0,06	0,64	0,03	08-juin	0,13	0,36	0,01
17-juin	0,03	0,26	0,02	15-juin	0,00	0,15	0,01

Annexe 19 : Analyse de variance de la densité des différents stades de développements (œuf, larve et nymphe) en fonction de la date (Test de Newman-Keuls - Seuil = 5%)

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR. Totale	39,583	119	0,333				
VAR. Facteur 1 (année)	0,003	1	0,003	0,127	0,72372		
VAR. Facteur 2 (semaine)	8,63	19	0,454	21,214	0		
VAR. Facteur 3 (stades évolutifs)	14,508	2	7,254	338,817	0		
VAR.INTER F1*2	0,773	19	0,041	1,901	0,0453		
VAR.INTER F1*3	0,015	2	0,008	0,36	0,70477		
VAR.INTER F2*3	14,841	38	0,391	18,241	0		
VAR. Résiduelle 1	0,814	38	0,021			0,146	30,16%

Annexe 20 : Effectifs moyen par foliole des stades larvaires de *T. absoluta* des années 2012 et 2013

2012	L1 /F	L2 /F	L3 /F	L4 /F	2013	L1 /F	L2 /F	L3 /F	L4 /F
05-févr	0,2	0	0	0	03-févr	0,00	0,00	0,00	0,00
12-févr	0,24	0,00	0,00	0,00	10-févr	0,00	0,00	0,00	0,00
19-févr	0,22	0,00	0,00	0,00	17-févr	0,00	0,00	0,00	0,00
26-févr	0,29	0,00	0,00	0,00	24-févr	0,23	0,00	0,00	0,00
04-mars	0,26	0,05	0,00	0,00	02-mars	0,33	0,10	0,03	0,00
11-mars	0,28	0,10	0,10	0,01	09-mars	0,45	0,18	0,13	0,00
18-mars	0,34	0,11	0,10	0,02	16-mars	0,41	0,15	0,12	0,04
25-mars	0,58	0,12	0,12	0,02	23-mars	0,47	0,14	0,17	0,03
01-avr	0,44	0,13	0,04	0,02	30-mars	0,27	0,16	0,36	0,02
08-avr	0,79	0,15	0,06	0,00	06-avr	0,43	0,17	0,55	0,00
15-avr	0,78	0,35	0,08	0,02	13-avr	0,21	0,36	0,66	0,02
22-avr	1,56	0,46	0,19	0,04	20-avr	0,61	0,71	1,03	0,04
29-avr	1,58	0,39	0,35	0,11	27-avr	0,50	0,62	0,88	0,06
06-mai	0,89	0,43	0,11	0,11	04-mai	0,25	0,48	0,85	0,06
13-mai	0,35	0,29	0,09	0,04	11-mai	0,12	0,37	0,60	0,05
20-mai	0,36	0,20	0,11	0,02	18-mai	0,26	0,23	0,55	0,03
27-mai	0,47	0,16	0,12	0,02	25-mai	0,21	0,28	0,82	0,03
03-juin	0,58	0,21	0,10	0,00	01-juin	0,11	0,23	0,38	0,01
10-juin	0,44	0,14	0,06	0,01	08-juin	0,07	0,08	0,20	0,01
17-juin	0,11	0,08	0,06	0,01	15-juin	0,03	0,04	0,07	0,01

Annexe 21 : Analyse de variance de la densité des différents stades larvaires (L1, L2, L3 et L4) en fonction de la date (Test de Newman-Keuls - Seuil = 5%)

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR. Totale	11,94	159	0,075				
VAR. Facteur 1 (année)	0,004	1	0,004	0,133	0,71734		
VAR. Facteur 2 (semaine)	3,88	19	0,204	6,791	0		
VAR. Facteur 3 (stades larvaires)	2,786	3	0,929	30,88	0		
VAR.INTER F1*2	0,148	19	0,008	0,26	0,99		
VAR.INTER F1*3	1,674	3	0,558	18,554	0		
VAR.INTER F2*3	1,734	57	0,03	1,012	0,48224		
VAR. Résiduelle 1	1,714	57	0,03			0,173	83,22%

Annexe 22 : Préférence de ponte des années 2012 et 2013

2012	face INF + SUP	Face INF	face SUP
05-févr	0,48	0,40	0,08
12-févr	0,54	0,43	0,11
19-févr	0,69	0,49	0,20
26-févr	0,54	0,43	0,12
04-mars	0,69	0,48	0,21
11-mars	1,01	0,67	0,34
18-mars	1,30	1,10	0,19
25-mars	1,33	1,03	0,31
01-avr	1,62	1,32	0,30
08-avr	1,18	0,72	0,46
15-avr	0,61	0,49	0,12
22-avr	0,42	0,31	0,12
29-avr	0,34	0,24	0,10
06-mai	0,44	0,36	0,08
13-mai	0,54	0,39	0,15
20-mai	0,21	0,15	0,07
27-mai	0,23	0,17	0,06
03-juin	0,11	0,06	0,06
10-juin	0,06	0,04	0,02
17-juin	0,03	0,02	0,01

2013	face INF + SUP	Face INF	face SUP
03-févr	0,00	0,00	0,00
10-févr	0,00	0,00	0,00
17-févr	0,00	0,00	0,00
24-févr	0,27	0,23	0,04
02-mars	0,63	0,47	0,17
09-mars	1,07	0,71	0,36
16-mars	1,11	0,74	0,37
23-mars	1,52	0,95	0,57
30-mars	1,59	1,36	0,23
06-avr	1,23	1,09	0,14
13-avr	1,18	0,86	0,33
20-avr	0,61	0,48	0,13
27-avr	0,43	0,31	0,12
04-mai	0,38	0,27	0,11
11-mai	0,42	0,26	0,15
18-mai	0,55	0,48	0,07
25-mai	0,77	0,61	0,15
01-juin	0,25	0,19	0,06
08-juin	0,13	0,10	0,03
15-juin	0,00	0,00	0,00

Annexe 23 : Analyse de variance de la préférence de ponte (face inférieur et face supérieur)
en fonction de la date (Test de Newman-Keuls - Seuil = 5%)

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR. Totale	19,264	119	0,162				
VAR. Facteur 1 (année)	0,002	1	0,002	0,142	0,70935		
VAR. Facteur 2 (semaine)	10,614	19	0,559	38,139	0		
VAR. Facteur 3 (face foliaire)	4,322	2	2,161	147,531	0		
VAR.INTER F1*2	1,309	19	0,069	4,704	0,00003		
VAR.INTER F1*3	0	2	0	0,007	0,99		
VAR.INTER F2*3	2,46	38	0,065	4,42	0,00001		
VAR.RESIDUELLE 1	0,557	38	0,015			0,121	29,60%

Annexe 24 : Taux de mortalité et de parasitisme des années 2012 et 2013

2012	Taux de mortalité (%)	Taux de parasitisme (%)	2013	Taux de mortalité (%)	Taux de parasitisme (%)
05-févr	0,00	0,00	03-févr	0,00	0,00
12-févr	0,00	0,00	10-févr	0,00	0,00
19-févr	0,00	0,00	17-févr	0,00	0,00
26-févr	1,61	0,00	24-févr	0,00	0,00
04-mars	3,49	0,00	02-mars	0,00	0,00
11-mars	3,95	0,00	09-mars	1,16	0,00
18-mars	4,35	0,72	16-mars	2,46	0,00
25-mars	3,26	1,35	23-mars	2,78	0,00
01-avr	7,76	3,16	30-mars	1,79	0,00
08-avr	11,03	2,45	06-avr	1,50	0,00
15-avr	19,52	4,41	13-avr	2,99	0,00
22-avr	13,55	3,01	20-avr	4,15	0,78
29-avr	5,51	2,25	27-avr	3,93	0,75
06-mai	6,78	2,60	04-mai	16,58	2,63
13-mai	6,21	2,30	11-mai	16,74	3,32
20-mai	7,14	2,26	18-mai	10,26	1,88
27-mai	6,33	1,56	25-mai	9,57	1,65
03-juin	5,23	1,36	01-juin	6,39	1,25
10-juin	7,35	0,98	08-juin	4,24	0,56
17-juin	5,66	1,26	15-juin	4,17	0,33
Taux de parasitisme global = 2.12%			Taux de parasitisme global = 1.46%		

Annexe 25 : Analyse de variance de la mortalité naturelle en fonction de la date (Test de Newman-Keuls - Seuil = 5%)

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR. Totale	3778,927	39	96,896				
VAR. Facteur 1 (année)	93,758	1	93,758	1,234	0,28043		
VAR. Facteur 2 (semaine)	2241,797	19	117,989	1,553	0,17255		
VAR. Résiduelle 1	1443,371	19	75,967			8,716	84,27%

Annexe 26 : Analyse de variance du parasitisme en fonction de la date (Test de Newman-Keuls - Seuil = 5%)

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR. Totale	524,375	39	13,446				
VAR. Facteur 1 (année)	66,461	1	66,461	8,196	0,00967		
VAR. Facteur 2 (semaine)	303,849	19	15,992	1,972	0,07388		
VAR. Résiduelle 1	154,066	19	8,109			2,848	88,68%

Annexe 27 : Abondance des différentes espèces de parasitoïdes et de punaises prédatrices de *T. absoluta*

	Prédateurs		Parasitoïdes		
	<i>N. tenuis</i>	<i>Macrolophus</i> sp.	<i>N. artynes</i>	<i>D. isaea</i>	autres
Abondance	70 %	30 %	80 %	15 %	05 %

Annexe 28 : Examen microscopique des bactéries (Joffin et Leyral , 2006)

Examen microscopique			
Observation à l'état frais		Coloration de Gram	
Technique	Lecture	Technique	Lecture
<ol style="list-style-type: none"> Déposer une goutte d'eau stérile sur une lame et ajouter une fraction de colonie bactérienne à l'aide de l'anse stérilisée. Etaler et recouvrir avec une lamelle. 	Observer microscopique	<ol style="list-style-type: none"> Réaliser un frottis et le fixer Recouvrir le frottis de violet de gentiane phéniqué durant une minute Laver à l'eau distillée et égoutter (non obligatoire) Recouvrir le frottis d'une solution de lugol durant 30 secondes Laver à l'eau distillée et égoutter (non obligatoire) Incliner la lame, verser l'éthanol à 90° jusqu'à disparition du reflet bleu. Rincer à l'eau distillée immédiatement et égoutter Recouvrir le frottis de fuchsine phéniqué pendant 01 minute Laver à l'eau distillée Observer après séchage à l'immersion et en plein lumière. 	<p>➤ Gram(+) couleur violette</p> <p>➤ Gram(-) coloration rose.</p>

Annexe 29: Métabolisme énergétique des bactéries (Joffin et Leyral , 2006)

		<i>Techniques</i>	<i>Lecture</i>	
Métabolisme énergétique	Type respiratoire	<ol style="list-style-type: none"> 1. Régénérer la gélose VF par ébullition au bain-marie bouillant pendant environ 30 minutes. 2. Ajouter une ampoule de sulfite de sodium 3. Ensemencer lorsque le milieu est encore liquide (vers 45°C), à l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée et chargée en remontant en spirale à partir du fond du tube. 4. Refroidir à l'eau courante 5. Placer ensuite le tube à l'étuve (37°C) pendant 24 heures. 	<ol style="list-style-type: none"> a. Les aérobies stricts AS (croissance en surface) b. Les anaérobies stricts (croissance dans la zone profonde de la gélose) c. Les aéro-anaérobies facultatifs AAF (croissance tout le long du tube) 	
	Recherche de'une	catalase	<ol style="list-style-type: none"> 1. Sur une lame propre et sèche déposer une goutte d'eau oxygénée à 10 volumes 2. A l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée ajouter l'inoculum et observer immédiatement 	<ol style="list-style-type: none"> a. Apparition de bulles, dégagement gazeux de dioxygène : catalase + b. Pas de bulles : catalase -
		oxydase	<ol style="list-style-type: none"> 1. A partir d'un milieu solide aérobie, prélever une quantité suffisante de culture à l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée (ne pas utiliser l'anse métallique) 2. Déposer puis écraser les colonies bactériennes sur un disque ou un papier filtre imprégnés du réactif 	<ol style="list-style-type: none"> a. Une réaction positive se traduit par un virage rapide du réactif de l'incolore au violet : oxydase + b. Sinon il reste incolore : oxydase -
	nitrate réductase	<ol style="list-style-type: none"> 1. Ensemencer quelques gouttes de la suspension bactérienne dans le bouillon nitraté 2. Incuber à 37°C pendant 24 heures 3. Ajouter à la surface du milieu 5 gouttes d'alpha-naphtylamine. (NR1) puis 5 gouttes d'acide sulfanilique (NR2). Mélanger et observer 	<p>La lecture se fait directement après l'addition des réactifs de la manière suivante.</p> <ol style="list-style-type: none"> I. <u>Présence de nitrite</u> est indiquée par l'apparition d'une coloration rouge. Donc la bactérie possède une nitrate réductase NR(+). II. <u>Le milieu reste inchangé</u> : on ajoute alors de la poudre de zinc qui joue le même rôle que la nitrate réductase vis à vis des nitrates. <ol style="list-style-type: none"> a. Coloration rouge : on a donc eu transformation des nitrates en nitrites par le zinc. La bactérie ne possédait pas cette enzyme NR(-). b. Pas de coloration : les nitrates ont été transformés par la bactérie au delà des nitrites. La bactérie possède cette enzyme NR(+). 	

Annexe 30: Principes des tests biochimiques utilisés pour l'étude des métabolismes bactériens (Joffin et Leyral , 2006)

	Tests biochimiques	Objectif
Métabolisme énergétique	Type respiratoire	L'étude du type respiratoire d'une bactérie nécessite un milieu de culture riche contenant un gradient d'oxygène. Le principal milieu utilisé à cette fin est la gélose viande-foie (gélose VF).
	Recherche d'une catalase	Cette enzyme est produite en abondance par les bactéries à métabolisme respiratoire (AS et AAF) qui peuvent détruire les peroxydes. La plupart des microorganismes aérobies possèdent une catalase, en particulier les bacilles Gram négatifs aérobies. Son absence est donc un critère d'identification intéressant.
	Recherche d'une oxydase	Le terme exact est « recherche du cytochrome oxydase ». Les cytochromes sont des protéines qui appartiennent à la chaîne respiratoire, composée d'une succession de transporteurs d'électrons, en particulier les cytochromes. En fait, ce test recherche le cytochrome c-oxydase. Cette recherche est un des critères les plus discriminatifs et les plus employés pour l'identification des bactéries, surtout celle des bacilles à Gram négatif.
	Recherche d'une nitrate réductase	En l'absence d'oxygène, certaines bactéries peuvent obtenir leur énergie par respiration anaérobie. Cette respiration est liée à l'activité du nitrate réductase. La réduction des nitrates par la nitrate réductase se traduit par la production de nitrites. Parfois, certaines bactéries peuvent poursuivre cette réduction jusqu'à une dénitrification.
Métabolisme glucidique	Test de l'ONPG	La recherche de la β -galactosidase est un des premiers tests enzymatiques réalisés en pratique courante. Il est particulièrement important pour les entérobactéries. Cette recherche explore la présence d'une enzyme du métabolisme du lactose
	Test de TSI	La gélose TSI (Triple Sugar Iron) permet l'identification des entérobactéries par la mise en évidence rapide de la fermentation du lactose, du glucose (avec ou sans production de gaz), du saccharose et de la production de sulfure d'hydrogène (H ₂ S).
	Test de Clark et Lubs	Le milieu Clark et Lubs permet l'étude de la voie de fermentation du glucose. Chez les bactéries cette fermentation conduit à la production soit <ol style="list-style-type: none"> 1. De nombreux acides par la voie des fermentations acides mixtes qui sont mis en évidence par le test RM (au rouge de méthyle), 2. D'acétone produit par fermentation butane-diolique qui est mise en évidence par le test VP (Voges-Proskauer)

	Test manitol mobilité	Le milieu manitol mobilité permet la mise en évidence d'une part l'utilisation de l'alcool lors de la fermentation du mannitol qui abouti à l'acidification du milieu et d'autre la mobilité des germes.
	Recherche de l'amylase	L'amidon est une macromolécule glucidique. Il s'agit d'un polymère de glucose. Ce milieu permet après culture de mettre en évidence la capacité de la bactérie à dégrader ce substrat l'amidon. Ceci revient à déterminer si elle possède une enzyme spécifique, l'amylase
Métabolisme protéique	Recherche de l'uréase, la tryptophane désaminase (TDA) et la tryptophanase	Le milieu Urée Tryptophane (milieu Urée Indole) est un milieu d'identification, synthétique, qui fournit un ensemble de résultats utiles à l'identification de nombreux germes bactériens. Il permet la recherche de trois enzymes qui sont : l'uréase, la tryptophane désaminase (TDA) et la tryptophanase (mettre en évidence les bactéries indologènes qui dégradent le tryptophane jusqu' à la formation d'indole).
	Recherche de l'ADH, l'ODC et LDC:	Les milieux de Möller consistent à étudier les décarboxylases. Selon l'acide aminé introduit dans le milieu on recherchera la lysine décarboxylase (LDC) l'arginine décarboxylase (ADC) ou l'ornithine décarboxylase (ODC).
	Recherche de l'activité protéolytique caséinase	Le milieu gélose au lait est utilisé principalement pour mettre en évidence la capacité chez une bactérie à dégrader des protéines. Cette capacité est liée à la présence de protéase (activité ou pouvoir protéolytique).
Métabolisme des acides organiques		
<p><u>Test du Citrate de Simmons</u> : Le milieu Citrate de Simmons est présenté sous forme de gélose inclinée. Il permet de mettre en évidence l'utilisation du citrate comme seule source de carbone et d'énergie par les bactéries. Ces dernières possèdent un citrate perméase et les enzymes du catabolisme du citrate.</p>		
Milieux sélectifs		
<p><u>Production de la pyocyanine et pyoverdine</u> : Les milieux de King (milieu King A et milieu King B) permettent de différencier entre elles les différences espèces du genre <i>Pseudomonas</i>, par la mise en évidence de la production de pigments spécifiques.</p>		

Annexe 31 : Métabolisme protéique des bactéries (Joffin et Leyral , 2006)

		<i>Techniques</i>	<i>Lecture</i>
Métabolisme protéique	Utilisation du milieu Urée Tryptophane	<p>1.ensemencer le milieu Urée-tryptophane avec trois à six gouttes de suspension bactérienne bien dense ou à partir d'une colonie.</p> <p>2.Incuber 24 h à 37°C</p> <p>3.Lecture du résultat de l'uréase</p> <p>4.Partager le contenu du milieu en deux tubes à hémolyses pour la recherche des autres enzymes .</p> <p><u>Tryptophane désaminase (TDA) (tube.01):</u></p> <p>1) Ajouter quelques gouttes du réactif de TDA (perchlorure de fer)</p> <p>2) Lecture après quelques minutes.</p> <p><u>Tryptophanase (tube.02):</u></p> <p>1) Ajouter quelques gouttes du réactif de Kovacs</p> <p>2) Lecture après quelques minutes.</p>	<p>I. <u>Uréase</u></p> <p>a. La coloration rouge traduit une alcalinisation du milieu: Uréase (+)</p> <p>b. La coloration orange ou jaune montre l'absence d'hydrolyse de l'urée : Uréase (-)</p> <p>II. <u>Tryptophane désaminase (TDA) (tube.01)</u></p> <p>a. Obtention d'un précipité brun foncé : TDA (+)</p> <p>b. Absence de précipité : TDA (-).</p> <p>III. <u>Tryptophanase (tube.02)</u></p> <p>a. La présence d'indole se manifeste par un anneau rouge indole(+)</p> <p>b. Absence de coloration rouge : indole(-)</p>
	Recherche de l'ADH, l'ODC et LDC	<p>1. Préparer une suspension en eau physiologique stérile à partir d'une culture de la souche à étudier.</p> <p>2. Ensemencer 2 ou 3 gouttes de cette suspension dans trois tubes contenant le milieu Møller avec l'acide aminé à étudier. Parallèlement un tube témoin est ensemencé.</p> <p>3. Réaliser une anaérobiose en ajoutant 1ml de l'huile de vaseline stérile</p> <p>4. Incuber à 37°C pendant 24 h, jusqu'à 4 jours.</p>	<p>a. Virage au jaune de l'indication colorée dans le tube témoin à cause de la dégradation des glucoses.</p> <p>b. Pour les autres tubes :</p> <p>a) La réaction positive se traduit par un virage violet indiquant la présence d'amine et l'alcalinisation du milieu.</p> <p>b) La réaction négative est révélée par une coloration jaune.</p>
	protéolytique	<p>1. Faire une strie centrale à la surface du milieu</p> <p>2. Incuber à 37°C pendant 24 h, jusqu'à 7 jours.</p>	<p>L'hydrolyse de la caséine se traduit par l'apparition d'une zone claire autour de la culture</p>

Annexe 32 : Métabolisme glucidique des bactéries (Joffin et Leyral , 2006)

		<i>Techniques</i>	<i>Lecture</i>
Métabolisme glucidique	Test de l'ONPG	<ol style="list-style-type: none"> Réaliser une suspension épaisse des bactéries testées en eau distillée. Ajouter avec une pince flambée mais refroidie un disque imprégné d'ONPG. Lire le résultat après incubation pendant 30 min à 37°C 	<ol style="list-style-type: none"> Une coloration jaune traduit l'hydrolyse de l'ONPG (ONPG +). Absence de la coloration jaune révèle absence d'hydrolyse de l'ONPG (ONPG -)
	Test de TSI	<p>Le milieu doit être incliné de façon à présenter un culot assez important par rapport aux autres géloses inclinées.</p> <ol style="list-style-type: none"> Ensemencer abondamment la surface par stries serrées ou par inondation, puis le culot par simple piqûre, à l'aide de la même pipette boutonnée. Il est important de ne pas oublier de dévisser partiellement la capsule afin de permettre les échanges gazeux. Mettre à l'étuve 24h à 37°C. 	<p>Une lecture correcte est nécessaire pour tirer le maximum de renseignement.</p> <ol style="list-style-type: none"> Bactérie de type fermentatif du glucose et lactose + : culot jaune et pente jaune. Bactérie de type fermentatif du glucose et lactose - : culot jaune et pente rouge. Bactérie de type oxydatif du glucose ou glucose - et lactose - : culot rouge et pente rouge. Bactérie de type oxydatif du glucose et lactose + : culot rouge et pente jaune. La réduction du thiosulfate en anaérobiose par certaines bactéries se traduira par la fabrication d'hydrogène sulfureux (H₂S), qui en réagissant avec le citrate ferrique donnera un précipité noir. En cas de production de gaz, si celle-ci est faible il y a formation de quelques bulles dans le culot. Si elle est abondante, il y a décollement du culot.
	Test de Clark et Lubs	<ol style="list-style-type: none"> Ensemencer quelques gouttes de la suspension bactérienne dans le milieu Clark et Lubs Incuber 24 h à 37°C Prélever 2 fois 1 ml du milieu et les transvaser dans deux tubes à hémolyse <p><u>Test VP (tube.01):</u></p> <ol style="list-style-type: none"> Ajouter 10 gouttes d'alpha naphthol à 6% (VP1) et le même volume de soude concentrée ou de potasse (VP2). Incliner le tube pour permettre une bonne oxygénation. Attendre quelques min à 1 heure. <p><u>Test RM (tube.2):</u></p> <ol style="list-style-type: none"> Ajouter 2 à 3 gouttes de rouge de méthyle, La lecture est immédiate. 	<p><u>1^{er} tube :</u></p> <ol style="list-style-type: none"> Coloration rose rouge (anneau rouge à la surface) signe une réaction positif VP (+). Absence de coloration montre une réaction négative VP (-). <p><u>2^{ème} tube :</u></p> <ol style="list-style-type: none"> Coloration rouge (PH <4) réaction positive ou il y a une forte acidification RM (+). Coloration jaune (PH >6) réaction négative où il y a une faible acidification où une réalcanisation RM (-).

Test manitol mobilité	<ol style="list-style-type: none"> 1. Ensemencer le milieu manitol mobilité par piqûre central à l'aide d'une pipette pasteur chargée de la suspension bactérienne 2. Incuber 24h à 37°C. 	<p>I. L'utilisation du manitol</p> <ol style="list-style-type: none"> a. Virage de milieu du rouge au jaune (milieu acide) indique la fermentation du manitol ; les bactéries sont dites manitol (+) b. Si le milieu garde sa couleur initiale (milieu basique), les bactéries sont manitol (-). <p>II. La mise en évidence de la mobilité</p> <ol style="list-style-type: none"> a. Les bactéries mobiles diffusent à partir de la ligne d'ensemencement en créant un trouble du milieu vers les bords du tube mobilité (+). b. Les bactéries immobiles cultivent uniquement le long de la piqûre mobilité (-).
Recherche de l'amylase	<ol style="list-style-type: none"> 1. Ensemencer par une strie ou par spot à la surface du milieu (gélose à l'amidon). 2. Après un temps d'incubation suffisant (un à huit jours), recouvrir la gélose d'une solution de lugol 3. Observer Il est nécessaire de faire un témoin avec une boîte non ensemencée. 	<p>Après l'ajout de lugol, il y'a formation de complexe amidon, lugol qui donne une coloration bleu-rouge).</p> <ol style="list-style-type: none"> a. La disparition de la coloration bleu-rouge due à l'amidon montre l'attaque de l'amidon (présence d'amylase) . Amidon (+) b. Le maintien de la coloration bleu-rouge due à l'amidon montre que l'amidon n'a pas été attaqué (absence d'amylase): Amidon (-).

Annexe 33: Métabolisme des acides organiques des bactéries (Joffin et Leyral , 2006)

Métabolisme des acides organiques	
Test du Citrate de Simmons	
Technique	Lecture
<ol style="list-style-type: none"> 1. La pente est ensemencée par une strie longitudinale, réalisée à l'anse, à partir d'une suspension de la culture solide en eau distillée stérile. 2. Ne pas visser le bouchon à fond, afin de permettre les échanges gazeux (en particulier élimination du dioxyde de carbone). 3. Mettre à l'étuve 24 heures à 37°C. <p>Il est important de ne pas apporter de substrats carbonés. Ainsi l'ensemencement à partir d'une souche pure fournie en bouillon nutritif ou en eau peptonée est impossible.</p>	<ol style="list-style-type: none"> a. La présence d'une coloration bleue même localisée uniquement en surface démontre que la réaction est positive et qu'il existe l'enzyme du catabolisme du citrate chez la bactérie ensemencée. La souche est citrate de Simmons (+). b. La réaction est négative si la coloration du milieu ne change pas et reste verte même en présence d'une culture. La souche est citrate de Simmons (-).

Annexe 34: Mode opératoire de la galerie miniaturisées API 20NE

Technique		
Préparation de la galerie	Préparation de l'inoculum	Inoculation de la galerie :
<p>1. Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir de l'eau dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide.</p> <p>2. Déposer stérilement la galerie dans la boîte d'incubation.</p>	<p>✓ Faire une suspension bactérienne, dans une ampoule de NaCl 0,85% Medium ou dans un tube d'eau distillée stérile, de turbidité égale à celle de l'étalon 0,5 Mcfarland.</p>	<p>1. Remplir les tubes (et non les cupules) des tests NO₃ à PNPG avec la suspension précédente. Eviter la formation de bulles.</p> <p>2. Transférer 200 µl (4 à 8 gouttes) de la suspension précédente, dans une ampoule AUX Medium. Homogénéiser.</p> <p>3. Remplir les tubes et cupules des tests GLU à PAC.</p> <p>4. Remplir d'huile de paraffine les cupules des trois tests GLU, ADH, URE.</p> <p>5. Incuber 24 heures à 30°C.</p>
<p>Avant la lecture de la galerie, une révélation des deux tests NO₃ et TRP doit se faire.</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ Ajouter une goutte de réactifs NIT 1 et NIT 2 dans la cupule NO₃ ➤ Ajouter une goutte de réactif JAMES dans la cupule TRP. 		

Annexe 37: Taux d'abondance des bactéries isolées

Espèces	Nombre d'isolat	% d'abondance
Bactéries bacilles à Gram positif	11	34,38 %
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	8	25,00 %
<i>Moraxella lacunata</i>	7	21,88 %
<i>Burkholderia cepacia</i>	4	12,50 %
<i>Chryseobacterium meningosepticum</i>	2	6,25 %
Total	32	100 %

Annexe 38: Taux d'abondance de la mycoflore isolée

Espèces	Nombre d'isolats	% d'abondance
<i>Rhizopus</i> sp.	13	31,71 %
<i>Beauveria</i> sp.	8	19,51 %
<i>Aspergillus</i> sp.	7	17,07 %
<i>Penicillium</i> sp.	6	14,63 %
<i>Fusarium</i> sp.	4	9,76 %
<i>Ulocladium</i> sp.	3	7,32 %
Total	41	100 %

Annexe 35 : Tableau de lecture de la galerie miniaturisée Api 20NE

Tests	Substrat	Enzymes/Réactions	Résultats	
			Négatif	Positif
NO ₃	Nitrate de potassium	Réduction des nitrates en nitrites	NIT 1 + NIT 2 / 5 mn	
			Incolore	Rose-rouge
		Réduction des nitrates en azote	ZN / 5 mn	
			Rose	Incolore
TRP	Tryptophane	Formation d'indole	TRP / 3-5 mn	
			Incolore	Goutte rouge
GLU	Glucose	Fermentation	Bleu à vert	Jaune
ADH	Arginine	Arginine dihydrolase	Jaune	Orange/rose/rouge
URE	Urée	Uréase	Jaune	Orange/rose/rouge
ESC	Esculine	Hydrolyse	Jaune	Gris/marron/noir
GEL	Gélatine	Hydrolyse	Pas de diffusion du pigment	Diffusion du pigment noir
PNPG	p-nitro-phényl-βD-galactopyranoside	B-galactosidase	Incolore	Jaune
GLU	Glucose	Assimilation	Transparence	Trouble
ARA	Arabinose			
MNE	Mannose			
MAN	Mannitol			
NAG	N-acétyl-glucosamine			
MAL	Maltose			
GNT	Gluconate			
CAP	Caprate			
ADI	Adipate			
MLT	Malate			
CIT	Citrate			
PAC	Phényl-acétate			
Ox	Tetraméthyl-p-phenylène diamine			

Annexe 36 : Tableau d'identification de la galerie miniaturisée Api 20NE

API 20 NE	V7.0	NO3	TRP	GLU	ADH	URE	ESC	GEL	PNPG	GLUa	ARAa	MNEa	MANa	NAGa	MALa	GNTa	CAPa	ADLa	MLTa	CITa	PACa	CX
<i>Achromobacter denitrificans</i>		93	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	86	20	96	99	94	93	100
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>		81	0	0	1	0	0	1	0	99	0	30	1	1	1	100	81	94	99	98	96	100
<i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i>		2	0	8	0	1	1	1	0	67	70	1	1	1	1	20	98	80	100	99	87	0
<i>Acinetobacter haemolyticus</i>		1	0	14	0	0	0	96	0	1	0	0	0	0	0	99	2	99	81	1	0	0
<i>Acinetobacter junii/johnsonii</i>		1	0	0	0	1	0	0	0	24	8	2	0	0	0	99	4	95	70	0	0	0
<i>Acinetobacter lwoffii</i>		3	0	0	0	2	0	0	0	11	1	0	1	1	0	70	20	46	1	38	0	0
<i>Acinetobacter radioresistens</i>		2	2	0	2	0	0	0	0	19	2	0	0	2	0	97	100	2	2	97	0	0
<i>Aeromonas hydrophila/caviae</i>		99	89	99	78	1	89	97	98	99	80	78	99	99	99	95	84	1	99	37	1	99
<i>Aer. salm. ssp. masoucida/achromogenes</i>		100	21	9	0	0	2	33	0	66	0	33	50	2	21	2	0	0	2	0	0	100
<i>Aeromonas salmonicida ssp. salmonicida</i>		100	0	57	36	0	100	98	18	84	1	0	96	84	99	99	0	1	99	1	0	100
<i>Aeromonas sobria</i>		100	86	96	86	0	1	99	99	100	12	99	99	99	100	100	93	0	99	81	0	100
<i>Alcaligenes faecalis 1</i>		1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	3	77	7	100	97	97	98
<i>Alcaligenes faecalis 2</i>		78	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	99	73	91	100	69	73	100
<i>Bergeyella zoohelcum</i>		0	0	0	0	99	0	74	0	0	0	2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	99
<i>Bordetella avium</i>		0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	99	100	100	100	95	0
<i>Bordetella bronchiseptica</i>		76	0	0	0	96	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	94	85	91	80	100	0
<i>Brevundimonas diminuta/Oligella urethralis</i>		1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	2	1	99	33	0	100
<i>Brevundimonas vesiculans</i>		16	0	0	0	0	98	12	34	72	1	1	3	10	72	1	1	1	40	0	0	98
<i>Burkholderia cepacia</i>		39	0	24	1	1	46	70	72	100	75	99	96	99	8	97	99	93	100	99	99	91
<i>Burkholderia pseudomallei</i>		100	0	0	98	0	5	100	0	100	0	99	100	100	0	100	100	99	100	99	94	100
<i>Chromobacterium violaceum</i>		97	1	99	100	0	0	100	0	100	0	66	10	97	0	100	75	0	100	36	0	97
<i>Chryseobacterium indologenes</i>		20	81	1	0	70	98	99	22	55	12	37	1	0	66	1	0	1	1	12	12	99
<i>Chryseobacterium meningosepticum</i>		0	83	1	0	5	99	95	93	86	1	80	76	70	61	0	0	1	0	25	0	99
<i>Comamonas testosteroni/Ps. alcaligenes</i>		75	0	0	6	4	0	4	1	11	3	3	4	1	2	42	55	38	87	32	3	98
<i>Deiftia acidovorans</i>		95	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	76	0	0	99	71	89	99	28	83	100
<i>Grimontia holisiae</i>		100	100	31	0	0	0	0	3	10	67	68	0	24	1	41	0	0	94	0	0	100
<i>Mannheimia haemolytica / Pasteurella trehalos</i>		95	0	2	0	0	2	0	85	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	85
<i>Methylobacterium mesophilicum</i>		21	0	0	0	76	0	0	0	21	40	0	0	1	0	7	0	5	75	8	0	99
<i>Moraxella lacunata</i>		90	0	0	0	0	0	99	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	1	0	0	99
<i>Moraxella spp</i>		34	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	17	1	0	1	1	99
<i>Myroides spp</i>		0	1	0	0	94	1	99	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	100
<i>Ochrobactrum anthraci</i>		80	0	0	0	84	1	0	1	82	75	60	20	75	76	34	34	4	99	47	1	99
<i>Oligella ureolytica</i>		71	0	0	0	99	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	95	95	26	96
<i>Pasteurella aerogenes</i>		100	0	97	0	100	0	0	100	99	75	97	1	80	99	97	0	0	95	0	0	77
<i>Pasteurella multocida</i>		96	96	1	0	0	0	0	10	1	0	2	1	1	2	1	0	1	1	0	0	86
<i>Pasteurella pneumotropica</i>		100	61	26	0	85	0	0	83	6	1*	6	0	6	3	6	0	1	6	0	0	84
<i>Pasteurella spp</i>		96	1	2	2	1	1	1	4	19	1	1	1	1	1	1	0	1	13	1	0	87
<i>Photobacterium damselae</i>		99	0	94	99	99	2	0	11	11	0	6	0	1	6	0	0	0	63	0	0	100
<i>Plesiomonas shigelloides</i>		99	99	98	98	0	0	0	86	94	0	12	0	77	98	99	77	0	94	0	0	99
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		96	0	0	80	20	1	92	1	99	1	1	89	84	1	97	98	91	98	99	1	98
<i>Pseudomonas fluorescens</i>		27	0	0	80	1	1	39	1	99	71	97	89	85	1	99	99	10	99	99	16	99
<i>Pseudomonas luscata</i>		78	0	13	71	1	100	30	98	99	99	99	88	12	76	85	62	1	94	94	1	2
<i>Pseudomonas mendocina</i>		100	0	0	94	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	99	100	0	100	100	0	100
<i>Pseudomonas cryzhibitans</i>		0	0	0	0	1	0	11	1	100	99	99	100	0	84	99	88	2	99	99	0	1
<i>Pseudomonas putida</i>		3	0	1	88	1	0	0	1	99	56	57	5	2	1	97	99	1	100	99	53	99
<i>Pseudomonas stutzeri</i>		94	0	0	1	1	0	1	0	98	1	10	67	0	75	87	87	1	99	85	1	100
<i>Psychrobacter phenylpyruvicus</i>		60	0	0	0	95	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	3	1	0	100
<i>Ralstonia pickettii</i>		32	0	1	1	3	0	1	0	96	35	1	10	14	0	99	86	62	99	98	18	99
<i>Rhizobium radiobacter</i>		98	0	0	0	65	99	1	99	100	100	100	100	99	99	90	2	0	100	0	1	99
<i>Shewanella putrefaciens group</i>		96	0	1	0	1	71	95	0	6	11	0	0	95	10	1	71	1	90	2	0	100
<i>Sphingobacterium multivorum</i>		0	0	1	0	95	100	1	99	99	91	99	0	99	99	0	0	0	1	0	0	99
<i>Sphingobacterium spiritivorum</i>		0	0	0	0	1	100	0	100	100	1	99	10	100	100	0	0	0	0	0	0	99
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>		10	0	0	0	1	97	1	90	99	83	75	15	64	95	34	9	3	61	45	1	73
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>		37	1	0	0	0	99	99	87	84	3	95	2	98	99	2	1	0	99	98	0	7
<i>Vibrio alginolyticus</i>		98	93	93	0	0	65	91	10	70	1	18	75	57	74	76	1	0	99	1	0	99
<i>Vibrio cholerae</i>		99	100	99	0	0	1	99	99	88	0	30	78	75	97	98	1	0	99	97	1	100
<i>Vibrio metschnikovii</i>		0	50	64	0	0	7	100	50	100	0	71	99	99	99	99	17	0	99	50	0	0
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>		99	99	100	1	6	1	98	97	90	81	82	99	51	98	90	0	1	99	21	1	99
<i>Vibrio vulnificus</i>		100	95	95	0	1	95	99	99	9	0	10	9	1	6	28	0	0	95	91	0	100
<i>Wautersia peccata</i>		1	0	0	0	23	0	1	0	1	1	0	1	0	1	89	89	86	99	96	14	98
<i>Weeksella virosa/Empedobacter brevis</i>		12	5	0	0	0	1	100	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	3	1	0	98

Annexe 39 : Mortalité des larves de *T. absoluta* traitées par *Beauveria* (BV6)

	1j	2j	3j	4j	5j	6j	7j
4.7 x 10⁷	67	87	100	100	100	100	100
4.7 x 10⁶	47	73	93	100	100	100	100
4.7 x 10⁵	20	47	67	87	87	87	87
Témoin	0	7	13	13	13	13	13

Annexe 40 : Mortalité cumulée des larves de *T. absoluta* traitées par les huit *Beauveria* sp

	1j	2j	3j	4j	5j	6j	7j	8j	9j	10j
BV1	9,52	14,29	28,57	47,61	61,90	66,66	71,43	76,19	80,95	80,95
BV2	23,80	38,09	57,14	66,66	76,19	85,72	100	100	100	100
BV3	0,00	4,76	14,29	19,04	23,80	28,57	38,09	47,61	47,61	57,14
BV4	4,76	9,52	14,29	19,04	19,04	23,80	38,09	38,09	42,85	52,38
BV5	4,76	4,76	19,04	38,09	42,85	57,14	66,66	71,43	71,43	71,43
BV6	19,04	28,57	52,38	85,72	100	100	100	100	100	100
BV7	4,76	9,52	14,29	28,80	33,33	42,85	52,38	52,38	57,14	66,66
BV8	14,29	38,09	61,90	76,19	80,95	90,48	95,24	95,24	100	100
Témoin	0,00	0,00	4,75	4,75	9,52	9,52	9,52	14,29	19,04	19,04

Annexe 41: Analyse de variance de la mortalité des larves de *T. absoluta* exposées aux huit isolats de *Beauveria* sp. (Test de Newman-Keuls - Seuil = 5%)

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.TOTALE	97274,34	89	1092,97				
VAR .isolats	49625,07	8	6203,133	64,36	0		
VAR.temps	40709,77	9	4523,308	46,931	0		
VAR.RESIDUELLE 1	6939,5	72	96,382			9,817	20,71%

Annexe 42: Effet des différentes doses de BV1 sur la mortalité des larves de *T. absoluta*

	1j	2j	3j	4j	5j	6j	7j	8j	9j	10j
10⁷	9,52	14,29	28,57	47,61	61,90	66,66	71,43	76,19	80,95	80,95
10⁶	4,76	9,52	23,80	38,09	47,61	47,61	52,38	57,14	57,14	66,66
10⁵	4,76	4,76	19,04	38,09	38,09	42,85	42,85	47,61	47,61	57,14
10⁴	4,76	9,52	14,29	28,80	33,33	38,09	38,09	42,85	42,85	42,85
10³	0,00	4,76	14,29	14,29	19,04	23,80	28,57	33,33	33,33	42,85
10²	0,00	4,76	4,76	9,52	14,29	19,04	19,04	23,80	23,80	23,80
Témoin	0,00	0,00	0,00	9,52	9,52	9,52	14,29	14,29	14,29	14,29

Annexe 43: Analyse de variance de l'effet des différentes doses de BV1 sur la mortalité des larves de *T. absoluta* (Test de Newman-Keuls - Seuil = 5%)

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.TOTALE	33071,61	69	479,299				
VAR.DOSES	14664,07	6	2444,012	41,028	0		
VAR.TEMPS	15190,77	9	1687,864	28,334	0		
VAR.RESIDUELLE 1	3216,77	54	59,57			7,718	26,70%

Annexe 44 : Effet des différentes doses de BV6 sur la mortalité des larves de *T. absoluta*

	1j	2j	3j	4j	5j	6j	7j	8j	9j	10j
107	28,57	52,38	85,72	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	28,57
106	14,29	38,09	61,90	76,19	80,95	90,48	95,24	95,24	95,24	14,29
105	9,52	23,80	47,61	66,66	66,66	71,43	76,19	76,19	85,72	9,52
104	9,52	19,04	42,85	52,38	57,14	66,66	71,43	71,43	71,43	9,52
103	14,29	28,57	33,33	42,85	42,85	52,38	52,38	57,14	57,14	14,29
102	9,52	14,29	19,05	28,57	28,57	38,09	38,09	42,85	42,85	9,52
Témoin	4,75	4,75	4,75	9,52	9,52	9,52	14,29	14,29	14,29	4,75

Annexe 45 : Analyse de variance de l'effet des différentes doses de BV6 sur la mortalité des larves de *T. absoluta* (Test de Newman-Keuls - Seuil = 5%)

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.TOTALE	69207,55	69	1003,008				
VAR.DOSES	33500,47	6	5583,412	43,259	0		
VAR.TEMPS	28737,32	9	3193,036	24,739	0		
VAR.RESIDUELLE 1	6969,754	54	129,07			11,361	24,71%

Annexe 46 Analyse de variance de l'effet des différentes doses de BV1 et BV6 sur la mortalité des larves de *T. absoluta* (Test de Newman-Keuls - Seuil = 5%)

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.TOTALE	112620,3	119	946,39				
VAR.ISOLATS (F1)	3958,844	1	3958,844	72,401	0		
VAR.DOSES (F2)	42159,41	5	8431,883	154,205	0		
VAR.TEMPS (F3)	36999,34	9	4111,037	75,184	0		
VAR.INTER F1*2	1518,762	5	303,752	5,555	0,00049		
VAR.INTER F1*3	2520,227	9	280,025	5,121	0,0001		
VAR.INTER F2*3	23003,18	45	511,182	9,349	0		
VAR.RESIDUELLE 1	2460,582	45	54,68			7,395	35,93%

Annexe 47: Mortalité corrigée sous l'effet de BV1 enregistrée pendant 10 jours

	1j	2j	3j	4j	5j	6j	7j	8j	9j	10j	Ln (5j)	Ln (9j)
10^7	9,52	14,29	28,57	42,10	57,89	63,15	66,67	72,22	77,77	77,77	4,06	4,35
10^6	4,76	9,52	23,80	31,58	42,10	42,10	44,44	49,99	49,99	61,10	3,74	3,91
10^5	4,76	4,76	19,04	31,58	31,58	36,84	33,32	38,88	38,88	49,99	3,45	3,66
10^4	4,76	9,52	14,29	21,31	26,32	31,58	27,77	33,32	33,32	33,32	3,27	3,51
10^3	0,00	4,76	14,29	5,27	10,52	15,78	16,66	22,21	22,21	33,32	2,76	3,10
10^2	0,00	4,76	4,76	0,00	5,27	10,52	5,54	11,10	11,10	11,10	1,66	2,41

Annexe 48 : Mortalité corrigée sous l'effet de BV6 enregistrée pendant 10 jours

	1j	2j	3j	4j	5j	6j	7j	8j	9j	10j	Ln (5j)	Ln (9j)
10^7	19,04	25,01	50,01	85,01	100	100	100	100	100	100	4,61	4,61
10^6	9,52	10,02	35,00	60,00	73,68	78,95	89,48	94,45	94,45	94,45	4,33	4,55
10^5	4,76	5,01	20,00	45,00	63,15	63,15	68,42	72,22	72,22	83,34	4,20	4,28
10^4	4,76	5,01	15,00	40,00	47,37	52,63	63,15	66,67	66,67	66,67	3,96	4,20
10^3	9,52	10,02	25,01	30,01	36,84	36,84	47,37	44,44	49,99	49,99	3,76	3,91
10^2	0,00	5,01	10,02	15,01	21,05	21,05	31,58	27,77	33,32	33,32	3,35	3,51

Annexe 49 : Evolution de la muscardine blanche sur les larves infestées par l'entomopathogène BV1

	1j	2j	3j	4j	5j	6j	7j	8j	9j	10j	Larves mortes	Larves momifiées
10^7	0,00	0,00	5,88	17,65	35,29	58,82	70,59	76,47	88,24	88,24	17	15
10^6	0,00	0,00	0,00	7,14	28,57	35,71	42,86	50,00	50,00	57,14	14	8
10^5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	8,33	8,33	16,66	33,33	33,33	15	4
10^4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	11,11	22,22	22,22	9	2
10^3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	11,11	11,11	9	1
10^2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	5	0

Annexe 50 : Analyse de variance de l'évolution de la muscardine blanche sur les larves infestées par l'entomopathogène BV1 (Test de Newman-Keuls - Seuil = 5%)

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.TOTALE	34482,68	59	584,452				
VAR.DOSES	14976,36	5	2995,273	14,588	0		
VAR.TEMPS	10266,73	9	1140,748	5,556	0,00004		
VAR.RESIDUELLE 1	9239,582	45	205,324			14,329	96,56%

Annexe 51 : Evolution de la muscardine blanche sur les larves infestées par l'entomopathogène BV6

	1j	2j	3j	4j	5j	6j	7j	8j	9j	10j	Larves mortes	Larves momifiées
10^7	0,00	0,00	28,57	42,85	71,43	90,48	100	100	100	100	21	21
10^6	0,00	0,00	0,00	10	40	60	70	85	90	90	20	18
10^5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	22,22	38,88	55,55	77,77	83,33	18	15
10^4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	13,33	33,33	40,00	53,53	15	8
10^3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00	25,00	33,33	12	4
10^2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	9	0

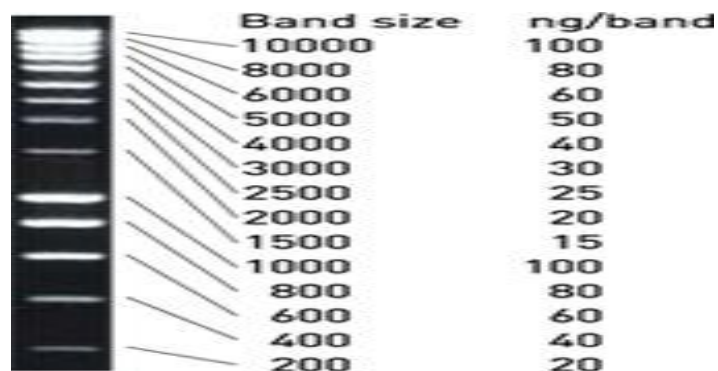
Annexe 52 : Analyse de variance de l'évolution de la muscardine blanche sur les larves infestées par l'entomopathogène BV6 (Test de Newman-Keuls - Seuil = 5%)

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.TOTALE	74178,82	59	1257,268				
VAR.DOSES	28701,81	5	5740,362	15,922	0		
VAR.TEMPS	29252,83	9	3250,314	9,015	0		
VAR.RESIDUELLE 1	16224,18	45	360,537			18,988	72,12%

Annexe 53 : Analyse de variance de l'évolution de la muscardine blanche sur les larves infestées par les entomopathogènes BV1 et BV6 (Test de Newman-Keuls - Seuil = 5%)

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.TOTALE	112620,3	119	946,39				
VAR.ISOLATS (F1)	3958,844	1	3958,844	72,401	0		
VAR.DOSES (F2)	42159,41	5	8431,883	154,205	0		
VAR.TEMPS (F3)	36999,34	9	4111,037	75,184	0		
VAR.INTER F1*2	1518,762	5	303,752	5,555	0,00049		
VAR.INTER F1*3	2520,227	9	280,025	5,121	0,0001		
VAR.INTER F2*3	23003,18	45	511,182	9,349	0		
VAR.RESIDUELLE 1	2460,582	45	54,68			7,395	35,93%

Annexe 54 : Marqueur de taille (SmartLadder de 0.2 à 10 Kbp)



Annexe 55 : Protocol de purification des produits PCR

NucleoSpin® Extract II Kits User Manual

VI. Protocol for Direct Purification of PCR Products**1. Adjust DNA binding conditions**

Mix **2 volumes** of **buffer NT** with **1 volume** of **sample** (e.g. 200 μ l and 100 μ l PCR reaction mix).

For sample volumes < 50 μ l adjust the volume of the reaction mix to 50 μ l using TE buffer (pH 7.5).

2. Bind DNA

Place a NucleoSpin® Extract II column into a 2 ml collecting tube and load the sample.

Centrifuge for **1 min** at **11,000 x g**. Discard flow-through and place the NucleoSpin® Extract II column back into the collecting tube.

3. Wash silica membrane

Add **600 μ l buffer NT3**. Centrifuge for **1 min** at **11,000 x g**. Discard flow-through and place the NucleoSpin® Extract II column back into the collecting tube.

4. Dry silica membrane

Centrifuge for **2 min** at **11,000 x g** to remove **buffer NT3** quantitatively. Make sure the spin column doesn't come in contact with the flow-through while removing it from the centrifuge and the collecting tube.

Residual ethanol from buffer NT3 would inhibit subsequent reactions and has to be removed in this step. In addition to centrifugation, total removal can be achieved by incubation of NucleoSpin® Extract II columns for 2-5 min at 70°C prior to elution.

5. Elute DNA

Place the NucleoSpin® Extract II column into a **clean** 1.5 ml microcentrifuge tube. Add **15-50 μ l elution buffer NE**, incubate at **room temperature** for **1 min** to increase the yield of eluted DNA. Centrifuge for **1 min** at **11,000 x g**.

Yield of larger fragments (> 5-10 kb) can be increased by using prewarmed elution buffer (70°C): For elution, add prewarmed elution buffer and incubate at room temperature for 1 min before collecting

Annexe 56: Mélange réactionnel et programme d'amplification d'une PCR standard

	1 tube	Concentration
H ₂ O	31,8 µl	
Tampon	10µl	TEA 0.5 x
MgCl ₂	3µl	1.5 mM
Amorce 1	1µl	1 µM
Amorce 2	1µl	1 µM
dNTP	1µl	0.2 mM
<i>Taq</i> polymérase	0,2µl	1U
ADN	2µl	10 à 15 ng
Total	50 µl	

1 cycle	35 cycles	1 cycle
94°C à 2 min	95°C à 30 s	72°C à 7 min
	56°C à 30 s	
	72°C à 45 s	

Annexe 57 : Mélange réactionnel d'amplification systématique avec la méthode M13

	1 tube	Concentration
Tampon 10 X	1	1 X
MgCl ₂ 25 mM	0.8	2 mM
dNTP 2.5 mM	1	0.25mM
M13fluo 10µM	0.15	0.15 µM
M13F 10µM	0.04	0.04 µM
Amorce R 10µM	0.15	0.15 µM
H ₂ O	4.36	
<i>Taq</i> polymérase 1U/ µL	0.5	0.5 U
ADN 5 ng/ µL	2	1 ng/ µL
Total	10 µL	

Tampon de lyse (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 50 mM EDTA, 3% SDS, 1% 2-mercaptoéthanol)

Tampon TE (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.1 mM EDTA)

Tampon TEA 0.5x (20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.5 mM EDTA)

bromure d'éthidium (BET)

Annexe 58 : Composition des produits microbiologiques utilisés**I. Milieux d'isolement****P D A** : (potato-dextrose-agar)

Pomme de terre	200g
Glucose	20g
Agar-agar	20g
Eau distillé	1000ml

Gélose nutritive :

Extrait de viande de bœuf	1g
Extrait de levure	2g
Peptone	5g
Chlorure de sodium	5g
Gélose	15g
pH	7.4

II. Milieux d'identification**II.1 Milieux solides****Citrate de Simmons :**

Citrate de sodium	1 g
Sulfate de magnésium	0.2g
Hydrogénéphosphate de potassium	1g
Dihydrogénéphosphate d'ammonium	1g
Chlorure de sodium	5g
Bleu de bromothymol	0.08g
Agar	15g
pH	7.1

Gélose d'amidon :

Gélose nutritif stérile	100ml
Amidon	1%

Gélose au lait :

Gélose nutritif stérile	100ml
Lait écrémé stérile	50ml

TSI (Triple Sugar Iron):

Peptone	15g
Extrait de viande	3g
Extrait de levure	3g
Peptone pepsique De viande	5g
Glucose	1g
Lactose	10g
Saccharose	10g
Rouge de phénol	0.024g
Chlorure de sodium	5g
Sulfate de fer 11 (pasteur)	0.2g
Thiosulfate de sodium	0.3g
Agar	11g
pH	7.5

King A :

Peptone de gélatine	20g
Glycérol	10g
Sulfate de potassium	10g
Chlorure de magnésium	1.4g
Agar purifié	12g
pH	7.2

King B:

Polypeptone	20g
Glycérol	10g
Hydrogénophosphate de potassium	1.5g
Sulfate de magnésium Heptahydraté	1.5g
Agar purifié	12g
pH	7,2

Mannitol mobilité :

Peptone	20g
Mannitol	0.2g
Rouge de phénol 1%	04ml
KNO ₃	0.1g
Agar-agar	0.4g
Eau distillée	100ml
pH	7.6

Vf (Gélose viande – foie) :

Base viande- foie	30g
Glucose	2g
Agar-agar	6g
pH	7.4

II.2 Milieux liquides

ADH (Arginine -di hydrolase):

Extrait de levure	3g
L -arginine (Monochlorhydrate)	5g
Glucose	1g
Bromocrésol pourpre	0.16 mg
Ethanol solvant du BCP	1cm ³
Chlorure de sodium	5g
pH	6.8

Bouillon nitrate :

Infusion cœur- cerveau	25g
Nitrate de sodium	10g
pH	7.2

Clark et Lubs :

Peptone	5g
Glucose	5g
Hydrogénophosphate de potassium	5g
pH	7.5

LDC (Lysine- décarboxylase) :

Extrait de levure	3g
L-lysine (Monochlorhydrate)	5g
Glucose	1g
Bromocrésol pourpre	0.16mg
Ethanol (solvant du BCP)	0.1cm ³
Chlorure de sodium	5g
pH	6.8

Bouillon nutritif

Tryptophane	10g
Extrait de viande	5g
chlorure de sodium	5g

ODC (Ornithine- décarboxylase) :

Extrait de levure	3g
L-ornithine (monochlorhydrate)	5g
Glucose	1g
Bromocrésol pourpre	0.16mg
Ethanol (solvant du BCP)	1cm ³
Chlorure de sodium	5g
PH	6.8

Urée indole :

Urée	2g
L- tryptophane	0.3g
Ethanol à 0.95	1cm ³
Rouge de phénol	2.5mg
Chlorure de sodium	0.5 g
Di hydrogénoPhosphate de potassium	0.1g
HydrogénoPhosphate de potassium	0.1g
pH	7

II.3 Réactifs

Kovacs :

Diméthylamino-benzaladéhyde	50g
Acide chlorhydrique pur	250cm ³
Pentanol	750cm ³

Nitrate 1 :

Acide sulfanilique	0.8g
Acide acétique 5N	100ml

Nitrate 2 :

Naphtylamine	1.5g
Acide acétique 5N	100ml

TDA (Tryptophane désaminase) :

diméthyle-amino-4-benzaldéhyde	50g
Acide chlorhydrique pur	250ml
Pentanol	1000ml

Rouge de méthyle :

Rouge de méthyle	5g
Ethanol à 0.60	1dm ³

II.4 Colorons

Fushine de ziehl :

Fuschine basique	10g
Phénol	50g
Ethanol à 0.95	100cm ³
Eau distillée	1dm ³

Violet de gentiane :

violet de gentiane	10g
Phénol	20g
Ethanol à 0.95	100cm ³
Eau distillée	1dm ³

Lugol :

Iode	5g
Iodure de potassium	10g
Eau distillée	1dm