



République Algérienne démocratique et populaire
Université 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 :

Mme SAIAH Farida

**Contribution à L'étude
sur la lutte biologique à l'égard
de *Phyllocnistis citrella* Stainton
(Lepidoptera ; Gracillariidae),
mineuse des *Citrus*.**

Soutenu publiquement le :

Devant le Jury :

BENDAHMANE Boubekour Seddik	Professeur	Président	Univ. Mostaganem
BERKANI Abdellah	Professeur	Examineur	Univ-Mostaganem
BOUHRAOUA Rachid Tarik	Professeur	Examineur	Univ-Tlemcen
BELABID Lakhdar	Professeur	Examineur	Univ-Mascara
LOTMANI Brahim	Professeur	Examineur	Univ-Mostaganem
YOUCEF BENKKADA Mokhtar	Professeur	Directeur de thèse	Univ. Mostaganem

Année Universitaire : 2013/2014

Dédicaces

A la mémoire de ma très chère amie et sœur Naouel que dieux l'accueil dans son vaste paradis

A la mémoire de mon cher père, j'espère que j'ai répondu aux espoirs qu'il a fondé en moi, Qu'Allah lui fasse miséricorde

A ma chère mère, Tous les mots du monde ne sauraient t'exprimer l'immense amour que je te porte

A baba abdelkader, que dieu te garde pour nous

A mon mari, Aucun mot ne saurait t'exprimer mon profond attachement et ma reconnaissance pour l'amour, la tendresse et la gentillesse dont tu m'as toujours entouré. Que dieu te garde

Aux prunelles de mes yeux Kaoutar, Sarah et Meriem vous resterez pour toujours le rayon du soleil qui égaye ma vie. Que dieu vous garde

A toutes mes sœurs et leurs petites familles

A mes amie(s)

A tout les enseignants du département de biotechnologies et d'agronomie

Farida

Remerciements

Je tiens en premier lieu à exprimer mes vifs remerciements au professeur YUCEF BENKADDA M. mon directeur de thèse, Pour toute la confiance qu'il m'a accordée, en acceptant de me diriger dans ce travail. Pour m'avoir soutenu tout le long de cette période et même bien avant, en m'indiquant les bonnes directions de recherche quand il le fallait, me laisser chercher seule quand il le fallait, et surtout pour sa gentillesse, oh ! Combien absente de nos jours.

Mes sincères remerciements s'adressent également au professeur BENDAHMANE B.S, tout d'abord pour avoir accepté de présider ce jury, mais également pour ses fructueuses remarques et précieux conseils.

Je suis profondément reconnaissante au professeur BERKANI, qui était à l'origine de ce travail. Je pense avoir énormément appris à son contact, j'ai sincèrement apprécié de travailler avec lui et lui suis reconnaissante pour m'avoir appuyé à maintes reprises, pour le temps qu'il m'a consacré malgré les fonctions qu'il occupe et pour toutes les opportunités qu'il m'a facilité au cours de ces dernières années.

Je ne saurais oublier de remercier les Professeurs BELABID L. et BOUHRAOUA R.T. pour l'honneur qu'ils m'ont accordé en acceptant d'examiner ce travail, malgré leurs nombreuses occupations.

Je n'oublierais surtout pas de remercier le professeur LOTMANI B, évidemment pour avoir accepté de juger ce travail, mais surtout pour ses précieux conseils, sa patience et sa disponibilité malgré son emploi du temps très chargé.

Je profite de cette occasion, pour remercier encore une fois monsieur PAPIEROK B de l'institut pasteur de paris, pour l'aide précieuse qu'il m'a apporté pour l'identification de mes souches fongiques.

Une grande part de mes remerciements s'adressent à mon mari Abdenour et mes trois fille, qui ne cesse de supporté mon absence, mes sot d'humeur et mon indisponibilité.

Je ne trouve pas les mots pour exprimer ma sincère gratitude envers ma chère amie Naouel Kolai décédée à la fin de la rédaction de cette thèse ; sans elle je n'aurais sûrement pas arrivé. Que Dieu l'accueille dans son vaste paradis.

Je réserve un grand merci à Mon amie Boualem Malika pour son aide précieuse et pour sa présence lors de la perte de notre chère Naouel ; ses encouragements m'ont permis de remonter la pente.

Je remercie ma sœur Aouaouech pour sa sollicitude et sa bienveillance.

Je ne me manquerais pas de remercier mon amie Badaoui MI, pour laquelle je souhaite beaucoup de courage pour la rédaction de sa thèse de doctorat

Je n'oublierais pas de remercier mes précieux ami(e)s Benourad Fouzia, Tiaiba Ammar et Mahiout Djamel.

Je ne manquerai surtout pas de remercier Mr Mokhbi Abdelwahab d'avoir eu l'amabilité de lire ce travail et sa gentillesse ainsi que Madame Houara Saliha pour sa prévenance, oh combien réconfortante.

Je remercie également Mr Berrahal Nabil, ingénieur du laboratoire de protection de végétaux, Mmes Ketroussi Nadia, Bouadelli Houria ; Mrs Souane Abdelkader, Boukhalfa Mohamed et Hafidha pour leur gentillesse et leur disponibilité

En fin j'exprime toute ma gratitude à toute ma famille et ma belle famille pour leur présence et leur soutien.

SAIAH Farida

Résumé

Phyllocnistis citrella Stainton est responsable de dégâts spectaculaires sur les jeunes pousses (en pépinière ou au champ) des agrumes en Algérie. Elle induit donc indirectement un retard sur la mise à fruit et par conséquent sur la production et la rentabilité de la culture. Le mode de vie endophyte de la larve de l'insecte a compliqué la lutte chimique, de ce fait l'utilisation d'autres alternatives de lutte devient indispensable.

Pour cela, nous nous sommes proposé de chercher activement des souches de microorganismes dotés de pouvoir pathogène susceptible de contribuer dans la régulation des populations de l'insecte.

Notre étude consiste donc à isoler et identifier des souches bactériennes et fongiques naturellement présentes sur l'insecte.

L'isolement effectué à partir des nymphes de *Phyllocnistis citrella* n'ayant pas achevé leur cycle biologique, a mis en évidence l'existence de cinq souches bactériennes différentes. Leur identification par le système API montre que le genre *Bacillus* est le plus fréquemment rencontré, il s'agit d'*Aneurinbacillus aneurinlyticus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus mycoides*, *Brevibacillus agri* (*Bacillus agri*) et *Bacillus lentus*. Le test de pathogénicité avec les bactéries isolées a démontré une mortalité importante de larves de *P. citrella*, *Bacillus mycoides* *Aneurinbacillus aneurinlyticus*, et *Bacillus subtilis* ont causé respectivement 70 %, 75 % et 80 % de mortalité. En revanche *Brevibacillus agri* et *Bacillus lentus* n'en ont provoqué que 30 à 50 %.

L'isolement à partir des nymphes mortes de *Phyllocnistis citrella* (Hemiptera: Aphididae) montrant des symptômes naturels de mycoses entomopathogènes, a révélé la présence de trois (03) souches entomopathogènes à savoir *Metarhizium anisopliae* var *anisopliae*, *Fusarium semitectum* et *Aspergillus flavus*. Les résultats du test de pathogénicité, a démontré que *Fusarium semitectum*, est le seul le champignon qui a dévoilé une efficacité intéressante vis à vis des larves et des œufs de *P. citrella* avec des DL50 respectifs de $10^{2,13}$ spores/ml et $10^{2,01}$ spores/ml.

L'isolement des champignons à partir de *Schistocerca gregaria* a révélé également la présence de trois (03) champignons connus pour leur pathogénicité envers différents ordres d'insectes à savoir *Metarhizium anisopliae* var *acridum*, *Metarhizium flavoviride* var *minus* et *Beauveria bassiana*. Le test de l'effet des champignons sur la mortalité des larves et des œufs a démontré que *M. flavoviride* var *minus* est le plus actif et le plus rapide à éliminer les larves et les œufs de *Phyllocnistis citrella* avec des DL50 respectifs de $10^{1,64}$ spores/ml et $10^{2,36}$ spores/ml.

A la lumière de ces résultats, nous pouvons affirmer que l'ensemble des bactéries et champignons testés ont pu efficacement détourner la stratégie de défense de *Phyllocnistis citrella* et représentent de ce fait des agents potentiels de lutte microbiologique contre cet insecte.

Mots-clés: *Phyllocnistis citrella*, *Citrus* sp. , entomopathogènes, bactéries, champignons.

Abstract

Phyllocnistis citrella Stainton is responsible for spectacular damage to seedlings (nursery or field) of citrus in Algeria. It induces indirectly behind the fruit set and consequently the production and profitability of the crop. Lifestyle endophyte of insect larva complicated chemical control, thus the use of alternative control becomes indispensable.

For this, we have proposed to actively seek strains of microorganisms with pathogenicity may contribute in the regulation of insect populations.

Our study is to isolate and identify bacterial and fungal strains naturally present on the insect.

The isolation made from nymphs *Phyllocnistis citrella* who have not completed their life cycle, showed the existence of five different bacterial strains. Identification by the API system shows that the genus *Bacillus* is the most frequently encountered; it is *Aneurinbacillus aneurinolyticus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus mycoides*, *Brevibacillus agri* (*Bacillus agri*) and *Bacillus lentus*. The pathogenicity test with bacteria isolated showed a significant mortality of larvae of *P. citrella*, *Bacillus mycoides*, *Aneurinbacillus aneurinolyticus*, et *Bacillus subtilis* caused 70%, 75 % and 80 % mortality, respectively. However *Brevibacillus agri* and *Bacillus lentus* not have caused 30 to 50%.

The isolation from dead nymphs *Phyllocnistis citrella* (Hemiptera: Aphididae) showing natural symptoms of fungal entomopathogens, revealed the presence of three (03) entomopathogenic strains namely *Metarhizium anisopliae* var *anisopliae*, *Fusarium semitectum* and *Aspergillus flavus*. The test results of pathogenicity showed that *Fusarium semitectum* seems fastest to control larvae and eggs of *P. citrella* and more efficient, with an LD50 of $10^{2,13}$ spores / ml and $10^{2,01}$ spores/ ml.

The isolation of fungi from *Schistocerca gregaria* revealed also the presence of three (03) fungi known for their pathogenicity to different orders of insects namely *Metarhizium anisopliae* var *acridum*, *Metarhizium flavoviride* var *minus*. Test the effect of the fungus showed that *M. flavoviride* var *minus*, is most effective against larvae the eggs of *P. citrella*, with an LD50 of $10^{1,64}$ spores/ml and $10^{2,36}$ spores/ml.

In the light of these results, we can say that all bacteria and fungi tested were able to effectively divert the defense strategy *Phyllocnistis citrella* and therefore represent potential microbial control agents against this insect.

Keywords: *Phyllocnistis citrella* , *Citrus* sp. , Entomopathogenic bacteria, fungi.

ملخص

Phyllocnistis citrella Stainton هي الحشرة المسؤولة عن اضرار مذهلة في حقول و خاصة في مشتلات الحمضيات في الجزائر. إنها تؤدي بشكل غير مباشر على تاخير عملية الاثمار ، وبالتالي التأثير على الإنتاج وربحية المحصول . كون اليرقة تعيش داخل بشرة الورقة عقدت و حالت دون نجاح المكافحة الكيميائية، مما يلزم علينا البحث على طريقة بديلة للمكافحة. و لهذا الغرض، قررنا السعي وراء البحث على سلالات من الكائنات الدقيقة الممرضة للحشرات بغية الحد من انتشارها.

تتمثل الدراسة التي قمنا بها في عزل وتحديد السلالات البكتيرية والفطرية موجودة بشكل طبيعي على الحشرات. العزل المنجز من شرانق حوريات حشرة *P. citrella* ، يدل على وجود خمس سلالات بكتيرية مختلفة . ان التعريف عن طريق النظام API يدل على أن البكتيريا المعزولة تنتمي كلها الى جنس *Bacillus* وهي *Aneurinbacillus aneurinolyticus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus mycoides*, *Brevibacillus agri* (*Bacillus agri*) et *Bacillus lentus*. اختبار الأمراض بالنسبة للبكتيريا المعزولة أظهرت معدل وفيات كبير من يرقات *Aneurinilyticus Aneurinbacillus Aneurinbacillus aneurinilyticus*, *Bacillus* ، *P. citrella* ، *subtilis et Bacillus mycoides* حدثوا على التوالي 70 %، 75 % و 80 % من الوفيات ، في حين لم يحدث *Brevibacillus agri Bacillus lentus* الى على 30-50 % من الوفيات .

اما عملية عزل الفطريات من الشرانق ميتة تحيط بها خيوط فطرية بيضاء كشفت عن وجود ثلاثة (03) سلالات ممرضة للحشرات و هي *Metarhizium anisopliae var anisopliae*, *Fusarium semitectum* و *Aspergillus flavus*. اما النتائج الاختبار الأمراضية أظهرت أن *Fusarium semitectum* يبدو الإسرع للسيطرة على يرقات وبيض *citrella* وأكثر كفاءة ، لأنه أدى للقضاء على اليرقات والبيض مع LD 50 مساوي 10^{2,36} أبواغ / مل و 10^{2,01} أبواغ / مل.

من جهة اخرى عزل الفطريات من الجراد كشف عن وجود عزل ثلاثة (03) فطريات ممرضة للحشرات معروفة و هي *Metarhizium anisopliae var anisopliae*, *Metarhizium flavoviride var minus* و *Beauveria bassiana* ان اختبار تأثير الفطر على موت اليرقات أظهرت أن *M. flavoviride var minus* هو الأكثر فعالية ضد يرقات *P. citrella*، مع LD 50 مساوي 10^{1,64} أبواغ / مل والسبيل الأكثر نشاطا والأسرع لإزالة بيض حشرة *P. citrella* مع LD 50 مساوي 10^{2,36} أبواغ / مل.

في ضوء هذه النتائج ، يمكننا ان نقول ان كل البكتيريا والفطريات التي تم اختبارها كانت فعالة و من الممكن استعمالها في استراتيجية الدفاع ضد هذه الحشرة.

كلمات البحث: *P. citrella*، الحمضيات، البكتيريا و الفطريات الممرضة للحشرات

Table des matières

Introduction	1
Chapitre1: La mineuse des agrumes "Phyllocnistis citrella Stainton"	3
1.1 Introduction	3
1.2 Historique de l'invasion de <i>P. citrella</i>	3
1.3- Position systématique.....	4
1.4-Description des stades biologiques de <i>P. citrella</i>	5
1.4.1- L'Adulte.....	5
1.4.2- L'œuf.....	5
1.4.3- La larve.....	6
1.4.5- La nymphe.....	7
1.5- Caractéristiques bioécologiques de la mineuse des agrumes.....	8
1.6- La plante hôte.....	10
1.6.1-Présentation de la plante hôte	10
1-6-2-Situation économique des agrumes.....	11
1-6-3-Avantages nutritionnels des agrumes.....	12
1.4- Dégâts et importance économique de la mineuse des agrumes.....	13
1.7- Méthodes de lutte	14
1.7.1- Lutte culturale	15
1.7.2- Lutte chimique	15
1.7.3- Lutte biologique.....	16
Chapitre 2 : La lutte biologique par les entomopathogènes	19
Introduction	20
2.1- Les bactéries entomopathogènes.....	20
2.1.1-Définition.....	20
2.1.2- Mode d'action des bactéries entomopathogènes.....	21
2.2- Les champignons entomopathogènes.....	22
2.2.1- Définition.....	22
2.2.2- Position systématique des champignons entomopathogènes.....	22
2.2.3-Reproduction des champignons entomopathogènes.....	26
2.2.4- Mode d'action des champignons entomopathogènes.....	27
2.2.4.1- La phase d'adhésion	28
2.2.4.2-La phase de germination des spores.....	28
2.2.4.3-La phase de pénétration de l'hôte	29
2.2.4.4-La phase de réponse de l'insecte à l'infection.....	30
2.2.5-Facteurs environnementaux influençant l'infection par les champignons entomopathogènes.....	31
2.2.5.1-La lumière ultraviolette.....	31
2.2.5.2-Température.....	32
2.2.5.3-Humidité.....	34
2.3- Avantages de la lutte biologique	34
Chapitre 3 : Isolement et test de pathogénécité de bactéries entomopathogènes	35
3.1- Isolement de bactéries entomopathogènes	35
3.1.1-Matériel et méthodes.....	35
3.1.1.1-Matériel biologique.....	35
3.1.1. 2- Méthode d'isolement des bactéries entomopathogènes.....	35
3.1.1.3- Purification	35
3.1.1.4- Identification des souches bactériennes.....	36
3.1.1.4.1- Aspect cultural.....	36
3.1.1.4.2- Aspect morphologique	36

3.1.1.4.3- Etude biochimique par l'API système.....	36
3.1.2 Résultats et discussion	38
3.1.2.1 Etudes morphologiques	38
3.1.2.1.1- Aspects macroscopiques des souches obtenues.....	38
3.1.2.1.2- Aspect microscopique des bactéries obtenues.....	38
3.1.2.2 – Etude biochimique.....	42
3.2. Tests de pathogénéicité des bactéries isolées sur les larves de <i>P citrella</i>	45
3.2.1 Introduction.....	45
3.2.2-. Matériel et Méthodes.....	45
3.2.2.1. Prélèvement des feuilles	45
3.2.2.2. Préparation de l'inoculum	45
3.2.2.3. Test de pathogénéicité	46
3.2.3. Résultats et interprétations :.....	47
3.3. Discussion.....	50
Chapitre 4-Isolement des champignons entomopathogènes.....	52
4.1- Isolement à partir de <i>Phyllocnistis citrella</i>	52
4.1.1 Introduction.....	52
4.1.2-Matériel et méthodes.....	52
4.1.2.1- Matériel végétal.....	52
4.1.2.2-Méthode d'isolement des champignons.....	52
4.1.2.3-Purification.....	53
4.1.2.4-Identification.....	53
4.1.2.5- Conservation des isolats.....	54
4.1.3- Calcul de l'abondance des espèces isolées.....	55
4.1.4- Résultats et Interprétation.....	55
4.1.4.1-Champignons isolés à partir de <i>P. citrella</i>	55
4-1.4.1.1-Aspect microscopique et macroscopique des souches isolées.....	61
4-1-4. 2.Calcul de l'abondance des espèces isolées.....	63
4.2- Isolement à partir de <i>Shistocerca gregaria</i>	63
4.2.1- Matériel et méthodes.....	63
4.2.1.1-Matériel biologique	63
4.2.1.2- Méthode d'isolement des champignons	65
4.2.2-Résultats et interprétations.....	65
4.2.2.1-Champignons isolés.....	69
4.2.2.2- Calcul de l'abondance des espèces isolées.....	71
4.3. Discussion.....	
Chapitre 5 : Essai de pathogénéicité des champignons isolés sur les larves et les œufs de <i>P. citrella</i>.....	73
5.1. Introduction.....	73
5.2. Matériel et méthodes.....	73
5.2.1-Matériel biologique	73
5.2.2- Substrat	73
5.2.3- Conduite du test de pathogénéicité des champignons.....	75
5.3-Résultats et interprétation.....	76
5.3.1-Essai de pathogénéicité des différents champignons isolés à partir des nymphes de <i>P. citrella</i>	76
5.3.1.1. Effet des champignons sur les larves de <i>P. citrella</i>	76
5.3.1.2. Effet des champignons sur les œufs de <i>P. citrella</i>	79

5.3.2- Essai de pathogénéicité des différents champignons isolés à partir de <i>Shistocerca gregaria</i>	85
5.3.2.1- Effet des champignons sur les larves de <i>P. citrella</i>	85
5.3.2.2-Effet de différents champignons sur les œufs de <i>P. citrella</i>	88
5.4-Discussion.....	94
Chapitre 6 : Étude de l'influence de quelques facteurs abiotiques sur le comportement « in vitro » des isolats fongiques entomopathogènes.....	96
6.1. Introduction.....	96
6.2. Matériel.....	96
6.2.1. Choix des isolats fongiques.....	96
6.2.2 Choix du milieu de culture.....	96
6.3. Méthodes.....	97
6.3.1. Estimation de la croissance mycélienne.....	97
6.3.2. Évaluation quantitative des spores.....	97
6.3.3. Conduites des différents tests de l'influence des facteurs abiotique sur la croissance végétative des isolats entomopathogènes.....	98
6.3.3.1. Influence de la température.....	98
6.3.3.2. Influence de l'humidité relative.....	98
6.3.3.3. Influence du pH.....	99
6.3.3.4 Influence de la lumière et de l'obscurité.....	100
6.4. Résultats et interprétations.....	100
6.4.1 Influence de la température.....	100
6.4.1.1 Influence de la température sur la croissance mycélienne.....	100
6.4.1.2 Influence de la température sur la sporulation.....	103
6.4.2 Influence de l'humidité relative.....	105
6.4.2.1 Influence de l'humidité relative sur la croissance mycélienne.....	105
6.4.2.2 Influence de l'humidité relative sur la sporulation.....	108
6.4.3Influence du pH.....	111
6.4.3.1 Influence du pH sur la croissance mycélienne.....	111
6.4.3.2 Influence du pH sur la sporulation.....	112
6.4.4 Influence de la lumière et de l'obscurité sur la croissance mycélienne et la sporulation.....	113
6.5. Discussion.....	116
Conclusion.....	119

Liste des Figures

Figure 1: les différents stades biologiques de <i>P. citrella</i>	8
Figure 2: Répartition géographique des exportations d'agrumes frais.....	12
Figure 3: Dégâts de <i>P. citrella</i> sur les feuilles de <i>Citrus</i>	13
Figure 4 : <i>Pnigalio mediterraneus</i>	17
Figure 5 : Les aspects macroscopiques des bactéries isolées à partir des larves et nymphes de <i>P. citrella</i>	41
Figure 6: Aspects microscopiques des bactéries isolées à partir des larves et nymphes de <i>P. citrella</i>	41
Figure 7 : Aspect de la galerie API20E inoculé par la bactérie1.....	42
Figure8: Aspect de la galerie API20E inoculé par la bactérie 2.....	42
Figure 9: Aspect de la galerie API20E inoculé par la bacterie3.....	42
Figure10 : Aspect de la galerie API20E inoculé par la bactérie 4.....	42
Figure 11: Aspect de la galerie API20E inoculé par la bacterie 5.....	42
Figure 12 : les suspensions bactériennes après l'incubation.....	46
Figure 13: Effet des différents traitements sur la mortalité des larves de <i>P citrella</i>	47
Figure14 : mortalité corrigé des larves de <i>P. citrella</i> traitées par les solutions bactériennes.....	48
Figure15 : Larve morte inoculée par <i>Bacillus mycoides</i>	49
Figure16 : Larve morte inoculée par <i>Bacillus subtilis</i>	49
Figure 17 : nymphes de <i>P.citrella</i> naturellement enroulées par des hyphes blancs d'un champignon entomopathogène.....	52
Figure 18 : Isolement des champignons à partir des nymphes de <i>P. citrella</i>	53
Figure 19: Aspect macroscopique et microscopique de <i>Bipolaris</i> sp.....	55
Figure 20 : Aspect macroscopique (A) et microscopique (B) de <i>Cladosporium</i> sp.....	55
Figure 21: Aspect macroscopique (A) et microscopique (B) de <i>Alternaria</i> sp.....	56
Figure 22: Aspect macroscopique (A) et microscopique (B) de <i>Fusarium</i> sp.....	57
Figure 23: Aspect macroscopique (A) et microscopique (B) de <i>Stemphyllium</i> sp.....	57
Figure 24: Aspect macroscopique (A) et microscopique (B) de <i>Phoma</i> sp.....	58
Figure 25 : Aspect macroscopique (A) et microscopique (B) de <i>Metarhizium</i> sp.....	58
Figure 26 : Aspect macroscopique (A) et microscopique (B) de <i>Penicillium</i> sp.....	59
Figure 27 : Aspect macroscopique (A) et microscopique (B) <i>Aspergillus</i>	60
Figure28 : Aspect microscopique de <i>Coelomycedium</i> sp.....	60
Figure 29 : Aspect macroscopique (A) et microscopique (B) d' <i>Aspergillus flavus</i>	61
Figure 30: Pourcentage d'abondance des espèces isolées à partir des nymphes de <i>Phyllocnistis citrella</i>	62
Figure 31 : Adulte de <i>Shistocerca gregaria</i> présentant des symptômes d'infection.....	63
Figure 32: Isolement des champignons a partir de <i>Shistocerca gregaria</i>	64
Figure 33: Aspect macroscopique (A) et microscopique (B) de <i>Fusarium</i> sp1. (X40).....	65
Figure 34: Aspect macroscopique (A) et microscopique (B) de <i>Fusarium</i> sp2. (X40).....	65
Figure 35 : Aspect macroscopique (A) et microscopique (B) de <i>Fusarium</i> sp3.....	65
Figure 36: Aspect macroscopique (A) et microscopique (B) de <i>Metarhizium flavoviride</i>	66
Figure 37 : Aspect macroscopique (A) et microscopique (B) de <i>Metarhizium anisopliae</i>	66
Figure 38 : Aspect macroscopique (A) et microscopique (B1 conidies, B2 hyphes) de <i>Beauveria bassiana</i> . (X40).....	67
Figure 39: Aspect macroscopique (A) et microscopique (B) d' <i>Aspergillus niger</i>	67
Figure 40 : Aspect macroscopique (A) et microscopique (B) d' <i>Alternaria</i> sp.....	68
Figure 41 : Pourcentage d'abondance totale des souches isolées à partir des adultes de <i>Schistocerca gregaria</i>	69

Figure 42 : Pourcentages d'abondance des champignons isolés à partir des organes externes (A) et internes (B) des adultes de <i>Schistocerca gregaria</i>	70
Figure 43 : Substrat expérimentale pour le test de pathogénicité (Boites de Pétri contenant du coton humidifié).....	75
Figure 44 : Effet de différentes concentrations de spores d' <i>Aspergillus flavus</i> sur la mortalité des larves de <i>P. citrella</i>	76
Figure 45 : Effet de différentes concentrations de spores <i>Metarhizium anisopliae</i> var <i>anisopliae</i> sur la mortalité des larves de <i>P. citrella</i>	77
Figure 46 : Effet de différentes concentrations de spores de <i>Fusarium semitectum</i> sur la mortalité des larves de <i>P. citrella</i>	77
Figure 47 : Taux de mortalité des larves de <i>P. citrella</i> sous l'effet de <i>Metarhizium anisopliae</i> var <i>anisopliae</i> noté au 5 ^{ème} jour du traitement.....	78
Figure 48 : Taux de mortalité des larves de <i>P. citrella</i> sous l'effet de <i>Fusarium semitectum</i> noté au 5 ^{ème} jour du traitement.....	78
Figure 49 : Taux de mortalité des larves de <i>P. citrella</i> sous l'effet d' <i>Aspergillus flavus</i> noté au 5 ^{ème} jour du traitement.....	79
Figure 50 Effet de différentes concentrations de spores de <i>Fusarium semitectum</i> sur la mortalité des œufs de <i>P. citrella</i>	80
Figure 51 : Effet de différentes concentrations de spores de <i>Metarhizium anisopliae</i> var <i>anisopliae</i> sur la mortalité des œufs de <i>P. citrella</i>	80
Figure 52 : Effet de différentes concentrations de spores <i>Aspergillus flavus</i> sur la mortalité des œufs de <i>P. citrella</i>	81
Figure 53 : Mortalité corrigée des œufs de <i>P. citrella</i> sous l'effet de <i>Fusarium semitectum</i>	82
Figure 54 : Mortalité corrigée des œufs de <i>P. citrella</i> sous l'effet de <i>Metarhizium anisopliae</i> var <i>anisopliae</i>	82
Figure 55 : Mortalité corrigée des œufs de <i>P. citrella</i> sous l'effet de <i>Aspergillus flavus</i>	83
Figure 56 : Action d' <i>A. flavus</i> sur les larves de <i>P. citrella</i>	84
Figure 57 : Action de <i>F. semitectum</i> sur les larves de <i>P. citrella</i>	84
Figure 58 : Effet de différentes concentrations de spores de <i>Metarhizium anisopliae</i> var <i>acridum</i> sur la mortalité des larves de <i>P. citrella</i>	85
Figure 59 : Effet de différentes concentrations de spores de <i>Beauveria bassiana</i> sur la mortalité des larves de <i>P. citrella</i>	86
Figure 60 : Effet de différentes concentrations de spores de <i>Metarhizium flavoviride</i> var <i>minus</i> sur la mortalité des larves de <i>P. citrella</i>	86
Figure 61 : Mortalité corrigé des larves de <i>P. citrella</i> sous l'effet de <i>Metarhizium anisopliae</i> var <i>acridum</i> notée le 3 ^{ème} jour du traitement.....	87
Figure 62 : Mortalité corrigé des larves de <i>P. citrella</i> sous l'effet de <i>Metarhizium flavoviride</i> notée le 3 ^{ème} jour du traitement.....	87
Figure 63 : Mortalité corrigée des larves de <i>P. citrella</i> sous l'effet de <i>Beauveria bassiana</i> notée le 3 ^{ème} jour du traitement.....	88
Figure 64 : Effet de différentes concentrations de spores de <i>Metarhizium anisopliae</i> var <i>acridum</i> sur la mortalité des œufs de <i>P. citrella</i>	89
Figure 65 : Effet de différentes concentrations de spores de <i>Metarhizium flavoviride</i> var <i>minus</i> sur la mortalité des œufs de <i>P. citrella</i>	89
Figure 66 : Effet de différentes concentrations de spores de <i>Beauveria sp.</i> sur la mortalité des œufs de <i>P. citrella</i>	90
Figure 67 : Mortalité corrigé des œufs de <i>P. citrella</i> sous l'effet de <i>Metarhizium anisopliae</i>	90
Figure 68 : Mortalité corrigé des œufs de <i>P. citrella</i> sous l'effet de <i>Metarhizium flavoviride</i> var <i>minus</i>	91
Figure 69 : Mortalité corrigée des œufs de <i>P. citrella</i> sous l'effet de <i>Beauveria bassiana</i>	91

Figure 70: Action de <i>Metarhizium flavoviride</i> var <i>minus</i> (dose 10^6) sur les larves de <i>P. citrella</i> (X10).....	92
Figure 71: Action de <i>Metarhizium anisopliae</i> var <i>acridum</i> (dose 10^4) sur les larves de <i>P. citrella</i> (X10)	92
Figure 72 : Action de <i>Beauveria bassiana</i> sur les larves de <i>P. citrella</i> (X10).....	92
Figure 73: Action des champignons isolés à partir de <i>Schistocerca gregaria</i> sur les œufs de <i>P. citrella</i> (X10).....	93
Figure74 : Influence des différentes températures sur la croissance mycélienne de <i>Metarhizium flavoviride</i> var <i>minus</i>	100
Figure 75 : Influence des différentes températures sur la croissance mycélienne de <i>Metarhizium anisopliae</i> var <i>aridum</i>	101
Figure76 : Influence des différentes températures sur la croissance mycélienne de <i>Beauveria bassiana</i>	101
Figure77: Influence des différentes températures sur la croissance mycélienne de <i>Fusarium semitectum</i>	102
Figure 78: La vitesse de croissance des quatre souches fongiques entomopathogènes en fonction de la température.....	102
Figure 79 : Effet des températures sur la sporulation de <i>Metarhizium flavoviride</i> var <i>minus</i>	103
Figure 80: Effet des températures sur la sporulation de <i>Metarhizium anisopliae</i> var <i>acridum</i> ...	104
Figure 81 : Effet des températures sur la sporulation de <i>Beauveria bassiana</i>	104
Figure 82: Effet des températures sur la sporulation de <i>Fusarium semitectum</i>	105
Figure 83 : Effet des niveaux d'humidités sur la croissance mycélienne de <i>Metarhizium flavoviride</i> var <i>minus</i>	106
Figure 84 : Effet des niveaux d'humidités sur la croissance mycélienne de <i>Metarhizium anisopliae</i> var <i>acridum</i>	106
Figure 85 : Effet des niveaux d'humidités sur la croissance mycélienne de <i>Beauveria bassiana</i>	107
Figure 86 : Effet des niveaux d'humidités sur la croissance mycélienne de <i>Fusarium semitectum</i>	108
Figure 87 : Effet des niveaux d'humidités sur la sporulation de <i>Metarhizium flavoviride</i> var <i>minus</i>	108
Figure 88: Effet des niveaux d'humidités sur la sporulation de <i>Metarhizium anisopliae</i>	109
Figure 89 : Effet des niveaux d'humidités sur la sporulation de <i>Beauveria bassiana</i>	109
Figure 90 : Effet des niveaux d'humidités sur la sporulation de <i>Fusarium semitectum</i>	110
Figure 91: Effet des niveaux d'humidités sur la croissance mycélienne de <i>Metarhizium flavoviride</i> var <i>minus</i> (A) et <i>Metarhizium anisopliae</i> var <i>acridum</i> (B).....	111
Figure 92 : Effet des niveaux d'humidités sur la croissance mycélienne de <i>Beauveria bassiana</i> (A) et <i>Fusarium semitectum</i> (B).....	112
Figure 93 : Effet du pH sur la sporulation de <i>Metarhizium flavoviride</i> var <i>minus</i> (A) et <i>Metarhizium anisopliae</i> var <i>acridum</i> (B).....	112
Figure 94 : Effet des pH sur la sporulation de <i>Beauveria bassiana</i> (A) et <i>Fusarium semitectum</i> (B).....	113
Figure 95 : Effet de la lumière et de obscurité sur la croissance mycélienne de <i>Metarhizium flavoviride</i> var <i>minus</i> (A) et <i>Metarhizium anisopliae</i> var <i>acridum</i> (B).....	113
Figure 96 : Effet de la lumière et de obscurité sur la croissance mycélienne de <i>Beauveria bassiana</i> (A) et <i>Fusarium semitectum</i> (B).....	114
Figure 97 : Effet de la lumière et de obscurité sur la sporulation de <i>Metarhizium flavoviride</i> var <i>minus</i> (A) et <i>Metarhizium anisopliae</i> var <i>acridum</i> (B).....	114
Figure 98 : Effet de la lumière et de obscurité sur la sporulation de <i>Beauveria bassiana</i> (A) et <i>Fusarium semitectum</i> (B).....	115

Liste des tableaux

Tableau1: Critères d'identification des différents stades larvaires de <i>P. citrella</i>	7
Tableau2 : genres et espèces de champignons entomopathogènes appartenant à différents Phylum.....	25
Tableau 3 : Tableau de lecture de la galerie miniaturisée API 20E.....	38
Tableau 4: Différents aspects macroscopique et microscopiques des souches bactériennes isolées.....	39
Tableau 5 : Résultats des tests biochimiques par l'API système d' <i>Aneurinbacillus aneurinilyticus</i> (<i>Bacillus aneurinilyticus</i>) et <i>Bacillus subtilis</i>	43
Tableau 6 : les résultats des tests biochimiques par la galerie API système de <i>Bacillus mycoide</i> , <i>Brevibacillus agri</i> et <i>Bacillus lentus</i>	44
Tableau7: Quantité de produit à utiliser	98
Tableau 8: Quantité d' HCl et de NaOH nécessaire pour obtenir la gamme de pH allant de 4,1 à 8,1	99

Liste des abréviations

OIE : organisation mondiale de la santé animale
Vip : Vegetative Insecticidal Protein
L1: premier stade larvaire
L2 : deuxième stade larvaire
L3 : troisième stade larvaire
FAO: food and agriculture organisation
STAT: statistiques
INPV: institut national de protection des végétaux
SRPV: station régionale de protection des végétaux
g/l : gramme par litre
Lannate 25WP
MAD1 : Adhesin of *Metarhizium anisopliae* Links Adhesion with Blastospores
per os : par voie orale (ingestion)
GN : gélose nutritive
API: tests biochimiques miniaturisés
API 20 E : tests biochimiques miniaturisés destinée à l'identification des entérobactéries
CIT : citrate
VP : pyruvate de sodium
GEL: gélatine
ADH : arginine di hydrolase
LDC: lysine décarboxylase
ODC : omithine décarboxylase
URE : uréase
TDA : tryptophane (tryptophane désaminase)
IND : tryptophane (production d'indole)
PDA : potato dextrose agar
OGA : oxytétracycline glucose agar
DL50 : dose létale pour 50% de population
R² : coefficient de corrélation au carré
Var: variété
Ln : logarithme népérien
mm/j : millimètre par jour
ml : millitre
°C : degré Celsius
4N: 4 fois normale
HR: humidité relative
pH: potentiel d'hydrogène
et al. : et collaborateurs

Introduction

Parmi les cultures les plus appréciées en Algérie, l'agrumiculture occupe une place très importante et constitue un intérêt économique de valeur. Cependant, le genre *Citrus* se trouve confrontée à certaines contraintes en particulier celles d'ordre biotique.

La mineuse des agrumes "*Phyllocnistis citrella* Stainton" constitue le dernier en date des ravageurs introduit en Algérie. En effet, ce micro-lépidoptère a été identifié pour la première fois dans les vergers agrumicoles de l'ouest algérien en 1994 (Berkani, 1995).

Phyllocnistis citrella (Lepidoptera: Gracillariidae) a envahi l'Ouest algérien, et s'est propagé par la suite rapidement dans toutes les régions productrices d'agrumes du pays. La femelle pond ses œufs et les dépose individuellement à côté de la nervure principale des jeunes feuilles tendres (Knapp et al., 1995). Après l'éclosion, les trois stades larvaires se nourrissent du parenchyme des feuilles en creusant des mines d'où le nom de mineuse. La nymphose a lieu au bord de la feuille.

Cet insecte est un ravageur important par les dégâts qu'il occasionne durant la période des pousses végétatives. Il diminue la surface du limbe des feuilles photosynthétiquement actives, ce qui nuit gravement aux jeunes plants en pépinière ou en verger nouvellement planté.

La lutte contre ce ravageur pose une problématique quant à la stratégie et aux moyens à utiliser et constitue de nouveaux défis à relever. La lutte chimique ne donnant pas les résultats escomptés, les méthodes de lutte biologique peuvent constituer une réponse aux attaques de cet insecte. 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.

En effet en 2011, l'INPV a engagé un programme de relance des élevages d'auxiliaires allochtones *Semilacher petiolatus* et *Citrostichus phyllocnistoides*, et entrepris des lâchers pour la mise en place de la lutte biologique contre la mineuse des agrumes *Phyllocnistis citrella*. Ce programme montre que cet insecte n'a pas encore été complètement maîtrisé et nécessite d'autres perspectives de lutte.

Outre les auxiliaires introduits, trois hyménoptères parasitoïdes de *P. citrella* avaient été identifiés jusqu'à ce jour en Algérie : les Eulophidae : *Pnigalio agraulis* Walker, *Cirrospilus vittatus* Walker et *Cirrospilus pictus* Nées. Les travaux de Boualem (2010) ont permis d'identifier trois nouvelles espèces de parasitoïdes : *Citrostichus phyllocnistoides* Narayanan, *Closterocerus formosus* Westwood et *Pnigalio pectinicornis* L., collectées dans la région de Mostaganem.

Afin d'identifier et de mettre en évidence d'autres populations d'auxiliaires, dans le cadre de la lutte intégrée mise en œuvre contre *P. citrella* dans l'Ouest algérien. La lutte microbiologique pourrait être envisageable, en particulier après les résultats forts satisfaisants, qu'elle a donnés sur

d'autres ravageurs des cultures. Il s'agit évidemment de la lutte par l'utilisation des entomopathogènes (champignons et bactéries) inféodés à ce parasite.

Les agents pathogènes naturels des insectes comprennent des bactéries, des virus, des champignons et des protozoaires. Ils sont tous présents à l'état naturel parmi les populations d'insectes. Sous des conditions qui leur sont favorables, ils peuvent provoquer l'éclosion de foyers de maladies pouvant restreindre considérablement les populations d'insectes. Les chenilles sont d'ailleurs souvent touchées par des infections virales ou fongiques cycliques qui se propagent facilement si le milieu est humide.

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

C'est dans cette perspective que cette étude a été orientée. Elle constitue la première approche en Algérie visant l'utilisation d'isolats indigènes de bactéries et de champignons contre *P. citrella*.

L'étude se résume dans les points suivants :

- Isolement et identification des bactéries présentes naturellement sur les cadavres des nymphes de *P. citrella*. Détermination du niveau de leur toxicité sur les larves de cette dernière.
- Isolement et identification des différentes souches de champignons présentes sur les nymphes de *P. citrella* enroulées par des hyphes fongiques. En vérifiant l'influence de ces souches sur la mortalité des larves et des oeufs de *P. citrella*.
- Isolement et identification des champignons retrouvés enroulés sur les cadavres de *Schistocerca gregaria*, en vérifiant leur pathogénéicité sur les larves et les œufs de *P. citrella*,
- Étude de l'effet de quelques facteurs abiotiques sur le comportement "in vitro" des champignons entomopathogènes ayant présenté un pouvoir pathogène important sur les larves de *P. citrella*.

Chapitre1:La mineuse des agrumes "*Phyllocnistis citrella* Stainton"

1.1-Introduction

Phyllocnistis citrella Stainton appartient à la famille des Gracillariidae est appelé communément «mineuse des feuilles des agrumes». Son identification a été faite pour la première fois en Inde par Stainton en 1856, puis confirmé par Davis (1987) spécialiste des Gracillariidae (Heppner, 1993).

Ce microlépidoptère fut signalé pour la première fois dans les vergers agrumicoles de l'Ouest algérien durant l'été 1994 (Berkani, 1995). Depuis, il est considéré comme le principal ravageur des *Citrus* en Algérie.

1.2- Historique

La mineuse des agrumes provient du sud-est asiatique, zone d'origine des agrumes, hôtes spécifiques de ce ravageur (Clausen, 1931 ; 1933 ; Quilici *et al.*, 1995). Stainton (1856) est le premier auteur qui a mentionné l'Inde comme origine de cette espèce. (Fletcher, 1920 ; Ba-Angood, 1977; Beattie, 1989 ; Heppner, 1993 ; Berkani, 1995; Knapp *et al.*, 1995 ; Chermiti, 1997). A cette époque, *P. citrella* a été confondu avec d'autres espèces européennes telles que *Phyllocnistis suffurella* et *P. saligna* (Knapp *et al.*, 1995).

Elle a été annoncée ensuite au Nord de Hong Kong, en Chine et au Philippines (Sasser, 1915). Ultérieurement, elle a été introduite en Australie en 1918; pour atteindre subséquemment l'Arabie Saoudite en Asie du sud (Fletcher, 1920), puis elle fut signalée au sud du Japon (Clausen, 1927).

Par la suite la mineuse a colonisé d'autres territoires. Elle a été introduite au Soudan (Badawy, 1967), et la Côte d'Ivoire (Gerrou, 1973). Après, elle s'est rapidement étendue vers presque tous les pays de l'Afrique de l'ouest.

La distribution de cette espèce invasive a évolué d'une manière alarmante à partir des années 90, elle a été signalée simultanément en 1993, dans la région de Malaga en Espagne (Garijo et Garcia, 1994), et dans les pépinières agrumicoles du sud de la Floride (Heppner, 1993).

Dans le Bassin méditerranéen, les premières infestations ont été observées :

- En 1993, en Espagne (Garijo et García, 1994; Garido, 1995).
- En 1994, au Maroc (Belarbi et Abir, 1995), en Italie (Benfatto, 1995 et Ortu *et al.*, 1995) ainsi qu'en Algérie (Berkani, 1995). Depuis, *P. citrella* est devenue le principal ravageur des agrumes en Afrique du Nord (Chermiti *et al.*, 1999 ; Saharaoui *et al.*, 2001 ; Rizqi *et al.*, 2003).

• En 1995, en France, en Grèce et en Tunisie (Quillici *et al.*, 1995 ; Anagnou *et al.*, 2006).

Dans l'hémisphère occidental, la mineuse des feuilles d'agrumes a d'abord été découverte aux Etats Unis plus précisément en Floride, en mai 1993. Depuis, elle s'est étendue à tous les comtés d'agrumes de la Floride. En 1994, elle s'est propagée à l'Alabama, la Louisiane et le Texas (Nagamine et Heu 2003). En 1995, la mineuse des agrumes a été découverte en Amérique centrale, l'ouest du Mexique, et plusieurs îles des Caraïbes (Jones, 2001). En 2000, elle est arrivé dans le sud de la Californie en provenance du Mexique (Grafton-Cardwell *et al.*, 2009), et a été détecté pour la première fois à Hawaii à Oahu, Kauai, elle s'est propagée à Maui et Molokai en 2001 et à Big Island (Hawaii) en 2002 (Nagamine et Heu, 2003).

Depuis, la mineuse a colonisé et gagné toutes les régions où l'agrumiculture est pratiquée, soit la quasi-totalité des régions du monde, y compris l'Argentine, le Brésil, la Corse, le Costa Rica, le Cuba, la Palestine occupée, la Malaisie, l'île Maurice et l'Afrique du Sud (Vercher *et al.*, 2005 ; Amiri-Besheli, 2009 ; Heppner, 2010).

1.3- Position systématique

Selon Balachowsky (1966), La position systématique de La mineuse des feuilles des agrumes est comme suit :

Regne: Animalia

Phylum: Arthropoda

Classe: Insecta

Ordre: Lepidoptera

S/ordre: Hetereneura

Super famille: Tineoidea

Famille: Gracillariidae

Sous famille: Phyllocnistinae

Genre: *Phyllocnistis*

Espèce: *P. citrella* Stainton (1856)

1.4-Description biologique de *P. citrella*

1.4.1- L'Adulte.

L'adulte (Fig.1) est un microlépidoptère, de 4 à 8 mm d'envergure et mesurant 2 à 4 mm de long en position de repos (Balachowski, 1966 ; Quilici *et al.*, 1995). La couleur a été décrite selon certains auteurs comme blanche argentée (Guerout, 1974 ; Heppner, 1998), alors que d'autres signalent une couleur grisâtre (Quilici *et al.*, 1995).

Le fond des ailes antérieures est d'un blanc neigeux devenant jaune distalement avec plusieurs petites stries obliques ou perpendiculaires à la côte, en plus d'un trait noir distal formant le rayon et un éventail de trois à quatre lignes de même couleur (Balachowsky, 1966). Ces paires d'ailes sont pourvues de franges extrêmement fragile leur chute rend l'identification de l'imago très difficile (Balachowski, 1966 ; Guerout, 1974 ; Quilici *et al.*, 1995 Heppner, 1993, ; Garijo et Garcia Heppner, 1998).

Guerout (1974) rapporte que la partie basale des ailes antérieures est blanche avec une ligne sinueuse argentée et ne porte pas de franges. Alors que la partie apicale est d'un colorie légèrement différent, résultat du mélange d'écailles blanches, beige et dorées, semées de quelques écailles noires.

P. citrella présente trois paires de pattes avec des griffes non apparentées ; les pattes antérieures sont courtes et moins longues que celles du centre, alors que les postérieures sont les plus développées et munies de deux paires d'éperons de différentes dimensions, s'élevant des extrémités du tibia et du tarse avec cinq articles, l'article basale étant le plus long (Guerout, 1974).

D'après Knapp *et al.* (1995), l'adulte est actif à partir du crépuscule jusqu'au matin. Durant la journée, il passe la plupart de son temps sur la face inférieure de la feuille. Généralement, il vit de 2 à 12 jours mais sa vie peut se prolonger jusqu'à 20 jours. La femelle est légèrement plus large que le mâle, et probablement pond le soir et aux premières heures du matin, elle se nourrit de nectar afin d'augmenter son oviposition.

1.4.2- L'œuf

Il est généralement convexe, aplati dépourvu de toute ornements avec une couleur transparente virant au jaune pâle, il mesure entre 0,2 à 0,3 mm (Balachowsky, 1966 ; Guerout, 1974 ; Quilici *et al.*, 1995). Guerout (1974), Balachowsky (1966), Beattie et Smith (1993), Zhang *et al.* (1994), Quilici *et al.* (1995) et Knapp *et al.* (1995) notent que l'œuf ressemble à une gouttelette d'eau brillante puis devient jaune pâle et opaque après deux jours de sa ponte (Fig. 1). Généralement, il est déposé isolément ou par groupe de deux ou trois éléments

juxtaposés, près de la nervure centrale des jeunes feuilles, de préférence sur la face inférieure ; lors des fortes infestations, il est déposé sur les deux faces. Plusieurs pontes peuvent être observées sur une seule feuille.

1.4.3- La larve

Durant son cycle de développement, *Phyllocnistis citrella* passe par quatre stades larvaires dont les trois premiers seulement se nourrissent, et possèdent un appareil buccal typique des chenilles mineuses comprenant en particulier deux mandibules aplaties dorso-ventralement en lame portant une fine denture. Chez le quatrième stade qui ne se nourrit pas on assiste à une transformation des pièces buccales qui seront destinées au tissage du cocon nymphal (Ayoub, 1960 ; Badawy, 1967; Knapp *et al.*, 1995).

Michelakis et Vacante (1997), les larves néonates mesurent entre 1 à 2 mm de long, ils sont de couleur blanche puis avec l'âge acquièrent une couleur jaune. Knapp *et al.* (1995), notent que la capsule céphalique de celle-ci est plus large que le thorax et les segments abdominaux. Le développement larvaire progresse tant que les larves se nourrissent.

Le corps de la larve (Fig.1) est apode, allongé avec une forme aplatie dorso-ventralement, la tête est prognathe robuste et triangulaire (Guerout, 1974). Le thorax élargit l'abdomen avec des segments bien délimités dont les trois derniers sont étroitement cylindriques (Knapp *et al.*, 1995).

Balachowsky (1966), Badawy (1976) et Guerout (1974) notent que le quatrième stade larvaire (Fig.1), peut être considéré comme prénymphe et il est de même taille que le troisième sauf que celui-ci est de forme cylindrique. Arrivés à ce stade, les individus se métamorphosent et atteignent leur développement maximal. La prénymphe, contrairement aux autres stades larvaires se caractérise par un appareil buccal atrophié ne permettant pas la prise normale de nourriture ; il est destiné essentiellement à tisser le cocon nymphal. Barroga (1969) et Garrido (1995) rapportent que c'est un stade de repos qui n'a aucun rôle et semble n'avoir aucune mobilité exceptée pour les mouvements abdominaux.

Les trois premiers stades larvaires ne diffèrent entre eux que par leurs tailles (Barroga, 1969 et Knapp *et al.*, 1994). En effet, Badawy (1969) note que les trois derniers stades larvaires sont presque similaires en forme et facilement identifiable par plusieurs caractères tels que :

- La largeur de la capsule céphalique ;
- La largeur latérale des segments du corps ;

- La forme du dernier segment du corps:
 - ✓ Incisé au milieu pour la larve du premier stade (L1),
 - ✓ Portant deux courts processus caudaux pour la larve du deuxième stade (L2),
 - ✓ Portant deux processus caudaux relativement longs pour le troisième stade (L3).

Les travaux de Beattie et Smith (1993) sur les larves de *P. citrella* ont fait ressortir les mensurations suivantes :

- ▲ 1^{er} stade larvaire : jusqu' à : 1,5 mm,
- ▲ 2^{ème} stade larvaire : entre 1,5 à 2,5 mm,
- ▲ 3^{ème} stade larvaire : entre 2,5 à 4,5 mm,
- ▲ Prénympe : + de 4,5mm.

Le tableau 1, illustre les mensurations, la couleur et les formes des galeries des trois stades larvaires rapportés par Berkani (2000).

Tableau1: Critères d'identification des différents stades larvaires de *P. citrella* (Berkani, 2000)

Stade larvaire	Mensuration	Couleur de la larve	Forme des galeries
L1	0,81	Très claire	Rectiligne
L2	1,56	Début de coloration Jaune	Sinueuse peu développée
L3	3,25	Jaune foncée	Sinueuse très développée

1.4.4- La nymphe

Oblongue, mesurant entre 3 à 4 mm de long, de couleur d'abord brun clair puis devient foncée (Badawy, 1969 ; Guerout, 1974). La tête est de couleur marron jaunâtre avec des plages noires sur la partie dorsale (Fig.1) (Beattie et Smith, 1993) ; elle est munie d'une épine frontale acérée, destinée à perforer le cocon formé lors de la nymphose (Balachowsky, 1966 et Guerout, 1974).

P. citrella possède un dimorphisme sexuel. Chez la nymphe femelle, l'épine frontale est longue et courbée alors que chez le mâle, elle est courte et droite (Jacas et Garrido, 1996). Ce dimorphisme permet le sexage rapide. *P. citrella* présente une morphologie pygidiale différente, ce qui rend capable la prédiction des sexes des adultes. En effet, comparativement à celui du mâle, le pygidium femelle est plus long portant ainsi deux poils (Jacas et Garrido, 1996).

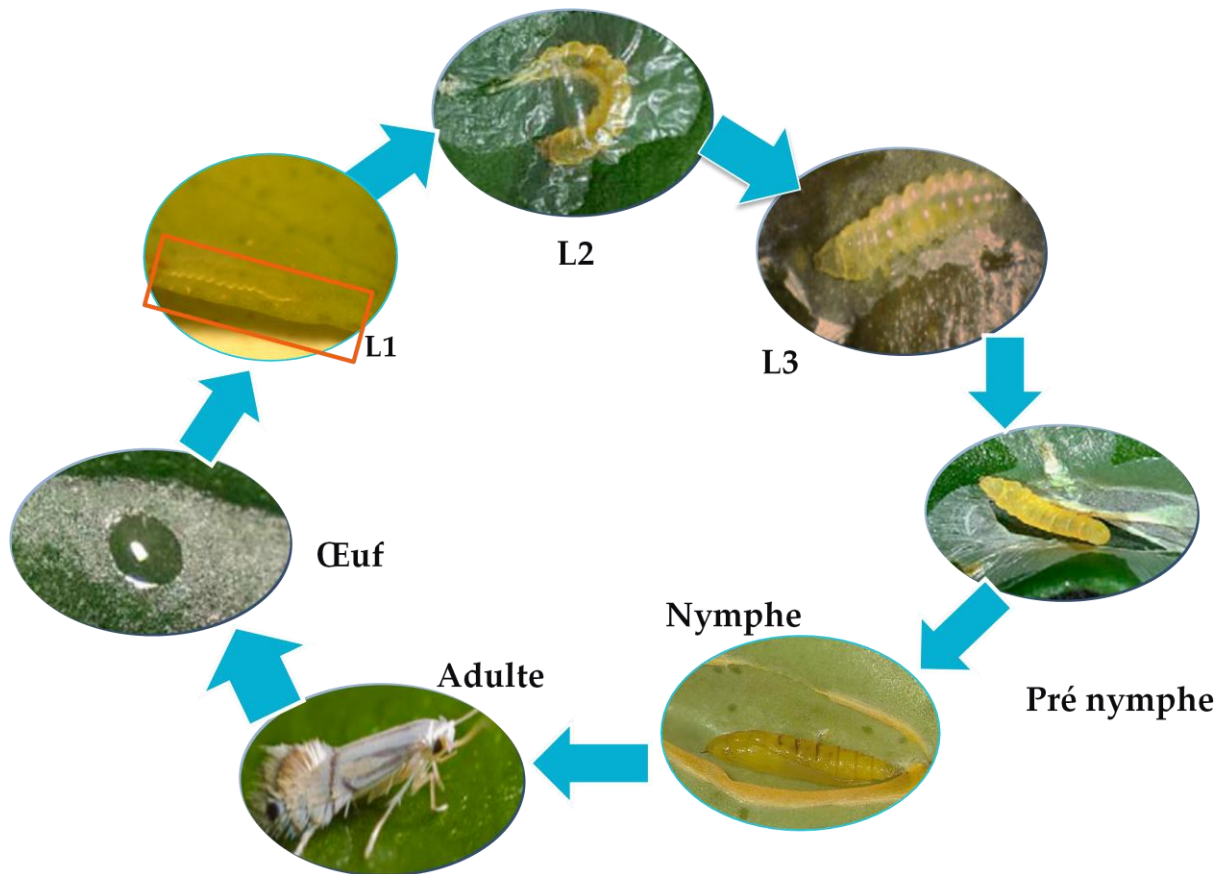


Figure 1: les différents stades biologiques de *P. citrella* (Originale, 2012)

1.5- Caractéristiques bioécologiques de la mineuse des agrumes

Ce ravageur cause des dégâts importants sur les cultures d'agrumes, il constitue un danger réel, les adultes de *P. citrella* hibernent et apparaissent dès le printemps (Balachowsky, 1966).

Selon Abassi et *al.* (1997) et Abassi (1995), l'insecte émerge tôt le matin, vole facilement et rapidement malgré son faible sens de l'orientation phototaxique en raison de ses mœurs nocturnes. Selon Beattie et Smith (1993), les accouplements ont lieu entre 9 et 12 heures après l'émergence suivis de l'oviposition. Les femelles recherchent les jeunes feuilles d'agrumes pour y déposer leurs œufs. Ces derniers sont déposés isolément près de la nervure principale sur l'une des faces de la feuille, rarement sur la face supérieure et jamais sur les feuilles âgées, (Badawy, 1969 ; Pandey et Pandey, 1964 ; Quilici *et al.*, 1995 et Knapp *et al.*, 1995). Selon Hoy et Nguen (1997). Il paraît que la ponte sur la face inférieure protège mieux les œufs des rayons solaires. L'oviposition peut se faire sur la face supérieure en cas de forte densité ou bien d'humidité relative élevée. Chaque femelle peut pondre entre 20 à 100 œufs (Quilici *et al.*, 1995 et Heppner, 1993).

La durée de l'embryogenèse varie entre 1 à 10 jours (Beattie et Smith, 1993 ; Knapp et al., 1995). D'autres auteurs notamment, Ba-Angood (1978) et Quilici *et al.* (1995) indiquent que l'éclosion des œufs commence 48 heures après leur ponte. La durée de l'incubation dépend essentiellement de la température. Dans la nature, l'embryogenèse dure de 1 à 3 jours quand les températures varient entre 13 à 36°C, de 2 à 6 jours à des températures variant entre 7 à 34°C et de 2 à 10 jours pour des températures variant de 11 à 38°C.

Sabine (1971), note que la larve néonate commence à perforer le chorion de l'œuf au point de contact de l'épiderme qu'elle perce aussi.

Grace à ses mandibules qui fonctionnent, comme de minuscules scies circulaires dans le sens horizontal. La larve creuse une mine serpentine parallèle à la nervure principale en ouvrant les cellules épidermiques et en les désoperculant pour en aspirer la sève, d'où le nom de chenille suceuse de sève (Balachowsky, 1966). Elle laisse ainsi dans leur parcours de minuscules mines caractéristiques, centrées par une ligne sombre d'excréments (Badawy, 1967 ; Heppner, 1993; Quilici *et al.*, 1995).

Au fur et à mesure que la larve progresse, les mines deviennent plus larges et plus visibles. La longueur de la mine à la fin du développement de l'insecte est en moyenne de 150 à 300 mm. Les larves se déplacent tantôt en se contractant, tantôt en déployant les segments de leur corps en avant (Quilici *et al.*, 1995; Knapp *et al.*, 1995).

Les chenilles endophytes, dès leur éclosion évoluent intégralement en mineuse jusqu'au stade nymphal. Elles sont incapables de survivre en dehors de leurs mines, aussi il semble que la larve ne peut pas compléter son développement dans le fruit (Argov et Rossler, 1996).

En phase terminale de son évolution, la chenille âgée (prénympe) cesse de s'alimenter et se dirige au bord de la feuille qu'elle replie sur elle-même et confectionne une loge pour s'y nymphoser (Badawy, 1969 ; Guerout, 1974 ; Quilici *et al.*, 1995).

La nymphose peut avoir lieu dans les dépressions, ailleurs que sur la surface de la feuille. La nymphe perce à l'aide de son sclérite céphalique, la chambre nymphale pour permettre à l'adulte d'émerger en forçant sur son corps à travers l'ouverture de la loge (Heppner, 1993).

La durée du cycle biologique est sous la dépendance des facteurs climatiques. Au cours de la période estivale, il varie de 14 à 17 jours (Beattie et Smith, 1993). A la période hivernale, il est de l'ordre de 52 jours. Knapp *et al.* (1995) et Quilici *et al.* (1995) notent que la durée totale du cycle est de 13 à 15 jours à des températures variant entre 26 et 28°C.

La longévité des phases du cycle biologique de *P. citrella* selon Heppner (1993) et Knapp *et al.* (1994) est de :

- 2 à 10 jours pour l'éclosion des œufs (incubation) ;
- 5 à 20 jours pour le développement larvaire ;
- 6 à 22 jours pour le développement nymphal.

Berkani (1999) et Boualem (2002) signalent qu'à une température de $30 \pm 1^\circ\text{C}$, la mineuse accomplit son cycle biologique en 12,57 jours en moyenne.

Le seuil thermique du développement de l'adulte est compris entre une température minimale de $12,2^\circ\text{C}$, et une maximale de 46°C (Guerout, 1974), par contre la femelle peut résister pendant 5 mois à de basses températures (Huang *et al.*, 1989).

P. citrella est polyvoltine, le nombre de génération est variable selon les régions et les conditions climatiques. Badawy (1967), Heppner (1993) et Knapp *et al.* (1995) s'accordent sur l'existence de 5 à 15 générations par an qui peuvent se chevaucher tout au long de l'année. En effet, au Japon Clausen (1931) rapporte la présence de 6 à 10 générations par an, alors qu'en Chine le nombre de génération oscille entre 9 à 15 (Zhang *et al.*, 1994). En Algérie, Berkani *et al.*, (1996) et Boualem (2010) ont pu identifier cinq phases de développement massives du phytophage correspondant à cinq générations par an.

1.6- La plante hôte

P. citrella est un ravageur inféodé principalement et préférentiellement aux *Citrus* de la famille des Rutaceae (Heppner, 1993). En dehors des *Citrus*, *P. citrella* peut se trouver sur d'autres plantes telles que sur la vigne et le maïs, sans pouvoir compléter son cycle biologique (Balachowsky, 1966 ; Guerout, 1974 ; Quilici *et al.*, 1995). Les jeunes feuilles minées se tordent et se recroquevillent, perturbant le développement de l'arbre. Ainsi, les variétés les plus sensibles sont : *Citrus paradisi* (Latif et Yunus, 1951; Badawy, 1967 ; Ba-Angood, 1978), *C. medica* (Latif et Yunus, 1951 et Ba-Angood, 1978), *C. sinensis* (Ba-Angood, 1978 et Padmanban, 1994) et *C. latifolia* (Zhang *et al.*, 1994).

Les variétés considérées comme plus résistantes sont : *C. nobilis* (Latif et Yunus, 1951 ; Badawy, 1967 ; Guerout, 1974), *C. aurantiifolia* (Latif et Yunus, 1951 et Ba-Angood, 1977), *C. sinensis* cultivar Hamelin (Batra et Sandhu, 1981 ; Batra *et al.*, 1988) et *C. reticulata*, l'hybride du mandarinier « Queen Mandarin » (Zhang *et al.*, 1994).

1.6.1-Présentation de la plante hôte

Le mot « agrume » d'origine italienne désigne les fruits comestible et par extension les arbres qui les portent et qui appartiennent au genre *Citrus* (Loussert, 1989 et Praloran, 1971 ; Sosthène, 2010).

L'ancienneté de la culture des agrumes ne permet pas de définir avec certitude leur zone d'origine. D'après Praloran (1971) et Sosthène (2010), il serait originaire des pays du sud-est asiatique (Inde, Chine, Nouvelle Guinée et Polynésie). Le principal centre d'origine se situerait sous une ligne allant du nord-est de l'Inde au nord de la Birmanie et au sud de l'île de Hainan.

Ces arbres de petite taille résultent d'une longue évolution. C'est à partir d'espèce acide et amer que ce sont créées les espèces comestibles actuelles (Praloran, 1971). Grâce aux grandes découvertes les agrumes furent diffusés dans le monde. Les navigateurs arabes les propagent sur la côte orientale de l'Afrique jusqu'au Mozambique. Christophe Colomb en 1493 les introduit à Haïti, aux îles de la mer des Caraïbes à partir de laquelle la diffusion se fera vers le Mexique (1518), puis aux États-Unis d'Amérique (1560-1890). Enfin ce sont les anglo-hollandais qui en 1654, introduisent les premiers plants d'agrumes dans la province du Cap en Afrique du sud (Praloran, 1971 et Loussert, 1989).

1-6-2 : Situation économique des agrumes

Au niveau mondial, les agrumes occupent le premier rang de fruit en termes d'exportation et le deuxième dans la production. En effet, la production mondiale d'agrumes a connu une croissance continue dans les dernières décennies du XXe siècle. La production totale d'agrumes est estimée à plus de 95 millions de tonnes et plus de la moitié a été produite en Afrique, suivie par l'Asie (38%) et l'Amérique (11%). Les agrumes sont produits partout dans le monde soit 69 pays entre l'an 2000 et 2010. Cependant, la production est essentiellement concentrée dans certaines régions, dans les pays tropicaux et subtropicaux dans une bande de 35° de latitude nord et 35° de latitude sud (Timmer *et al.*, 2003). Les principaux pays producteurs d'agrumes sont la Chine, le Nigeria, la Colombie, l'Inde et la Guinée.

Les oranges constituent l'essentiel de la production d'agrumes, ce qui représente plus de la moitié de la production mondiale d'agrumes, suivi par les mandarines et les clémentines. Il y a deux marchés clairement différenciés dans le secteur des agrumes, à savoir le marché du frais avec une prédominance des oranges, et le marché des produits transformés, jus d'orange principalement.

Les exportations d'agrumes frais ont représenté environ 11% de la production totale d'agrumes et ont été estimées à plus de 685 millions de dollars pour la période 2000-2011. Elles étaient, de toute évidence, une source vitale de revenus pour de nombreux pays. La majeure partie des exportations d'agrumes frais se trouve en Asie et en Amérique, ce qui représente respectivement environ 36,5% et 27,54% pour 2000-2011. La répartition géographique des exportations d'agrumes frais est résumée dans la figure 2.

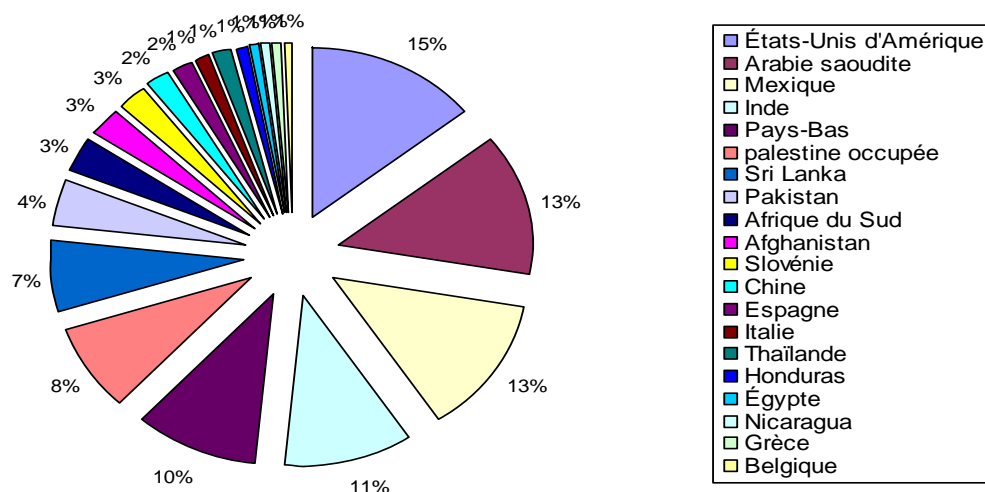


Figure 2: Répartition géographique des exportations d'agrumes frais (FAOSTAT, 2013).

Les principales destinations des exportations d'agrumes frais entre les années 2000-2009 ont été les pays de l'Union européenne, le Japon, le Canada et les pays d'Asie du sud (FAOSTAT, 2013).

1.6.3. Avantages nutritionnels des agrumes

Les agrumes sont consommés comme fruits frais ou utilisés dans l'industrie alimentaire. Leur pulpe est utilisée pour l'alimentation du bétail. Les agrumes et leur jus ont plusieurs propriétés nutritives bénéfiques pour la santé. Ils sont riches en acide ascorbique (vitamine C), et acide folique, et sont une bonne source de fibres. Ils contiennent du potassium, du calcium, de la thiamine, de la niacine, de la vitamine B6, du phosphore, du magnésium et du cuivre, et sont dépourvus de matière grasse et de sodium. Ils peuvent aider à réduire le risque de maladies cardiovasculaires et certains types de cancer (So *et al.*, 1996 ; Guthrie *et al.*, 2000 ; Ejaz *et al.*, 2006 ; Ladaniya, 2007; Harats *et al.*, 1998 ; Block *et al.*, 1992 ; Jacques *et al.*, 1997). Ils sont également utiles pour réduire le risque chez la femme, d'avoir des enfants atteints de maladies congénitales (Economos *et al.*, 1999).

Les huiles essentielles obtenus à partir de la pelure d'agrumes sont utilisées par l'industrie alimentaire pour donner de la saveur aux boissons et aux aliments (Chutia *et al.*, 2009). Elles sont également utilisées dans l'industrie pharmaceutique, pour la préparation de médicaments, de savons, de parfums et d'autres cosmétiques, ainsi que des produits ménagers. En plus, elles possèdent des propriétés pesticides, utiles dans la lutte contre plusieurs micro-organismes nuisibles (Viuda-Martos *et al.*, 2008 et Rammane *et al.*, 2011).

1.7- Dégâts et importance économique de la mineuse des agrumes

L'espèce *P. citrella* est redoutable surtout en pépinière, et dans les jeunes vergers agrumicoles. Sur des arbres âgés on peut observer des baisses de productivité notables. Les dégâts sont causés par les différents stades larvaires qui accomplissent tout leur cycle de développement à l'intérieur des jeunes feuilles. Des galeries sinueuses finissent par couvrir toute la feuille portant la larve et les excréments, ce qui à l'extérieur va donner un reflet argenté (Fig. 3). En plus de l'enroulement, jaunissement et dessèchement des feuilles qui dépérissent et chutent, la détérioration des feuilles des nouvelles pousses formées va perturber l'accomplissement de la photosynthèse ce qui va entraîner un ralentissement dans la croissance de l'arbre et même un arrêt de développement au niveau des jeunes plants. Les dégâts les plus importants s'observent au niveau des pépinières et des jeunes plantations d'agrumes qui ne sont pas encore en production (Lebdi Grissa, 2010).

Lorsque les attaques sont sévères, elles peuvent entraîner la mort des sujets touchés (Sabine, 1971).

Les pertes au niveau de la production sont difficiles à apprécier. L'intervention chimique ne peut se justifier que si le seuil de 0,74 larve par feuille est atteint (Huang et Li, 1989). Il semble que les infestations qui ne dépassent pas les 20% de la surface foliaire n'ont pas de répercussions sur le développement et le rendement des arbres touchés.

La conséquence de l'activité alimentaire des larves au cours de leur développement se caractérise par une destruction importante de la matière végétale en raison de la grande étendue de la mine qui peut présenter une longueur de 50 à 100 mm, trois larves par feuille peuvent endommager 40 à 50 % de la surface photosynthétique. En cas de forte attaques, un fort ralentissement significatif de croissance est noté sur les jeunes arbres et une baisse de la productivité sur les arbres plus âgés (Quilici *et al.*, 1995).

De plus, les dégâts favorisent l'apparition d'une maladie bactérienne qui est le chancre citrique (*Xanthomonas campestris* pv. *citri*) (Sohi, 1968 ; Sinha *et al.*, 1972 ; Grafton-Cardwell *et al.*, 2008 ; Heppner, 2010).



Figure 3: Dégâts de *P. citrella* sur les feuilles de *Citrus* (Originale, 2012)

A : face inférieure de la feuille B : face supérieure de la feuille

Il est certain que lorsqu'un ravageur exotique arrive dans une région dépourvue d'ennemis naturels efficaces et spécifiques, les dégâts seront graves et prévisibles. Déjà En 1966, Balachowsky a prévu que son arrivée dans les pays du Bassin méditerranéen causerait de graves dégâts.

En 2010, une recrudescence de l'activité de la mineuse a été remarqué (plus de 50% de la surface foliaire était atteinte), ce qui a poussé l'INPV a engagé un programme de relance des élevages d'auxiliaires allochtones *Semielacher petiolatus* et *Citrostichus phyllocnistoides*, pour la mise en place de lâchers pour limiter les populations contre la mineuse des agrumes (INPV, 2012).

1.8- Méthodes de lutte

Les mesures de protection doivent être raisonnées en fonction des époques d'émission de nouvelles pousses qui sont exclusivement concernées par les attaques du ravageur (Mazih, 1995).

Pour faire face à ce phytophage, une stratégie basée sur les mesures prophylactiques, associées aux applications chimiques très limitées dans le temps et en fréquence doivent permettre de préparer le terrain pour le contrôle biologique, par l'utilisation d'auxiliaires locaux ou exotiques (Berkani, 1995).

1.8.1- Lutte culturale

Des pratiques culturales ont été préconisées selon El-Ouard (1997) et consistent à :

- Favoriser un verger propre avec un bon désherbage ;
- Supprimer les jeunes pousses au démarrage de la végétation, période coïncidant avec la sortie des adultes après l'hibernation afin de désynchroniser le végétale et son hôte de manière à perturber l'évolution de ce dernier dans le temps ;
- Appliquer une fertilisation équilibrée avec une irrigation conséquente pour favoriser la première poussée de sève (pousse de printemps) ; c'est de cette phase de croissance que dépendra la production. En effet, cette pousse échappe en grande partie aux attaques de la mineuse.

En Algérie, les mêmes recommandations ont été préconisées par Berkani (1995), ajoutant à cela l'élimination des jeunes pousses tendres infestées sur les citronniers quatre saisons, les jeunes plantes en pépinière et les gourmands.

Au Maroc, El-Ouard (1997) note que la suppression des pousses intermédiaires entre celles du printemps et de l'été, ainsi que l'élimination des feuilles contaminées peut apporter une certaine efficacité, qui reste cependant limité.

Par ailleurs, aux USA, une autre méthode a été préconisée ; elle consiste à provoquer la sortie de nouvelles pousses dites « pousses libres » qui seront contaminées par l'insecte puis supprimées avant chacune des trois poussées de sève de l'année (Heppner, 1993).

Lucas Espada (1995), quant à lui, suggère la réduction des périodes d'apparition des pousses, notamment celles inutiles, en utilisant des régulateurs de croissance qui ont un effet régressif sur les pousses.

En Chine, on procède à la suppression manuelle des gourmands et des pousses secondaires constituant en général une source de contamination (Knapp *et al.*, 1995).

L'utilisation d'un matériel sain et la réglementation de la circulation des plants entre les régions sont recommandées (Garijo et Garcia, 1994).

1.8.2- Lutte chimique

Partout dans le monde, l'utilisation des insecticides s'est heurté à de nombreuses contraintes, et s'est avéré ne pas être la solution à long terme (très polluante et coûteuse). Très souvent des applications répétées sont nécessaires pour assurer une protection prolongée car peu de produit homologué garantissent plus de 14 jours de protection par voie foliaire. Cependant l'utilisation abusive des insecticides risque d'engendrer des problèmes de phytotoxicité et de déséquilibre de l'écosystème biologique. En outre, nous assisterons à des

explosions de populations de divers ravageurs maîtrisés jusque-là par leur propres ennemis naturels (Knapp *et al.*, 1994;1995).

Beattie et Smith (1993), Heppner (1993; 1998), Knapp *et al.*, (1994 ;1995), signalent que la lutte contre la mineuse des feuilles des agrumes par voie chimique reste difficile en raison de sa vie endophyte c'est à dire intra tissulaire ; la larve vivant en mineuse est protégée par l'épiderme de la feuille tandis que la nymphe et la prénymphe vivent à l'intérieur des loges confectionnées par le repliement des bords de la feuille.

Parmi les principaux produits homologués contre la mineuse des agrumes en Algérie, on peut citer:

Abac (Abamerie 18 g/l); Abats 1,8 (Abamectine18g/l); Cascade (Flufenoxuron 100 g/l); Citrole (Huile minérale 97%); Lannat 20 (Methomyl 200 g/l); Lannate 25WP (Methomyl 25%); Mopilan 20 sp (Acetamiprid 20%); Sumi alpha (Esfenvalerate 25 g/l); Ultracidin (Methidathion 400 g/l); Vapcomic (Abamectin 18 g/l);et Vertimec (Abamectine 18 g/l) (Anonyme, 2003).

1.8.3- Lutte biologique

L'idée d'utiliser des organismes auxiliaires pour combattre les ravageurs des cultures n'est pas récente car les premiers exemples d'utilisation d'insectes remontent au XIX^{ème} siècle (Jaurdheuil *et al.*, 1991).

La lutte biologique contre les insectes déprédateurs des cultures présente une alternative à la lutte chimique sur le plan économique et environnemental. Elle est beaucoup plus sélective et peut permettre de maîtriser la démographie de ces espèces sur de grandes surfaces (Van Lenteren, 1997).

La lutte contre *P. citrella*, est parfaitement justifiée étant donné l'importance de ses dégâts (Balachowsky, 1966). La lutte chimique s'avérant peu efficace, la possibilité de la lutte biologique basée sur l'utilisation des ennemis naturels de ce ravageur devenait dès lors utile à étudier et à envisager (Berkani *et al.*, 1997).

La lutte biologique contre *P. citrella* est réalisée, essentiellement, grâce à l'utilisation d'auxiliaires spécifiques pour réguler les populations du ravageur afin de les maintenir à un seuil économique tolérable. Son efficacité dépend de la qualité de l'auxiliaire et sa spécificité car elle n'a pas la même valeur dans tous les pays. En Inde par exemple, malgré la présence de plusieurs parasitoïdes, le taux de parasitisme reste faible (entre 30 et 50 %) et ne suffit pas à maintenir les populations du ravageur dans des limites raisonnables (Guerrou, 1974).

En revanche, aux Philippines les parasitoïdes *Ageniaspis* sp., *Elasmus zester*, *Cirrospilus ingenuus*, *Bracon* sp. provoquent une forte mortalité (Barroga, 1969).

À travers les différents inventaires, on recense plus de 40 espèces de parasitoïdes hyménoptères appartenant à sept familles différentes (*Closterocerus* spp., *Cirrospilus* spp., *Pnigalio* sp.) (Fig. 4), *Chrysocharis* sp. et *Sympiesis* sp, la plus représentée est la famille des Chalcidoïdea qui a été signalée à travers toutes les régions de la répartition de la mineuse (Heppner, 1993 ; Boualem *et al.*, 2007 ; Grafton-Cardwell, 2008).

En Algérie, plusieurs tentatives de lutte biologique ont été menées pour lutter contre *P. citrella* en utilisant soit des parasitoïdes autochtones ou des parasitoïdes exotiques (Boualem *et al.*, 2008).

Berkani et Mouats (1998), ont mené une lutte en introduisant trois espèces parasitoïdes, il s'agit d'*Ageniaspis citricola*, *Semielacher petiolatus* et *Cirrospilus quadrastratus*. Un inventaire réalisé par Boualem (2002) a permis de recenser cinq (05) espèces parasitoïdes autochtones : *Pnigalio mediterraneus*, *Cirrospilus pictus*, *Cirrospilus vittatus*, *Chrysocharis* sp, *Sympiesis gregori* dans la région Ouest de l'Algérie.



Figure 4 : *Pnigalio mediterraneus* (Originale, 2011)

Sur quatre entomoparasites introduits par l'Institut National de la protection des végétaux (INPV d'El Harrach) en provenance de la Syrie et du Maroc et lâchés en 1996. Seule *Semielacher petiolatus* a pu s'acclimater et se maintenir à un niveau appréciable.

Les résultats obtenus montrent que l'ensemble des ennemis naturels (exotiques et autochtones) contribuent à contrôler les populations de *P. citrella* en réduisant considérablement les infestations de celui-ci.

En 2010, l'INPV a engagé un programme de relance des élevages d'auxiliaires allochtones *Semielacher petiolatus* et *Citrostichus phyllocnistoides*, pour la mise en place de la lutte biologique contre la mineuse des agrumes. Le dispositif d'intervention s'appuie sur cinq centres d'élevage installés au niveau des stations de l'INPV d' Alger, d'El Tarf, de Boufarik, de Chlef et de Mostaganem.

Pour la campagne 2011, les opérations de lâcher ont été réalisées par trois centres d'élevage des SRPV de Boufarik, Mostaganem et El Tarf, au niveau de tous les vergers agrumicoles ayant connu une recrudescence de la mineuse et le recul du taux de parasitisme.

À cet effet, deux phases de lâchers ont été réalisées. La première a été effectuée entre la fin du printemps et le début de l'été sur la poussée de sève estivale. Ceci est suivi par une évaluation du taux d'infestation, afin de décider de la réalisation de la 2ème phase automnale de lâcher. Si le taux d'infestation reste élevé (+30%), les lâchers automnaux s'avèrent nécessaires.

Les lâchers de la période estivale ont été déclenchés le 04 juillet et se sont achevés le 10 août, touchant 55 vergers d'agrumes répartis dans 26 communes.

Ainsi, six wilayats ont bénéficié de ces lâchers, il s'agit de Blida, Mostaganem, Relizane, Skikda, Guelma et El Tarf.

Les lâchers de la période automnale ont été effectués vers le début du mois d'octobre par la SRPV d'El Tarf au niveau de sa circonscription, notamment, à El Tarf, Skikda et Guelma.

Aussi, un mois après les lâchers, un contrôle sur terrain a été effectué afin d'évaluer l'action des auxiliaires dans les sites concernés par cette lutte. Les résultats d'évaluation de cette opération font état de la bonne action de ces auxiliaires par une régression de l'activité de la mineuse des agrumes jusqu'à 7% après avoir atteint un taux dépassant 50% (INPV, 2013).

D'autres agents de lutte biologique ont été testés avec succès pour le contrôle de *P. citrella*, tels que *Bacillus thuringiensis* (Berl.) ainsi que des bioinsectides d'origine végétale (Zhang *et al.*, 1994 ; Amiri-Besheli, 2009).

Alors que, Mohammadi Sharif (2012) a isolé à partir de *Metarhizium anisopliae* des toxines formées par un ensemble de peptides cycliques portant le nom de destruxines. Ces dernières ont dévoilé une variété d'action insecticide vis-à-vis de *P. citrella*.

Campos *et al.* (2007) ont testé l'effet croisé des bactéries *Enterobacter cloacae* (Jordanie) Hormaeche et Edwards, *Serratia marcescens* et *Pseudomonas mendocina* Palleroni qu'il a isolé à partir de *Anastrepha fraterculus* et *Ceratitis capitata* sur *P. citrella* ; les deux dernières bactéries se sont montrées pathogènes sur les larves avec un taux de mortalité dépassant les 66,7%.

Chapitre 2 : La lutte biologique par les entomopathogènes

2.1-Introduction

On entend par lutte biologique toute forme d'utilisation d'organismes vivants ayant pour but de juguler la pullulation et/ou la nocivité de divers ennemis de cultures (Jourdheuil et *al.*, 1991).

La lutte biologique, précisément par utilisation de micro-organismes entomopathogènes est une alternative très prometteuse pour assurer une protection phytosanitaire performante de part l'ubiquité naturelle des agents microbiologiques dans les écosystèmes, leur grande variété, leur dissémination facile, leur spécificité d'action et aussi leur persistance dans l'environnement (De Kouassi, 2001).

La pathologie des invertébrés puise ses origines dans l'étude des maladies touchant certains organismes utiles comme le ver à soie et l'abeille domestique. Ce sont les travaux de Bassi qui, en 1834, ont permis pour la première fois d'associer un microorganisme, en l'occurrence le champignon *Beauveria bassiana*, à l'apparition d'une maladie chez le ver à soie. Trente années plus tard, Louis Pasteur entreprenait d'étudier de façon rigoureuse les diverses maladies du ver à soie. Ces deux pionniers du XIXe siècle estimaient que les microorganismes sont susceptibles d'être mis à profit pour lutter contre les insectes nuisibles (Steinhaus, 1956).

C'est à la fin du XXI siècle et à partir de la découverte, de la mise au point et, subséquemment, de la production commerciale du *Bacillus thuringiensis* Berliner que la lutte microbienne a pris son véritable essor (Lacey et Goettel, 1995). Aujourd'hui, plusieurs milliers de micro-organismes entomopathogènes ont été décrits et plus d'une centaine d'espèces sont utilisées (Ignoffo, 1970 et Ignoffo, 1973). Les formulations de biocides à base de micro-organismes deviennent de plus en plus performantes avec des prix compétitifs (Ahmed *et al.*, 1994 et Starnes *et al.*, 1993 ; De Kouassi, 2001).

Les microorganismes pathogènes d'insectes sont naturellement présents dans l'environnement (sol, air, eau) et infectent généralement leur hôte soit par ingestion, soit par pénétration à travers la cuticule ou par les orifices. 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 à brève échéance. Tous ces micro-organismes possèdent des formes de résistance leur permettant de persister dans l'environnement et de perpétuer leur cycle de vie (Jourdheuil et *al.*, 1992). Cependant, les microorganismes ont des spectres d'action assez étroits à cause de certains facteurs abiotiques qui peuvent être limitant pour leur développement optimal, par exemple: les UV (Ignoffo et Hostetter, 1977; Burges, 1981;

Roberts et Campbell, 1977; Gardner et *al.*, 1977; Fargues et *al.*, 1988), les variations suboptimales de température (Roberts et Campbell, 1977; Doberski, 1981; Stathers et *al.*, 1993) et de l'humidité (Fargues, 1972; Ramoska, 1984; Riba et Marcandier 1984; Khachatourians, 1987 et De Kouassi, 2001).

La lutte biologique par utilisation de micro-organismes offre une diversité d'agents de lutte microbiologique. Ces microorganismes appartiennent à plusieurs taxons à savoir les protozoaires, les virus, les nématodes, les bactéries et les microchampignons.

2.2- Les bactéries entomopathogènes

2.2.1-Définition

Les bactéries entomopathogènes sont des procaryotes microscopiques, elles n'ont pas de noyau, ni d'organites bien définis. Elles ont une paroi cellulaire structurellement distincte.

Selon Starnes *et al.*, 1993, plus d'une centaine de bactéries ont été identifiées comme ayant un potentiel d'utilisation en lutte biologique. Ces bactéries entomopathogènes appartiennent surtout, à trois grandes familles qui sont les *Bacillaceae*, les *Enterobacteriaceae* et les *Pseudomonaceae* (Greathead *et al.*, 1994).

Le *Bacillus thuringiensis* est efficace contre certaines espèces de coléoptères, lépidoptères et diptères (Morris, 1983; Ahmed *et al.*, 1994). Cependant il ne serait pas efficace contre les acridiens en raison de l'acidité intestinale (Greathead *et al.*, 1994). A l'instar de *B. thuringiensis* d'autres bactéries se sont révélées efficaces comme le genre *Xenorhabdus* (Enterobacteriaceae), très connu pour sa virulence contre les acridiens. Elles forment le plus souvent des symbiotes avec les nématodes qui agissent comme vecteur, libérées dans l'hémocoèle, elles tuent rapidement leur hôte (Greathead *et al.*, 1994).

Différents travaux ont démontré l'efficacité de la bactérie *B. popilliae* contre les Scarabaeidae, après avoir été utilisée avec succès contre le scarabée japonais *Popillia japonica* (Hutton et Burbutis, 1974; Miller *et al.*, 1983; Krieg, 1987). Burgers (1982) a démontré que les spores ingérées de cette bactérie, germent dans le tube digestif et traversent la membrane épithéliale; l'insecte meurt par septicémie.

Selon Doumandji-Mitiche *et al.* (1998) et Doumandji-Mitiche et Doumandji (2008), *Bacillus subtilis* a montré des capacités entomopathogènes contre *Locusta migratoria migratorioides* (Orthoptera: Acrididae). De même, Saik *et al.* (1990) rapportent que les bactéries *Pseudomonas aeruginosa* et *Serratia marcescens* sont des agents potentiels de lutte.

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

2.2.2- Mode d'action des bactéries entomopathogènes

L'infection survient après ingestion de cellules ou de spores bactériennes par l'insecte. Elle affecte surtout les stades larvaires phytophages. Ces dernières rompent la paroi intestinale et envahissent l'hémocèle et s'y reproduisent, ce qui entraîne une septicémie mortelle. Dans le cas de *B. sphaericus*, la toxine est localisée dans la paroi sporale et va être libérée par une digestion partielle de la bactérie dans le tube digestif de la larve de l'insecte. La toxine pénètre dans la membrane péritrophique du tube digestif et empoisonne la larve (De kouassi, 2001 ; Burges, 1981; Singer, 1981).

B. popilliae par contre ne produit aucune toxine dans le cycle d'infection. Les larves du coléoptère japonais (*Popillia japonica*) ingèrent les spores dans le sol qui germent et produisent des cellules végétatives qui remplissent l'intestin en trois à cinq jours. Certaines cellules pénètrent la paroi intestinale, puis se développent et sporulent dans l'hémolymphe. 14 à 21 jours après l'infection initiale, le corps de l'insecte est gonflé et se transforme en couleur crème (maladie laiteuse). Après la mort, les spores sont libérées dans le sol où elles établissent des sites d'infection persistante (Burgers, 1981).

Le mode d'action de *Bacillus thuringiensis* a été le plus étudié. Cette bactérie possède une spore et une inclusion parasporale composée d'une ou de plusieurs toxines protéiques. Quatre types de toxine peuvent être isolées du *B. thuringiensis*, les α -exotoxines (Heimpel, 1955; Heimpel, 1967; Kushner et Heimpel., 1957; Toumanoff, 1953), les β -exotoxines (Burgerjon, 1965; Heimpel, 1967; Heimpel et Angus, 1963), les δ -endotoxines et les γ -exotoxines (Heimpel, 1967; Heimpel et Angus, 1963). Dans le mésenteron de l'insecte, en présence d'un pH stomacal basique (8,9), le cristal va se désintégrer pour libérer une endotoxine, un polypeptide toxique qui va provoquer une rapide baisse de l'ATP au niveau des cellules stomacales, un gonflement de cellules épithéliales, une paralysie du tube digestif et un déséquilibre ionique dans l'hémolymphe. L'insecte meurt par inanition (Fast, 1981; Cloutier et Cloutier, 1992; Greathead *et al.*, 1992; Miller *et al.*, 1983) ou par une septicémie provoquée par la multiplication de la bactérie dans l'hémolymphe et les tissus. Le *B. thuringiensis* est efficace contre certaines espèces de coléoptères, lépidoptères et diptères (Morris, 1983; Ahmed *et al.*, 1994).

Bacillus subtilis pénètre dans le corps du criquet par ingestion, agit sur les rythmes cardiaques et respiratoires significativement en diminuant le nombre de battements de l'organe pulsatile et le nombre d'ouvertures et de fermetures du stigmate métathoracique, ce qui entraîne la mort de l'insecte quel que soit le stade et le sexe.

2.2.3- Les champignons entomopathogènes

2.2.3.1- Définition

Les champignons sont des eucaryotes avec des noyaux, des organites bien définis et une paroi cellulaire chitineuse. Ils se présentent sous forme de filaments (hyphes) constituant le mycélium et dans lesquels sont rangées les cellules. Leur reproduction se fait par formation des spores sexuées ou asexuées (Launois-Luong, 1994). Dans la nature, de nombreux cryptogames microscopiques attaquent les insectes lorsque certaines conditions favorables de développement se trouvent réunies (Balachowsky, 1951).

Les champignons entomopathogènes ont attiré l'attention de plusieurs chercheurs à cause de leur compétence dans l'infection d'une large gamme d'insectes. Les mycoses chez les insectes ont fait l'objet de longues et fructueuses recherches. Le marché total des champignons entomopathogènes est en pleine expansion et a connu des taux de croissance atteignant 25% par an (De Kouassi, 2001).

2.2.3.2- 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.

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.

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 (ce qui n'est pas toujours corrélé à une ressemblance phénotypique globale). Les liens de parenté entre deux membres d'un taxon sont toujours plus étroits que les liens de parenté entre un membre quelconque du groupe et un être vivant extérieur au groupe (il arrive que ce membre extérieur soit pourtant très ressemblant en raison du phénomène de convergence évolutive, il s'agit alors d'analogie entre les espèces, ce qui ne permet pas de les classer).

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. Issue des travaux de l'entomologiste W. Henning, elle s'appuie sur des moyens d'analyses modernes. Les résultats de l'analyse (cladogrammes) mettent en évidence les groupes monophylétiques. Il est alors possible (en minimisant les hypothèses) d'établir un arbre phylogénétique 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'ils soient à peu près stables 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). 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).

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 *al.* (2012), et selon la classification de Hibbett et *al.* (2007), les champignons entomopathogènes appartiennent à 4 divisions différentes: Chytridiomycota, Zygomycota, Basidiomycota et Ascomycota.

A-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 (deux classes: Chytridiomycetes et Monoblepharidomycetes ; Les Neocallimastigomycota et les Blastocladiomycota ; Parmi ces trois phylums, le troisième regroupe un nombre important de genres avec de nombreuses espèces entomopathogènes.

B- 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 mycorhiziens 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 recombines dans un autre nouveau phylum). Les Entomophthorales représentent les plus importants zygomycètes entomopathogènes.

C-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*, *Coccidiodyton* et *Ordonia* sont des parasites spécialisés de cochenilles (Couch, 1938 Henk et Vilgalys, 2007) qui tuent rarement leur hôtes, mais s'en nourrissent tout en les préservant (Humber, 2008).

D. 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-embranchement *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 Dowd, 2005), cependant, il ne sont en aucun cas pathogènes d'insectes (Kurtzman et *al.*, 2011).

Cependant, le sous-embranchement 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 (forme asexuée) et téléomorphe (forme sexuée), les membres des Hypocréales fournissent de bons exemples de ce phénomène. 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 embranchement également que les Deutéromycètes (ancienne classification) ont été reclassés.

Le tableau 2 regroupe plusieurs espèces de champignons appartenant à différents phylum et reconnu comme étant entomopathogènes.

Tableau 2: genres et espèces de champignons entomopathogènes appartenant à différents Phylums

Genre	Espèce	Phylum	Auteur
<i>Batkoa</i> Humber	<i>B. apiculata</i>	Zygomycota	Balazy, 1993.
<i>Batkoa</i> Humber	<i>B. major</i>	Zygomycota	Balazy, 1993
<i>Conidiobolus</i> Brefeld	<i>C. coronatus</i>	Zygomycota	Soper et <i>al.</i> , 1988
<i>Conidiobolus</i> Brefeld	<i>C. obscurus</i>	Zygomycota	Humber, 2012
<i>Conidiobolus</i> Brefeld	<i>C. thromboides</i>	Zygomycota	Humber, 2012
<i>Entomophaga</i> Batko	<i>E. aulicae</i>	Zygomycota	Humber, 2012
<i>Entomophaga</i> Batko	<i>E. maimaiga</i>	Zygomycota	Humber, 2012
<i>Entomophaga</i> Batko	<i>E. grylli</i>	Zygomycota	Humber, 2012
<i>Entomophaga</i> Batko	<i>E. calopteni</i>	Zygomycota	Humber, 1989
<i>Entomophthora</i> Fresenius	<i>E. culicis</i>	Zygomycota	Keller, 2002
<i>Entomophthora</i> Fresenius	<i>E. muscae</i>	Zygomycota	Keller, 2002
<i>Entomophthora</i> Fresenius	<i>E. planchoniana</i>	Zygomycota	Humber, 2012
<i>Erynia</i> Nowakowski	<i>E. aquatica</i>	Zygomycota	Keller, 1991
<i>Erynia</i> Nowakowski	<i>E. conica</i>	Zygomycota	Balazy, 1993
<i>Erynia</i> Nowakowski	<i>E. rhizospora</i>	Zygomycota	Keller, 1991
<i>Erynia</i> Nowakowski	<i>E. ovispora</i>	Zygomycota	Humber, 2012
<i>Furia</i> Batko	<i>F. americana</i>	Zygomycota	Keller, 1991
<i>Furia</i> Batko	<i>F. F. virescens</i>	Zygomycota	Balazy, 1993
<i>Massospora</i> Peck	<i>M. cicadina</i>	Zygomycota	Humber, 2012
<i>Neozygites</i> Witlaczil	<i>N. fresenii</i>	Zygomycota	Humber, 2012
<i>Neozygites</i> Witlaczil	<i>N. parvispora</i>	Zygomycota	Humber, 2012
<i>Neozygites</i> Witlaczil	<i>N. floridana</i>	Zygomycota	Humber, 2012
<i>Pandora</i> Humber	<i>P. blunckii</i>	Zygomycota	Humber, 2012
<i>Pandora</i> Humber	<i>P. neoaphidis</i>	Zygomycota	Humber, 2012

<i>Zoophthora</i> Batko	<i>Z. phalloides</i>	Zygomycota	Humber, 2012
<i>Zoophthora</i> Batko	<i>Z. phytonomi</i>	Zygomycota	Humber, 2012
<i>Zoophthora</i> Batko	<i>Z. radicans</i>	Zygomycota	Balazy, 1993
<i>Septobasidium</i>	<i>Septobasidium sp</i>	Basidiomycota	Henk et vilgalys, 2007
<i>Auriculoscypha</i>	<i>Auriculoscypha sp</i>	Basidiomycota	Henk et vilgalys, 2007
<i>Uredinella</i>	<i>Uredinella,sp</i>	Basidiomycota	Henk et vilgalys, 2007
<i>Coccidioidictyon</i>	<i>Coccidioidictyon sp</i>	Basidiomycota	Sung et al., 2007
<i>Ordonia</i>	<i>Ordonia sp</i>	Basidiomycota	Sung et al., 2007
<i>Aschersonia</i>	<i>A. aleyrodinis</i>	Ascomycota	Chaverri et al., 2008.
<i>Aschersonia</i>	<i>A.Montagne</i>	Ascomycota	Liu et al., 2005; 2006;
<i>Ascospaera</i> Spiltoir & Olive	<i>A. aggregata</i>	Ascomycota	Anderson et al. 1998.
<i>Beauveria</i> Vuillemin	<i>B.bassiana</i> Balsamo)	Ascomycota	Rehner et al., 2011
<i>Beauveria</i> Vuillemin	<i>B. brongniartii</i> (Saccardo)	Ascomycota	Rehner et al., 2011
<i>Cordyceps</i>	<i>C. militaris</i>	Ascomycota	Kepler et al., 2012
<i>Cordyceps</i>	<i>C tuberculata</i>	Ascomycota	Kepler et al., 2012
<i>Fusarium</i> Link	<i>Fusarium sp</i>	Ascomycota	O'donnell et al., 2011
<i>Gibellula</i> Cavara	<i>G. pulchra</i>	Ascomycota	Tzean et al., 1997
<i>Gibellula</i> Cavara	<i>G. leiopus</i>	Ascomycota	Tzean et al., 1997.
<i>Hirsutella</i> Patouillard	<i>H. saussurei</i>	Ascomycota	Rombach & Roberts, 1989
<i>Hirsutella</i> Patouillard	<i>H. thompsonii</i>	Ascomycota	Hodge, 1998.
<i>Hymenostilbe</i> Petch Emend.	<i>H. citriformis</i>	Ascomycota	Humber, 2010
<i>Hymenostilbe</i> Petch Emend.	<i>H. rhossiliensis</i>	Ascomycota	Hodge, 1998.
<i>Hymenostilbe</i> Petch Emend.	<i>H. saussurei</i>	Ascomycota	Hodge, 1998.
<i>Hymenostilbe</i> Petch Emend.	<i>H. thompsonii</i>	Ascomycota	Rombach & Roberts, 1989
<i>Isaria</i> Persoon	<i>I. farinosa</i>	Ascomycota	Humber, 2012
<i>Isaria</i> Persoon	<i>I. fumosorosea</i>	Ascomycota	Humber, 2012
<i>Paecilomyces</i> Bainier	<i>P lilacinus</i>	Ascomycota	Humber, 2012
<i>Lecanicillium</i> Gams et Zare	<i>L lecanii</i>	Ascomycota	Zare et al., 2001.
<i>Metarhizium</i> Sorokin	<i>M. anisopliae</i>	Ascomycota	Bischoff et al., 2009
<i>Metarhizium</i> Sorokin	<i>M. flavoviride</i>	Ascomycota	Driver et al., 2000
<i>Metarhizium</i> Sorokin	<i>M. majus</i>	Ascomycota	Kepler et al., 2012.
<i>Metarhizium</i> Sorokin	<i>M. acridum</i>	Ascomycota	Kepler et al., 2012.
<i>Nomuraea</i> Maublanc	<i>N. rileyi</i>	Ascomycota	Kepler et al., 2012
<i>Tolypocladium</i>	<i>T. niveum</i>	Ascomycota	Humber, 2012
<i>Tolypocladium</i>	<i>T. cylindrosporium</i>	Ascomycota	Hodge et al., 1996.
<i>Torrubiella</i> Boudier	<i>T. ratticaudata</i>	Ascomycota	Sato et al., 2010
<i>Torrubiella</i> Boudier	<i>T. aranica</i>	Ascomycota	Sung et al., 2007

2.2.3.3-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: téléomorphe contre anamorphe, parfaite contre imparfaite, 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 de cellules conidiogènes (conidiophore) situés souvent à l'extrémité des hyphes (Alexopoulos et *al.*, 1996, Read et *al.*, 2010). La forme et la disposition des conidies et des conidiophores sont utiles à l'identification des champignons entomopathogènes (Humber, 1997).

2.2.3.4- Mode d'action des champignons entomopathogènes

Le processus infectieux chez les champignons entomopathogènes est divisé en quatre étapes distinctes (Vega et *al.*, 2012).

2.2.3.4.1- 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 caractérisée par un mécanisme de reconnaissance et de compatibilité des spores avec les cellules tégumentaires de l'insecte. 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 ; Wang et St. Leger 2007a).

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).

Wang et St. Leger (2007a) ont rapporté que l'adhésion des conidies de *M. anisopliae* à la cuticule de l'insecte est médiée par une protéine de type adhésine, connue sous le nom MAD1 (Wang et St. Leger, 2007a; Pava-Ripoll et *al.*, 2011). Cette protéine s'est également révélée, être impliquée dans la germination des conidies et la formation de blastospores (Wang et St. Leger, 2007a).

Les facteurs physiques, peuvent également influencer l'adhérence des conidies à la cuticule. Celle-ci peut se faire sur une région spécifique, par exemple, sur les membranes inter segmentaire (Butt et *al.*, 1995; Hajek et Eastburn, 2003). En effet, en étudiant quatre isolats différents de *M. anisopliae*, Mccauley et *al.*, (1968) ont constaté que l'infection est plus élevée, lorsque la pénétration est réalisée à travers les plis inter segmentaires et ceci peut être attribué au fait que les conidies dans les plis sont protégés contrairement à ceux exposés sur les sclerites lisses ; le microclimat dans les plis est plus propice à une humidité plus élevée, ce

qui facilite la germination ; ces plis sont dépourvues de scléro- protéine tannée se trouvant sur la cuticule, ce qui rend plus facile la pénétration. L'adhérence des conidies peut aussi être influencée par la topographie de la cuticule, par exemple, les conidies peuvent s'accumuler dans les zones contenant un grand nombre de soies et d'épines (Sosa-Gomez et *al.*, 1997).

2.2.3.4.2-La phase de germination des spores

La germination va dépendre des conditions environnantes et aussi de la physiologie de l'hôte (composition biochimique de la cuticule de l'hôte), qui peuvent la favoriser ou l'inhiber (Meikle et *al.*, 2007).

La germination, est l'événement décisif, qui s'accomplit suite à la fixation de la spore à la cuticule de l'insecte. C'est la formation d'un tube germinatif, avec ou sans la conception subséquente d'un appressorium.

En plus de la température et de l'humidité (Gottlieb, 1978), les facteurs nutritionnels, chimiques et physiques peuvent influencer la germination. Smith et Gula (1981) ont démontré que, pour que *B. bassiana* puisse germer et former un tube germinatif, des sources de carbone et d'azote sont nécessaires. Certains composants de la cuticule des insectes pourraient avoir une action inhibitrice (Smith et Gula, 1982; Latge et *al.*, 1987; SOSA-Gomez et *al.*, 1997; Priyatno et Ibrahim, 2002) ou stimulante sur la germination des conidies (Notini et *al.*, 1944 ; Veen, 1968). Des bactéries ou des champignons présents sur la cuticule pourrait également inhiber la germination (Schabel, 1976).

Si l'hôte est à un stade immature, la mue pourrait réduire l'efficacité des entomopathogènes fongiques, en partie à cause de l'effusion des conidies attachées à la cuticule muée (Fargues et Vey, 1974; Vey et Fargues, 1977; Luz et *al.*, 2003).

La Germination rapide serait donc avantageuse pour réduire l'exposition des conidies non seulement à des facteurs environnementaux externes défavorables, mais aussi à des adaptations de l'hôte qui réduisent le succès de l'infection. Vega et *al.* (1999) ont rapporté que dans certains cas, il existe une corrélation entre, une germination plus rapide et la virulence de l'entomopathogène.

Une fois la conidie attachée à la cuticule, un appressorium pourrait se former à l'extrémité du tube germinatif, qui en exerçant une pression mécanique va pénétrer par force à l'intérieur de la cellule et donc la coloniser (Howard et Valent, 1996; Bechinger et *al.*, 1999). Certains Entomophthorales (par exemple, *Conidiobolus obscurus*, *Pandora neoaphidis*, *P. blunckii*, *Entomophthora planchoniana* et *Batkoa apiculata*) ne forment pas d'appressoria et peuvent atteindre la cuticule directement à partir du tube germinatif (Hajek et *al.*, 2002).

D'autres champignons entomopathogènes tels que, *M. anisopliae*, *Isaria. farinosa*, *Entomophaga aulicae*, *Conidiobolus obscurus*, *Neozygites fresenii*, *Erynia radicans*, et *N. rileyi* produisent un mucilage lors de la formation du tube germinatif et de l'appressorium; ce mucilage exocellulaire est excrété pour aider à l'adhérence de la cuticule (Boucias et Pendland, 1991).

En plus de l'invasion de l'insecte via les zones cuticulaires et les membranes intersegmentaires, les champignons entomopathogènes envahissent également les insectes à travers les organes de sens et des stigmates, et "per os" (Charnley, 1984; Saint-Leger, 1991). En effet, Le mode normal d'infection Pour *Ascospaera* (Ascomycota) et *Culicinomyces* est "per os" (Humber, 2009).

2.2.3.4.3-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).

La cuticule est formée de trois couches (Locke, 2001; Klowden, 2007).

- L'épicuticule peut se diviser en deux parties, une interne et une externe. La première présente une structure lamellaire à l'excrétion qui devient par la suite amorphe. La seconde encore appelée cuticuline est essentiellement constituée de lipides hautement polymérisés. Enfin, la couche de cires (monomoléculaire) et le ciment (mélange de lipides et chromoprotéines) apportent une protection aussi bien chimique qu'hydrique. La cuticule, de part sa nature rigide, ne permet pas aux insectes d'avoir une croissance régulière dans le temps (comme un gastéropode par exemple). Des mécanismes physiologiques caractérisés par des mues périodiques permettent alors de palier à cette contrainte.
- L'exocuticule est la couche intermédiaire de la cuticule. Elle est composée essentiellement de protéines durcies par des orthoquinones, les *tannées*, qui la rendent résistante et relativement imperméable à l'eau. La mélanine, également présente, est responsable de la coloration brunâtre-noirâtre de nombreux arthropodes. Cette couche est absente au niveau des membranes articulaires.
- L'endocuticule, une couche fine, flexible, constituée d'un mélange de protéines (dont l'arthropodine) et de chitine appelé mucopolysaccharide.

L'exo et l'endocuticule ont une composition chimique voisine. Elles sont formées de fibres de chitine qui sont par contre absentes dans l'épicuticule. Ces fibres sont contenues

dans une matrice protéique amorphe (sans structure). Ces deux couches constituent ce qu'on appelle la procuticule (Willis et *al.*, 2005).

La cuticule est sécrétée par les cellules épidermiques. Ces dernières se trouvent à base de la procuticule, juste au dessus de l'hémocèle.

Le champignon peut perforer la cuticule par la pression mécanique (Mc Cauley et *al.*, 1968; Zacharuk, 1970) et par la production d'enzymes dégradant la cuticule, pour se nourrir et coloniser l'insecte.

Les enzymes impliquées dans la dégradation de la cuticule sont des protéases, des chitinases et des lipases, nécessaires pour dégrader respectivement, les protéines, la chitine, et les lipides (Wang et St. Leger, 2007b).

Une fois que le champignon a pu accéder à la hémocoèle, il commence à utiliser les nutriments disponibles pour sa croissance et sa reproduction. Pedrini et *al.* (2007) et Schrank et Vainstein (2010), 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. Alors que ceux qui présentent une croissance végétative rare, recourent plutôt à la production de métabolites secondaires pour tuer leur hôte.

2.2.3.4.4-La phase de réponse de l'insecte à l'infection

Le comportement des insectes peut altérer le succès des champignons entomopathogènes à produire l'infection. En théorie, les insectes sociaux ont plus de risque d'être infecté par des agents pathogènes, parce que plusieurs individus vivent rapprochés et sont souvent étroitement liés. Cependant, ces derniers ont développé une série de mécanismes de défense contre ces agents pathogènes (Cremer et *al.*, 2007). Par exemple, les termites (Boucias et *al.*, 1996; Rosengaus et *al.*, 1998; Yanagawa et *al.*, 2008) et les fourmis (Kermarrec et *al.*, 1986 ; Jaccoud et *al.*, 1999) effectuent le toilettage mutuel, comportement qui aide à supprimer les conidies des membres de la colonie. En outre, les glandes métapleurales des fourmis produisent des sécrétions qui inactivent les antibiotiques secrétés par les champignons entomopathogènes (Hughes et *al.*, 2002; Yek and Mueller, 2011). Cremer et *al.* (2007) ont énuméré une série de mécanismes par lesquels les insectes sociaux peuvent combattre l'établissement de l'infection.

Nielsen et *al.* (2010) ont montré que les fourmis élèveuses de pucerons se déploient à supprimer les cadavres de pucerons infectés par *P. neoaphidis* et participent au toilettage de la cuticule des pucerons pour supprimer les conidies du champignon en question,

probablement pour protéger leurs mutualistes, producteurs de miellat.

De même, certains insectes non-sociaux expriment une résistance accrue aux agents pathogènes lorsque leur densité est élevée (Wilson et Reeson, 1998). En effet, *Spodoptera littoralis* (Wilson et al., 2001) et *Tenebrio molitor* (Barnes et Siva-Jothy, 2010) ont montré une résistance importante, respectivement à *B. bassiana* et *M. anisopliae*, en situations de surpeuplement. Cette augmentation de la résistance semble être inhérente à la mélanisation de la cuticule, c'est à dire, la formation de la mélanine par polymérisation de composés phénoliques.

En revanche, l'accroissement de la résistance contre *M. acridum* chez *Shistocerca gregaria* élevés dans des conditions de surpeuplement semble être lié à une augmentation de l'activité antimicrobienne (Wilson et al., 2002). Une fois que le champignon entomopathogène a atteint l'hémolymphe, une gamme de réponses immunitaires peut être instaurée. Certaines sont des réponses antimicrobiennes d'ordre générales, alors que d'autres, ciblent spécifiquement le champignon envahissant.

Les propagules infectieuses des champignons peuvent être phagocytées ou encapsulées (Charnley, 1984; Gillespie et al., 1997). *Metarhizium anisopliae* et *Beauveria bassiana* sont capables d'éviter l'encapsulation au niveau de l'hémocoel. Cette adaptation est supposée être une conséquence de la biologie de ces champignons, qui ont la capacité de persister au niveau du sol comme saprophytes facultatifs où ils peuvent survivre encapsulés par des prédateurs amiboïdes (Bidochka et al., 2010).

Parmi les réponses des insectes à l'infection fongique, le concept de la fièvre comportementale qui représente l'une des réponses les plus fascinantes employées par les insectes pour contrer cette infection. (Roy et al., 2006). Les insectes infectés (les sauterelles, les mouches.....) modifient leur comportement, comme par exemple, se dorer au soleil, pour augmenter la température du corps ayant un effet négatif sur la survie du champignon entomopathogène présent dans l'hémocoel (Carruthers et al., 1992 ; Kalsbeek et al., 2001; Elliot et al., 2002).

2.2.3.5-Facteurs environnementaux influençant l'infection par les champignons entomopathogènes

2.2.3.5.1-La lumière ultraviolette

L'exposition au rayonnement solaire représente un obstacle majeur à la survie des conidies dans l'environnement. Le spectre solaire contient un rayonnement électromagnétique à différentes longueurs d'onde (mesurée en nanomètres, nm).

La lumière ultraviolette (UV) se produit à trois spectres différents: UVC (100-280 nm), UVB (280-315 nm) et UVA (315-400 nm). La gamme de lumière visible se produit entre 380-780 nm. Parmi les trois spectres de la lumière ultraviolette celle comprise entre 100 et 280nm (UVC), est bloqué par l'ozone et n'atteint pas la Terre (Blumthaler, 1993).

Les conidies sont très sensibles aux UVB. Les dommages causés par la lumière UV sont dus aux photoréactions des acides nucléiques, des protéines, des lipides, et des membranes (Tevini, 1993). L'exposition sublétales au rayonnement UV peut provoquer des altérations physiologiques ou génétiques qui réduisent la virulence, par exemple, réduire et retarder la germination (Hunt et al., 1994; Braga et al., 2001a).

La pigmentation des conidies influence souvent la sensibilité au rayonnement solaire, les conidies les plus pigmentées sont généralement plus tolérantes au rayonnement UV (Ignoffo et Garcia, 1992; Fargues et al., 1996; Braga et al., 2006). Plusieurs méthodes artificielles ont été étudiées pour protéger les conidies du rayonnement UV. Ceux-ci impliquent l'utilisation d'écrans solaires qui agissent comme inhibiteurs en réfléchissant le rayonnement (par exemple, les azurants optiques tels que Tinopal) ou UVA / UVB absorbants (par exemple, des colorants comme le rouge Congo). Inglis et al. (1995) ont testé 21 écrans solaires dans des formulations d'huile ou d'eau en laboratoire et sur le terrain ; il a signalé que certains écrans solaires ont augmenté la survie de *B. bassiana*. En revanche, Shah et al. (1998) ont rapporté que le traitement des conidies de *M. acridum* et ceux de *M. flavoviride* avec de l'oxybenzone comme un écran solaire n'a pas présenté une efficacité accrue dans la lutte contre les sauterelles. Les pigments naturels contenus dans les huiles végétales utilisées dans les formulations peuvent aussi protéger les conidies en bloquant le rayonnement solaire (Braga et al., 2001b). De même, les contraintes sublétales (nutritionnel, osmotique, etc) peuvent améliorer la tolérance des conidies au rayonnement solaire (Rangel et al., 2008).

2.2.3.5.2-Température

Un problème majeur rencontré au cours de l'évaluation des effets de la température sur les entomopathogènes fongiques, est que la plupart des études sont basées sur des températures constantes en laboratoire qui n'imitent pas les conditions naturelles. En outre, les conditions environnementales généralement mesurées sur le terrain pourraient ne pas refléter celles rencontrées dans le microenvironnement habité par les insectes et les champignons entomopathogènes (Benz, 1987).

Néanmoins, diverses études montrent que les températures ambiantes optimales pour la croissance végétative des champignons entomopathogènes varient considérablement entre

et au sein des espèces. Par exemple, en étudiant 37 isolats de *Isaria fumosorosea*, Vidal et al. (1997) ont observé des températures optimales de 20 à 30°C, alors que les températures optimales pour 65 isolats de *B. bassiana* étaient comprises entre 25 et 28°C, bien que les températures optimales pour certains isolats étaient comprise entre 20 et 30°C (Fargues et al., 1997). Roberts et Campbell (1977) ont publié un tableau vaste indiquant que les températures optimales pour la germination, la croissance et la sporulation sont situés entre 20 et 30°C. En revanche, la température optimale de croissance des champignons entomophthorales est située au dessous de 20°C (Hajek, 1997), bien que certaines espèces telles que *Neozygites tanajoae* et *N. floridana* se rencontrent dans les régions tropicales.

Certains champignons se sont montrés capables de rester infectieux à basse température. Ainsi, Doberski (1981) a évalué l'infection des coléoptères qui attaquent l'écorce d'orme après leur inoculation par *B. bassiana* ou *I. farinosa* et incubation à 2, 6, 10, 15, et 20°C, et rapporté que l'infection est positive, même à 2°C. Ces résultats impliquent que l'infection peut se produire à des températures auxquelles les insectes hôtes sont inactifs.

Différents genres d'entomopathogènes fongiques ont été isolés dans l'Antarctique, tel que *B. bassiana* (Mahaney et al., 2001), *Neozygites cf. acaridis* (Bridge et Worland, 2004), et *Conidiobolus antarcticus* (Tosi et al., 2004). De même, *M. anisopliae* et *B. bassiana* ont été isolés à partir de sols sub-antarctiques dans l'île Macquarie, alors que *M. anisopliae* a pu germer à 2,5°C (Roddam et Rath, 1997). De Croos et Bidochka (1999) ont retrouvé 26 isolats de *M. anisopliae* en Ontario au Canada, au moins sept d'entre eux ont pu germer et croître à 8°C.

Ces données indiquent que la température est une variable dont les généralisations sont difficiles à faire. Un fait important lié à la température, c'est que les champignons entomopathogènes ne poussent pas à la température du corps humain (37°C), un aspect positif dans l'évaluation des risques lors du processus d'homologation des biopesticides (Butt, 2002), bien que certains isolats tropicaux de *M. anisopliae* et *M. flavoviride* peuvent croître à des températures supérieures ou égales à 37°C (Rangel et al., 2005; Zimmermann, 2007). L'infection humaine par *Beauveria* a été rapportée chez les sujets immunodéprimés (Henke et al., 2002; Tucker et al., 2004). En effet, un isolement de *B. bassiana* a été réalisé à partir d'une lésion du foie chez un patient recevant un traitement immunodépresseur, cet isolat ne pouvait pas croître à 37°C, mais s'est avéré être très virulent au doryphore, *Leptinotarsa decemlineata* (Henke et al., 2002).

Zimmermann (1982) a montré qu'il existe une corrélation entre les températures létales pour les conidies de *M. anisopliae* et l'humidité, la température moyenne létale augmente au

fur et à mesure que l'humidité diminue.

La température pourrait avoir un effet négatif plus marqué sur l'infection des insectes par les champignons entomopathogènes près de la surface du sol, en raison des températures plus élevées (jusqu'à 60 à 65°C), enregistrées à cet endroit (Arthurs et *al.*, 2001; Rangel et *al.*, 2005).

2.2.3.5.3-Humidité

Le niveau d'humidité peut avoir un effet sur la germination des conidies et la croissance fongique ultérieure ainsi que la sporulation sur le cadavre de l'insecte (Jaronski, 2010). Roberts et Campbell (1977) mentionnent plusieurs études dans lesquelles il a été démontré que l'humidité est nécessaire pour une infection réussie, et d'autres où elle n'était pas nécessaire; cette différence a été attribuée au microclimat qui entoure la conidie sur la cuticule de l'insecte (Ferron, 1977; Benz, 1987; Inglis et *al.*, 2001). Pour la croissance végétative, Ferron (1977) a démontré que le développement du mycélium de *B. bassiana* sur le cadavre de l'insecte requiert 92% d'humidité ou plus.

2.4- Avantages de la lutte biologique

Contre les insectes ravageurs, un des principaux avantages des agents de lutte biologique réside dans le fait qu'ils peuvent remplacer, du moins partiellement, certains des insecticides chimiques les plus dangereux. A l'heure actuelle, les agents de lutte chimique sont utilisés beaucoup plus couramment à l'échelle mondiale que les agents biologiques. Comme il n'est pas certain que tous les pesticides représentent une menace pour l'environnement, leur remplacement par des agents biologiques n'allégerait pas nécessairement les risques pour l'environnement. Néanmoins, de nombreux pesticides chimiques représentent une toxicité qui s'étend au-delà des ravageurs ciblés, notamment aux animaux et aux humains. L'accès à des agents de lutte biologique plus sûrs, plus sélectifs et biodégradables comporte d'importants avantages au plan écologique. Un des avantages écologiques des agents biologiques provient dans leur grande sélectivité (Boisclair et Estevez, 2006).

Chapitre 3 : Isolement et test de pathogénécité de bactéries entomopathogènes.

3.1- Isolement de bactéries entomopathogènes

3.1.1-Matériel et méthodes

3.1.1.1-Matériel biologique

Les bactéries utilisées dans notre travail ont été isolées à partir des larves et nymphes mortes de *P. citrella* Stainton. Ces dernières proviennent de feuilles d'agrumes contaminées par *P. citrella*, prélevées au niveau de l'exploitation expérimentale de l'université de Mostaganem (Mazagran).

3.1.1.2- Méthode d'isolement des bactéries entomopathogènes

Afin d'éviter toute source de contamination de nos échantillons par d'autres germes, la surface des feuilles contaminées est nettoyée avec de l'alcool éthylique à 70%. Les larves et les nymphes mortes sont prélevées par une épingle stérile à l'aide d'une loupe binoculaire. Les larves et les nymphes ainsi dégagées sont désinfectés avec de l'hypochlorite de sodium diluée à 2° chlorimétrique pendant 5 minutes, rincée à l'eau distillée stérile pendant quelques minutes, on laisse les échantillons sécher à l'air près d'un bec Bunsen.

L'isolement a été réalisé par deux méthodes différentes :

- Méthode N°1 : mettre les larves et les nymphes à la surface de la gélose nutritive
- Méthode N°2 : mettre une nymphe dans un tube contenant de l'eau distillée stérile avec des conditions de travail bactériologique. Après 20 à 30 minutes et à l'aide d'une anse platine on ensemence l'échantillon prélevé à la surface de la boîte de Pétri contenant la gélose nutritive. Les boîtes de Pétri issues des deux méthodes d'isolement sont mises à incuber à une température de 37°C pendant 24 à 48 heures.

3.1.1.3- Purification

La purification consiste à effectuer des repiquages sur gélose nutritive de chaque colonie qui a poussé à côté des nymphes de *P. citrella*.

D'autres repiquages ont été faits directement de la colonie ensemencée à partir de la source liquide (eau + nymphes).

La purification des souches sur milieu solide se fait par la méthode de stries, elle est arrêtée dès l'obtention sur les boîtes de pétrie de colonies bien homogènes.

3.1.1.4- Identification des souches bactériennes

L'identification a été effectuée sur la base des méthodes classiques suivantes:

- Caractères culturaux
- Caractères morphologiques
- Caractères biochimiques (Identification par l'API système)

3.1.1.4.1- Aspect cultural

Elle est basée sur la détermination des exigences de la culture, si la culture se fait en absence ou en présence d'air et établir les températures de la culture bactérienne.

3.1.1.4.2- Aspect morphologique

Elle est basée sur l'observation macroscopique et microscopique. La première consiste à déterminer la couleur, la forme, l'aspect et la taille des colonies. La seconde est réalisée à l'aide d'un microscope optique après avoir réalisé une coloration de Gram, indispensable pour distinguer les genres bactériens, elle doit se faire sur des bactéries en cultures jeunes, que les endospores soient présent ou pas.

3.1.1.4.3- Etude biochimique par l'API système

Cette technique est utilisée pour étudier quelques caractères biochimiques des bactéries tels que :

- La présence d'enzymes
- Capacité à métaboliser les sucres, les acides aminés, les lipides...
- Capacité de culture en présence d'un inhibiteur (NaCl, antibiotique, antiseptique)
- Capacité de synthèse à partir de Carbone donné.






















Pour notre étude nous avons pratiqué l'étude biochimique par le système API 20 E, une version miniaturisée et standardisée des techniques biochimiques conventionnelles pour l'identification des bactéries. C'est un système de micro tests prêts à l'emploi qui permet la réalisation de 20 tests biochimiques en partant d'une seule colonie prélevée sur une boîte de pétri.

a- Principe : la galerie API 20 E est constituée de micro-tubes contenant des substrats déshydratés. Ces derniers sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les milieux. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés et l'identification est obtenue à l'aide d'un catalogue analytique.

b- Mode opératoire

- Préparation de la galerie : Repartir environ 5 ml d'eau distillée dans les alvéoles du fond de la boîte pour créer une atmosphère humide.
- Préparation de l'inoculum : on utilise un tube contenant 9 ml d'eau physiologique stérile, sans additif. Prélever à l'aide d'une pipette ou une anse à platine, une colonie bien isolée sur un milieu gélosé. Réaliser une suspension bactérienne en homogénéisant soigneusement les bactéries dans le milieu.
- Inoculation de la galerie : Remplir tubes et ampoules des tests suivants : CIT, VP, GEL, avec la suspension bactérienne à l'aide d'une pipette Pasteur et remplir uniquement les tubes des autres tests. Créer une anaérobiose dans les tests : ADH, LDC, ODC, URE en remplissant leurs cupules par l'huile de vaseline. Renfermer la boîte et placer à 37°C pendant 24 heures.
- Lecture de la galerie : Elle se fait qu'après avoir ajouter les réactifs des tests suivants VP, TDA, IND (Tableau3)
- Traitement de la galerie :
L'identification se fait avec un logiciel d'identification

Tableau 3 : Tableau de lecture de la galerie miniaturisée API 20E

TABLEAU DE LECTURE DE LA GALERIE MINIATURISEE API 20E					
Microtube	Substrat	Caractère recherché	Lecture directe ou indirecte (Test si nécessaire)	Résultat +	Résultat -
ONPG	Ortho-Nitro-Phényl-Galactoside	β -galactosidase	Lecture directe		
ADH LDC ODH	Arginine Lysine Ornithine	Arginine dihydrolase Lysine décarboxylase Ornithine décarboxylase	Lecture directe		
CIT	Citrate	Utilisation du citrate	Lecture directe		
H ₂ S	Thiosulfate de sodium	Production d'H ₂ S	Lecture directe		
URE	Urée	Uréase	Lecture directe		
TDA	Tryptophane	Tryptophane désaminase	Lecture indirecte Test : ajouter 1 goutte de Perchlorure de Fer		
IND	Tryptophane	Production d'indole	Lecture indirecte Test : ajouter 1 goutte de réactif de Kovacs		
VP	Pyruvate de sodium	Production d'acétoïne	Lecture indirecte (Attendre 10 minutes) Test : ajouter 1 goutte de KOH et d' α -naphthol		
GEL	Gélatine emprisonnant des particules de charbon	Gélatinase	Lecture directe		
GLU à ARA	Substrat carboné	Utilisation de substrat carboné	Lecture directe		
NO ₂ / N ₂	Nitrates (NO ₃)	Nitrate réductase	Lecture indirecte dans la cupule GLU Test : ajouter 1 goutte de réactif de Griess Ajouter de la poudre zinc en cas de résultat négatif		

3.1.2 Résultats et discussion

3.1.2.1 Etudes morphologiques

3.1.2.1.1- Aspects macroscopiques des souches obtenues

L'observation macroscopique des boîtes de pétri révèle la présence de différentes formes et couleurs de colonies, nous avons enregistré des colonies punctiforme de couleur crème à jaunâtre et lisse de différentes tailles et de petites colonies jaunâtres à contours réguliers et d'autres colonies de grande taille et de couleur blanchâtre. Nous avons également remarqué des colonies de grande taille (2 à 7 mm de diamètre), mates ou granuleuses et dont la forme est variable (circulaires ou non, à bords réguliers ou crénelés ou filamenteux) (Fig.6).

3.1.2.1.2- Aspect microscopique des bactéries obtenues

Nous avons remarqué que l'ensemble des espèces sont des bacilles rectilignes, à extrémités carrées ou arrondies, de taille variable (de 0,5 x 1,2 μ m jusqu'à 2,5 x 10 μ m) à Gram positif ou à Gram variable (fréquemment, la coloration de Gram n'est positive que dans les très jeunes cultures), les cellules bactériennes présentent un contour régulier souvent

ondulé (Fig. 6). Nous avons remarqué également la présence des spores sur les bactéries (endospores), et ces dernières sont généralement mobiles grâce à une ciliature péritriche. Nous avons remarqué également que la bactérie 2 est capsulée. Le tableau 4, représente les différents aspects microscopiques et macroscopiques des bactéries isolées.

Tableau 4: Différents aspects macroscopique et microscopiques des souches bactériennes isolées

Souches	Aspect macroscopique	Aspect microscopique	Gram
Bactérie 1	colonie granuleuse, contour irrégulier de couleur crème	Grands bacilles rectilignes peu isolée à extrémités arrondies	+
Bactérie 2	colonies de formes irrégulières, de consistance crémeuse (2 - 4 mm) en vieillissant elles deviennent sec, jaunâtre, rugueuse et s'incrustent dans la gélose.	Des petits bacilles isolés, à contour ondulé	+
Bactérie 3	colonies rhizoïdes, adhérentes qui s'étalent sur l'ensemble de la gélose et recouvrent toute la surface du milieu gélosé	Petits bâtonnets, isolés à extrémités arrondies	+
Bactérie 4	colonies rhizoïdes, adhérentes qui s'étalent sur l'ensemble de la gélose et recouvrent toute la surface du milieu gélosé	Petits bâtonnets sporulé, isolées à extrémité ondulée	+
Bactérie 5	Pas de caractéristiques particulières, aspect jaunâtre	Grands bâtonnets à extrémité ondulée	+

Les différentes souches de bactéries sont aérobies ou aéro-anaérobies, elles présentent une catalase positive, donnant une réponse variable au test de l'oxydase. Selon Donnio *et al.* (1987) l'ensemble de ces caractéristiques sont particulières au genre *Bacillus*. En plus la présence de l'endospore est considérée comme un indice d'orientation dans l'identification du genre *Bacillus*. Lorsque les conditions deviennent défavorables, les *Bacillus* sporulent et donnent des spores (une seule spore par cellule végétative) souvent très résistantes dans le milieu extérieur. Le phénomène de sporulation, contrairement à ce qui se produit pour les espèces du genre *Clostridium*, n'est pas inhibé par l'oxygène. La sporulation dépend des conditions de culture et, *in vitro*, certaines espèces ne sporulent que dans des milieux spéciaux (Riva *et al.*, 2001).

Traditionnellement, les espèces du genre *Bacillus* sont réparties en 3 groupes selon la morphologie de la spore.

A. Le groupe I est constitué des bacilles à Gram positif, présentant une spore centrale ou terminale, sphérique ou ovoïde, ne déformant pas la cellule. (*Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycoïdes*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus weihenstephanensis*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus firmus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*...).

B. Le groupe II est constitué des espèces à Gram variable, présentant une spore ovoïde, centrale ou terminale, déformante (*Bacillus circulans*, *Bacillus stearothermophilus* ...).

C. Le groupe III est caractérisé par des bacilles à Gram variable et présentant une spore sphérique, déformante, terminale ou sub-terminale (*Bacillus globisporus*, *Bacillus insolitus* (Riva *et al.*, 2001)).

Les résultats obtenus suite à la caractérisation macroscopiques et microscopiques nous ont orientés dans l'identification des souches isolées mais celle-ci ne peut être définitive qu'avec le recours aux tests biochimiques.

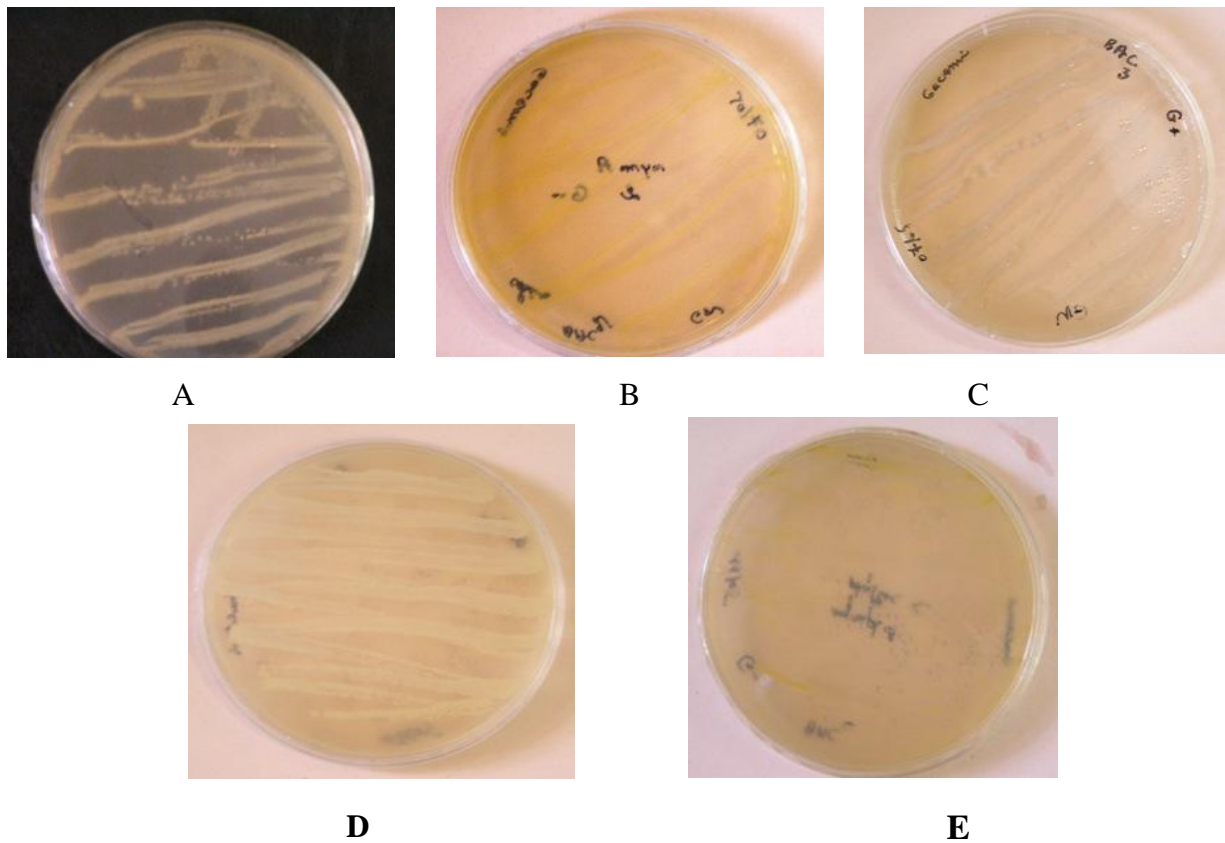


Figure 5 : Les aspects macroscopiques des bactéries isolées à partir des larves et nymphes de *P. citrella*

A : Bactérie 1 ; B : Bactérie 2 ; C : Bactérie 3 ; D : Bactérie 4 ; E : Bactérie 5.

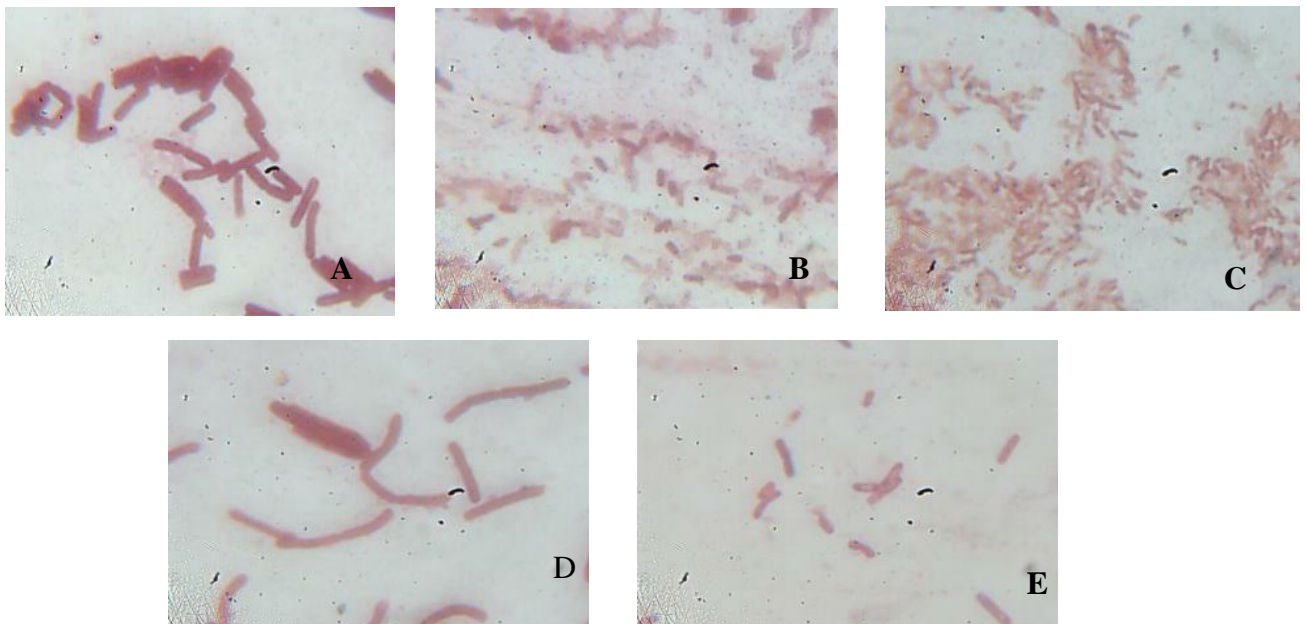


Figure 6 : Aspects microscopiques des bactéries isolées à partir des larves et nymphes de *P. citrella*

A : Bactérie 1 ; B : Bactérie 2 ; C : Bactérie 3 ; D : Bactérie 4 ; E : Bactérie 5

3.1.2.2 – Etude biochimique

Après l'inoculation de la galerie API 20E et l'incubation pendant 24 heures à 37°C, nous avons obtenues les résultats suivants après l'ajout des réactifs (Fig. 9, 10, 11, 12, 13) :



Figure 7 : Aspect de la galerie API20E inoculé par la bactérie 1



Figure 8: Aspect de la galerie API20E inoculé par la bactérie 2



Figure 9: Aspect de la galerie API20E inoculé par la bactérie 3



Figure 10 : Aspect de la galerie API20E inoculé par la bactérie 4



Figure 11: Aspect de la galerie API20E inoculé par la bactérie 5

Les résultats obtenus lors des tests biochimiques sur les souches isolées et identifiées par la galerie API 20E, sont regroupés dans les tableaux ci-dessous (tableau 4 et 5)

Tableau 5 : Résultats des tests biochimiques par l'API système d'*Aneurinbacillus aneurinilyticus* (*Bacillus aneurinilyticus*) et *Bacillus subtilis*

<i>Tests</i>	<i>Couleurs</i>	<i>Résultats</i>	<i>Couleurs</i>	<i>Résultats</i>
ONPG	Jaune	-	Jaune	-
<u>ADH</u>	Jaune	-	orange	-
<u>LDC</u>	Jaune	-	Jaune	-
<u>ODC</u>	Jaune	-	Jaune	-
CIT	Jaune	+	jaune	-
H₂S	Incolore	-	Incolore	-
<u>URE</u>	Jaune	-	Jaune	-
TDA	Jaune	-	Jaune	-
IND	jaune	-	Incolore	-
VP	Incolore	-	Rose	+
GEL	Diffusion du pigment noir	+	Diffusion du pigment noir	+
GLU	Bleu	-	Jaune/Jaune gris	+
MAN	bleu-vert	-	Jaune	+
INO	Bleu	-	bleu-vert	+
SOR	Bleu	-	bleu-vert	-
RHA	Bleu	-	Bleu	-
SAC	bleu-vert	+	Jaune	+
MEL	Bleu	-	Bleu	-
AMY	Bleu	-	Jaune	+
ARA	Bleu	-	Jaune	+
<i>Bactérie identifiée</i>	<i>Aneurinbacillus aneurinilyticus</i>		<i>Bacillus subtilis</i>	

Tableau 6 : les résultats des tests biochimiques par la galerie API système de *Bacillus mycoides*, *Brevibacillus agri* et *Bacillus lentus*

<i>Tests</i>	<i>Couleurs</i>	<i>Résultats</i>	<i>Couleurs</i>	<i>Résultats</i>	<i>couleurs</i>	<i>Résultats</i>
ONPG	Jaune	-	Jaune	-	Jaune	+
ADH	Rouge	+	Jaune	-	Jaune	-
LDC	Jaune	-	Jaune	-	Jaune	-
ODC	Jaune	-	Jaune	-	Jaune	-
CIT	Jaune	+	Jaune	+	Jaune	+
H₂S	Incolore	-	incolore	-	Incolore	-
URE	Jaune	-	Jaune	-	Jaune	-
TDA	Jaune	-	Jaune	-	Jaune	-
IND	Incolore	-	Jaune	-	Jaune	+
VP	Rose	+	jaune	+	Incolore	-
GEL	Non diffusion du pigment noir	-	Diffusion du pigment noir	+	Diffusion du pigment noir	+
GLU	Jaune	+	Bleu / bleu-vert	-	Bleu / bleu-vert	-
MAN	Bleu	-	Jaune-vert	+	Bleu-vert	+
INO	Bleu	-	Bleu	-	Bleu	-
SOR	Bleu	-	Bleu-vert	-	Bleu-vert	-
RHA	Bleu	-	Bleu	-	Bleu	-
SAC	Jaune	+	Bleu / bleu-vert	+	Bleu / bleu-vert	+
MEL	Bleu	-	Bleu	-	Bleu	-
AMY	Jaune	+	Bleu	-	Bleu-vert	+
ARA	Bleu-vert	+	Bleu	-	Bleu-vert	-
<i>Bactérie identifiée</i>	<i>Bacillus mycoides</i>		<i>Brevibacillus agri</i>		<i>Bacillus lentus</i>	

3.2. Tests de pathogénéicité des bactéries isolées à partir des nymphes de *P citrella*

3.2.1. Introduction

Plusieurs espèces de bactéries ont un pouvoir pathogène pour les insectes. C'est notamment le cas de *Bacillus thuringiensis*, isolé à partir de *Bombyx mori* L. (de vers à soie) infectés, par le bactériologiste japonais S. Ishiwata En 1911, qui a démontré suite à plusieurs études entreprises une réelle toxicité pour les lépidoptères.

L'objectif de cette étude est de vérifier la pathogénéicité des *Bacillus* sp isolés à partir des larves et des nymphes de *Phyllocnistis citrella* Stainton.

3.2.2.- Matériel et Méthodes

3.2.2.1. Prélèvement des feuilles

Les feuilles proviennent du verger de *Citrus* de l'exploitation expérimentale de l'université de Mostaganem (Mazagan). Le principe est de récolter suffisamment de feuilles minées par *Phyllocnistis citrella*, suivit ensuite par une sélection au laboratoire à l'aide d'une loupe binoculaire afin de dénombrer les larves vivantes.

3.2.2.2. Préparation de l'inoculum

Les bactéries utilisées dans le traitement sont celles isolées à partir des larves et nymphes de *phyllocnistis citrella* à savoir: *Aneurinbacillus aneurinilyticus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus mycoides*, *Brevibacillus agri*, *Bacillus lentus*.

L'inoculum est préparé à partir des bactéries retenues etensemencées sur le milieu GN solide. Un prélèvement à l'aide d'une anse de platine dans chaque colonie bactérienne est introduit dans un tube à essai contenant du bouillon nutritif ; il est mis à incuber pendant 24 heures à 37°C. Le développement des bactéries est confirmé par le trouble remarquable à l'œil nu par rapport au témoin dépourvu de la suspension bactérienne.

10µl sont prélevés par la suite à l'aide d'une micropipette et remis dans un nouveau tube contenant du bouillon nutritif stérile et laisser en incubation pendant 24 heures à 37°C (figure 18). A l'aide d'un spectrophotomètre on ajuste la concentration de l'inoculum à 10⁵ UFC.

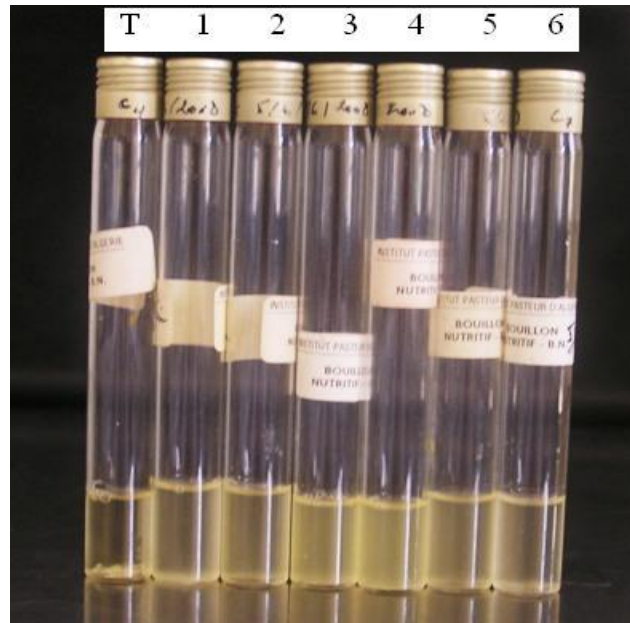


Figure 12 : les suspensions bactériennes après l'incubation

3.2.2.3. Test de pathogénécité

Des tests de toxicité avec les bactéries isolées et identifiées ont été réalisés au laboratoire afin de vérifier l'effet de ces bactéries sur la mortalité des larves de *P. citrella*.

Après avoir repéré les feuilles contenant des larves vivantes, nous les mettons dans des boîtes de Pétri contenant du coton humidifié, pour éviter la dessiccation de la feuille, et ne pas entraver le développement de l'insecte.

L'inoculum de 10^5 UFC a été inoculé par injection dans la mine des larves (2^{ème} et 3^{ème} stade), juste au dessus de leur tête pour faciliter l'ingestion de la solution. Les feuilles d'agrumes contenant les insectes préalablement traitées sont mises dans des boîtes de pétri contenant du coton humidifié. 20 larves par traitement sont retenues y compris pour le témoin. Des observations sont effectuées après 6, 24 et 48 heures après l'injection.

Le lot témoin contient 20 larves vivantes a coté desquelles on a injecté une solution à base d'eau distillée stérile. Le taux de mortalité est déterminé par la formule suivante :

$$TM\% = \frac{\text{Nombre de larves mortes}}{\text{Nomre de larves dénombrées}}$$

Afin d'écartier tous les risques de mortalité naturelle, nous avons calculé la mortalité corrigée selon la formule de Schneider et Oreilli :

$$\text{Mortalité corrigée (MC \%)} = \frac{M2 - M1 * 100}{100 - M1}$$

M2 : Pourcentage de mortalité dans le lot traité.

M1 : Pourcentage de mortalité dans le lot témoin.

3.2.3- Résultats et interprétations

Les résultats obtenus suite au traitement des larves de *P.citrella* par les germes isolés (*Aneurinbacillus aneurinilyticu*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus mycoides*, *Brevibacillus agri*, *Bacillus lentus*), montrent l'effet significatif ($P \leq 0,05$) des traitements sur la mortalité des larves comparativement au témoin. On remarque aussi que sous l'effet des traitements la morbidité des larves, est influencée par le temps (Figure 13), en effet, 6 heures après le traitement on observe que quelques larves seulement sont mortes sauf pour *Bacillus mycoides* qui ne manifeste aucun changement dans le comportement de ces dernières. 24h après, nous avons remarqué des mortalités importantes et constaté que c'est *Bacillus subtilis* qui a présenté la plus forte toxicité avec 80 % de mortalité, suivi par *Aneurinbacillus aneurinilyticus* avec 75 % et *Bacillus mycoides* avec 70 %. La mortalité enregistrée pour *Brevibacillus agri* et *Bacillus lentus* est nettement moins importante avec respectivement 55 % et 30 % (Fig.13)

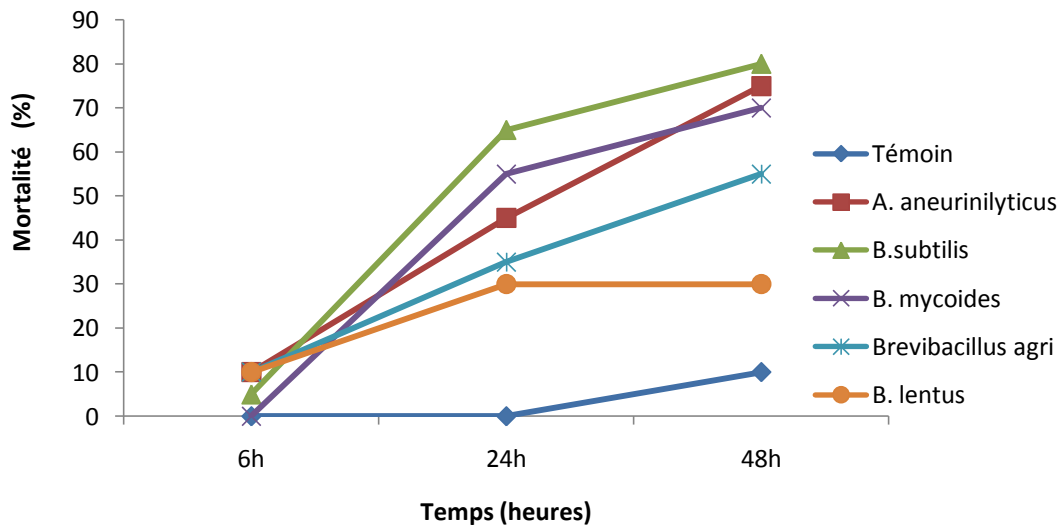


Figure 13: Effet des différents traitements sur la mortalité des larves de *P. citrella*

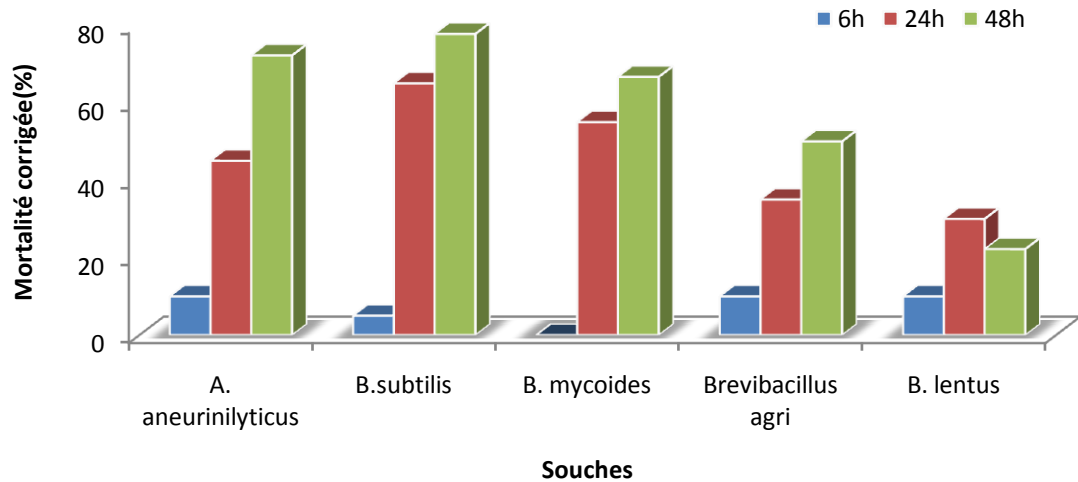


Figure14 : mortalité corrigée des larves de *P. citrella* traitées par les solutions bactériennes.

Par ailleurs, nous avons remarqué que les larves mortes, suite aux infections, présentent des tâches pathologiques de couleur noire. Le nombre des larves mortes est déterminé 6, 24 et 48 heures après la fin du traitement. En effet lorsque l'on analyse leur comportement, il en ressort que suite au traitement, des larves s'arrêtent de se nourrir. Elles s'immobilisent en cessant de creuser leur mine. Nous avons remarqué également que la plupart d'entre elles reviennent en arrière. Quelques heures après on distingue l'apparition des tâches noires à l'intérieur de l'appareil digestif des larves. Les photos suivantes montrent deux larves mortes après 24 heures de l'injection des bactéries la tache est apparente (voir photo figure 15 et 16).

Au bout des six premières heures, certains individus vont retrouver leur mobilité, tandis que d'autres meurent après une phase de paralysie (immobilité) plus ou moins longue.



Figure15 : Larve morte inoculée par *Bacillus mycoides*



Figure 16 : Larve morte inoculée par *Bacillus subtilis*

2.2.4. Discussion

A travers ces quelques expériences, nous avons pu mettre en évidence la forte toxicité des bactéries isolées (*Aneurinbacillus aneurinilyticu*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus mycoides*, *Brevibacillus agri*, *Bacillus lentus*) vis-à-vis les larves de *P.citrella* testées mais avec des sensibilités qui varient d'une bactérie à l'autre. Le présent travail, à l'instar d'autres études, telles que celles de Shapiro *et al.* (1998), Khyami et Ateyyat (2002), Dias *et al.* (2005), Amiri Besheli (2007), Meca *et al.* (2009), a démontré que le traitement à base de bactéries entomopathogènes donnait des résultats fort intéressants dans la lutte contre la mineuse des feuilles d'agrumes *P.citrella*. Stainton. Plus précisément *Bcillus thuringiensis*.

Selon Aronson *et al.*, (1986); Höfte et Whiteley (1989); Lereclus *et al.*(1989); Adang (1991); Gill *et al.* (1992); Bauer (1995), le *Bacillus thuringiensis* produit un corps d'inclusion parasporal de nature cristalline durant la sporulation. Ce cristal est constitué de protéines. Un grand nombre de protéines cristallisées apparentées ont été identifiées; un cristal peut renfermer plusieurs types de protéine. Les protéines cristallisées exercent leur effet sur l'hôte en lysant les cellules épithéliales de l'intestin moyen et en provoquant la paralysie du tube digestif. L'insecte infecté cesse de se nourrir et finit par mourir s'il ne parvient pas à se rétablir. Une fois ingérés, les cristaux se dissolvent dans l'environnement alcalin de l'intestin moyen de l'hôte. La protéolyse de la protéine cristallisée solubilisée ou protoxine produit le fragment toxique (toxine). Une fois liée à des récepteurs spécifiques présents sur les membranes des cellules épithéliales de l'intestin moyen, la toxine induit la formation de pores dans la membrane des cellules épithéliales et, ce faisant, provoque la mort des cellules et de la larve infectée.

L'effet de *B.thuringiensis* sur *Phyllocnistis citrella* a fait l'objet de plusieurs travaux, notamment ceux réalisés par Shapiro *et al.* (1998), Dias *et al.* (2005); Amiri Besheli (2007),...

Tous les essais réalisés au laboratoire et même en plein champs effectué pour tester la pathologie des insectes suite à leur inoculation par *Bacillus thuringiensis*, n'ont pas utilisé des bactéries isolées à partir de *Phyllocnistis citrella* elle-même, ni mis en évidence la présence naturelle de *Bacillus thurinsiensis* sur l'insecte. Notre travail a pu mettre en exergue la part jouée par les bactéries entomopathogènes autochtones présentes sur l'insecte sur la régulation naturelle des populations larvaires de *P citrella*.

B. cereus à l'instar de *B. thuringiensis* produit un ensemble d'exotoxines non protéiques ayant une capacité insecticide seulement ces molécules ne sont produites que par une faible proportion de souches. En outre, les souches de *B. cereus* sont pathogènes de

lépidoptères (To et *al.*, 1975) et de diptères (Kaaya et Darji, 1989). Alors que Warren et *al.* (1996) a démontré que *B cereus* sécrète aussi une exotoxine insecticide nommés Vip. ce qui confirme que ce dernier peut également être un agent pathogène d'insectes (Pechat et *al.*, 1990 ; Gohar et *al.*, 2005)

Bacillus subtilis quant à lui, représente la matière active d'un produit homologué pour la maîtrise d'un certain nombre de maladies dans les cultures fruitières et contribue à empêcher le développement de microorganismes pathogènes. Plusieurs souches ont démontré un pouvoir insecticide.

Chapitre 4-Isolement des champignons entomopathogènes

4.1- Isolement à partir de *Phyllocnistis citrella*

Introduction

Des champignons pathogènes peuvent servir à combattre de nombreuses espèces différentes d'insectes. Dans leur utilisation comme agent de lutte, la première étape consiste à trouver une souche de pathogène efficace. Pour cela, il faut donc les rechercher activement sur les insectes contaminés, ensuite, les identifier et les conserver correctement.

4.1.1-Matériel et méthodes

4.1.1.1- Matériel végétal

Les feuilles d'agrumes infestées par les nymphes de *P. citrella* ayant servies à l'isolement des champignons proviennent de deux régions distinctes: l'exploitation expérimentale de l'université de Mostaganem (Mazagran), le verger privé de Benkaizane de la commune de sidi Fellag (Mostaganem).

Nous avons prélevé des feuilles portant des nymphes enroulées de mycélium durant les mois de Mars, Avril de l'année 2009 (Fig. 17).



Figure 17 : nymphes de *P.citrella* naturellement enroulées par des hyphes blancs d'un champignon entomopathogène (Originale, 2009)

4.1.1.2-Méthode d'isolement des champignons

L'isolement des champignons est réalisé dans des conditions aussi stériles que possible sur les nymphes de *P. citrella* enroulées d'hyphes mycéliens. La nymphe attaquée est découpée puis désinfecter à l'eau de javel titrée à 2° chlorométrique pendant 2min. Après trois rinçages à l'eau distillée stérile, ensuite, un séchage sur papier buvard stérilisé, les nymphes sont alors déposées sur milieu de culture en boîtes de Pétri à raison de 4 fragments par boîte puis incubé à 25 ° C (Fig. 18).

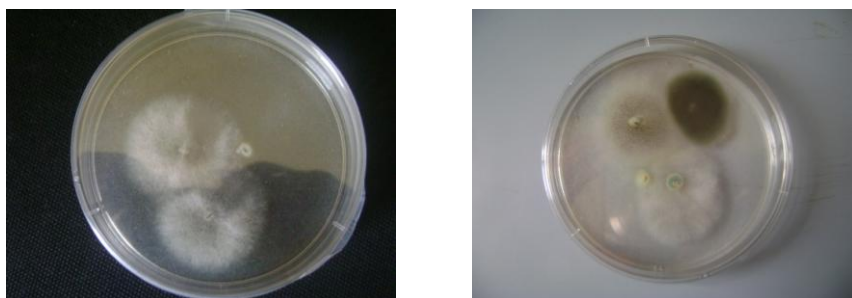


Figure 18 : Isolement des champignons à partir des nymphes de *P. citrella* (Originale, 2009)

Afin de réussir l'isolement et d'assurer un bon développement mycélien des souches fongiques, nous avons utilisé les milieux P.D.A (Potato-Dextrose-Agar), Saboureau et OGA (gélose à l'Oxytétracycline).

4.1.1.3-Purification

Les colonies développées autour des fragments de l'insecte n'étant pas toujours pures et dans la plupart des cas sont contaminées par d'autres champignons ou bactéries, ce qui nécessite une opération de purification avant toute manipulation. Pour cela, nous avons réalisé des repiquages successifs de manière aseptique. Des explants de culture ne présentant aucune contamination sont choisis au niveau de la zone périphérique de croissance des colonies et redéposés dans des boîtes de pétri contenant le milieu P.D.A.

4.1.1.4-Identification

a) Identification morphologique

L'identification des champignons fait essentiellement appel aux caractères cultureux et à la morphologie, mais aussi à des propriétés biochimiques qui nécessitent l'utilisation de milieux standard favorisant la croissance. Par conséquent, nous nous sommes basés pour l'identification des isolats sur leurs aspects macroscopiques et microscopiques.

a) Aspect macroscopique

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

b) 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, et ensuite sont mises entre lame et lamelle pour être observés au microscope optique.

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.

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

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

Nous nous sommes basés pour l'identification des souches sur la clé de détermination de Barnett *et al.* (1977) et George *et al.* (1984). Et sur des souches de références provenant du laboratoire de zoologie de l'université de Blida.

4.1.1.5- Conservation des isolats

Après avoir identifié les isolats, des cultures pures sont transférées dans des tubes à essai inclinés contenant le milieu P.D.A., leurs conservation s'effectue à basse température entre 4 et 8°C (Wraight *et al.*, 1987).

4.1.1.6- Calcul de l'abondance des espèces isolées

Le pourcentage total d'abondance a été calculé par la méthode de Mc mullen *et al.* (1983) en utilisant la formule suivante:

$$\text{Abondance} = \frac{\text{Nombre d'isolat de l'espèce donné}}{\text{Nombre total d'isolat}} \times 100$$

4.1.2- Résultats et interprétation

4.2.1-Champignons isolés à partir de *P. citrella*

4-2.1.1-Aspect microscopique et macroscopique des souches isolées

a- *Bipolaris* sp.

Les colonies forment un revêtement mycélien non vigoureux, de couleur vert gris. Les conidiophores sont simple très fortement géniculés.

Les conidies poussent de manière sympodiale, elles sont essentiellement cylindrées, brunes à membranes épaisses, sont tronquées à la base, et sont en continuité avec la paroi des conidiophores ; demeurant attachées en longs et denses épis conidiens.

Les *Bipolaris* sp sont souvent diagnostiqués à tort comme *Drechslera* ou *Helminthosporium*. Mais ces derniers n'ont cependant pas été documentés pour provoquer une maladie.

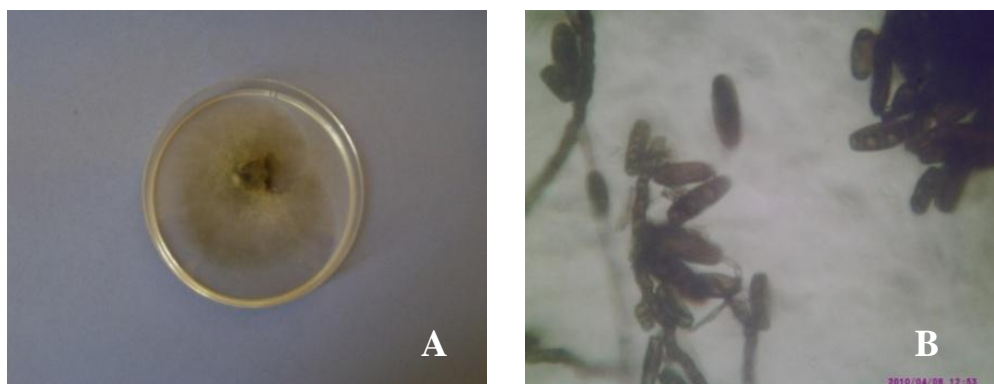


Figure 19: Aspect macroscopique (A) et microscopique (B) (X40) de *Bipolaris* sp (Originale, 2009)

b- *Cladosporium* sp.

Le *Cladosporium* a une croissance lente à modérément rapide sur tous les milieux de culture utilisés. Ils ne poussent généralement qu'à 20 à 25°C, les colonies ont une texture veloutée ou floconneuse, parfois poudreuse. La couleur va du vert olive au brun noir très foncé, le revers est brun noir.

La morphologie microscopique montre des hyphes septés et pigmentés, ils produisent des conidiophores de longueurs variables. Les premières conidies formées à l'extrémité des conidiophores sont de grande taille, uni ou pluricellulaires, l'ensemble forme de longues

chaînes acropètes, ramifiées réalisant des arbuscules fragiles qui se dissocient lors du montage (Fig. 20).

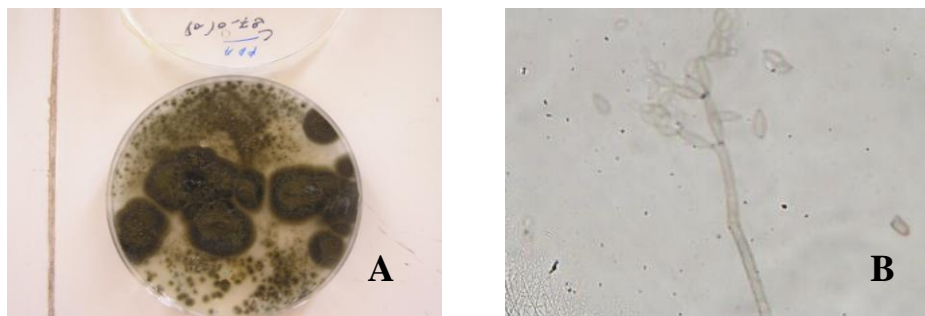


Figure 20 : Aspect macroscopique (A) et microscopique (B) (X40) de *Cladosporium* sp (Originale, 2009)

c- *Alternaria* sp.

Les colonies sont de croissance rapide sur milieu PDA entre 25 et 30°C, la couleur blanche grise au départ, devient rapidement foncée (noir foncé). La texture est duveteuse à laineuse. La colonie est de couleur verte foncée, d'aspect duveteux et de forme concentrique, les cercles sont auréolés de blanc. Les conidies sont de couleurs noires.

L'étude microscopique démontre la présence d'hyphes, septés et ramifiés, tardivement certains filaments sont pigmentés en brun. Les conidiophores sont cloisonnés, bruns, pluricellulaires, d'aspect piriforme ou ovoïde, avec une partie basale arrondie et une extrémité apicale allongée en bec plus ou moins important (Fig. 21).

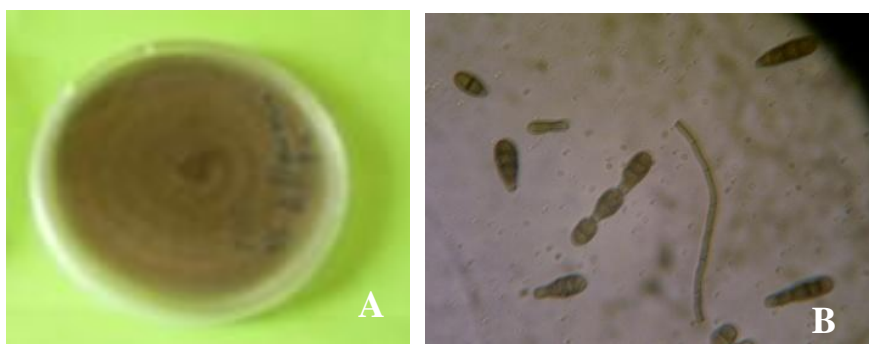


Figure 21: Aspect macroscopique (A) et microscopique (B)(X40) de *Alternaria* sp. (Originale, 2009)

d- *Fusarium semitectum*

Cette espèce forme des colonies duveteuses ou cotonneuses de couleur blanche puis devient rose claire.

Le principal caractère morphologique des *Fusarium* est la présence de macroconidies fusiformes et cloisonnées.

Les phialides sont courtes, larges et formées sur le mycélium aérien ; les microconidies sont absentes ; les macroconidies sont fusiformes courbées et septés ; les chlamydospores sont intercalaires ou terminales formées par le mycélium ou par les conidies. (Fig. 22).

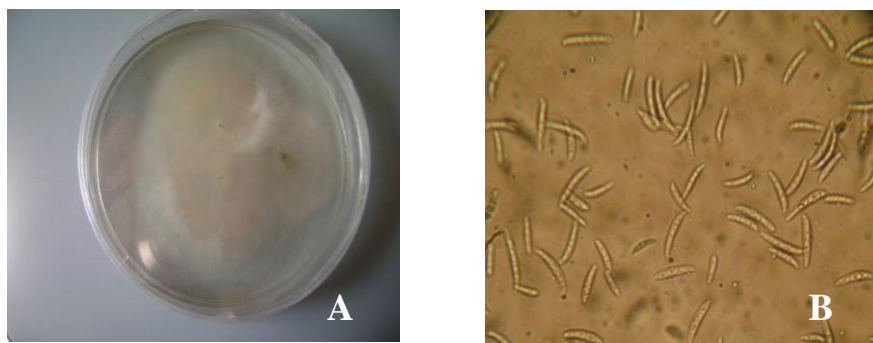


Figure 22: Aspect macroscopique (A) et microscopique (B) (X40) de *Fusarium semitectum* (Originale, 2009)

e- *Stemphyllium* sp.

Le champignon *Stemphyllium* sp. présente sur le milieu de culture P.D.A une coloration verte et un mycélium plus ou moins cotonneux. L'observation microscopique a montré que chez *Stemphyllium* sp., le mycélium produit des conidiophores uniques, ils se distinguent par le mode de production des conidies « en cyme » et leurs formes globuleuses. Elles sont septées longitudinalement et transversalement (Fig. 23).

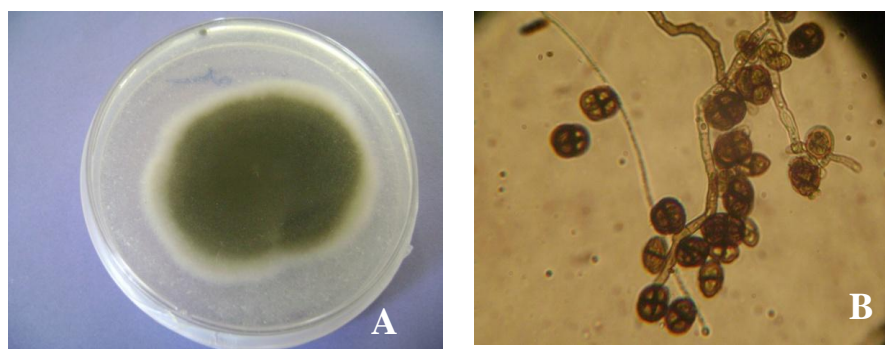
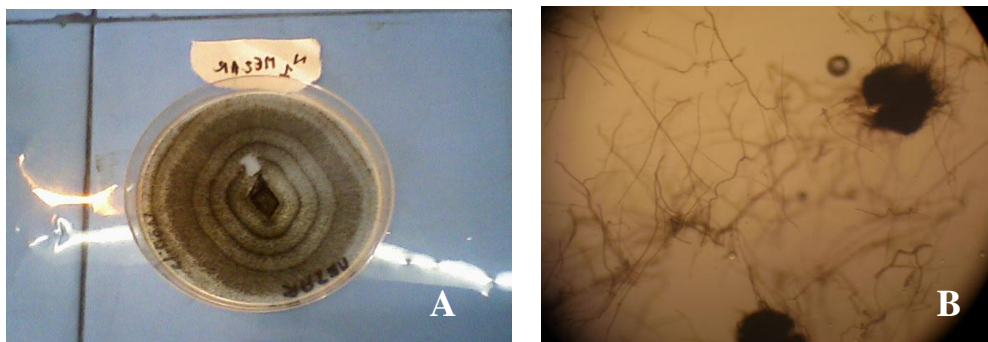


Figure 23: Aspect macroscopique (A) et microscopique (B) (X40) de *Stemphyllium* sp. (Originale, 2009)

f- *Phoma* sp.

Champignons à croissance rapides et extensive sur milieu PDA les colonies présentent initialement une texture glabre. Au bout de 7 jours de culture, on observe à l'œil nu de petits grains foncés à la surface de colonies. Les hyphes septés sont d'abord hyalins, puis bruns. Les pycnides sont les seuls organes de fructification; ce sont des éléments arrondis ou piriformes, bruns à noir. On observe des conidies hyalines d'allure cylindrique et unicellulaire (Fig. 24).



**Figure 24: Aspect macroscopique (A) et microscopique (B) (X40) de *Phoma* sp.
(Originale, 2009)**

g- *Metarhizium anisopliae* var *anisopliae*

La fructification se fait sous forme de phialides ; ces derniers donnent naissance aux conidies ou phialospores. Les phialides peuvent être uniques, en paire ou multiples, produits à partir d'une chaîne basale ; elles sont compactes en colonnes longues ovoïdes voire cylindriques. En masse les phialides présentent une coloration vert-olive. Les conidies sont de forme allongée plus ou moins cylindrique (Fig. 25).

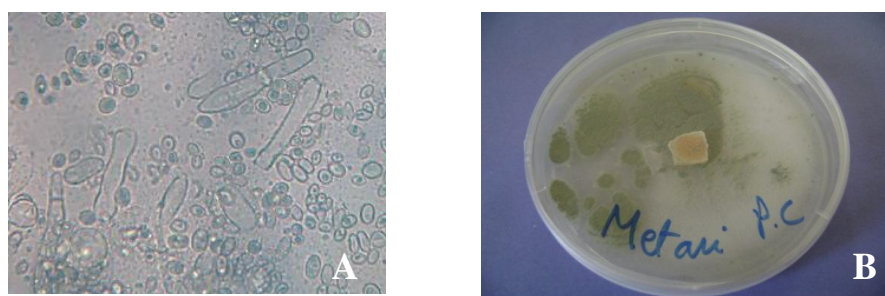


Figure 25 : Aspect macroscopique (A) et microscopique (B) (X40) de *Metarhizium anisopliae* var *anisopliae* (Originale, 2009).

h- *Penicillium crustosum*

L'observation microscopique a démontré la présence d'un mycélium cloisonné avec des conidiophores lisses ramifiés, sur lesquels sont portés les phialides ; portant à leur tour des conidies hyalines ou de couleur vive lorsqu'elles sont en masse. Elles sont de forme sphérique assemblées en chaînettes.

Sur le milieu de culture P.D.A, la colonie de *Penicillium crustosum* est colorée en vert, sa croissance mycélienne, est plus ou moins rapide (Fig. 26).

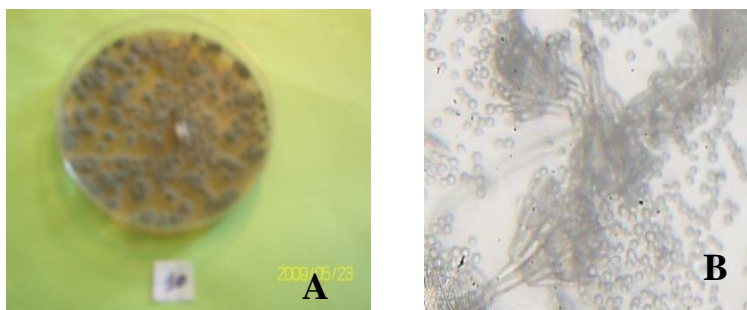


Figure 26 : Aspect macroscopique (A) et microscopique (B) (X40) de *Penicillium crustosum* (Originale, 2009)

i- *Aspergillus niger*

Les têtes conidiennes, bisériées, radiées, sont disposées en plusieurs colonnes brunâtres ou noires. Les conidiophores sont longs, lisses, hyalins ou brunâtres dans leur moitié supérieure. Les vésicules sont globuleuses et entièrement fertiles. Les phialides sont portées par des métules brunâtres.

De dimensions variables, les conidies sont habituellement globuleuses, parfois légèrement aplaties. Elles sont brunes, échinulées à très verruqueuses. Les sclérotés parfois différenciés, sont crème à chamois foncé au début, puis virent au chamois.

Les phialides sont plus ou moins allongées et présentent plusieurs sites de bourgeonnement (polyphialides) (Fig. 27).

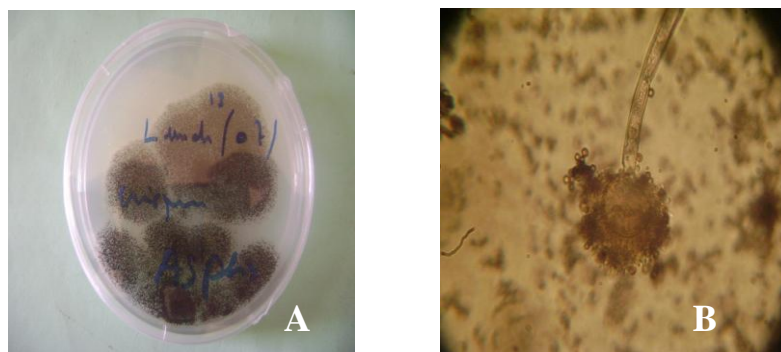


Figure 27 : Aspect macroscopique (A) et microscopique) (B) (X40) *Aspergillus niger* (Originale, 2009)

j- *Coelomycedium* sp.

Nous avons remarqué une colonie de couleur beige entourant les nymphes de l'insecte ; Après repiquage sur milieu de culture aucun développement n'a été constaté (Fig. 28). La figure 28 représente les sporanges de cette espèce.



Figure28 : Aspect microscopique de *Coelomycedium* sp. (Originale, 2009)

k- *Aspergillus flavus*

Le champignon se développe rapidement sur le milieu PDA, il forme des colonies duveteuses à poudreuses, d'abord blanche puis jaune, la tête conidienne au préalable est radiée puis se répartit en plusieurs colonies jaunâtres. Les conidiophores sont hyalins, et les vésicules subglobuleuses. Les phialides sont insérées directement sur la vésicule. Les conidies sont globuleuses à ovoïdes (Fig. 29).

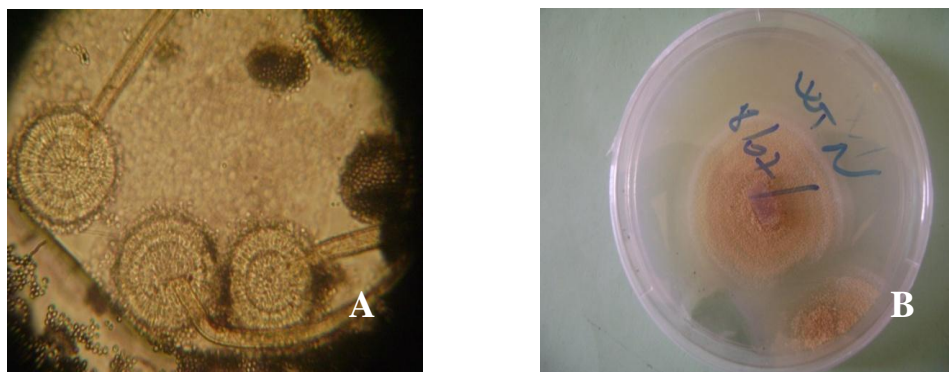


Figure 29 : Aspect macroscopique (A) et microscopique (B) (X40) d'*Aspergillus flavus* (Originale, 2009)

4-1-3- Calcul de l'abondance des espèces isolées

La Figure 30, représente toutes les espèces isolées à partir des nymphes de *Phyllocnistis citrella*. Nous avons remarqué qu'elles appartiennent toutes 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 genres suivants, *Bipolaris* sp, *Cladosporium* sp, *Alternaria* sp, *Phoma* sp, *Fusarium semitectum*, *Coelomycedium* sp, *Metarhizium anisopliae* var *anisopliae*, *Penicillium crustosum*, *Aspergillus niger*, et *Stemphyllium* sp.

En effet, les genres les plus abondants sont *Fusarium semitectum*, *Stemphyllium* sp, *Alternaria* sp et *Bipolaris* sp ensuite *Cladosporium* sp avec respectivement 20 %, 16,36%, 14,54%, 12,72% et 10,90 % d'abondance. Les espèces *Aspergillus niger* et *Penicillium crustosum* et *Aspergillus niger* sont moins abondantes avec 7,27%. Alors que *Coelomycedium* sp était présent avec un pourcentage de 5, 45%. *Metarhizium anisopliae* var *anisopliae* et *Phoma* sp sont les moins abondants avec 3,63% et 1,81%

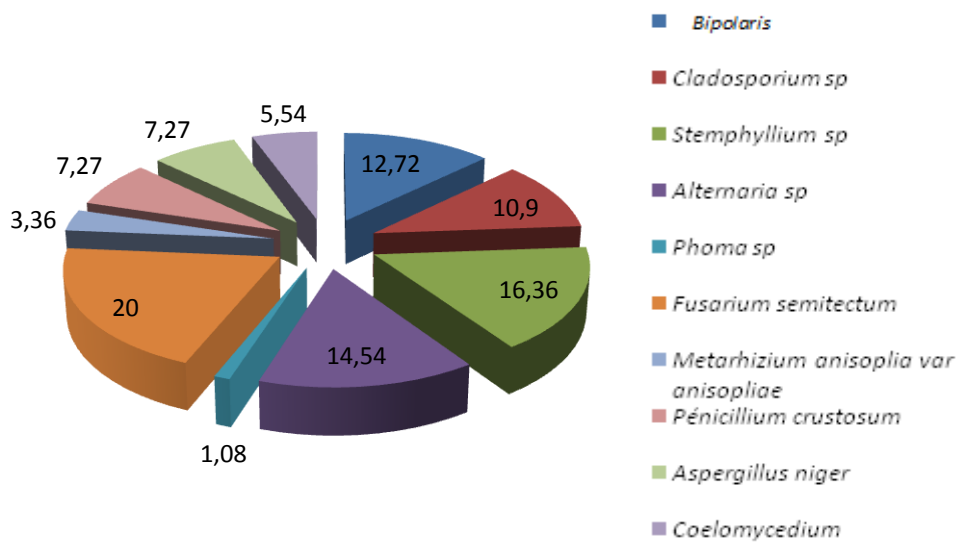


Figure 30: Pourcentage d'abondance des espèces isolées à partir des nymphes de *Phyllocnistis citrella*.

4.2- Isolement à partir de *Shistocerca gregaria*

4.2.1- Matériel et méthodes

4.2.1.1-Matériel biologique

Notre travail a été effectué sur des adultes de *Shistocerca gregaria* provenant de la région de Zaouit Kounta de la wilaya d'Adrar et présentant des symptômes d'infection fongique.

Ces insectes sont placés dans des boîtes de Pétri avec un coton humide à une température de 25°.



Figure 31 : Adulte de *Shistocerca gregaria* présentant des symptômes d'infection (Originale, 2011)

4.2.1.2- Méthode d'isolement des champignons

L'isolement des microorganismes entomopathogènes est réalisé dans des conditions aussi stériles que possible. Toutes les manipulations se sont déroulées à proximité de la flamme du bec bunsun.

Les insectes utilisés sont morts, (Fig., 31), et présentent le développement d'un mycélium de couleur blanche.

Afin d'isoler les champignons présents sur les spécimens susceptibles d'être entomopathogènes, nous avons:

1. Séparer les organes internes des organes externes,
2. Découper l'insecte en petits fragments,
3. Stériliser la surface de l'insecte dans l'hypochlorite de sodium à 2° chlorométrique pendant dix minutes,
4. Rincer trois fois dans l'eau distillée stérile,
5. Sécher sur du papier buvard stérile,

6. Après désinfections, les fragments de l'insecte sont placés dans des boîtes de pétri contenant le milieu P.D.A (Potato-Dextrose-Agar), à raison de deux à quatre fragments par boîtes,
7. Incuber dans l'étuve à 25°C (température convenable au développement des champignons),
8. Examiner les boîtes ensemencées chaque jour afin de purifier les champignons retenus au début du développement pour éviter les contaminations (Fig., 32).

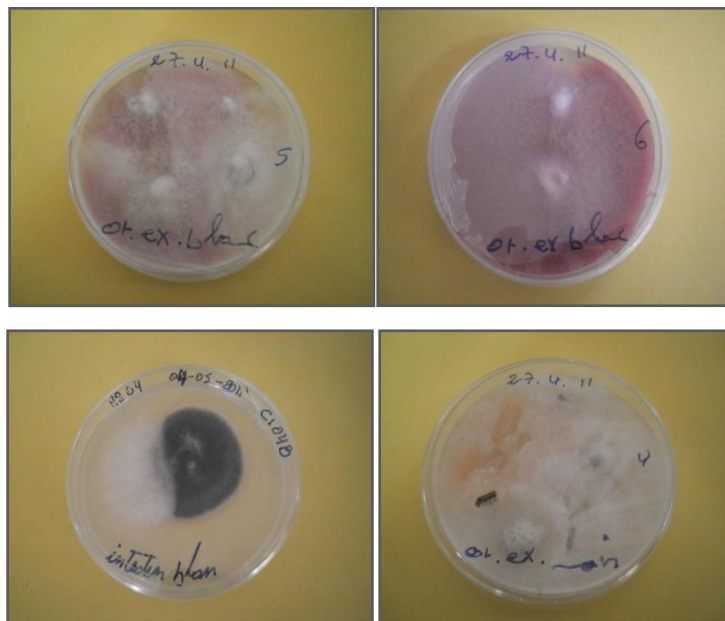


Figure 32: Isolement des champignons a partir de *Shistocerca gregaria* (Originale, 2010)

4.2.2-Résultats et interprétations

4.2.2.1-Champignons isolés

a) *Fusarium sp.*

Nous avons isolés trois souches différentes. Cette espèce forme des colonies duveteuses ou cotonneuses de couleur blanche puis devient soit rose orange, soit rouge pourpre, soit reste blanche (Fig : 33, 34 et 35).

Le principal caractère morphologique des *Fusarium* est la présence de macroconidies fusiformes et cloisonnées.

Les phialides sont courtes et larges et formées sur le mycélium aérien, les microconidies sont abondantes, les macroconidies sont fusiformes courbées et septées, les chlamydospores sont intercalaires ou terminales formées par le mycélium ou par les conidies.

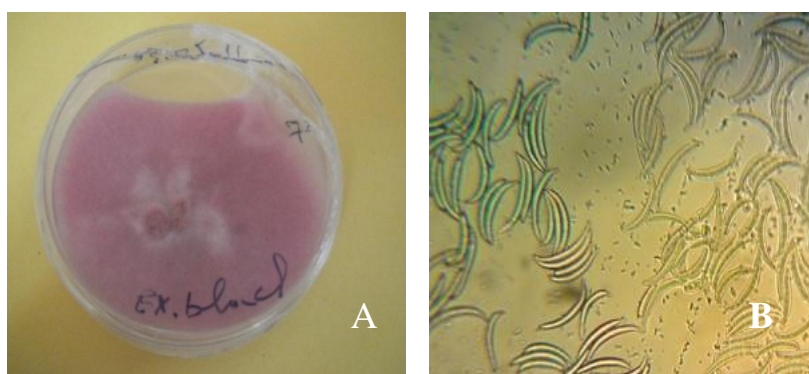


Figure 33: Aspect macroscopique (A) et microscopique (B)(X40) de *Fusarium sp.cfc.nelsonii* (X40) (Originale, 2010)

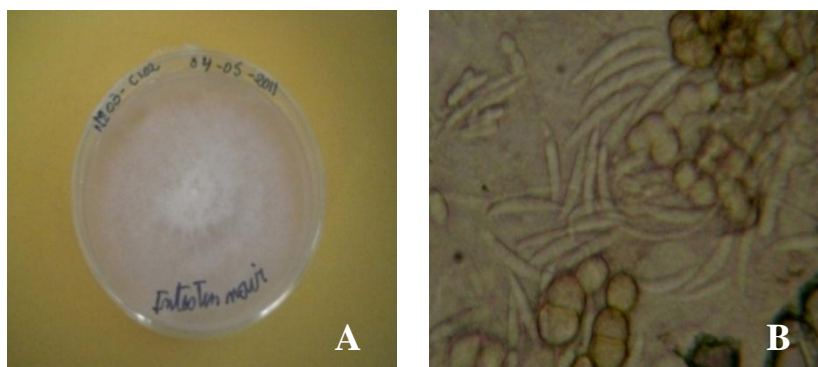
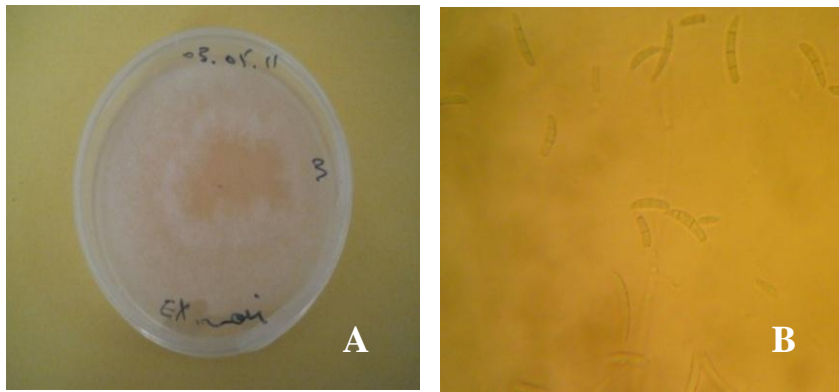


Figure 34: Aspect macroscopique (A) et microscopique (B) (X40) de *F. redolens* (X40) (Originale, 2010)



**Figure 35 : Aspect macroscopique (A) et microscopique (B) de *F. oxysporum* (X40)
(Originale, 2010)**

c) *Metarhizium* sp.

Deux espèces différentes de *Metarhizium* ont été identifiées (Fig. 36 et 37), il s'agit de *M. anisopliae* var *acridum* et *M. flavoviride* var *minus*, toutes deux sont connues pour leur pouvoir entomopathogène sur de nombreuses espèces d'insectes. La couleur de la colonie est verte. Leur aspect microscopique, montre que leur fructification se fait sous forme de phialides ; ces dernières donnent naissance aux conidies ou phialospores. Les phialides peuvent être uniques, en paire ou multiples, produites à partir d'une chaîne basale ; elles sont compactes en colonnes longues ovoïdes voire cylindriques. En masse les phialides présentent une coloration verte-olive. Les conidies sont de forme allongées plus ou moins cylindriques.

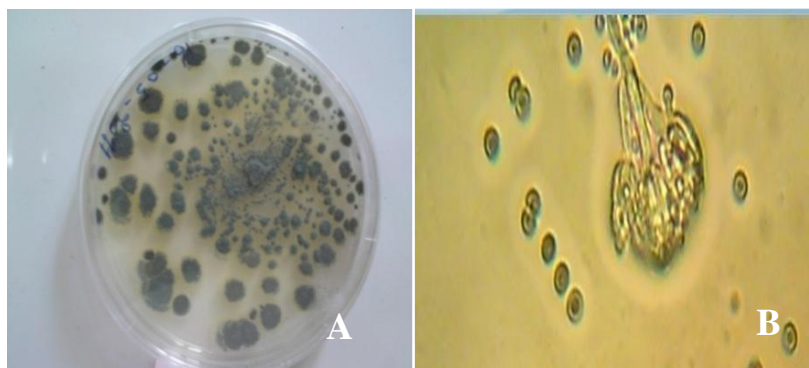


Figure 36: Aspect macroscopique (A) et microscopique (B) (X40) de *Metarhizium flavoviride* var *minus*. (X40) (Originale, 2010).

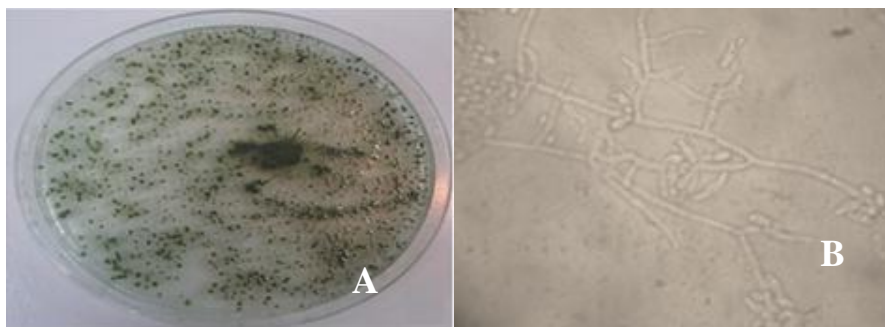


Figure 37 : Aspect macroscopique (A) et microscopique (B) (X40) de *Metarhizium anisopliae* var *acridum* (Originale, 2010)

c) *Beauveria bassiana*

La colonie de *Beauveria* sp. est de couleur blanche. L'aspect microscopique révèle des conidies hyalines, petites et cylindriques. Le mycélium est également hyalin et présente un aspect en zigzag, caractéristique des *Beauveria bassiana*. Cette espèce présente un pouvoir entomopathogène avéré.

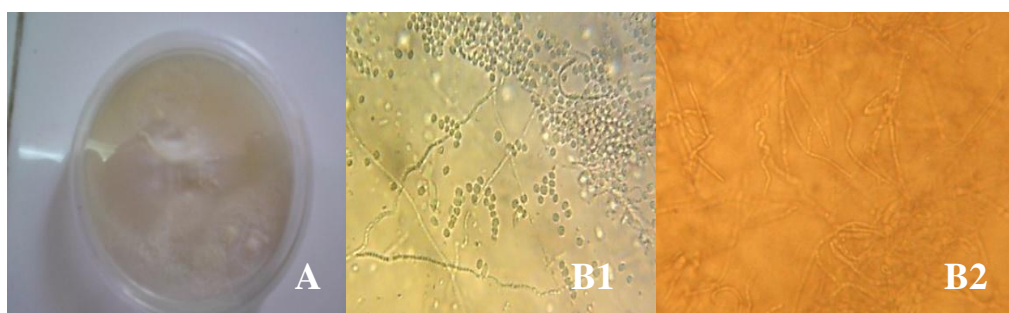


Figure 38 : Aspect macroscopique (A) et microscopique (B1 conidies, B2 hyphes) (X40) de *Beauveria bassiana*. (X40)(Originale, 2010)

d) *Aspergillus niger*

Les têtes conidiennes, bisériées, radiées, sont disposées en plusieurs colonnes brunâtres ou noires. Les conidiophores sont longs, lisses, hyalins ou brunâtres dans leur moitié supérieure. Les vésicules sont globuleuses et entièrement fertiles. Les phialides sont portées par des métules brunâtres, de dimensions variables.

Les conidies sont habituellement globuleuses, parfois légèrement aplaties. Elles sont brunes, échinulées à très verruqueuses. Les sclérotés parfois différenciés, sont crème à chamois foncé au début, puis virent au chamois (Fig. 39).

Les phialides, plus ou moins allongées, présentent plusieurs sites de bourgeonnement (polyphialides).

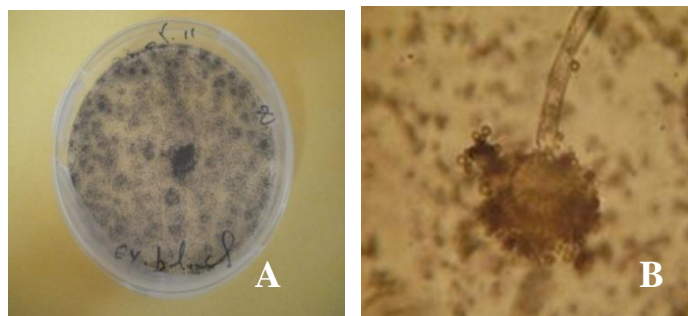


Figure 39: Aspect macroscopique (A) et microscopique (B) (X40) d'*Aspergillus niger* (Originale, 2010)

e) *Alternaria* sp.

Les colonies sont de croissance rapide sur milieu PDA entre 25 et 30°C, la couleur blanche grise au départ, devient rapidement foncée (noir foncé). La texture est duveteuse à laineuse. La colonie est de couleur verte foncée, d'aspect duveteux et de forme concentrique, les cercles sont auréolés de blanc. Les conidies sont de couleurs noires (Fig. 40).

L'étude microscopique démontre la présence d'hyphes, septés et ramifiés, tardivement certains filaments sont pigmentés en brun. Les conidiophores sont cloisonnés, brunes, pluricellulaires, d'aspect piriforme ou ovoïde, avec une partie basale arrondie et une extrémité apicale allongée en bec plus ou moins important.

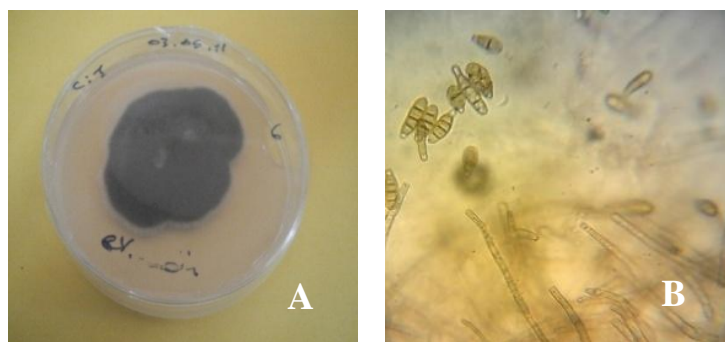


Figure 40 : Aspect macroscopique (A) et microscopique (B) (X40) d'*Alternaria* sp. (Originale, 2010)

4.2.2.2- Calcul de l'abondance des espèces isolées

La Figure 41, représente toutes les espèces isolées à partir des organes externes et internes de *Schistocerca gregaria*. Nous avons remarqué qu'elles appartiennent toutes au phylum des Ascomycot a, mais à des ordres et des genres différents. En effet l'identification des souches isolées a permis de mettre en évidence les espèces suivantes, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium redolens*, *Fusarium sp.cfc.nelsonii*, *Metarhizium anisopliae* var *acridum*, *Metarhizium flavoviride* var *minus*, *Beauveria bassiana*, *Alternaria* sp et *Aspergillus niger*.

Le calcul de l'abondance, a montré que l'espèce *Metarhizium flavoviride* var *minus*, est la plus abondante avec 30% de colonies, suivi de *Metarhizium anisopliae* var *acridum*, *Fusarium sp.cfc.nelsonii*, *F. oxysporum* et *F. redolens* avec des pourcentages respectifs de 19%, 18%, 15% et 10%. *Beauveria bassiana* et *Aspergillus niger* ont présenté la même abondance soit 3%. Alors que *Alternaria* sp était la moins présente avec 2% d'abondance

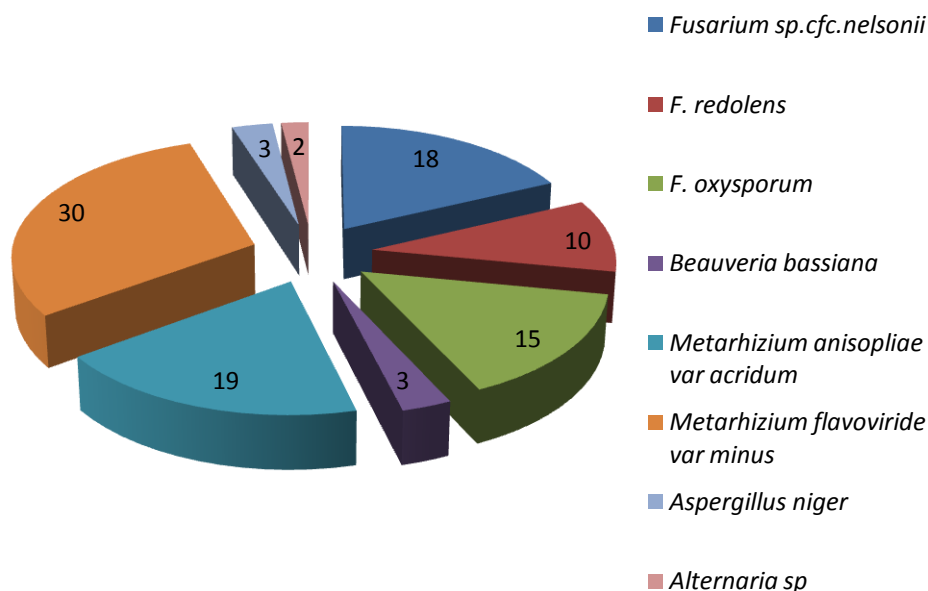


Figure 41 : Pourcentage d'abondance totale des souches isolées à partir des adultes de *Schistocerca gregaria*

La figure 42, illustre la répartition des espèces isolées sur les organes internes et externes de l'insecte. On remarque que 20% des colonies de *Metarhizium flavoviride* var *minus* proviennent des organes internes. Alors que *Metarhizium anisopliae* var *acridum* a présenté un pourcentage plus faible (12%).

L'espèce *Beauveria bassiana* été retrouvée uniquement sur les organes internes. Par contre, *Aspergillus niger* et *Alternaria* sp ne sont présents que sur les organes externes. Ces deux espèces pourraient être des espèces saprophytes, qui se sont installé sur la cuticule des criquets malades, affaiblies par l'infection.

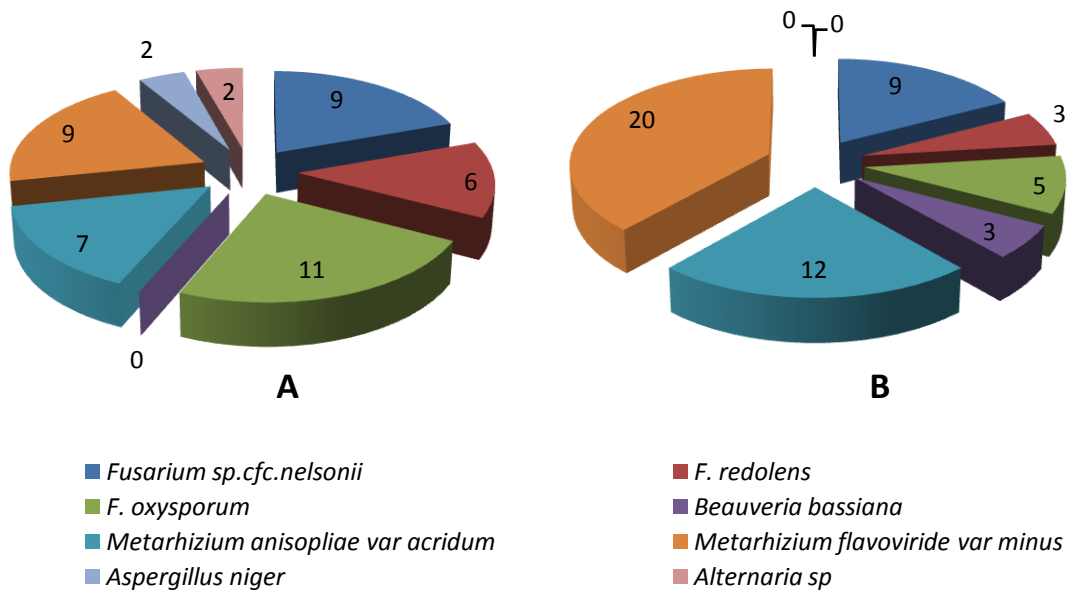


Figure 42 : Pourcentages d'abondance des champignons isolés à partir des organes externes (A) et internes (B) des adultes de *Schistocerca gregaria*.

Discussion

Afin de confirmer l'identification (des espèces) effectuée dans le laboratoire de protection des végétaux dont les travaux se sont faits sur la base des caractères morphologiques, des isolats ont été envoyés au laboratoire (BCCM/ MUCL, culture collection mycothèque de l'université catholique de Louvain-La-Neuve). Les isolats en question ont été identifiés par technique de séquençage en biologie moléculaire en corrélation avec une analyse morphologique macro et microscopique.

Cette analyse a permis de caractériser les éléments suivants :

- *Fusarium* sp isolé à partir de *P. citrella* : *F. semitectum* ;
- *Fusarium* sp1, isolé à partir de *Schistocerca gregaria* : *Fusarium* sp.cfc.nelsonii Marasas et Logrieco
- *Fusarium* sp2 isolé à partir de *Schistocerca gregaria*: *F. redolens* Wollenweber
- *Fusarium* sp3 isolés à partir de *Schistocerca gregaria* : *F. oxysporum* Schlenchtendahl
- *Penicillium* sp isolé à partir de *S.gregaria* : *Penicillium crustosum* Thom
- *Beauveria* sp isolé à partir de *S.gregaria*: *Beauveria bassiana*.

De même, cet examen a confirmé l'identification précise de *Metarhizium anisopliae* var *acridum*, *Metarhizium flavoviride* var *minus*, isolés à partir de *S.gregaria* et *M. anisopliae* var *anisopliae* isolé à partir de *P. citrella*.

En effet, les résultats de l'isolement des champignons à partir des nymphes de *P. citrella*, enroulées par des hyphes ont mis en exergue la présence d'espèces de champignons entomopathogènes autochtones qui contribuent à la régulation naturelle de l'insecte. Nous avons réussi à isoler trois espèces entomopathogènes connues à savoir *M. anisopliae* var *anisopliae*, *F. semitectum* et *A. flavus*.

Avant l'isolement des champignons à partir des criquets, nous les avons placés dans des boîtes humides pour favoriser leur sporulation. Après 48h, les spécimens de criquet extériorisés des hyphes de couleur blanche. En effet, d'après Hurpin et Vago (1958), la sporulation des champignons entomopathogènes s'effectue sur l'extérieur de l'insecte hôte dans des conditions humides et à l'intérieur de l'hôte si le milieu environnant est trop sec.

L'isolement des champignons à partir de *S. gregaria* montre que ces adultes de criquets hébergent un nombre importants de champignons. Parmi ce cortège, on retrouve trois espèces pathogènes à savoir *M. anisopliae* var *acridum*, *M. flavoviride* var *minus* et *Beauveria bassiana*. Nous avons pu isoler 6 autres espèces de champignons appartenant à 03 autres

genres à savoir *Fusarium* sp., *Alternaria* sp., *Aspergillus niger*, avec des taux d'abondance moins importants.

L'espèce la plus abondante est *M. flavoviride* avec 30% d'abondance, par contre *Aspergillus niger* et *Alternaria* sp. sont les espèces les moins présentes avec respectivement 3 et 2% d'abondance.

Nous avons relevé également qu'il y avait des espèces se trouvant uniquement sur les organes internes de *S. gregaria* tels que *Beauveria* sp alors que d'autres se retrouvent uniquement sur les organes externes, comme *Alternaria* sp et *Aspergillus* sp, il peut s'agir de champignons saprophytes installés sur les insectes suite à l'infection. La présence de *Beauveria bassiana* uniquement sur les organes interne dévoile sa capacité à traverser les téguments de l'insecte, et montre également que ce champignon n'a pas pu de développer à l'extérieur de l'insecte, probablement à cause des conditions environnementale qui lui sont défavorable particulièrement la température et l'humidité.

Chapitre 5: Essai de pathogénicité des champignons isolés sur les larves et les œufs de *P. citrella*

5.1-Introduction

La pathogénicité d'un agent induit des symptômes observables sur l'hôte (Postulat de Kock), ceci peut être vérifié par des contaminations artificielles. Afin de porter une étude sur l'agent pathogène isolé d'un insecte contaminé.

La deuxième partie de notre travail, consiste à tester l'effet des champignons préalablement isolés sur :

- Le comportement des larves de *P. citrella* par trempage des feuilles de *Citrus* contaminées par ces derniers dans des solutions sporales ;
- La mortalité des œufs de *P. citrella* par pulvérisation des feuilles infestées.

5.2- Matériel et méthodes

5.2.1-Matériel biologique

Pour réaliser l'essai d'inoculation des champignons isolés, nous nous sommes approvisionnés en feuilles d'agrumes portant des œufs et d'autres infestées de larves de *P. citrella*.

Les feuilles échantillonnées proviennent d'une parcelle fortement infestée du verger de l'exploitation expérimentale de l'université de Mostaganem (Mazagran). Les isolats de tous les champignons testés sur les larves de *P. citrella* ont été préalablement isolés à partir de criquet présentant des symptômes d'infection entomopathogène.

Les champignons utilisés pour le test sont : *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* var *acridum*, *Metarhizium flavoviride* var *minus* isolés à partir de *Schistocerca gregaria* et *Fusarium semitectum*, *Aspergillus flavus* et *Metarhizium anisopliae* var *anisopliae* isolés à partir de *P. citrella*.

5.2.2- Substrat

Afin de créer un milieu favorable au développement des larves tout en conservant la feuille infestée fraîche, le milieu le plus adéquat était celui des boîtes de Pétri contenant du coton humidifié. En effet, celui-ci maintient les feuilles fraîches durant une période permettant le bon développement des larves (Fig. 43).



Figure 43 : Substrat expérimentale pour le test de pathogénicité (Boîtes de Pétri contenant du coton humidifié) (Originales, 2011)

5.2.3- Conduite du test de pathogénicité des champignons

L'inoculation des larves de *P. citrella* a été effectuée par trempage des feuilles infestées de larves de *P. citrella* (vivantes et non parasitées), dans une suspension conidienne des champignons retenus. Parallèlement, nous avons utilisé la méthode de pulvérisation pour les œufs de *P. citrella*.

Cinq doses de suspensions de spores sont préparées et additionné d'une goutte de Tween 80. À savoir : 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 et 10^2 spores/ml.

L'inoculation est réalisée sur des lots de 20 larves. Chaque lot est traité par une seule dose, d'une seule espèce. Le trempage consiste à introduire les feuilles infestées de larves de *P. citrella* dans une suspension de spores ajustée à la concentration voulue et additionné d'une goutte de tween 80, puis ils sont déposés sur du coton humidifié.

Le lot témoin est formé par des feuilles infestées de larves de l'insecte qu'on trempe dans de l'eau distillée stérile contenant une goutte de tween 80. Nous avons également retenu un lot témoin zéro, non inoculé. Les feuilles de *Citrus* portant des œufs ont été pulvérisées par les suspensions de spores concentrées à 10^2 , 10^4 et 10^6 spores/ml.

Les observations ont été effectuées quotidiennement afin de déterminer l'effet de ces champignons sur la mortalité des larves. Et afin d'éliminer tous les risques de mortalité naturelle, nous avons calculé la mortalité corrigée selon la formule de Schneider et Oreilli :

$$\text{Mortalité corrigée (MC \%)} = \frac{M2 - M1 * 100}{100 - M1} ;$$

M2 : Pourcentage de mortalité dans le lot traité ;

M1 : Pourcentage de mortalité dans le lot témoin.

5.3-Résultats et interprétation

5.3.1-Essai de pathogénicité des différents champignons isolés à partir des nymphes de *P. citrella*

5.3.1.1. Effet des champignons sur les larves de *P. citrella*

D'une manière générale on remarque des mortalités dans l'ensemble des lots traités suite au test d'inoculation des larves par les trois champignons retenus. Les résultats obtenus sont représentés en (Annexe 1). L'analyse de variance des données montre un effet significatif ($P \leq 0.05$), des doses et du temps sur l'ensemble des champignons. En effet, la mortalité des larves augmente dans le temps en fonction des doses.

La Figure 44, représente la mortalité des larves sous l'effet des différentes dose de *Aspergillus flavus*, les résultats obtenus montrent que ce champignons a réussi avec 10^6 spores/ml a éliminé 100% dans une période de 06 jours, avec 10^5 spores/ml en 07 jours, et avec 10^4 spores /ml en 08 jours. Les autres doses n'ont pas réussi à éliminer la totalité de la population du lot.

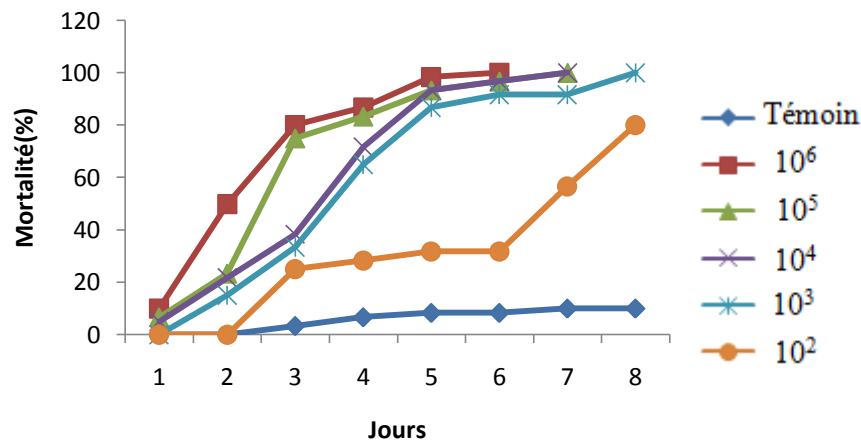


Figure 44: Effet de différentes concentrations de spores d'*Aspergillus flavus* sur la mortalité des larves de *P. citrella*

Représenté sur la Figure 45, *M. anisopliae* var *anisopliae* a également éliminé la totalité de l'effectif en 06 jours avec 10^6 spores /ml, en 07 jours pour 10^5 spores /ml et 10^4 spores /ml et en 08 jours pour 10^3 spores /ml.

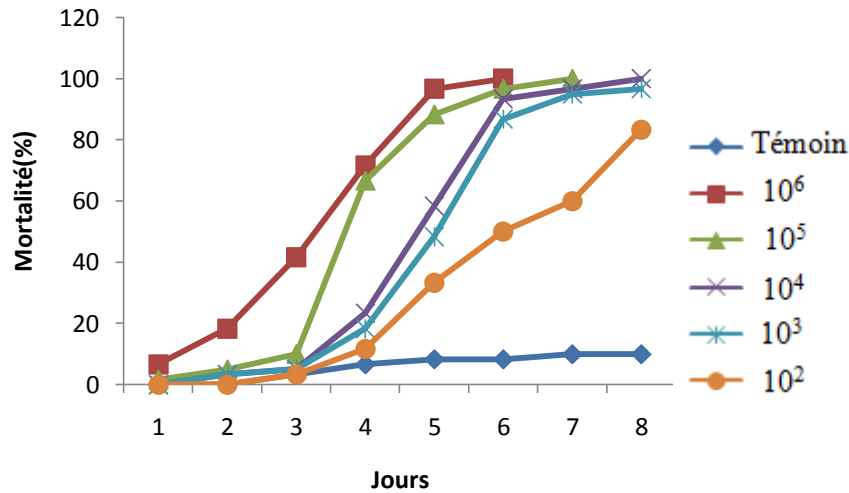


Figure 45 : Effet de différentes concentrations de spores *Metarhizium anisopliae* var *anisopliae* sur la mortalité des larves de *P. citrella*

La Figure 46, montre que *Fusarium semitectum*, a provoqué un maximum de mortalité en un temps record de 03 jours pour la concentration 10^6 spores/ ml, en 05 jours pour 10^5 et 10^4 , et en 07 jours pour 10^3 et 10^2 . Il en ressort que, c'est le seul champignon qui a réussi à contrôler la population larvaire tout entière, même pour les plus faibles concentrations (10^3 et 10^2). Il semble ainsi le plus rapide et le plus efficace pour contrôler les larves de *P. citrella*.

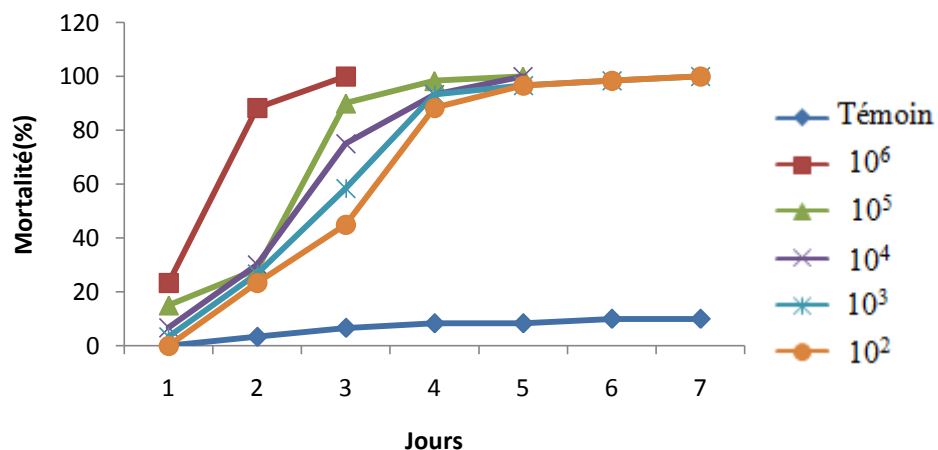


Figure 46: Effet de différentes concentrations de spores de *Fusarium semitectum* sur la mortalité des larves de *P. citrella*

Les Figures 47, 48, 49, représentent la relation proportionnelle qui existe entre les différentes doses et le taux de mortalité des souches testés. La première, montre une corrélation positive entre les doses de *M. anisopliae* var *anisopliae* et la mortalité des larves avec un coefficient de corrélation de 0,945. On remarque également que la DL50 est de $10^{5,3}$ spores/ml.

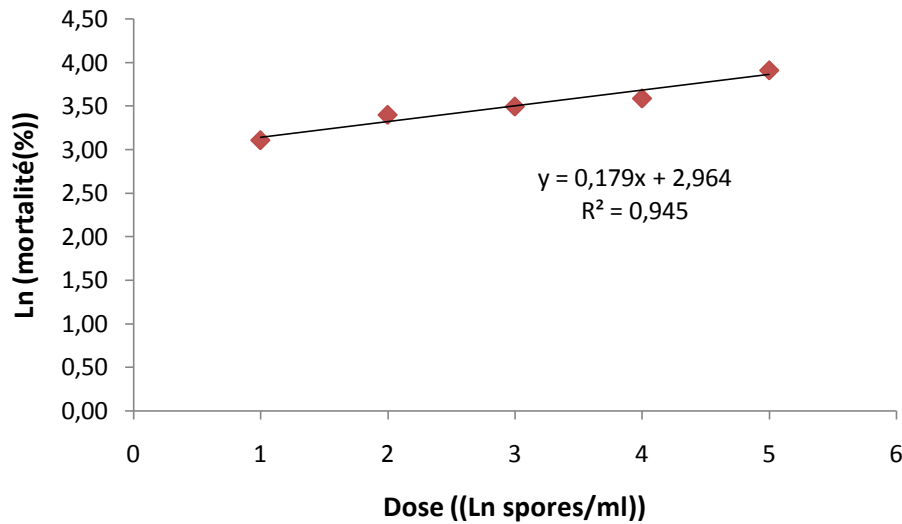


Figure 47 : Taux de mortalité des larves de *P. citrella* sous l'effet de *Metarhizium anisopliae* var *anisopliae* noté au 5^{ème} jour du traitement

De même, la figure 48, met en évidence une corrélation positive entre la dose du traitement par *F. semitectum* et la mortalité des larves avec un coefficient de 0,8, la DL50 est égale à $10^{2,13}$ spores/ml.

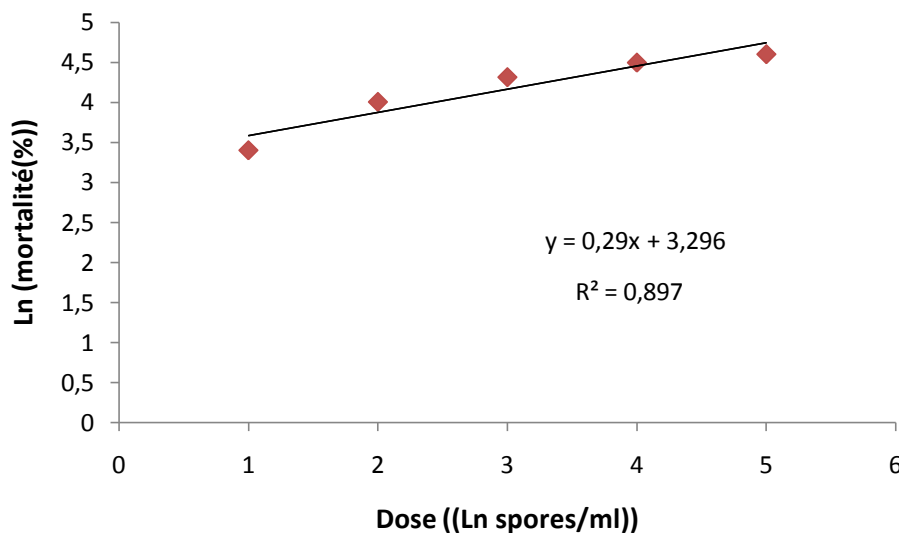


Figure 48: Taux de mortalité des larves de *P. citrella* sous l'effet de *Fusarium semitectum* noté au 5^{ème} jour du traitement

Le troisième graphe (Fig. 49), concerne *A. flavus*, et fait ressortir que ce champignon, a présenté un coefficient de corrélation de 0.862, avec une DL 50 de $10^{5,96}$ spores/ml.

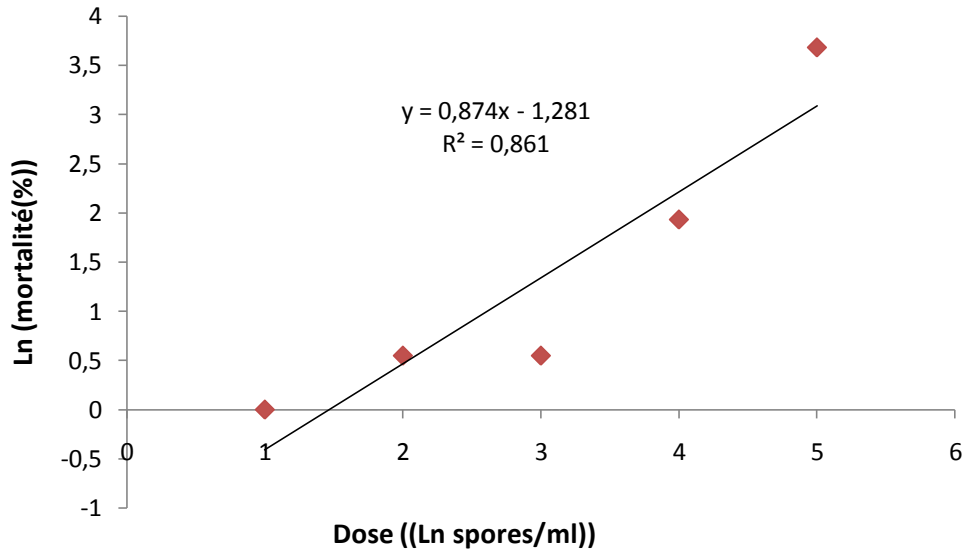


Figure 49 : Taux de mortalité des larves de *P. citrella* sous l'effet d'*Aspergillus flavus* noté au 5^{ème} jour du traitement

En comparant la mortalité causée par les trois champignons, on remarque que c'est *F. semitectum* qui a causé le plus de mortalité suivi par *M. anisoplae*, alors que *A. flavus* est celui qui a provoqué la plus faible morbidité. Ces résultats sont confirmés par le calcul de la DL50, qui a montré que *F. semitectum* a enregistré la DL50 la moins importante, $10^{2,13}$ spores/ml, ce champignon a réussi à contrôler et à éliminer 50% de la population larvaire avec la plus faible concentration, suivi par *M. anisoplae* var *anisoplae* avec une DL50 de $10^{5,3}$ spores/ml, et enfin *A. flavus* avec une DL50 de $10^{5,963}$ spores/ml.

A la lumière de ces résultats, on remarque que, *F. semitectum* est le plus performant contre les larves de *P. citrella*, après seulement trois jours de traitement.

5.3.1.2. Effet des champignons sur les œufs de *P. citrella*

Les résultats de l'effet des champignons testés sur la mortalité des œufs de *P. citrella* sont représentés dans les figures 50, 51, 52. On remarque qu'à l'instar des larves les trois champignons testés ont causé des mortalités importantes sur les œufs, en fonction du temps.

L'analyse de variance des résultats a montré l'effet significatif ($P \leq 0,05$), des doses et du temps. Il faut noter que la mortalité des œufs a commencé d'une manière remarquable pendant les deux premiers jours après traitement. La figure 49, montre que *Fusarium semitectum* a réussi à éliminer 100 % d'individus en sept (07) jours avec la concentration de 10^6 spores /ml.

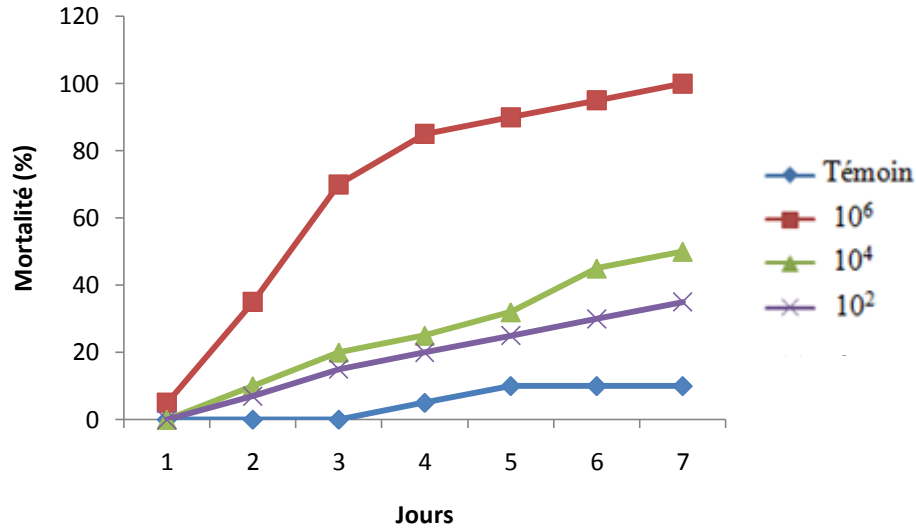


Figure 50: Effet de différentes concentrations de spores de *Fusarium semitectum* sur la mortalité des œufs de *P. citrella*

D'après la figure 51, on remarque que *Metarhizium anisopliae* var *anisopliae* a provoqué une mortalité des œufs faible, en effet un taux de mortalité de seulement 28% est enregistré à une concentration de 10^6 spores/ml, le septième jour après le traitement.

Il faut noter que contrairement aux lots traités par *Fusarium semitectum*, la mortalité n'a commencé qu'à partir du deuxième jour et a évolué dans le temps d'une manière très discrète jusqu'à la fin du test.

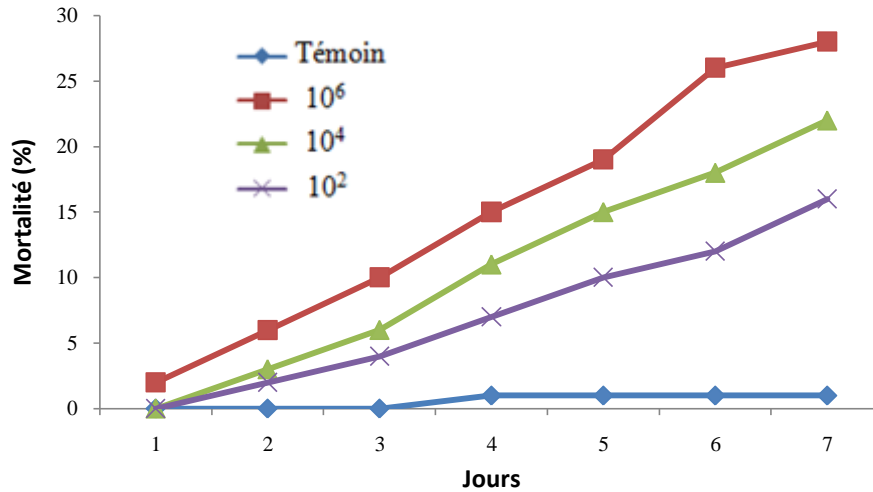


Figure 51: Effet de différentes concentrations de spores de *Metarhizium anisopliae* var *anisopliae* sur la mortalité des œufs de *P. citrella*

A l'instar de *Metarhizium anisopliae* var *anisopliae*, les œufs traités par *Aspergillus flavus* n'ont été que légèrement atteints par l'affection, en effet, un faible taux a été également enregistré sur le lot traité par ce champignon avec seulement 22% de létalité (Fig. 52).

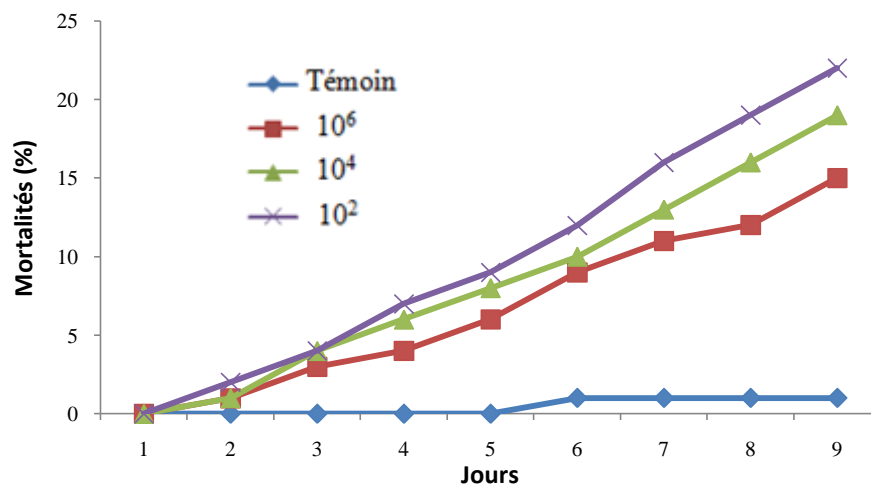
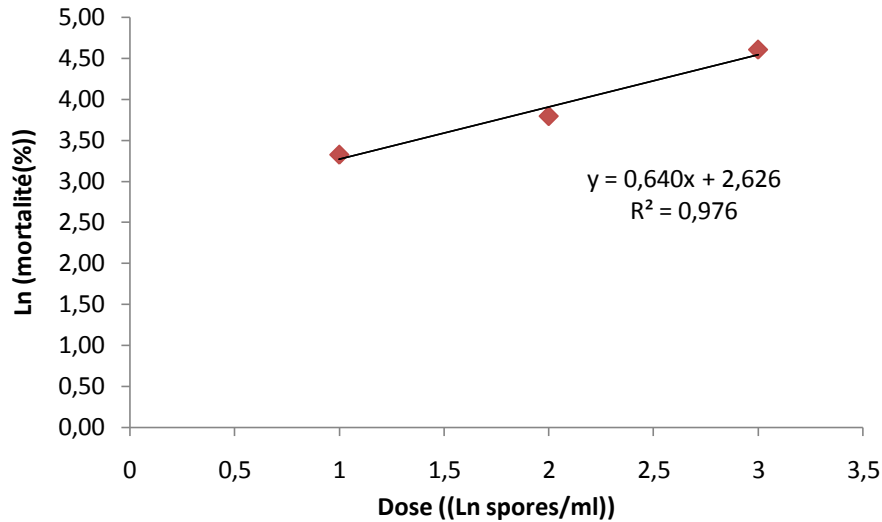


Figure 52: Effet de différentes concentrations de spores *Aspergillus flavus* sur la mortalité des œufs de *P. citrella*.

Toutes les doses testées n'ont pas réussi à éliminer la totalité des larves du lot, ceci est le propre de la lutte biologique, accepté d'ailleurs par la majorité des scientifiques. 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.



Tout comme pour le test effectué sur les larves, les courbes « dose-réponse » tracées permettent de déterminer la DL50 des spores des trois champignons testés. Les figures 53, 54 et 55 illustrent une corrélation positive entre la dose des champignons et la mortalité corrigée des œufs correspondante, et de ce fait met en évidence la proportionnalité de cette dernière par rapport à la concentration de l'inoculum.

Fusarium semitectum (Fig.53) a assuré une efficacité notable avec une DL50 de $10^{2,01}$ spores/ml. Au vu des résultats obtenus ce champignon a donné le meilleur effet ovocide, par un taux de mortalité élevé et une DL50 moins importante.

Figure 53: Mortalité corrigée des œufs de *P. citrella* sous l'effet de *Fusarium semitectum*

La figure 54 représente la relation dose-effet entre les différentes concentrations d'inoculum de *Metarhizium anisopliae* var *anisopliae* et la mortalité des œufs de *P. citrella*, le calcul de la DL 50 met en exergue la faible efficacité de ce champignon sur les œufs déjà noté sur la figure 49, en effet, le champignon a besoin de $10^{5,1}$ spores /ml, pour pouvoir contrôler seulement 50 % de la population.

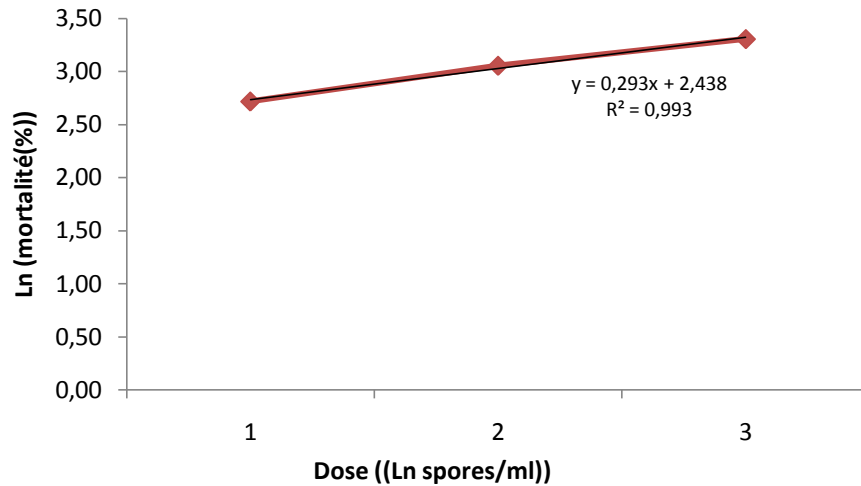


Figure 54: Mortalité corrigée des œufs de *P. citrella* sous l'effet de *Metarhizium anisopliae* var *anisopliae*

De même, *Aspergillus flavus* (fig.55) a démontré une action encore plus faible que celle de *M. anisopliae* puisque la DL50 calculée est de l'ordre de $10^{7.3}$ spores /ml.

Pour confirmer la pathogénécité des deux champignons testés, des prélèvements d'œufs momifiés par ces champignons à différentes concentrations ont étéensemencés sur le milieu P.D.A ; après cinq jours d'incubation à 25°C, il s'en est suivi l'observation d'un bon développement d'isolats fongiques purs.

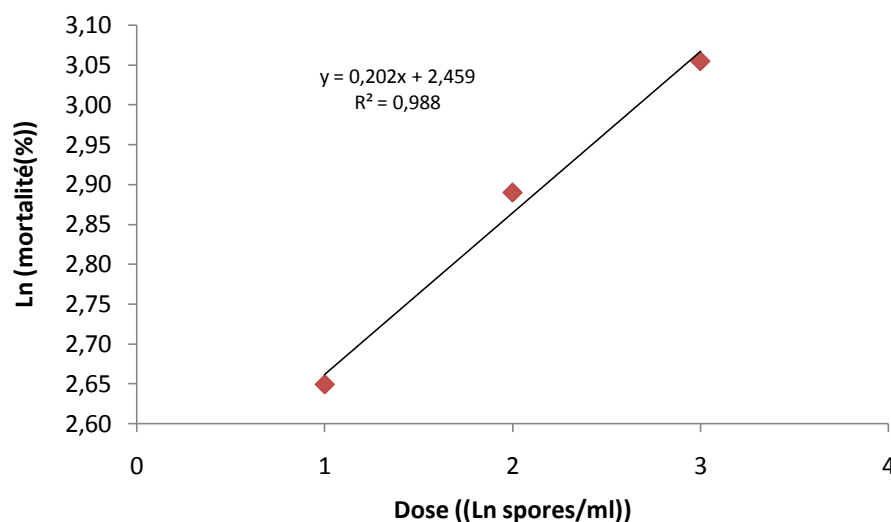
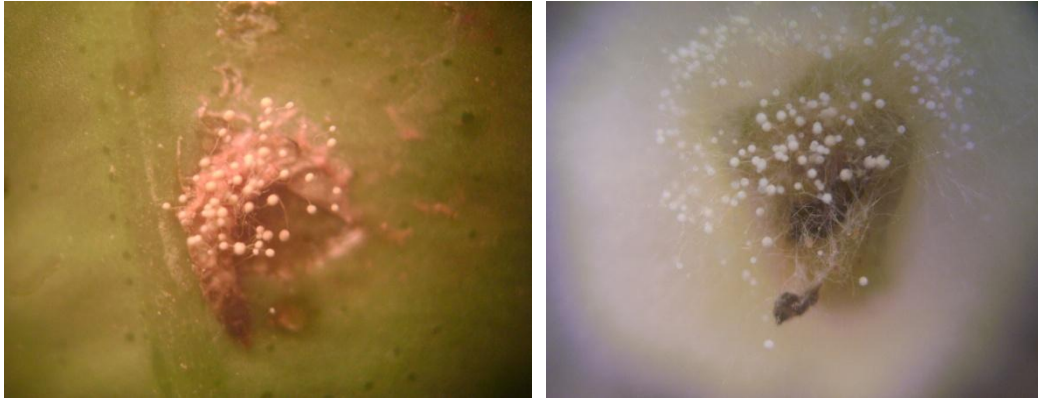


Figure 55: Mortalité corrigée des œufs de *P. citrella* sous l'effet de *Aspergillus flavus*

Suite à ce test, on peut déduire que *F. semitectum* est le seul champignon qui a dévoilé une efficacité intéressante vis à vis des œufs et des larves de *P. citrella* et peut être considéré comme entomopathogène intéressant susceptibles d'être préconisé dans le cadre d'une lutte biologique contre ce redoutable phytophage.



**Figure 56: Action d'*A. flavus* sur les larves de *P. citrella*
(Originale, 2010)**



**Figure 57 : Action de *F. semitectum* sur les larves de *P. citrella*
(Originale, 2010)**

5.3.2- Essai de pathogénicité des différents champignons isolés à partir de *Shistocerca gregaria*.

5.3.2.1- Effet des champignons sur les larves de *P. citrella*

Les résultats du test d'inoculation des larves de *P. citrella* par les champignons isolés sont représentés en (Annexe 1). L'analyse de variance des données montre un effet significatif des doses de l'ensemble des champignons sur les larves de l'insecte.

La figure 58, représente la mortalité des larves sous l'effet des différentes doses de *M. anisopliae var acridum*, elle montre que ce champignon a réussi à éliminer 100 % de larves dans une période de 06 jours avec la plus forte concentration à savoir 10^6 spores /ml, en 07 jours pour 10^5 spores /ml, et en 11 jours pour 10^4 spores /ml. Les autres doses n'ont pas réussi à éliminer la totalité des larves du lot.

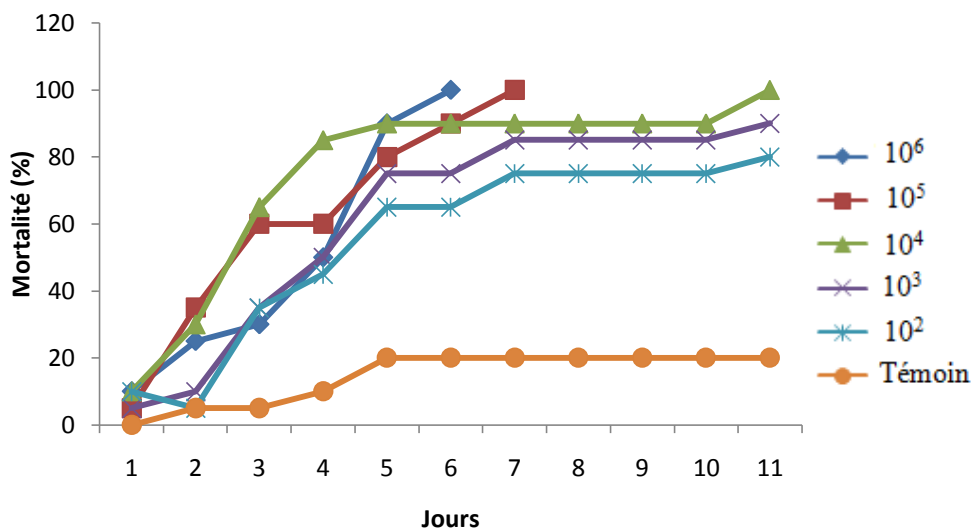


Figure 58: Effet de différentes concentrations de spores de *Metarhizium anisopliae var acridum* sur la mortalité des larves de *P. citrella*

Beauveria bassiana représentée sur la figure 59, a également éliminé la totalité de l'effectif en 07 jours pour 10^6 spores /ml, en 08 jours pour 10^5 et en 09 jours pour 10^4 .

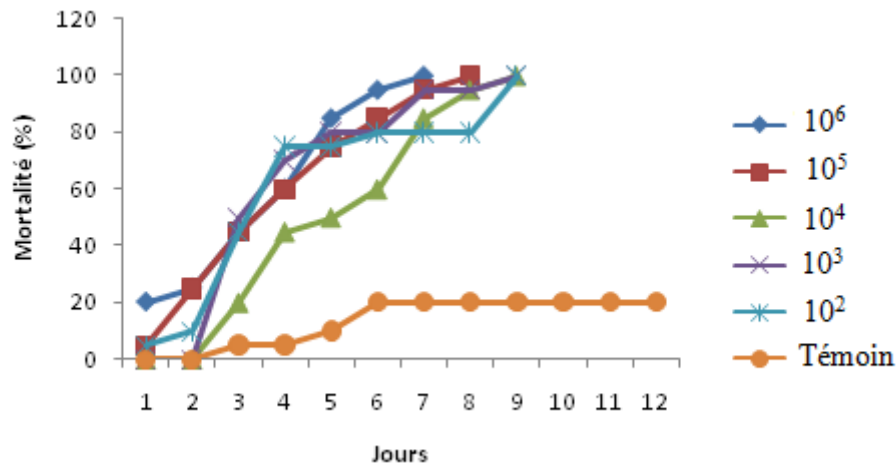


Figure 59 : Effet de différentes concentrations de spores de *Beauveria bassiana* sur la mortalité des larves de *P. citrella*

La figure 60, montre que *M. flavoviride* var *minus*, a induit un maximum de mortalité en seulement 05 jours pour la concentration 10^6 , en 06 jours pour 10^5 , en 07 jours pour 10^4 et 10^3 . Il semble ainsi le plus rapide à contrôler les larves de *P. citrella*.

D'après ces résultats, on constate que *Metarhizium flavoviride* var *minus* a été le plus efficace puisqu'il a réussi à éliminer 100 % de larves dans un temps plus court par rapport aux autres champignons.

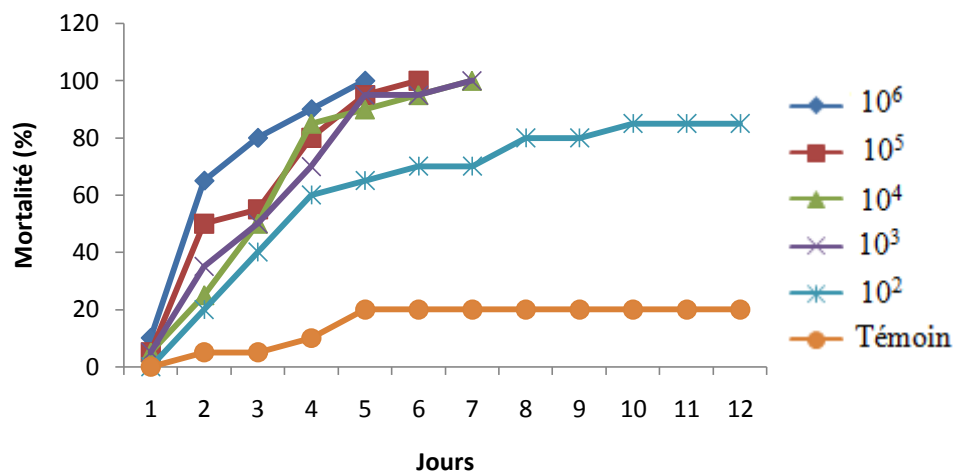


Figure 60: Effet de différentes concentrations de spores de *Metarhizium flavoviride* var *minus* sur la mortalité des larves de *P. citrella*

Les figures 61, 62, 63, représentent la relation proportionnelle qui existe entre les différentes doses et la mortalité corrigée des souches testées. La première (Fig. 61), montre

une corrélation positive entre les doses de *M. anisopliae* var *acidum* et la mortalité des larves de *P. citrella* avec un coefficient de 0,94. On remarque également que la DL50 est située au-delà de $10^{2,78}$ spores/ml.

De même, la figure 62, met en évidence une corrélation positive avec un coefficient de 0,97, pour *M. flavoviride* var *minus*, également la DL50 est égale à $10^{1,64}$ spores/ml.

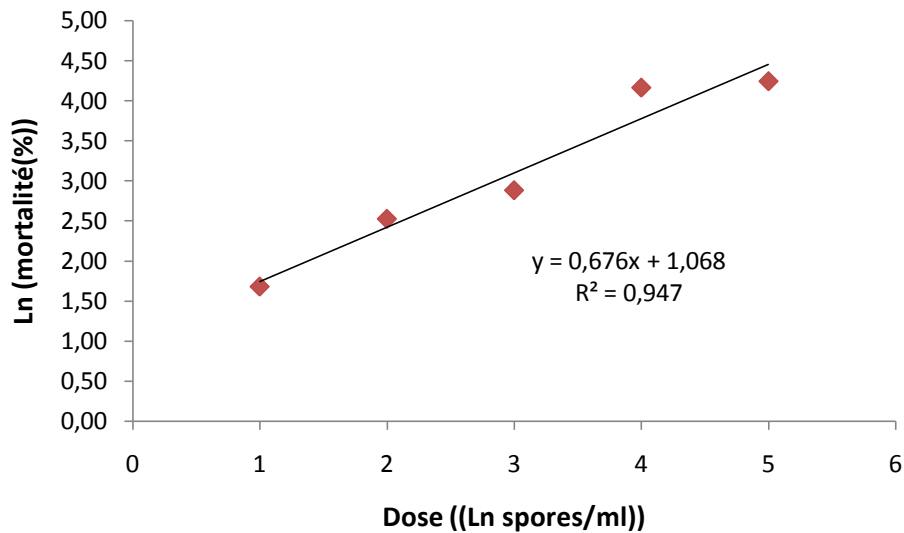


Figure 61 : Mortalité corrigée des larves de *P. citrella* sous l'effet de *Metarhizium anisopliae* var *acidum* notée le 3^{ème} jour du traitement

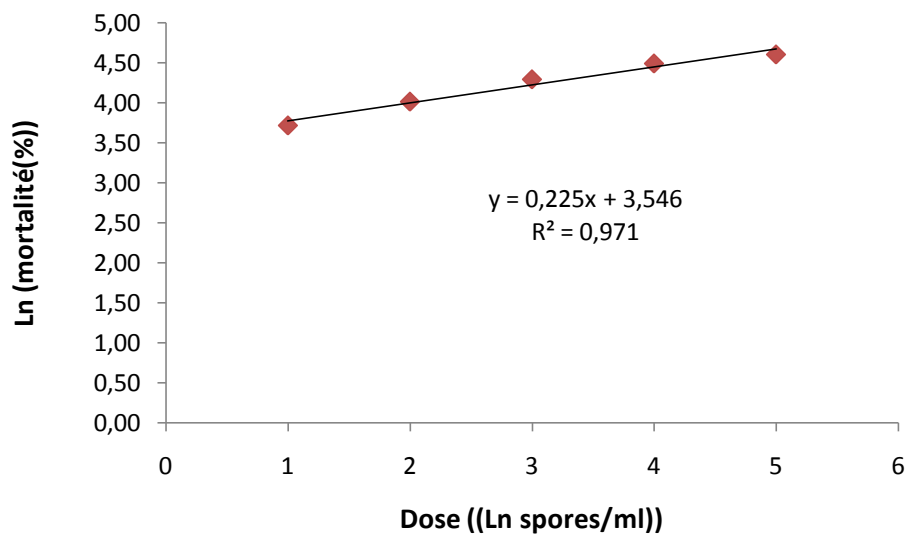


Figure 62 : Mortalité corrigée des larves de *P. citrella* sous l'effet de *Metarhizium flavoviride* var *minus* notée le 3^{ème} jour du traitement

La dernière (fig. 63), concerne *B. bassiana*, et fait ressortir que ce champignon, a présenté le coefficient de corrélation le moins important, ce qui signifie que malgré l'effet significatif des doses sur la mortalité corrigée, la différence entre les doses n'a pas été ressentie comme pour les deux premières souches. En effet, nous avons remarqué que même pour la première dose on a enregistré plus de 75 % de mortalité, la DL 50 pour ce cas est de $10^{3,53}$ spores/ml.

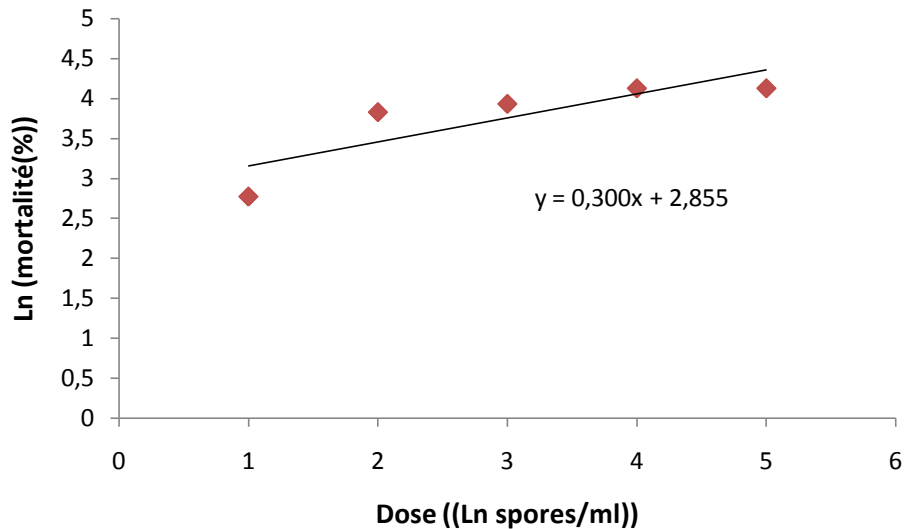


Figure 63: Mortalité corrigée des larves de *P.citrella* sous l'effet de *Beauveria bassiana* notée le 3^{ème} jour du traitement

A la lumière de ces résultats, on remarque que, *M. flavoviride* var *flavoviride* est plus actif et reste le plus efficace contre les larves de *P. citrella*, avec une DL50 de $10^{1,64}$ spores/ml après trois (03) jours de traitement.

5.3.2.2-Effet de différents champignons sur les œufs de *P. citrella*

Les résultats de l'effet des champignons testés sur la mortalité des œufs de *P. citrella* sont représentés sur les figures 64, 65 et 66. On remarque qu'à l'instar des larves, les trois champignons ont causé des mortalités sur les œufs en fonction du temps. L'analyse de variance des résultats a montré l'effet significatif ($P \leq 0,05$) des doses et du temps. Il faut noter que la mortalité des œufs a commencé le premier jour après traitement.

La Figure 64, montre que *M. anisopliae* var *aridum* a réussi à éliminé 100% d'individus en 04 jours avec la concentration de 10^6 spores /ml et en 05 jours avec 10^4 spores /ml.

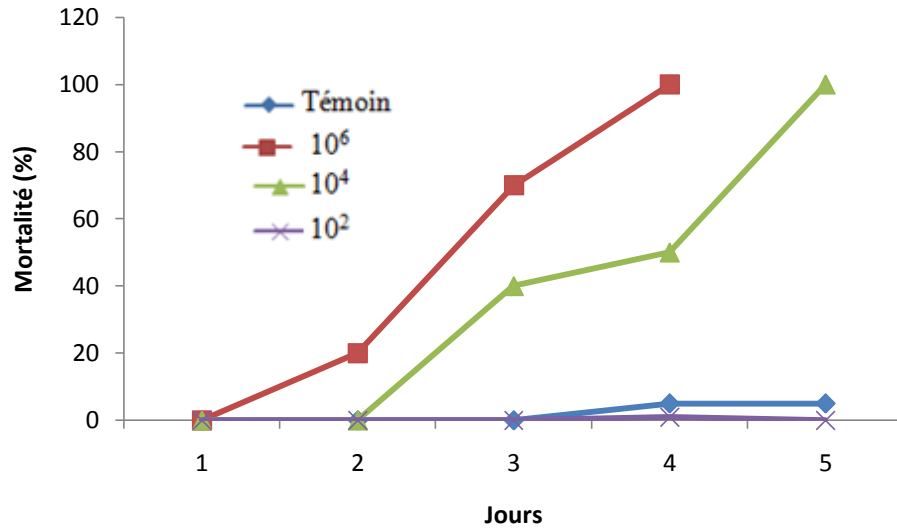


Figure 64: Effet de différentes concentrations de spores de *Metarhizium anisopliae* var *acridum* sur la mortalité des œufs de *P. citrella*

D'après la Figure 65, on remarque que *M. flavoviride* var *minus* a provoqué la mortalité de 90% d'œufs dès le deuxième jour, pour atteindre les 100% le cinquième jour.

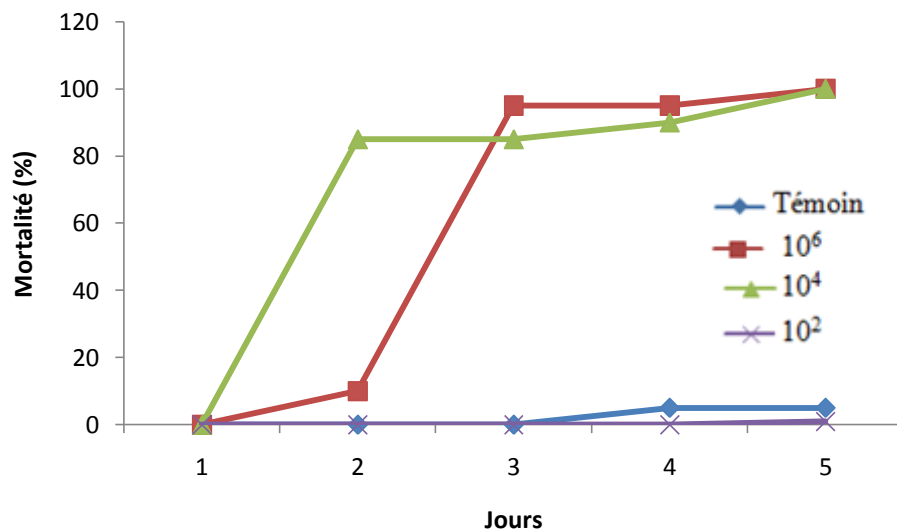


Figure 65: Effet de différentes concentrations de spores de *Metarhizium flavoviride* var *minus* sur la mortalité des œufs de *P. citrella*

Pour ce qui concerne *B. bassiana* (Fig. 66), on remarque que le taux de mortalité les premiers jours est le plus faible, c'est seulement au cinquième jour qu'il a dépassé le seuil de 20%, pour dépasser les 50% et atteindre les 100 % le sixième jour.

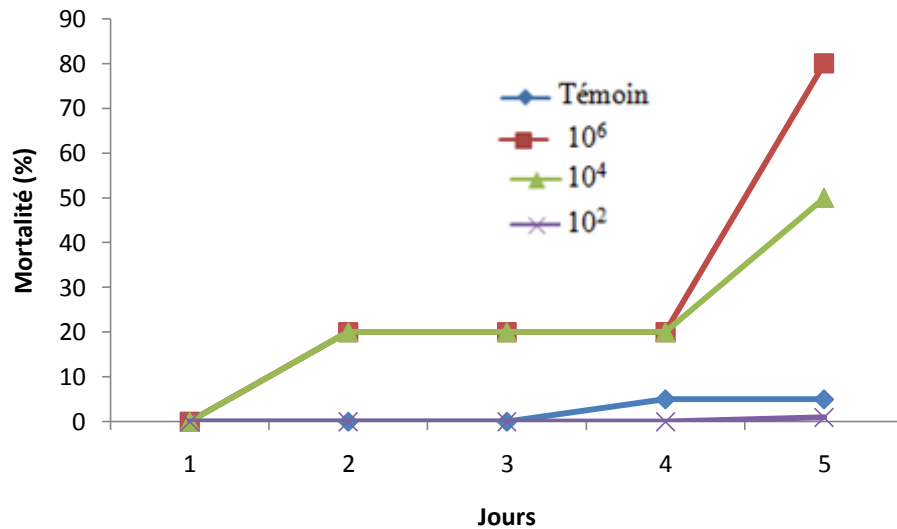


Figure 66 : Effet de différentes concentrations de spores de *Beauveria bassiana* sur la mortalité des œufs de *P. citrella*

Ces résultats montrent clairement que c'est *M. flavoviride* var *minus* qui a été le plus efficace et le plus rapide à éliminer les œufs de *P. citrella*.

Les figures 67, 68 et 69, montrent la corrélation positive qui existe entre la dose du champignon et la mortalité des œufs.

M. anisopliae var *acridum* a présenté un coefficient de corrélation de 0,86. Ce champignon a réussi à maîtriser 50 % d'œufs avec $10^{2.46}$ spores/ml (Fig. 67).

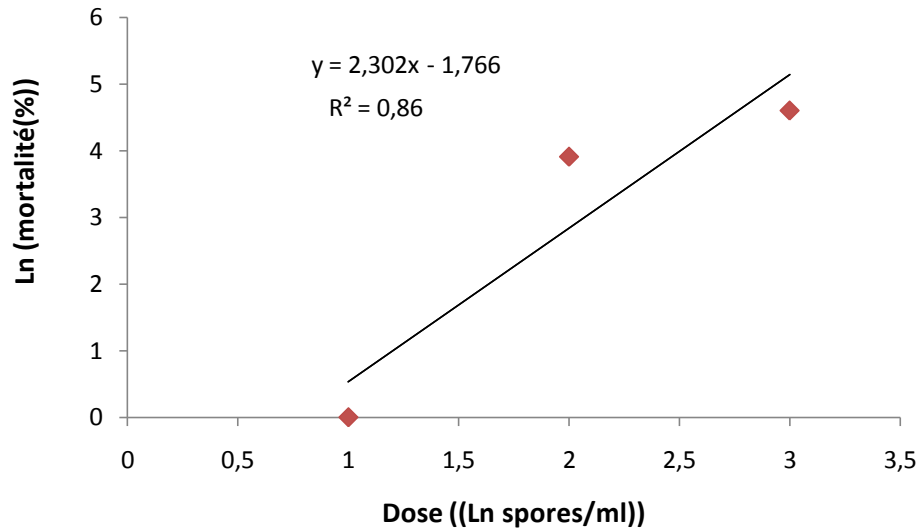


Figure 67: Mortalité corrigée des œufs de *P. citrella* sous l'effet de *Metarhizium anisopliae* var *acridum*

Les Figures 68, 69, sont d'allure similaire et démontrent que *M. flavoviride* var *minus* a présenté 100 % d'efficacité le cinquième jour, alors que *B. bassiana* l'a atteint le sixième jour. Le coefficient de corrélation des deux champignons est 0,75. La DL 50 calculé est respectivement de $10^{2,36}$ spores/m et de $10^{2,52}$.

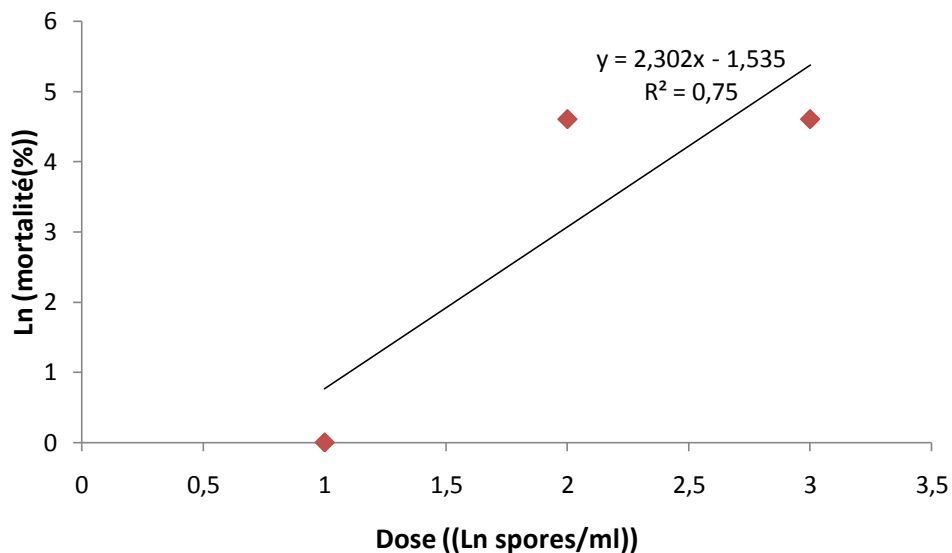


Figure 68: Mortalité corrigée des œufs de *P. citrella* sous l'effet de *Metarhizium flavoviride* var *minus*

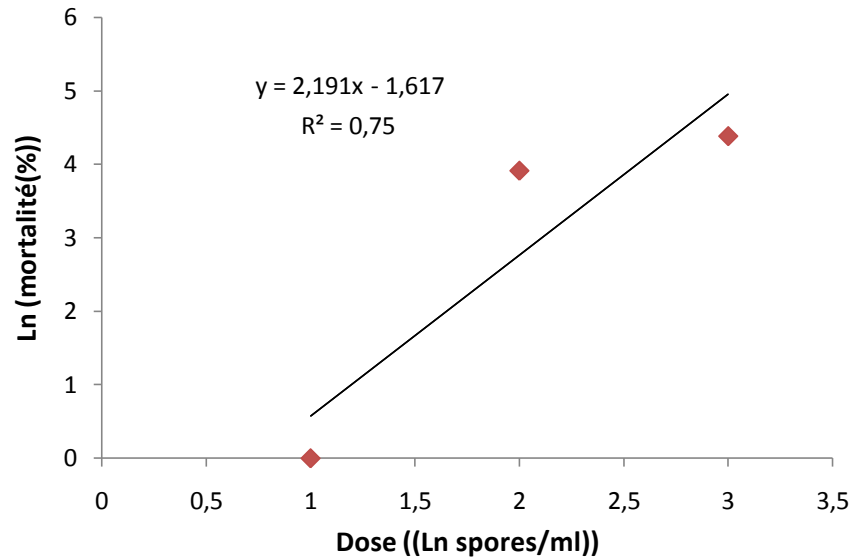


Figure 69 : Mortalité corrigée des œufs de *P. citrella* sous l'effet de *Beauveria bassiana*

En conclusion de ce test nous pouvons affirmer que les trois champignons ont présenté une efficacité notable et digne d'intérêt et que *M. flavoviride* var *minus* se distingue pour avoir provoqué le meilleur effet ovicide.

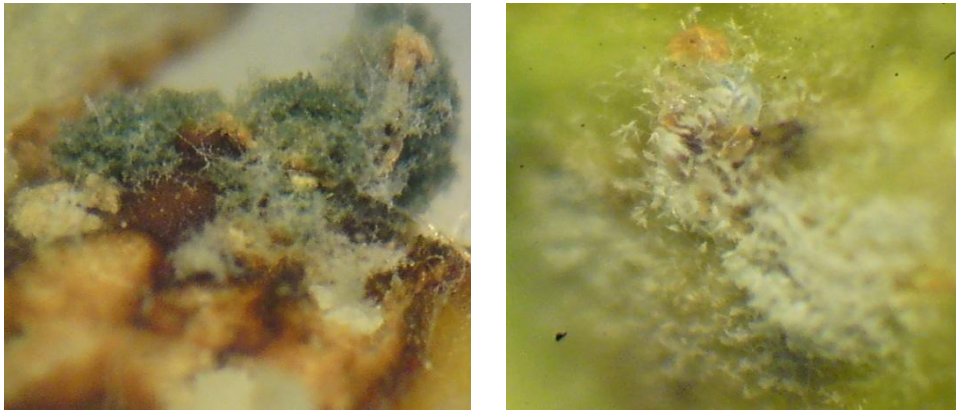


Figure 70: Action de *Metarhizium flavoviride* var *minus* (dose 10^6) sur les larves de *P. citrella* (X10) (Originale, 2011)

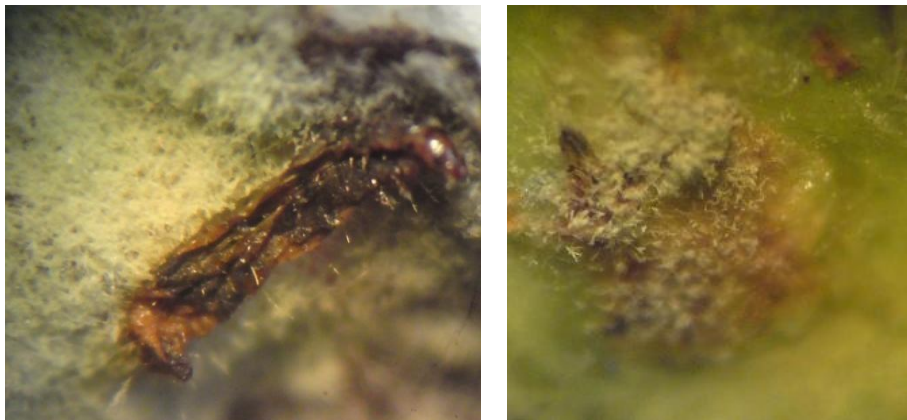


Figure 71: Action de *Metarhizium anisopliae* var *acridum* (dose 10^4) sur les larves de *P. citrella* (X10) (Originale, 2011).



Figure 72 : Action de *Beauveria bassiana* sur les larves de *P. citrella* (X10) (Originale, 2011)

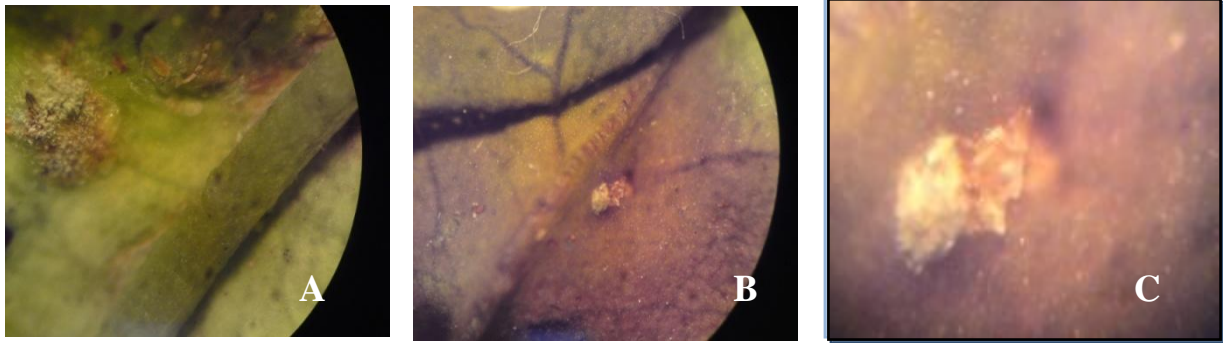


Figure 73: Action des champignons isolés à partir de *Schistocerca gregaria* sur les œufs de *P. citrella* (X10) (Originale, 2011)

A: *Metarhizium flavoviride* var *minus* , **B:** *Metarhizium anisopliae* var *acridum*, **C:** *Beauveria bassiana*

Discussion

Cette étude a concerné uniquement les souches de champignons ayant donné, lors des tests préliminaires de pathogénicité, des résultats positifs et ayant reproduit les symptômes de départ. Ces champignons utilisés sont connus pour leurs pathogénicité à l'égard des lépidoptères.

Les résultats du test de pathogénicité, par trempage des feuilles contaminées par les larves de *P. citrella*, dans une solution conidienne des champignons, attestent que ces derniers sont capables d'infecter les larves de *P. citrella* et causer jusqu'à 100 % de mort.

Nous avons remarqué que *M. flavoviride* a été le plus efficace, puisqu'il a réussi à éliminer 100% de larve dans un temps plus court (05 jours) en comparaison avec les autres champignons.

Lorsqu'on a comparé l'effet des doses sur la mortalité corrigée nous avons remarqué, que *M. flavoviride* var *minus* est le plus efficace contre les larves de *P. citrella*, avec une DL50 de $10^{1,64}$ spores/ml et une DL 100 de 10^6 après cinq jours de traitement.

Par ailleurs, les trois champignons ont montré une activité ovicide, qui reste toujours plus importante sur les œufs traité par *M. flavoviride* var *minus*, avec une DL 50 de $10^{2,36}$.

S'agissant des espèces isolées à partir de nymphes de *P. citrella*, c'est *F. semitectum* qui est le plus efficace, suivi par *M. anisopliae* var *anisopliae* et *A. flavus*.

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

Dans ce présent travail, nous avons prouvé que ces deux genres de champignons ont une fois de plus prouvé leur efficacité sur la mortalité larvaire et ovicide. Et nous pouvant affirmer que ces cinq champignons par leur mode d'action peuvent utilement détourner la stratégie de défense de *P. citrella*, et représente de ce fait des agents potentiels de lutte microbiologique contre cet insecte (Crous, *et al.*, 2007).

Par ailleurs, *Aspergillus flavus* peut être entomopathogène, il tue ses hôtes par les toxines qu'il produit. Cependant, cette espèce est aussi dangereuse pour les organismes autres que les insectes. Elle pourrait même être cancérogène. L'aspergillose affecte les poumons, les yeux, la peau etc. chez l'homme et les animaux domestiques, surtout la volaille. C'est pourquoi il est déconseillé d'utiliser *A. flavus* en lutte biologique (Greathead *et al.*, 1994). Ce

qui nous permet d'ores et déjà d'éliminer cette espèce pour une utilisation future en lutte biologique.

D'après les deux tests de pathogénicité nous avons remarqué que c'est le mode d'action de ces champignons qui influe sur l'efficacité de ces derniers. En effet, La colonisation de l'hôte se fait lorsque le champignon parvient à surmonter les mécanismes immunitaires de défense de l'insecte et envahit l'hémolymphe (Ferron *et al.*, 1993). À la mort de l'insecte, le champignon produit un antibiotique qui va lui permettre de surmonter la compétition des bactéries sur la paroi et dans l'intestin de l'insecte en cas d'ingestion (Bills *et al.*, 2000).

La mortalité des insectes peut être causée par l'une ou toutes les actions suivantes (Ramoska, 1984 ; Riba et Marcandier, 1984 ; Khachatourians, 1986 ; Poinar et Thomas, 1985 ; Cloutier, 1992) :

- L'action des toxines libérées, l'obstruction physique de la circulation ;
- L'invasion des organes et la destruction des tissus de l'insecte ;
- La déficience nutritionnelle.

Mais les champignons peuvent aussi infecter les insectes indépendamment de leur mode de nutrition. Dans ce cas, le développement de l'infection est relié à la dose utilisée (nombre de spores), soit à l'état physiologique de l'hôte, soit aux conditions abiotiques (Ferron, 1978).

Chapitre 6: Étude de l'influence de quelques facteurs abiotiques sur le comportement « in vitro » des isolats fongiques entomopathogènes

6.1-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'insectes nuisibles en santé végétale. Néanmoins, ces champignons bien qu'efficaces ont souvent une activité très dépendante des conditions environnementales notamment atmosphériques (Ferron et *al.*, 1991 ; Lacey et *al.*, 1996 ; Luz et Fargue, 1997). Le facteur climatique peut être extrêmement limitant dans le développement des entomomycoses et présente dans ce cas un véritable obstacle à leur utilisation en lutte microbiologique, en particulier dans le cadre d'un développement agricole durable.

La dépendance de ces pathogènes aux contraintes climatiques est à prendre en considération dans le choix et la sélection d'isolats (myco-insecticides). Notamment, que la plupart des travaux effectués sur l'effet des facteurs abiotiques sur les hyphomycètes entomopathogènes ont souligné la concordance entre l'optimum thermique de l'activité végétative du champignon et celle de l'infection fongique sur l'insecte hôte (Hall et Papierok, 1982 et Ferron, 1985).

Dans ce chapitre nous nous sommes proposés d'entamer l'étude de quelques facteurs abiotiques sur le comportement « in vitro » des isolats d'hyphomycètes entomopathogènes jugés intéressants du point de vue pathogénicité pour pouvoir situer leurs optima de températures, humidités et pH sur leurs croissances mycéliennes et leur sporulations.

6.2-Matériel

6.2.1-Choix des isolats fongiques

Les tests de l'étude des facteurs abiotiques ont été menés sur les isolats ayant présenté les meilleurs résultats de pathogénicité vis-à-vis des larves et œufs de *P. citrella*, il s'agit de *Metarhizium flavoviride* var *minus*, *Metarhizium anisopliae* var *acridum*, *Beauveria bassiana* (isolés à partir de *S. gragaria*) et *Fusarium semitectum* (isolé à partir de *P. citrella*).

6.2.2- Choix du milieu de culture

En dehors de quelques champignons entomopathogènes appartenant à l'ordre des entomophtorales dénommés " parasites obligatoires (Greathead et *al.* 1992), un grand nombre de champignons entomopathogènes en l'occurrence les hyphomycètes peuvent être cultivés " in vitro " sur milieu de culture.

Cependant, le choix du milieu de culture pour tout parasite fongique dépend de ses exigences nutritionnelles. L'essentiel chez les champignons est que le milieu de culture assure une bonne croissance mycélienne et une sporulation abondante. Pour cela nous avons retenu le milieu de culture P.D.A (Annexe 1) pour l'ensemble des tests suivants.

6.3-Méthodes

6.3.1- Estimation de la croissance mycélienne

L'influence des facteurs abiotiques (température, humidité, pH et lumière-obscurité) sur l'activité végétative des différents isolats fongiques a été analysée en mesurant la croissance linéaire « in vitro » d'explants calibrés (Rapilly, 1968 et Fargues *et al.*, 1992).

Après stérilisation et répartition des milieux dans des boîtes de Pétri à raison de 15 ml par boîte, des rondelles de culture non sporulées (3J après ensemencement) ont été prélevées à l'aide d'un emporte-pièce et transférées sur milieu PDA stérile à raison d'un explant (5 mm de diamètre) par boîte de Pétri (85 mm de diamètre).

L'expérience s'achève lorsque l'une des boîtes est complètement recouverte par la colonie mycélienne.

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

$$L = D - d/2$$

Où:

L : croissance mycélienne

D : diamètre de colonie

d : diamètre de l'explant

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

6.3.2- Évaluation quantitative des spores

La sporulation des isolats fongiques retenus a été estimée après que l'une des boîtes de pétri ait été remplie ; Le comptage a été effectué à l'aide de la cellule de Malassez. Les valeurs sont exprimées en nombre de spores par unité de volume (ml) (Rapilly, 1968).

Une fois que l'une des boîtes de pétri du test est complètement pleine, la mesure de la croissance mycélienne est arrêtée et on commence tout de suite l'estimation de la sporulation. Le milieu de culture, chargé de spores est découpé en petits cubes ; ces derniers sont raclés et

mis dans un bécher contenant 100 ml d'eau distillée. La solution obtenue est ensuite mise sous agitation afin d'extraire le maximum de spores, puis filtrée à l'aide d'une mousseline dans un entonnoir menant à un bécher, pour éliminer les débris (fragments mycéliens) qui pourraient interférer avec l'observation (OIE, 2005). Dans le cas où l'une des suspensions de spores est trop concentrée, une dilution au 1/10 est réalisée ; ceci dans le but d'obtenir une concentration supposée raisonnable pour le comptage, par la suite ce résultat est multiplié par le facteur de dilution (inverse de la dilution) (Balédent, 2000).

6.3.3- Conduites des différents tests de l'influence des facteurs abiotiques sur la croissance végétative des isolats entomopathogènes

6.3.3.1- Influence de la température

La gamme de températures étudiées sur le développement de nos isolats est comprise entre 5°C et 40°C, soit 8 étages de températures. Les étapes de l'estimation de la croissance mycélienne et la sporulation s'effectuent de la même manière que celle décrite auparavant.

6.3.3.2- Influence de l'humidité relative

Pour cette étude, il convient de préparer différents niveaux d'humidité selon la méthode décrite par Solomen (1951). Le tableau 6: récapitule les différentes gammes d'humidité étudiées.

Tableau7: Quantité de produit à utiliser (Solomen, 1951)

Produits utilisés	Poids du produit (g)	Quantité d'eau distillée (ml)	Humidité relative %
Hydroxyde de potassium (KOH)	100	100	14
	50	100	50
	32	100	73
Hydroxyde de sodium (NaOH)	30	100	80
	24	100	84
	8	100	95
	0	100	100

Après la préparation du milieu P.D.A, sa répartition dans les boites de Pétri et l'ensemencement des explants de 5 cm de diamètre; les boites sont retournées couvercle en bas, 10 ml de chaque concentration y est versée de façon à avoir 3 boites par concentration, c'est à dire par niveau d'humidité.

Les mesures de la croissance mycélienne et l'estimation de la sporulation sont identiques à celles décrites par (Rapilly, 1968).

6.3.3.3- Influence du pH

Dans le but d'apprécier l'influence du pH sur la croissance mycélienne et la sporulation de nos isolats fongiques, on a essayé une gamme de pH allant de 4,1 à 8,1. Pour cela on a préparé le milieu P.D.A qu'on a réparti dans des erlenmeyers de 100 ml où on a ajouté des quantités de HCl (4N) et NaOH (4N), selon le tableau 8.

Tableau 8: Quantité (ml) d' HCl et de NaOH nécessaire pour obtenir la gamme de pH allant de 4,1 à 8,1.

Valeur du pH	HCl (4N)	NaOH (4N)
4.1	2	0
4.6	1	0
5.1	0	0
5.9	0	1
6.8	0	3
7.1	0	4
8.1	0	5

Pour obtenir les valeurs de pH correspondant : chaque pH obtenu est contrôlé à l'aide d'un pH mètre pour une éventuelle correction. Après autoclavage des milieux tamponnés, on a suivi les étapes d'évaluation de la croissance mycélienne et la sporulation sus-citées.

6.3.3.4- Influence de la lumière et de l'obscurité

L'étude de l'effet de la lumière et de l'obscurité sur la croissance mycélienne, consiste à préparer le milieu P.D.A et procéder de la même manière que pour les autres tests afin de disposer de 6 boîtes de Pétri par souche ensemencée; 3 d'entre elles sont placées à la lumière continue, les autres sont couvertes par du papier aluminium puis mises à incuber; les mesures de croissance mycélienne ont été effectuées chaque 24 heures et le test s'achève lorsque l'une de ces boîtes sera totalement recouverte.

6.4-Résultats et interprétations

6.4.1- Influence de la température

6.4.1- Influence de la température sur la croissance mycélienne

Les résultats du test sont représentés sur les figures 74, 75, 76, 77. L'analyse de variance ($p < 0.01$) de l'ensemble des résultats a montré que la croissance mycélienne diffère significativement d'un isolat entomopathogène à l'autre, d'une température à l'autre ainsi que pour leur interaction.

Nous avons remarqué sur la figure 74, que la meilleure croissance mycélienne a été enregistrée pour l'isolat de *Metarhizium flavoviride* var *minus* aux températures de 30°C et 35°C, où ce dernier a réussi à remplir les boîtes de Pétri le troisième jour du test. A 5°C la croissance était nulle. Alors qu'à 40 °C nous avons relevé une légère croissance mycélienne qui s'est arrêté le 4ème jour avec 20 mm. En revanche, les autres températures ont favorisé une croissance mycélienne intermédiaire.

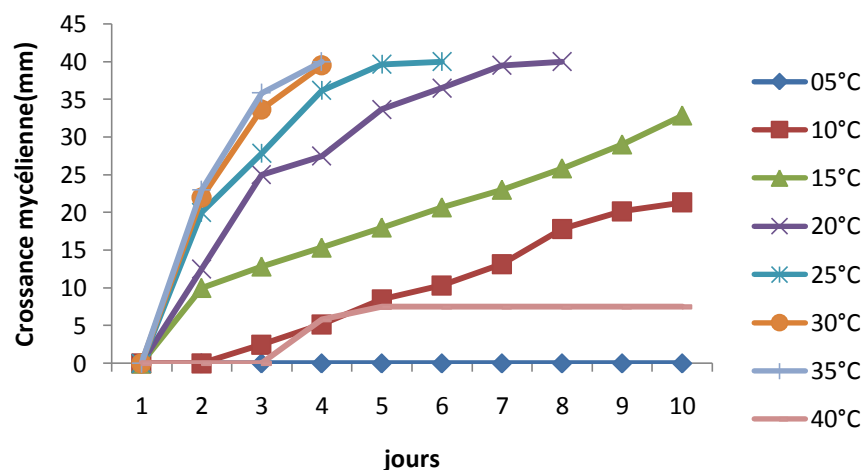


Figure 74 : Influence des différentes températures sur la croissance mycélienne de *Metarhizium flavoviride* var *minus*

La figure 75 représente la croissance mycélienne de l'isolat *Metarhizium anisopliae* var *acridum*, où on remarque qu'à 5°C la croissance était nulle, puis elle s'est améliorée au fur et à mesure que la température augmentait pour atteindre son optimum à 30°C, ensuite, elle a diminué très légèrement à 35°C, pour chuter à 40°C.

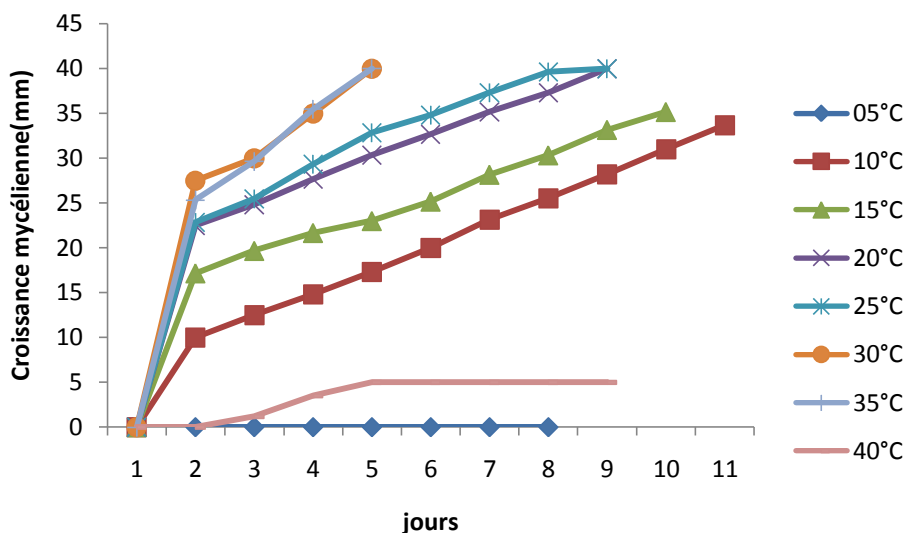


Figure 75 : Influence des différentes températures sur la croissance mycélienne de *Metarhizium anisopliae* var *aridum*

Pour *Beauveria bassiana*, la croissance mycélienne se fait entre la gamme de température de 10°C et 25°C, avec un optimum de croissance situé aux alentours de 20°C. Alors que les températures extrêmes, soit 5°C et 40°C ont présenté des croissances nulles (Fig. 76).

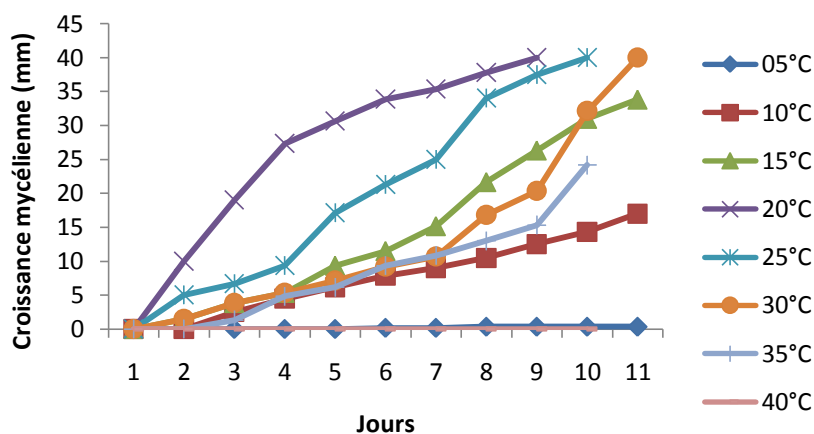


Figure76 : Influence des différentes températures sur la croissance mycélienne de *Beauveria bassiana*

L'étude de l'effet des 8 étages de températures sur *Fusarium semitectum* a révélé que l'optimum de la croissance mycélienne se situe aux alentours de 25°C, ou il a fallu 5 jours seulement pour remplir la totalité des boîtes de Pétri ; les températures de 30 et 20°C ont également présenté un maximum de croissance en une période de 7 jours. Alors que 35 et 15°C ont inhibé la croissance d'une manière non négligeable. Une inhibition totale de la croissance a été remarquée aux températures de 5 et 40°C.

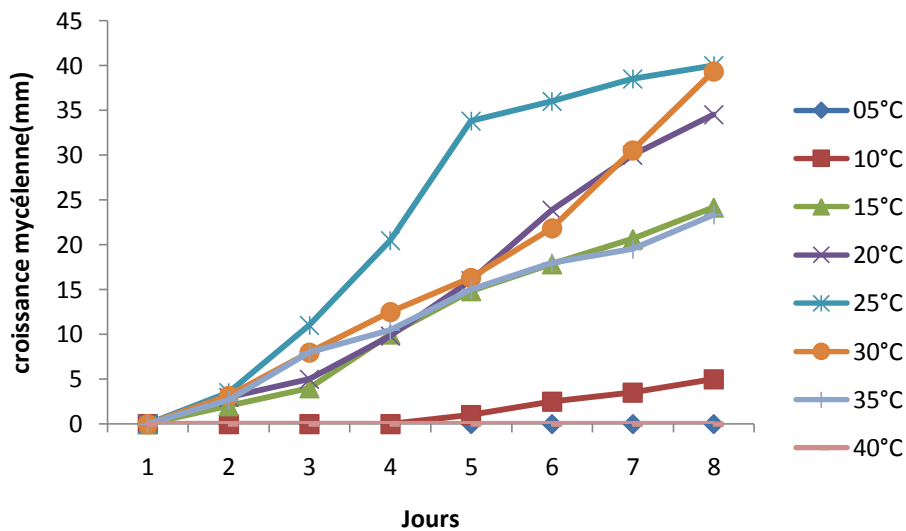


Figure 77: Influence des différentes températures sur la croissance mycélienne de *Fusarium semitectum*

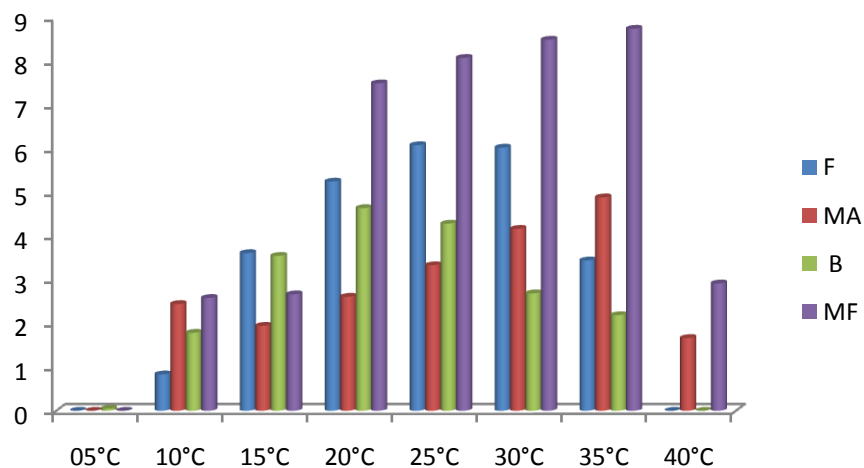


Figure 78: La vitesse de croissance des quatre souches fongiques entomopathogènes en fonction de la température

La figure ci-dessus, représente la vitesse de croissance des souches de champignons soumis à différentes températures, il en ressort que l'isolat *Metarhizium flavoviride* var *minus* représente la meilleure vitesse de croissance, avec un optimum de 8,75 mm/j à 35°C. Suivi par l'isolat de *Fusarium semitectum* avec 6,08 mm/jours enregistrée à 25°C ensuite on retrouve *Metarhizium anisopliae* var *acridum* avec une vitesse de croissance de 4,89 mm/j à 35°C et enfin *Beauveria bassiana* avec 4,64 mm/j à 20°C.

6.4.1.2- Influence de la température sur la sporulation.

Les figures 79, 80, 81 et 82 illustrent l'influence de la température sur la sporulation des isolats fongiques. D'après les résultats obtenus on remarque que l'effet des températures sur la sporulation est significatif et qu'il est étroitement proportionnelle à la croissance mycélienne.

La figure 79 montre que la sporulation de *Metarhizium flavoviride* var *minus* augmente progressivement avec la température jusqu'à atteindre son optimum aux alentours de 35°C, pour chuter par la suite à 40°C.

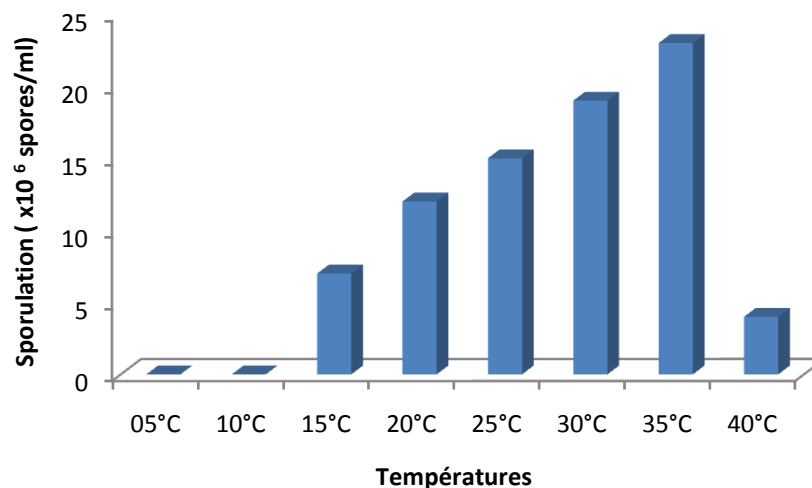


Figure 79 : Effet des températures sur la sporulation de *Metarhizium flavoviride* var *minus*

Tout comme la croissance mycélienne, l'optimum de sporulation de *Metarhizium anisopliae* var *acridum* (Fig.80) est atteint à la température de 30°C soit 20.10⁶, suivi par la température de 35°C avec 15.10⁶ spores/ml, ensuite on retrouve les températures

intermédiaires de 25 et 20°C avec 6 et 8.10⁶ spores /ml. Alors qu'à 10 et 40°C la sporulation est insignifiante, pour s'annuler complètement à 5°C (Fig.80).

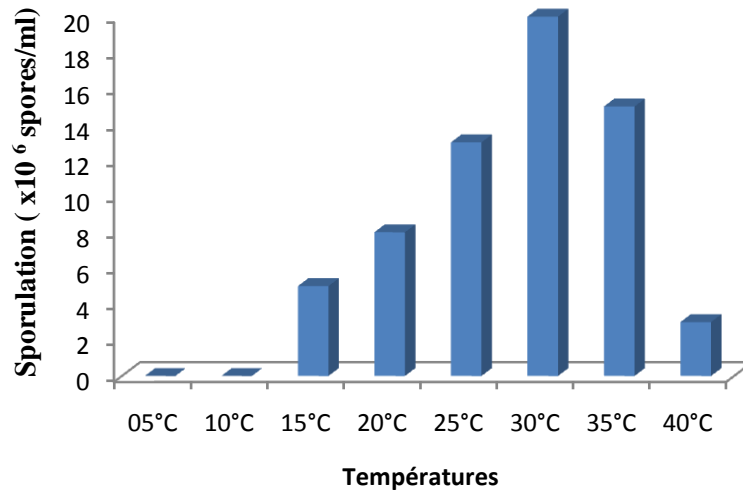


Figure 80: Effet des températures sur la sporulation de *Metarhizium anisopliae* var *acridum*

La sporulation de *Beauveria bassiana*, est représentée sur la figure 81, et démontre que cet isolat a présenté la sporulation la plus faible comparativement aux autres champignons avec un maximum de spores soit 5.10⁶ spores /ml, à la température de 20°C, et s'annule complètement à 5 et 40°C.

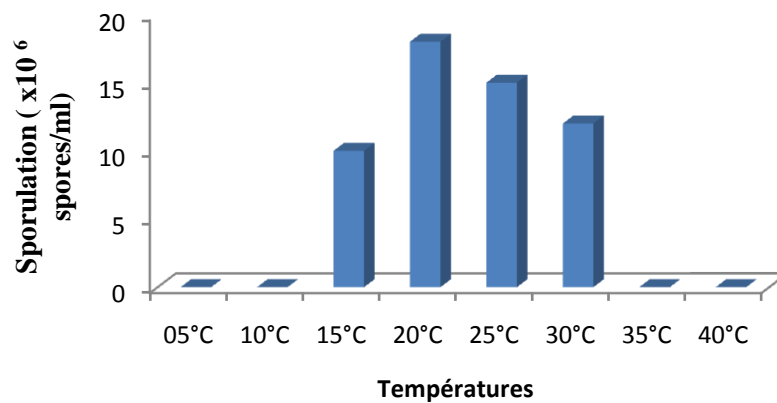


Figure 81 : Effet des températures sur la sporulation de *Beauveria bassiana*

Enfin, *Fusarium semitectum* (Fig.82), est le deuxième champignon à avoir sporulé abondamment après *M. flavoviride* var *minus* avec 18.10^6 spores /ml. Ce nombre a été atteint à la température de 25°C, plus on s'éloigne de cette température, plus la sporulation diminue, cette dernière s'annule à 5°C.

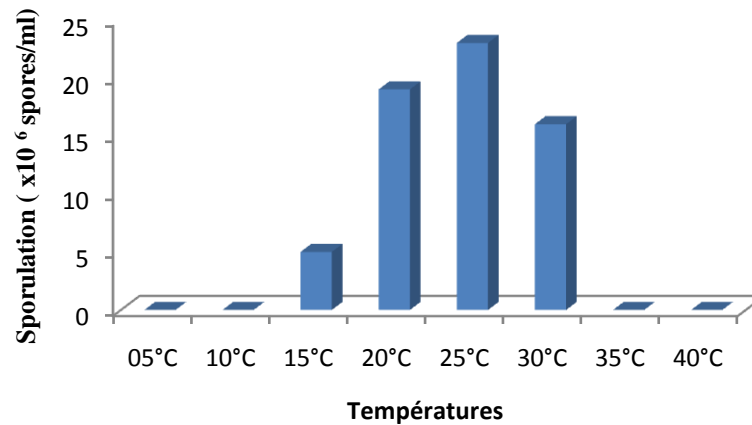


Figure 82 : Effet des températures sur la sporulation de *Fusarium semitectum*

6.4.2- Influence de l'humidité relative

6.4.2.1- Influence de l'humidité relative sur la croissance mycélienne

Les figures 82, 84, 85 et 86 représentent l'effet de l'humidité relative sur la croissance mycélienne des isolats fongiques retenus.

La figure 82 montre que l'optimum de croissance de *Metarhizium flavoviride* var *minus* est aux alentours de 73% d'humidité relative, elle diminue mais d'une manière non significative lorsque l'atmosphère approche de la saturation. On remarque également que la croissance est nulle lorsqu'elle est inférieure à 50%.

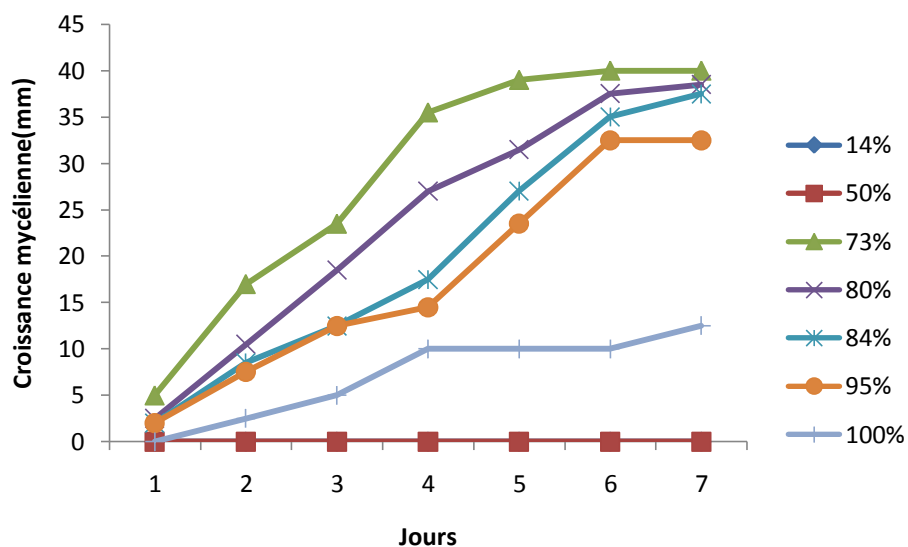


Figure 83 : Effet des niveaux d'humidités sur la croissance mycélienne de *Metarhizium flavoviride var minus*

La figure 84, qui illustre la croissance mycélienne de *Metarhizium anisopliae var acridum* sous différents niveaux d'humidités, montre que cette dernière augmente au fur et à mesure que ce facteur augmente. Mais la différence reste non significative. Tout comme les isolats précédents on ne remarque aucune croissance mycélienne aux deux plus faibles niveaux d'humidité.

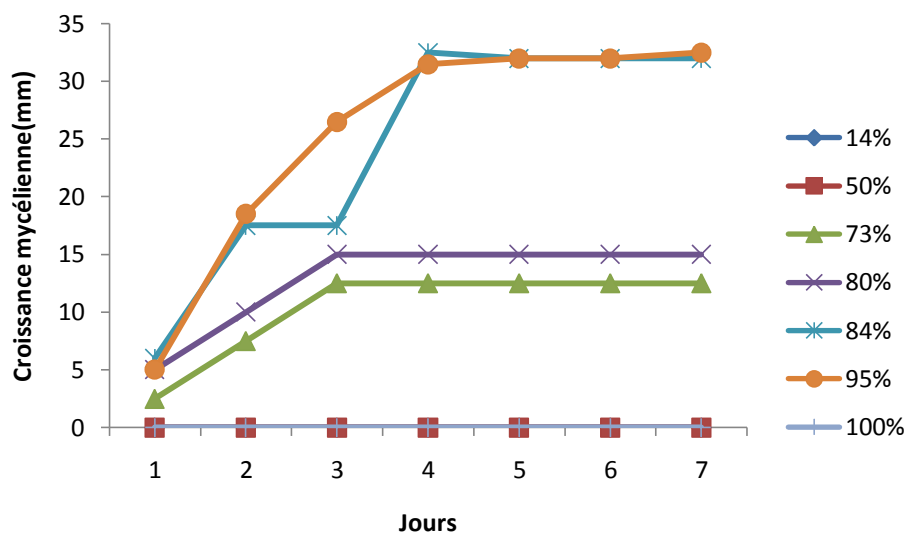
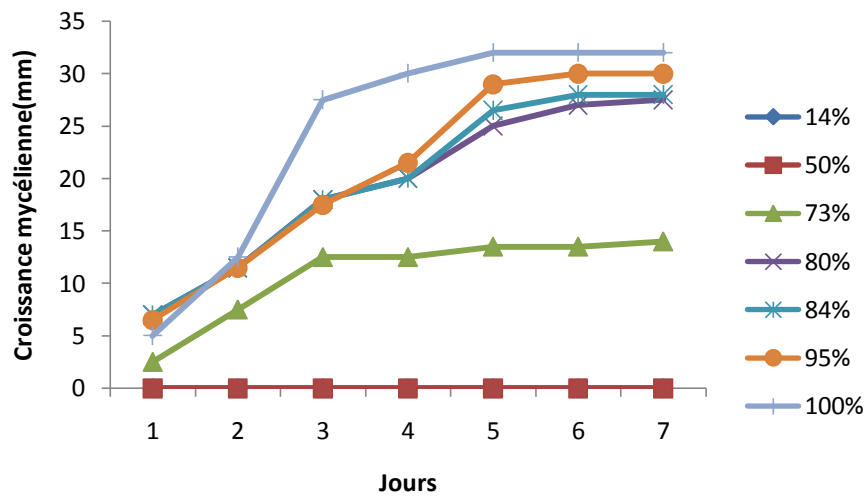


Figure 84 : Effet des niveaux d'humidités sur la croissance mycélienne de *Metarhizium anisopliae var acridum*

L'isolat de *Beauveria bassiana* préfère les fortes humidités, puisqu'on remarque sur la figure 85, que l'accroissement de la croissance mycélienne, se fait proportionnellement à l'élévation du taux d'humidité, cette dernière s'améliore en franchissant la barrière des 80%, pour atteindre son optimum à 100% d'humidité relative.



+

Figure 85 : Effet des niveaux d'humidités sur la croissance mycélienne de *Beauveria bassiana*

Contrairement aux autres isolats, celui de *Fusarium semitectum* (Fig.86), soumis à différents niveaux d'humidité montre une différence significative de ce facteur sur la croissance mycélienne, en effet, on remarque que ce dernier se développe uniquement dans une atmosphère chargée d'humidité c'est-à-dire supérieure à 95%, pour les autres niveaux son développement est presque nulle.

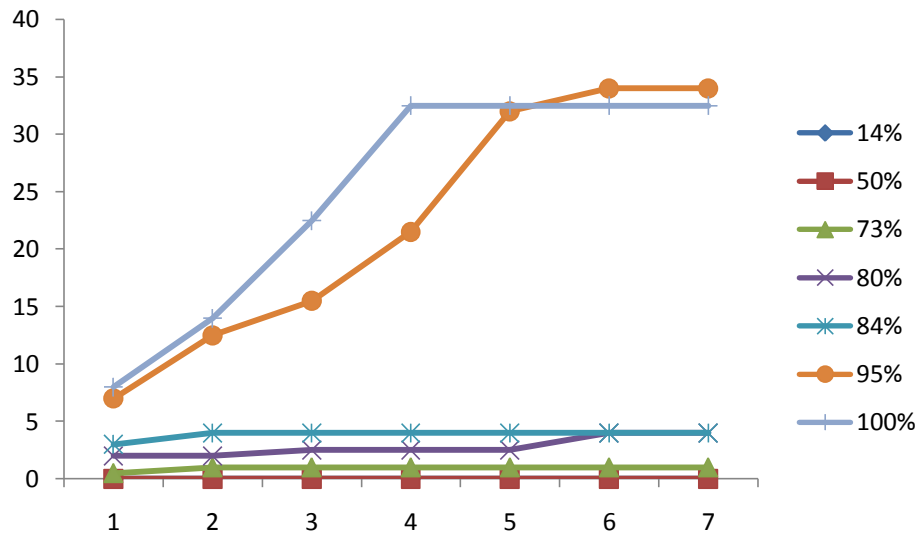


Figure 86 : Effet des niveaux d'humidités sur la croissance mycélienne de *Fusarium semitectum*

6.4.2.2-Influence de l'humidité relative sur la sporulation

D'après la figure 87, on constate que *Metarhizium flavoviride* var *minus* présente une meilleure sporulation à 73% HR, sa capacité à la sporulation diminue avec l'augmentation des niveaux d'humidité. Tout comme la croissance mycélienne, dans une atmosphère avec une humidité relative de 14 et 50%, ce champignon est incapable de sporuler.

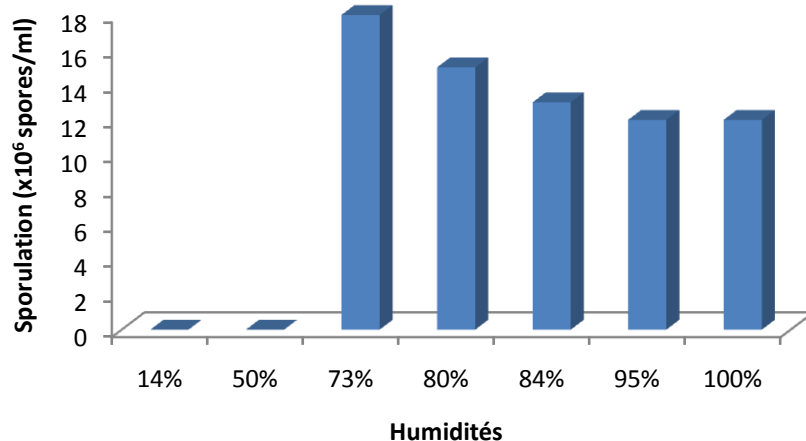


Figure 87 : Effet des niveaux d'humidités sur la sporulation de *Metarhizium flavoviride* var *minus*

De même, la deuxième espèce du genre *Metarhizium*, ne sporule pas si l'humidité relative est inférieure à 50%, au-delà de 80%, la sporulation augmente au fur et à mesure pour atteindre son optimum à 95% et elle diminue légèrement à 100% (Fig.88).

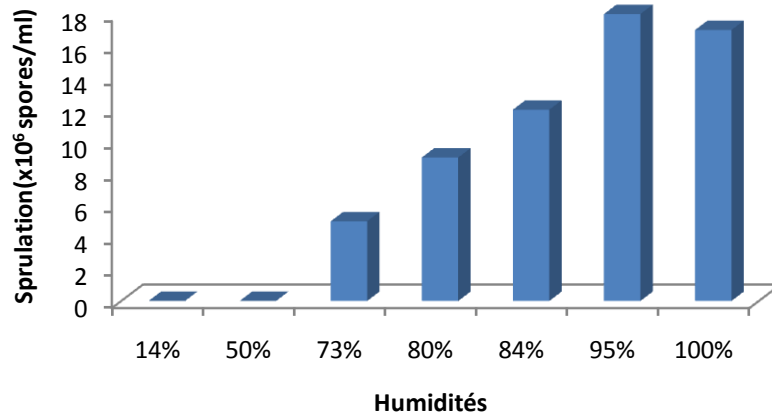


Figure 88: Effet des niveaux d'humidités sur la sporulation de *Metarhizium anisopliae* var *acridum*

Pour *Beauveria bassiana* (Fig.89), plus l'humidité augmente, plus la sporulation s'améliore pour obtenir l'optimum aux alentours de 100% d'HR.

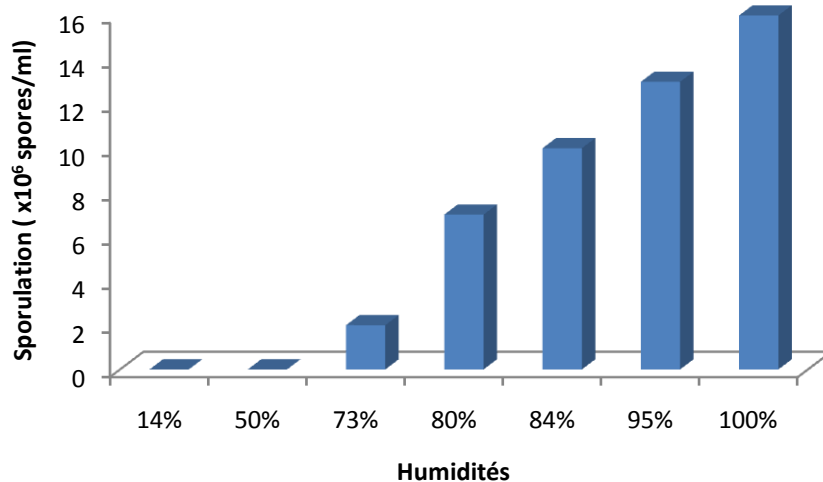


Figure 89 : Effet des niveaux d'humidités sur la sporulation de *Beauveria bassiana*

Le quatrième champignon, en l'occurrence *Fusarium semitectum* représenté sur la figure 90, ne sporule qu'aux forts taux d'humidité ; entre 100 % et 73 % ; avec un maximum de sporulation enregistré au niveau des colonies soumises à 73 % d'HR.

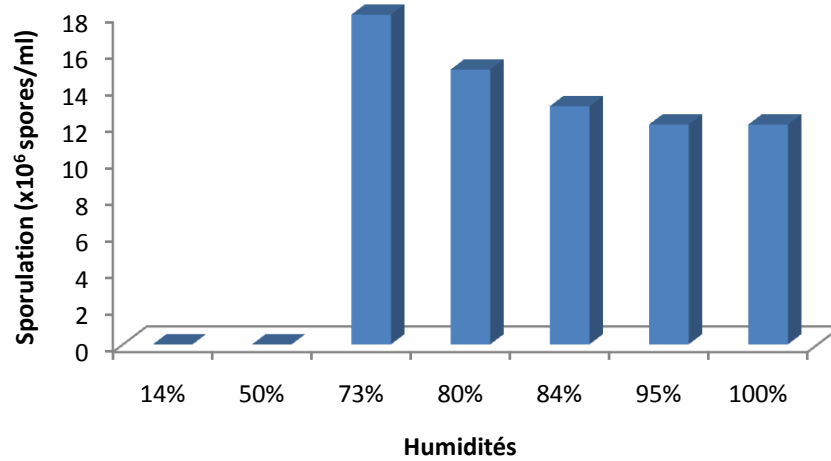


Figure 90 : Effet des niveaux d'humidités sur la sporulation de *Fusarium semitectum*

6.4.3- Influence du pH

6.4.3.1- Influence du pH sur la croissance mycélienne

L'analyse de variance de l'influence du pH démontre un effet non significatif de ce facteur sur la croissance mycélienne des quatre cryptogames testés.

En effet, selon la figure 91 (A), la croissance mycélienne sous les différents pH est très proche ; et on remarque également que *Metarhizium flavoviride* var *minus* se développe bien sur les différents pH testés.

Alors que *Metarhizium anisopliae* (Fig. 91, B) s'est développé d'une manière similaire sur toute la gamme de pH testés.

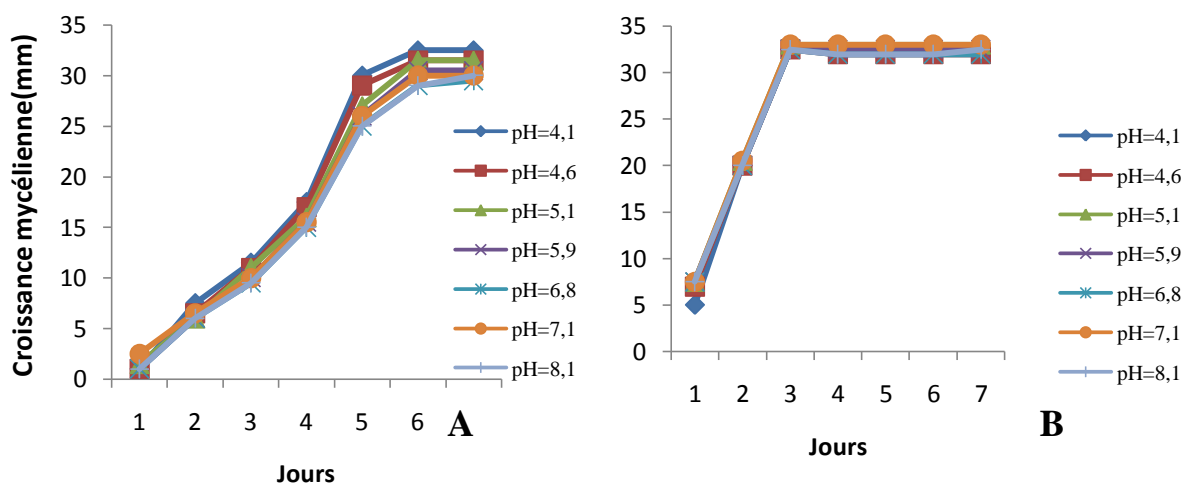


Figure 91: Effet des niveaux d'humidités sur la croissance mycélienne de *Metarhizium flavoviride* var *minus* (A) et *Metarhizium anisopliae* var *acridum* (B).

De même, les deux autres champignons se sont développés d'une manière identique sur les différents pH utilisés. Ce qui démontre clairement que le pH n'a aucun effet décelable sur la croissance mycélienne des quatre champignons entomopathogènes retenus.

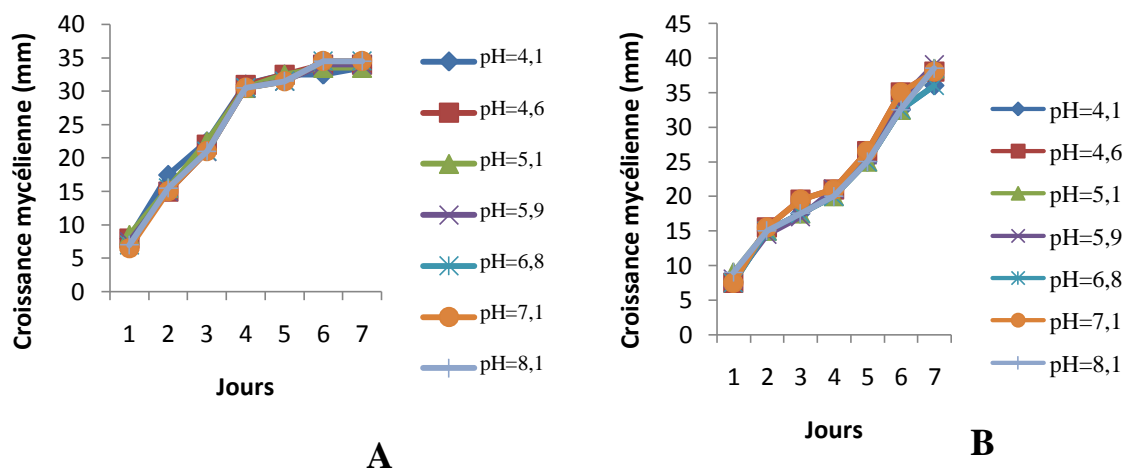


Figure 92 : Effet des niveaux d'humidités sur la croissance mycélienne de *Beauveria bassiana* (A) et *Fusarium semitectum* (B)

6.4.3.2- Influence du pH sur la sporulation

A l'instar de la croissance mycélienne, l'effet du pH sur la sporulation est non significatif, puisque nous avons remarqué que les isolats fongiques n'ont pas été sensibles à la variation du niveau de pH quant à la question de favoriser ou d'inhiber la sporulation. En effet, tous ces champignons se sont montrés capable de se développer et de sporuler de la même manière à tous les niveaux du pH.

D'après la figure 93, on remarque que pour *Metarhizium flavoviride* var *minus*, on remarque une légère augmentation de la sporulation au niveau du pH 7,1, alors que pour *M. anisopliae* var *acridum* c'est au niveau du pH 5,1.

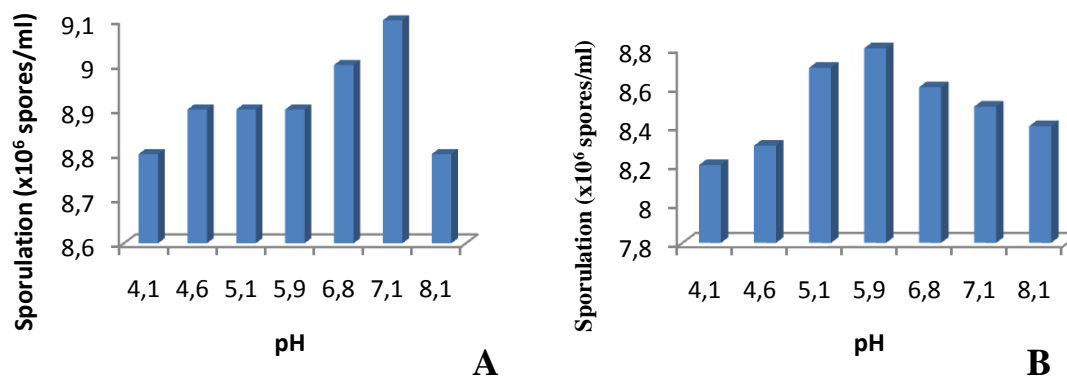


Figure 93 : Effet du pH sur la sporulation de *Metarhizium flavoviride* var *minus* (A) et *Metarhizium anisopliae* var *acridum* (B)

De même *Beauveria bassiana* et *Fusarium semitectum* (Fig.94), ont sporulé presque de la même manière en réponse au différent niveau de pH.

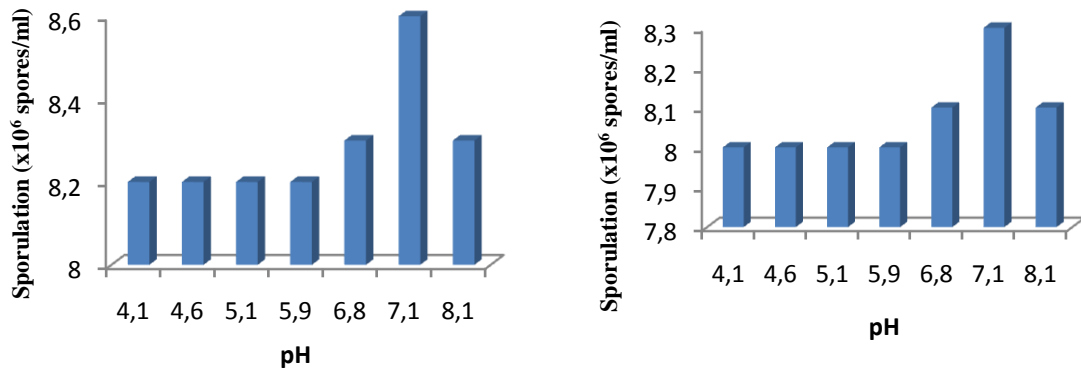


Figure 94 : Effet des pH sur la sporulation de *Beauveria bassiana* (A) et *Fusarium semitectum* (B)

6.4.4.1-Influence de la lumière et de l'obscurité sur la croissance mycélienne et la sporulation

D'après les résultats obtenus suite à l'étude de la lumière et de l'obscurité sur les isolats du genre *Metarhizium*, nous remarquons que les allures des courbes de croissance sont similaires. Ce qui veut dire que ces isolats se développent aussi bien en lumière qu'en obscurité. Avec une légère préférence de l'isolat *M. flavoviride* var *minus* à la lumière (Fig. 95).

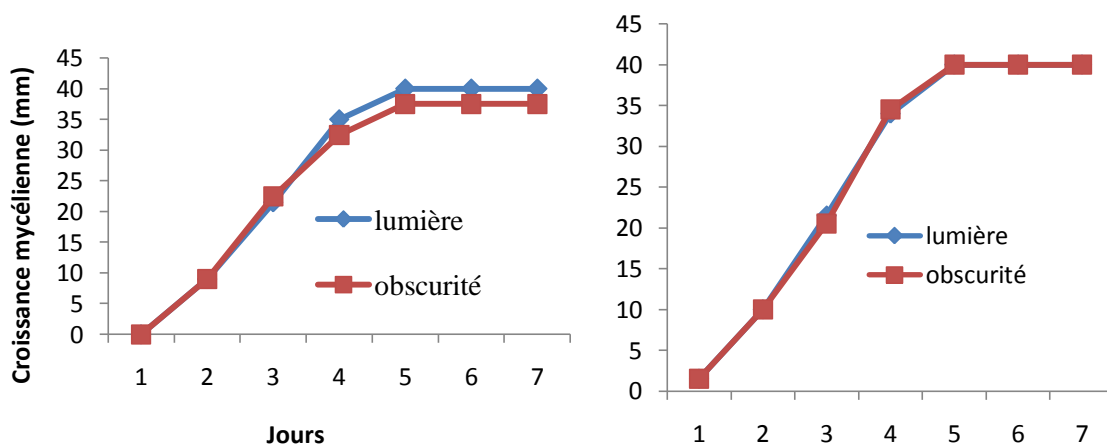


Figure 95 : Effet de la lumière et de l'obscurité sur la croissance mycélienne de *Metarhizium flavoviride* var *minus* (A) et *Metarhizium anisopliae* var *acridum* (B)

En revanche la préférence des isolats de *Beauveria bassiana* et *Fusarium semitectum* pour la lumière est beaucoup plus marqué spécialement après le 4^{ème} jour de développement (Fig.96)

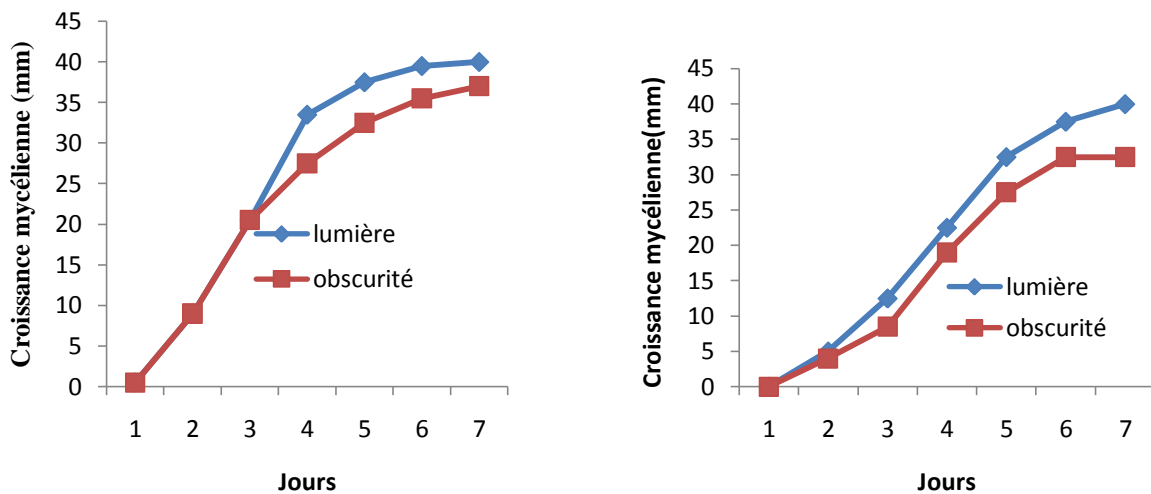


Figure 96 : Effet de la lumière et de obscurité sur la croissance mycélienne de *Beauveria bassiana* (A) et *Fusarium semitectum* (B)

Les résultats de l'effet de la lumière est significativement différents de celui de l'obscurité sur la sporulation des deux souches de *Metarhizium*, ce qui a été clairement établi sur la figure 97.

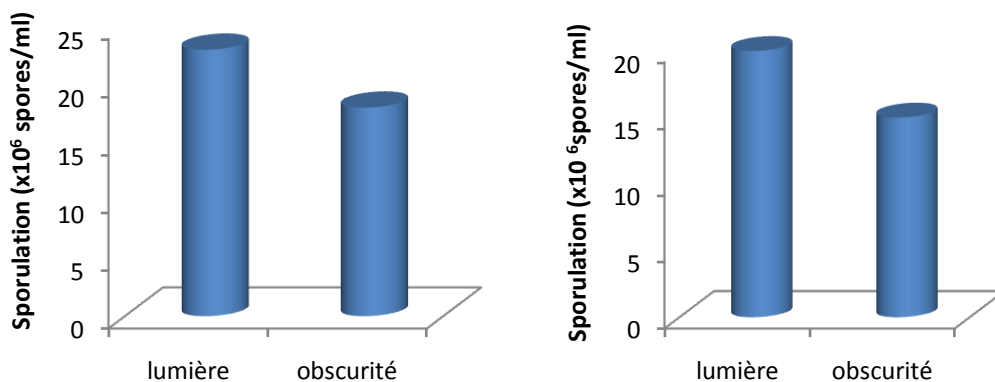


Figure 97 : Effet de la lumière et de obscurité sur la sporulation de *Metarhizium flavoviride var minus* (A) et *Metarhizium anisopliae var acridum* (B)

Aussi, sur la Figure 98, on remarque que les isolats *Beauveria bassiana* et *Fusarium semitectum* ont sporulé plus abondamment en lumière qu'en obscurité.

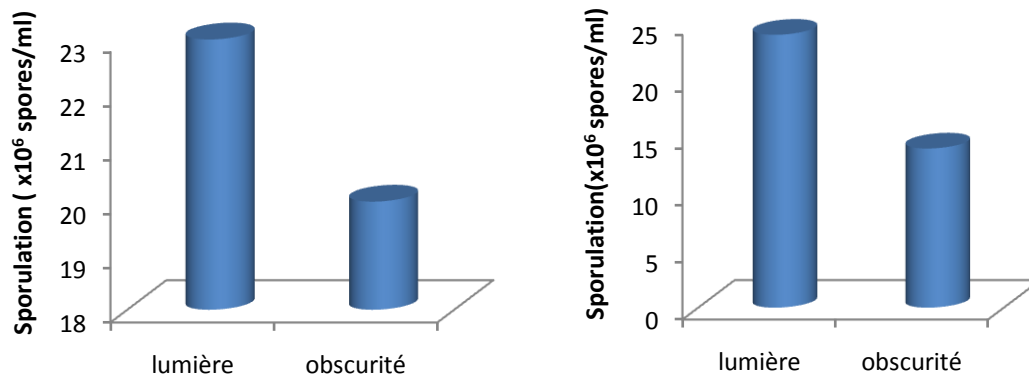


Figure 98 : Effet de la lumière et de l'obscurité sur la sporulation de *Beauveria bassiana* (A) et *Fusarium semitectum* (B)

6.5-Discussion

De premier abord il nous est d'ores et déjà possible d'affirmer que les quatre champignons testés rentrent dans la catégorie des champignons mésophile puisque l'optimum de leur croissance mycélienne est situé au-dessous de 50 °C (Fargues *et al.*, 1992)

D'autre part, d'après les résultats obtenus sous l'effet de la température, nous avons remarqué que la température optimale de la croissance et de sporulation de tous nos isolats fongiques se situe dans un intervalle de température entre 20 et 35°C. Il faut noter que leur croissance et sporulation ont été moyennes à partir de 15°C.

Metarhizium flavoviride var *minus* et *Metarhizium anisopliae* var *acridum* ont présenté un bon développement mycélien et une sporulation abondante dans un intervalle de température compris entre 10 et 35°C. Les résultats obtenus ont prouvé également que ces champignons ont la capacité de se développer à des températures voisine de 40°C. C'est la particularité la plus intéressante pour faire face à la mineuse des feuilles des agrumes dont la vitesse de la pullulation est proportionnelle à la température.

Paradoxalement, *Beauveria bassiana* s'est développé à un optimum de croissance avoisinant les 20°C, et se développe difficilement au-delà 30°C (Luz et fargues, 1997).

Quant au *Fusarium semitectum*, sa température optimale de croissance et de sporulation se situe entre 25 et 30°C, avec une inhibition totale aux températures de 5 et 40°C.

D'après Molot *et al.* (1990), les basses températures (<5°C) ne sont pas létales pour le champignon, car ce dernier, se conserve en formant des chlamydozoospores, et repart rapidement dès que les conditions lui redeviennent favorables, alors qu'un séjour de 3 jours à une température supérieur à 35°C lui est fatale. Cela ne semble pas vraie pour les isolats de *Metarhizium*, qui comme nous l'avons remarqué, se développent au-delà de cette température soit à 40°C. Ce qui s'accorde avec les confirmations de Selan (1964) in Fargues (1992) qui a remarqué que l'effet de la température sur les champignons est variable, il semble qu'il y ait une certaine adaptation thermique suivant l'origine des biotypes. Il faut préciser que les deux *Metarhizium* proviennent de l'isolement à partir des adultes de *Schistocerca gregaria* originaire de la région d'Adrar situé dans le désert algérien connue pour ses fortes températures presque durant toute l'année.

D'autre part, cette aptitude des champignons à résister aux températures élevées, est un autre point positif, car il ne faut pas oublier que ces champignons ont été sélectionnés pour être utilisés comme agents de lutte biologique potentielle contre la mineuse des pousses des agrumes et qui sévit pendant la période estivale quand les températures sont très élevées.

A la lumière des résultats obtenus sous l'effet de l'humidité relative, nous avons remarqué que tous ces champignons se développent mieux à une humidité relative comprise entre 73 et 100%, avec un optimum de croissance à 73% pour *Metarhizium flavoviride* var *minus*, qui semble insensible à un environnement légèrement sec. Ce dernier semble intéressant également pour une utilisation comme mycopesticide par temps chauds, ou en période estivale. Avec une humidité de 14 et 50 %, ces champignons n'ont présenté aucun développement mycélien.

Nous avons remarqué que l'effet des températures sur la croissance mycélienne est significatif, cependant celui de l'humidité ne l'est pas, ce qui permet de dire que l'hygrométrie n'est pas un facteur limitant pour le développement de ces souches fongiques. Ce résultat n'est pas seulement prouvé «in vitro » par ce présent travail, mais également « in vivo » comme la démontré avec ses travaux Fargues (1972), qui démontra que le rôle de la température sur l'infection apparaît beaucoup plus important que celui de l'humidité.

De même, nous avons remarqué que les isolats fongiques n'ont pas été sensibles aux différents niveaux de pH. Tous ces champignons se sont montrés capables de se développer et de sporuler aux différents niveaux de pH.

Les résultats du test de lumière et de l'obscurité ont démontré que la lumière favorise légèrement la croissance mycélienne et la sporulation, par rapport à l'obscurité. D'après McCoy et *al.* (1990) ; Ignoffo (1992) ; Silvy et Riba (1989) et Monteny (1990) la lumière peut avoir un rôle non négligeable sur la croissance mycélienne et la sporulation des champignons.

Conclusion

La mineuse des feuilles des agrumes *Phyllocnistis citrella* STANTON continu à être considéré par les agrumiculteurs comme le ravageur le plus important des vergers agrumicoles.

Plusieurs travaux ont été consacrés à ce redoutable insecte depuis son introduction accidentelle pour déterminer avec exactitude les moyens les plus adéquats pour une lutte efficace (BERKANI, 1995 ; 1996 ; 1998 ; 1999 ; Doumandji *et al.*, 1999 ; Sahraoui *et al.*, 2001., Boualem (2002) et Boualem *et al.* (2007 ; 2008).

Ce travail s'est voulu une initiation dans la recherche de bactéries et champignons capables de freiner le développement des populations de *Phyllocnistis citrella*. Il a pour but d'isoler des bactéries et des champignons à partir des nymphes de *Phyllocnistis citrella* ; et de déterminer ensuite la capacité de ces derniers à provoqué des mortalités sur les larves de cet insecte.

L'isolement effectué à partir des nymphes de *Phyllocnistis citrella* n'ayant pas achevés leur cycle biologique a mis en évidence l'existence de cinq souches bactériennes différentes. Leur identification par le système API indique que le genre *Bacillus* est le plus fréquemment rencontré, il s'agit de *Aneurinbacillus aneurinlyticus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus mycoides*, *Brevibacillus agri* (*Bacillus agri*) et *Bacillus lentus*.

Les résultats de l'isolement des champignons à partir des nymphes de *P citrella* enroulées par du mycélium a permis de mettre en évidence l'abondance des espèces présentes. En effet, les genres les plus abondants sont *Fusarium semitectum*, *Stemphyllium* sp, *Alternaria* sp et *Bipolaris* sp ensuite arrive *Cladosporium* sp avec respectivement 23,31%, 16,36%, 14,54%, 12,72% et 10,90 % d'abondance. Les espèces *Aspergillus niger* et *Pénicillium crustosum* sont moins abondantes avec 7,27%. Alors que *Coelomycedium* sp était présent avec un pourcentage de 5,45%. *Metarhizium* sp et *Phoma* sp sont les moins abondants avec 3,63% et 1,81%.

Les résultats du test de pathogénéicité de ces espèces fongiques sur les larves de *Phyllocnistis citrella*, ont mis en exergue l'efficacité de *Fusarium semitectum* qui a causé la plus forte mortalité, suivie par *Metarhizium anisopliae* var *anisopliae*, alors qu'*Aspergillus flavus* est celui qui a provoqué la plus faible mortalité. Ces résultats sont confirmés par le calcul de la DL50, qui a montré que *Fusarium semitectum* a enregistré la DL50 la moins importante, c'est-à-dire $10^{2,13}$ spores/ml, suivi par *M. anisopliae* var *anisopliae* avec une DL50 de $10^{5,3}$ spores/ml, pour qu'arrive *Aspergillus flavus* avec $10^{5,963}$ spores/ml.

L'isolement des champignons à partir de *Schistocerca gregaria* a permis d'obtenir huit (08) espèces de champignons appartenant à six (06) genres différents, à savoir *Fusarium* sp, *Metarhizium anisopliae* var *acridum*, *Metarhizium flavoviride* var *minus*, *Beauveria bassiana*, *Alternaria* sp, *Aspergillus niger* avec différents taux d'abondances.

L'espèce la plus abondante est *M. flavoviride* var *minus* avec 30% d'abondance, par contre *Aspergillus niger* et *Alternaria* sp sont les espèces les moins présentes avec respectivement 3% et 2% d'abondance.

Les résultats de l'essai de pathogénéicité de ces souches sur les larves et les œufs de *Phyllocnistis citrella*, mettent en exergue leur efficacité avec des taux de mortalité qui avoisinent les 100%, pour les concentrations 10^6 et 10^5 spores/ml.

A la lumière des résultats obtenus on pourrait affirmer que *M. flavoviride* var *minus* est le plus actif et le plus rapide à éliminer les larves et les œufs de *Phyllocnistis citrella* avec des DL50 respectifs $10^{1,64}$ spores/ml et $10^{2,36}$ spores/ml.

Il en ressort que l'ensemble des souches testées ont donné des résultats fort encourageants, ces dernières peuvent être considérées comme entomopathogènes.

Ces résultats doivent être reconduits par des expérimentations en plein champ afin de confirmer l'efficacité de ces microorganismes et valider leur efficacité dans les conditions climatiques de la région de Mostaganem, ainsi que d'autres régions de l'Algérie.

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

Les résultats obtenus pour cette culture pourront également être utilisables sur d'autres cultures en Algérie, d'importance économique, attaquées par des mineuses.

L'aboutissement positif et encourageant auquel nous sommes parvenus, nous permet d'affirmer que la recherche dans le domaine biologique mérite une attention très particulière. Et qu'en déployant des moyens plus conséquents et une expérience plus poussée et à grande échelle, l'alternative aux insecticides pourrait être envisageable dans un proche avenir.

Références bibliographiques

- Abassi, M., 1997.** Biologie et écologie de la mineuse des feuilles de *Citrus Phyllocnistis citrella* (Lepidoptera : Gracillariidae) au Maroc. Actes du Séminaire International sur la Mineuse des feuilles des agrumes, INRAA, Blida.
- Abassi, M., Oulachen, B., Aboulama, S., 1995.** La mineuse des agrumes *Phyllocnistis citrella* Stainton (Lepidoptera : Gracillariidae). Note ingénieur, 480, SASMA, Casablanca, Maroc. 12 p.
- Adang, M.J., 1991.** *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins, Structure, action, and utilization .Maramorosch (ed.), Biotechnology for Biological Control of Pests and Vectors. CRC Press, In: K. Boca Raton, FL, Chap 1, pp. 3-24.
- Ahmed, S., Saha, J.L. and Leather, S. R., 1994.** Suitability and potential of entomopathogenic microorganisms for forest pest management – some point for consideration. Intern. J .pest management 40: 287-292. Afrikjan, E. G., V. A. Tchilingirln et L.A. Tchil-akopln. Bakterialnii incekticidnii preparat BIP-805.j. armenii, t.22,3-7. 1969.
- Aime, M. C , Matheny, P. B, Henk, D A. Frieders, E.M., Nilsson, R. H, Goethe, J.W., McLaughlin, D. J., Szabo, L.J., Begerow, D., Sampaio, J.P., Bauer, R., Weiß, M., Oberwinkler, F., Hibbet, D. t., 2006.** An overview of the higher level classification of Pucciniomycotina based on combined analyses of nuclear large and small subunit rDNA sequences. Mycologia, 98(6), 2006, pp. 896–905.
- Alexopoulos, C.J., Mims, C.W. and Blackwell, M., 1996.** Introductory Mycology. John Wiley and Sons, New York. 869p.
- Amiri, Besheli B., 2007.** Efficacy of *Bacillus thuringiensis* and mineral oil against *Phyllocnistis citrella* Stainton (Lepidoptera: Gracillariidae). International Journal of Agriculture & Biology 9, p. 893-896.
- Amiri-Besheli ,B., 2009.** Toxicity evaluation of tracer, palizin, sirinol, runner and tondexir with and without mineral oils on *Phyllocnistis citrella* Stainton. African Journal of Biotechnology, Vol. 8 (14), pp. 3382-3386.
- Anagnou, V.M, 1995.** First recording of *Phyllocnistis citrella* (Staiton) on Citrus groves of Island Greece.ANN.TNS.Phytopath.Benaki 17:157-160
- Anagnou, V.M. Kontodimas, D., Kavallieratos, N. Doukas, D., Staroyiannis, G. and Tomanović, Ž., 2006.** Data on phenology, parasitism and control of citrus leaf miner, *Phyllocnistis citrella* Stainton (Lepidoptera, Gracillariidae), in Greece. Arch.Biol.Sci. Belgrade 58: 239-244.

- Anderson, D. L., Gibbs, A. J., & Gibson, N. L., 1998.** Identification and phylogeny of spore-cyst fungi (*Ascospaera* spp.) using ribosomal DNA sequences. *Mycol. Res.*, 102, 541-547.
- Anonyme., 2003.** Données statistiques sur les principaux produits utilisés contre la mineuse des agrumes en Algérie.
- Argov, Y. and Rossler, Y., 1996.** Introduction, Release and Recovery of Several Exotic Natural Enemies for Biological Control of the Citrus Leafminer, *Phyllocnistis citrella*, in occupied Palestine. *Phytoparasitica* 24(1):33-38
- Aronson, A. I., Beckman, W., and Dunn, P., 1986.** *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens *Micobiol. Rev.* 50, 1-24
- Arthurs, S. P., Thomas, M. B., & Lawton, J. L., 2001.** Seasonal patterns of persistence and infectivity of *Metarhizium anisopliae* var. *acidum* in grasshopper cadavers in the Sahel. *Entomol. Exp. Appl.*, 100, 69-76.
- Ayoub, M. 1960.** *Phyllocnistis citrella* St., a main Citrus pest in Saudi Arabia. *Bulletin Société Entomologique, Egypte* 44: 387-391
- Ba-angood, S.A.S., 1977.** A contribution to the biology and occurrence of the citrus leafminer, *Phyllocnistis citrella* Staint in the Sudan. *Z. angew. Entomol.* 83: 106-111.
- Ba-angood, S.A.S., 1978.** On the biology and food preference of the citrus leafminer, *Phyllocnistis citrella* Stainton, in PDR of Yemen. *Z. angew. Entomol.* 86: 53-57.
- Badawy, A., 1967.** The morphology and biology of *Phyllocnistis citrella* Stainton, a citrus leafminer in Sudan (Lepidoptera: Tineidae). *Bull. Entomol. Soc. Egypt.* 51: 95-103.
- Badawy, A., 1969.** The Morphology and Biology of *Phyllocnistis citrella* Staint, a citrus leaf miner in the Sudan. *Bull. Soc. Ent Egypt (Cairo)*, 51: 95-103.
- Balachowsky, A.S., 1951.** Les insectes nuisibles aux plantes cultivées, leur mœurs, leur destructions. Ed .Paris. pp 1245-1268.
- Balachowsky, A.S., 1966 :** Entomologie appliquée à l'agriculture. Lépidoptères, Masson, Paris, Tome II, Vol. 1, 1057 p.
- Balazy, S., 1993.** Flora of Poland (Flora Polska), Fungi (Mycota) 24, 1-356. Polish Acad. Sci., W. Szafer Inst. Botany, Krakow.
- Baledent, F., 2000.** Les cellules hématimètres. Développement et Santé, n°148, pp1-5
- Barnes, A. I., & Siva-Jothy, M. T., 2010.** Density-dependent prophylaxis in the mealworm beetle *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae): cuticular melanization is an indicator of investment in immunity. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 267, pp 177-182

- Barnett, H.L. , and Hunter, B.B., 1977.** Illustrated genera of imperfect fungi. *Second edition.*Burgess Publishing Co 180 P.
- Barroga, S. F. 1969.** Biological notes and control of citrus leafminer (*Phyllocnistis citrella* Stainton) affecting citrus seedlings. *Philippine J. Plant Industry* 33:17-29.
- Batra, R.C., et Sandhu, G.S., 1981.** Differential population of citrus leaf-miner and its parasites. *J. Res. Punjab Agric. Univ.* 18, 170–176.
- Batra, R.C., Sandhu, G.S., Sharma S.C. et Chanana, Y.R., 1988.** Biology of *Citrus* leafminer on some *Citrus* root-stocks and its relationship with abiotic factors. *Punjab Hort. J.(Patiala)*, 28 : 30-35.
- Bauer, L. S., 1995.** Resistance: A Threat to the Insecticidal Crystal Proteins of *Bacillus thuringiensis*, *Florida Entomologist* 78: 414-443.
- Beattie, G.A.C., 1989.** Citrus Leaf miner. NSW Agric. and Fisheries, Agfact, H2.AE.4; pp:1-4
- Beattie, G.A.C., et Smith, D., 1993.** *Citrus leafminer*. Agfact H2.AE.4, Second Edition, NSW Agriculture. Sydney, H2AF. 4: 1-4.
- Bechinger, C, Giebel, K.F., Schnell, M., Leiderer P., Deising, H.B., Bastmeyer, M., 1999.** Optical measurements of invasive forces exerted by appresoria of a plant pathogenic fungus. *Science* 285:1896–1899.
- Belarbi, M., et Abir, M., 1995.** La mineuse des agrumes: *Phyllocnistis citrella*_STAINTON (*Lep : Phyllocnistidae*)_in " AMPP, Protection phytosanitaire des agrumes - p.5.RABAT.
- Benfatto, D., 1995.** La minatrice serpentine degli agrumi: un nuovo fitofagi presente dans Italia - *L'Informatore Agrario* 4/94 : 79-80.
- Benjamin, R.K., Blackwel, M. Chapela, I.H, 2004.** Insect and other arthropod-associated fungi, In: Mueller GM, Bills GM., and Foster M.S; *Biodiversity of fungi: inventory and Monotoring Methods*, pp.395-433, Amsterdam press.
- Benz, G., 1987.** Environment. In: *Epizootiology of insect diseases* (Fuxa JR, Tanada Y eds) John, Wiley and Sons, New York, 177-214.
- Berkani A., 2000.** Durée de developpement pré-imaginal et mortalité de *phyllocnistis citrella* stainton (lepidoptera: gracillariidae) on condition semi. Controlées en Algerie, *Fruits* vol 55 (5).pp.303-308.
- Berkani, A., Mouats A. et Dridi, B., 1996.** Observation sur la dynamique des populations de *Phyllocnistis citrella* Stainton (Lepidoptera : Gracillariidae) en Algérie. *Fruits*, 51 : 417-424.
- Berkani, A., 1995.** Apparition en Algérie de *Phyllocnistis citrella* Stainton, chenille mineuse nuisible aux agrumes. *Fruits*, 50 : 347-352.

- Berkani, A., 1999.** Contribution à l'étude du cycle biologique de *Phyllocnistis citrella* Stainton (Lepidoptera : Gracillariidae) dans les conditions semi-contrôlées. Actes des VI^{ème} journées sur les activités de recherches en sciences Agronomiques, 26 et 27 octobre 1999, Université de Mostaganem (Algérie), 4 p.
- Berkani, A., Mouats, A. and Dridi B., 1997.** Observations sur la dynamique des populations de *Phyllocnistis citrella* Stainton (Lepidoptera: Gracillariidae) en Algérie. *Fruits*, 51:417–423.
- Berkani, A., et Mouats, A., 1998.** Vers une lutte biologique de *Phyllocnistis citrella* par introduction de *Ageniaspis citricola* en vergers d'agrumes dans l'ouest algérien. *Fruits*, 53 : 99-103.
- Berkani, A., Mouats, A., and Dridi B., 1996.** Observation sur la dynamique des populations de *Phyllocnistis citrella* Stainton (Lepidoptera : Gracillariidae) en Algérie. *Fruits*, 51 : 417-424.
- Bidochka, M.J., Clark, D.C., Lewis, M.W., et Keyhani, N.O., 2010.** Could insect phagocytic avoidance by entomogenous fungi have evolved via selection against soil amoeboid predators. *Microbiology* 156, 2164–2171.
- Bills, G., Dombrowski, A., Morris, S.A., Henens, O., Liesch Zink, D., Onishi, J., Mainz, M. S., Rosenbach, M., Thompson, J. R., Schwartz, R.E., 2000.** Recent and Future Discoveries of Pharmacologically Active Metabolites from Tropical Fungi. In: *Tropical Mycology*, Watling, R., J.C. Frankland, A.M. Ainsworth, S. Issac and C.H. Robinson (Eds.). Vol. 2. CABI Publishing, New York, pp: 165-194.
- Bischoff, J. F., Rehner, S. A., & Humber, R. A., 2009.** A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. *Mycologia*, 101, 512-530.
- Blackwell, M., 2010.** Fungal evolution and taxonomy. *BioControl*, 55,7-16.
- Blackwell, M., Hibbett, D. S., Taylor, J. W., & Spatafora, J. W., 2006.** Research coordination networks: a phylogeny for the kingdom Fungi (Deep Hypha). *Mycologia*, 98, 829-837.
- Block, G., Patterson, B., Subar, A., 1992.** Fruits, légumes et prévention du cancer: Un examen des données épidémiologiques. *Nutr. Cancer*, 18, 1-29.
- Blumthaler, M. 1993.** Solar UV measurements. In *UV-B radiation and ozone depletion: effects on humans, animals, plants, microorganisms, and materials*. Edited by M. Tevini. Lewis Publishers, Boca Raton, Fla. pp. 71–94.
- Boisclair, J, Estevez, B., 2006.** Lutter contre les insectes nuisibles en agric. Bio. : intervenir en harmonie face à la complexité. *Phytopro*.87: 83-90.

- Boualem, M., 2002.** Etude bioécologique de *Phyllocnistis citrella* Stainton (Lepidoptera : Gracillariidae) Mineuse des feuilles de *Citrus* dans l'ouest algérien. Thèse de magister, Université de Mostaganem, 171 p.
- Boualem, M., 2010.** Etude bioécologique de *Phyllocnistis citrella* Stainton (Lepidoptera : Gracillariidae) et de son complexe parasitaire dans la région de Mostaganem." Thèse de doctorat ; université de Mostaganem.200p
- Boualem, M., Villemant, C. et Berkani, A., 2007.** Présence en Algérie de trois nouveaux parasitoïdes (Hymenoptera, Eulophidae) de la Mineuse des agrumes *Phyllocnistis citrella* Stainton (Lepidoptera, Gracillariidae). *Bull. Soc. Entomol. Fr.*, 112 (3), 2007 : 381-386.
- Boualem, M., Villemant, C. et Berkani, A., 2008.** Bio-ecological study of the parasitoid complex of *Phyllocnistis citrella* Stainton (Lepidoptera: Gracillariidae) in Western Algeria. *IOBC/WPRS Bull.*, 38: 183-188.
- Boucias, D. G., and Pendland, J. C., 1991.** The fungal cell wall and its involvement in the pathogenic process in insect hosts. In "Fungal Cell Wall and Immune Response" (J. P. Latge' and D. Boucias, Eds.), pp. 303–314. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg.
- Boucias, D. G., Stokes, C., Storey, G., and Pendland, J. C., 1996.** The effects of imidacloprid on the termite *Reticulitermes flavipes* and its interaction with the mycopathogen *Beauveria bassiana*. *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer* 49, 105–151.
- Braga, G.U.L., Flint, S.D., Messias, C.L., Anderson, A.J., Roberts, D.W., 2001a.** Effects of UVB irradiance on conidia and germinants of the entomopathogenic hyphomycete.
- Braga, G.U.L., Flint, S.D., Messias, C.L., Anderson, A.J., Roberts, D.W., 2001b.** Effects of uv-B on conidia and germlings of the entomopathogenic hyphomycete *Metarhizium anisopliae*. *Mycol Res* 105:874–882.
- Braga, G.U., Rangel, D.E., Flint, S.D., Anderson, A.J. and Roberts, D.W., 2006.** Conidial pigmentation is important to tolerance against solar-simulated radiation in the entomopathogenic fungus *Metarhizium*.
- Bridge, P. D., & Worland, M. R., 2004.** First report of an entomophthoralean fungus on an arthropod host in Antarctica. *Polar Biol.*, 27,190-192.
- Burgerjon, A., 1965.** Le titrage biologique des cristaux de *Bacillus thuringiensis* Berliner par réduction de consommation au Laboratoire de La Minière, *Entomophaga*, pp 10 -21.
- Burgess, H. D. 1981.** *Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970-1980.* Academic Press, London, N.Y., 949p.

- Burgess, H. D. 1982.** Control of insect by bacteria. *Parasitology* 84, 79-117. **Butt, T.M. 1990.** "Fungal infection processes. A mini-review" Vth Int. Colloq. Invertebr. Pathol. Adelaide. Soc. for Invertebr. Pathol. pp 121-124.
- Butt, T. M., 2002.** Use of entomogenous fungi for the control of insect pests. In F. Kempken (Ed.), *The Mycota XI, Agricultural Applications* (pp. 111-134). Berlin: Springer.
- Butt, T. M., Ibrahim, L., Clark, S. J., & Beckett, A., 1995.** The germination behaviour of *Metarhizium anisopliae* on the surface of aphid and flea beetle cuticles. *Mycol. Res.*, 99, 945-950.
- Campos, Y., Sepúlveda, B.A., Tume, P., 2007.** Entomopathogenicity of native bacteria from *Anastrepha fraterculus* and *Ceratitis capitata* against the pest *Phyllocnistis citrella*. *Pest Manag Sci* 63, 394-398.
- Carruthers, R. L., Larkin, T. S., Firstencel, H., & Feng, Z., 1992.** Influence of thermal ecology on the mycosis of a rangeland grasshopper. *Ecology*, 73, 190-204.
- Charnley, A. K., 1984.** Physiological aspects of destructive pathogenesis in insects by fungi: a speculative review. In J. M. Anderson, A. D. M. Rayner & D. W. H. Walton (Eds.), *Invertebrate Microbial Interactions* (pp. 229-270). Cambridge: Cambridge University Press.
- Chaverri, P., Liu, M., & Hodge, K. T., 2008.** A monograph of the entomopathogenic genera *Hypocrella*, *Mollerella*, and *Samuelsia* gen. nov. (Ascomycota, Hypocreales, Clavicipitaceae), and their *Aschersonia*-like anamorphs in the Neotropics. *Stud. Mycol.*, 60, 1-66.
- Chermiti, B., Gahbiche, H., Braham, M. et Dali, M., 1999.** Natural parasitism of the *Citrus* leafminer, *Phyllocnistis citrella* Stainton (Lepidoptera: Gracillariidae) in Tunisia. *Fruits* (Paris). 54: 1, 11-22.
- Chermiti, B., 1997.** Outline for country report on the status of *Citrus leafminer* (CLM) *Phyllocnistis citrella* in Tunisia. Séminaire International sur la Mineuse des feuilles des agrumes. Actes du Séminaire International sur la Mineuse des feuilles des agrumes, INRAA, Blida 16-17, Décembre 1996.
- Chutia, M.; Bhuyan, P.D.; Pathak, M.G., Sarma, T.C., Boruah, P., 2009.** Antifungal activity and chemical composition of *Citrus Reticulata* Blanco essential oil against Phytopathogens from North East India. *Food Science and Technology*, v. 42, p. 777-780.
- Clarkson, J. M., & Charnley, A. K., 1996.** New insights into the mechanisms of fungal insect pathogenesis in insects. *Trends Microbiol.*, 4, 197-203.

- Clausen, CP. 1927.** The *Citrus* insects of Japan. USDA Washington, D.C. Technical Bulletin 15: 1-15.
- Clausen, C.P., 1931.** Two *Citrus* leaf miners of the Far East. U.S.D.A Technical Bulletin (Washington) 252. Pp 1-13.
- Cloutier, C., 1992.** Les solutions biologiques de lutte pour la répression des insectes et acariens ravageurs des cultures. In: La lutte biologique, sous la direction de C. Vincent et D.Coderre, pp 19-88. Chicoutimi, Québec, canada: Gaétan MORIN éditeur ltée.
- Cloutier, C., Cloutier, C., 1992.** Les solutions biologiques de lutte pour la répression des insectes et acariens ravageurs des cultures. In C. Vincent & D. Coderre : *La lutte biologique*. Gaétan Morin, Québec, pp 19-88.
- Couch, J. N., 1938.** The genus *Septobasidium*. Chapel Hill: University of North Carolina Press. 484p.
- Cremer, S., Armitage, S. A. O., & Schmid-Hempel, P., 2007.** Social immunity. *Curr. Biol.*, 17, pp 693-702.
- Davis, D.R. 1987.** Gracillariidae, p. 372–374. In: Stehr, F.W. (ed.). *Immature insects*, vol. 1, Dubuque, Kendall/Hunt publishing Company, 755 p.
- De Croos, J. N. A., & Bidochka, M. J., 1999.** Effects of low temperature on growth parameters in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Can. J. Microbiol.*, 45, 1055-1061.
- De la Riva, L. , Willing, S.E., Tate, E.W. , Fairweather, N.F.** 2011. Roles of cysteine proteases Cwp84 and Cwp13 in biogenesis of the cell wall of *Clostridium difficile*. *J. Bacteriol.* 193, 3276 – 3285.
- DeKouassi, M., 2001.** Les possibilités de la lutte microbiologique. Emphase sur le champignon entomopathogène *B. bassiana*. *Vertigo* : volume2 ; numero2
- Dias, C., Garcia, P., Simoes, N., et Oliveira, S., 2005.** Efficacy of *Bacillus thuringiensis* Against *Phyllocnistis citrella* (Lepidoptera: Phyllocnistidae). *Biological and Microbial Control, J. Econ. Entomol.* 98 (6): 1880-1883.
- Doberski, J. W., 1981.** Comparative laboratory studies on three fungal pathogens of the elm bark beetle *Scolytus scolytus*: Effect of temperature and humidity on infection by *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces farinosus*. *J. Invertebr. Pathol.* 37: 195-2
- Donnio P.Y., Le Deaut P., Schuttler, C. & Avril L.I., 1987.** Caractérisation et signification clinique des souches de *Bacillus* isolées par hémocultures. *Méd. Mal. Infect.*, 11: 110-112.

- Doumandji-Mitiche, B., Halouane, F., Bissaad, F., Haddadj, F., Mohand-Kaci, H., Doumandji, S., 1998.** Comparaison de l'efficacité de *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* et *Bacillus subtilis* sur les œufs, les cinquièmes stades larvaires et les adultes de *Schistocerca gregaria* (Orthoptera, Acrididae). IV^{ème} Conférence Internationale Francofaune d'Entomologie, Saint-Malo 5-9 juillet.
- Doumandji-Mitiche, B., and et Doumandji, S., 2008.** Quelques agents biologiques susceptibles d'être utilisés en lutte anti-acridienne. Rev. des régi. Arides. 3(21) :1154-1158.
- Driver, F., Milner, R. J., & Trueman, J. W. H., 2000.** A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. Mycol. Res., 104, 134-150.
- Dunphy, G. B. et Tibelius, 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. Coderre, pp. 305-322. Chicoutimi, Québec, Canada. Gaetan Morin éditeur ltée.
- Duyck, P.F., 2005.** Compétition interspécifique et capacités invasives. Le cas des Tephritidae de l'île de La Réunion. Doctorat de l'université de la réunion.93p
- Economos, C., Clay, W. D., 1999.** Nutritional and health benefits of citrus fruits. In: Lupien, J. R., Randell, A., Malek, Z., Cotier, J. P., Clay, W. D., eds. Food, Nutrition and Agriculture. FAO Food and Nutrition division, 24, 11-18.
- Ejaz, S., Ejaz, A., Matsuda, K., Lim, C. W., 2006.** Limonoids as cancer chemopreventive agents. Journal of the Science of Food and Agriculture, 86, 339-345.
- El Ouard, R., 1997.** La mineuse des feuilles des agrumes (*Phyllocnistis citrella*) au Maroc. Ampleur de problème et gestion de situation. Séminaire International sur la Mineuse des feuilles des agrumes. Actes du Séminaire International sur la Mineuse des feuilles des agrumes, INRAA, Blida 16-17 Décembre 1996.
- Elliot, S. L., Blanford, S., & Thomas, M. B., 2002.** Host-pathogen interactions in a varying environment: temperature, behavioural fever and fitness. Proc. R. Soc. Lond. B, 269, 1599-1607.
- Elsworth, J. F. and J. F., Grove., 1977.** Cyclodepsipeptides from *Beauveria bassiana* als. Part 1. Beauverolides H and I." J Chem Soc [Perkin 1] 3: 270-3.
- FAOStat, 2013.** <http://www.fao.org/corp/statistics/fr>.
- Fargues, J., Maniania, N.K., Delmas, J.C. et Smits, N., 1992.** Influence de la température sur la croissance in vitro d'hyphomycètes entomopathogènes Agronomy for Sustainable Development 12 (7) 557-564.

- Fargues, J., et Vey, A., 1974.** Modalistes d'infection des larves de *Leptinotarsa decemlineata* par *Beauveria bassiana* au cours de la mue. *Entomophaga*, 19, 311-323.
- Fargues, J. 1972.** Étude des conditions d'infection des larves de doryphore *Leptinotarsa decemlineata* Say par *Beauveria bassiana* (Bals.)Vuill. (*Fungi imperfecti*). *Entomophaga* 17: 319- 337.
- Fargues, J., Goettel, M., Smits, N., Ouedraogo, A., Vidal, C., Lacey, L., Lomer, C., and Rougier, M.; 1996.** Variability in susceptibility to stimulated sunlight of conidia among isolates of entomopathogenic *Hyphomycetes*. *Mycopathologia* (135) 171-181.
- Fargues, J., Goettel, M. S., Smits, N., Ouedraogo, A., & Rougier, M., 1997.** Effect of temperature on vegetative growth of *Beauveria bassiana* isolates from different origins. *Mycologia*, 89, 383-392.
- Fargues, J., N.K. Maniania, J.C. Delmas & Smits, N., 1992.** Influence de la température sur la croissance *in vitro* d'hyphomycètes entomopathogènes. *Agronomie* 12: 557-564.
- Fargues, J., Rougier, M., Goujet, R., Itier, B, 1988.** Effet du rayonnement solaire sur la persistance des conidiospores de l'hyphomycète entomopathogène, *Nomuraea rileyi*, à la surface du couvert végétal. *Entomophaga* 33, 357.
- Fast, P. G., 1981.** The crystal toxin of *Bacillus thuringiensis*. In: Burgess, H. D. (ed.), *Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970-1980*. Academic Press, London, pp. 223-48.
- Feng, M.G., Poprawski, T.J. and Khachatourians, G.G., 1994.** Production, formulation and application of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for insect control: current status. *Biocont. Sci. Tech.* 4: 3-34.
- Ferron, P., Fargues, J. et Riba, G., 1993.** Les possibilités de lutte microbiologique contre les ravageurs In : *La lutte biologique*. Fraval A. (ed.) Dossier de la cellule environnement de l'INRA 5 : 65- 93.
- Ferron, P., Fargues, J., Riba, G., 1991.** Fungi as a microbial insecticide against pests. In: Arora, DK., Ajello, L., Mukerji, KG (Eds.), *Handbook Appl. Mycol. Vol. 2: Humans, Animals, and Insects*. Dekker, New Yark, pp. 665-706
- Ferron, P., 1978.** Biological control of insects pests by entomogenous fungi. *Ann. Rev. Entomol.* 23: 409-442.
- Ferron, P., 1985.** Fungal control. In: Kerkut GA, Gilbert LI (Eds.), *Comprehensive Insect physiology, Biochemistry and Pharmacology*. Pergamon, Oxford, pp. 313-346.
- 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., 1977.** Influence of relative humidity on the development of fungal infection caused by *Beauveria bassiana* [Fungi Imperfecti, Moniliales] in imagines of *Acanthoscelides obtectus* [Col.: Bruchidae]. *Entomophaga*, 22, 393-396.
- Fletcher, T. B., 1920.** Life histories of Indian insects. Microlepidoptera. Mem. Dept. Agric. India 6:1-217, 68 p.
- Gardner, W. A., Sutton, M. R. et Noblet, R., 1977.** Persistence of *Beauveria bassiana*, *Nomuraea necatrix* on soybean foliage. *Environ. Entomol.* 6: 616-618.
- Garijo, C., et García, E.J., 1994.** *Phyllocnistis citrella* (Stainton, 1856) (Insecta: Lepidoptera: Gracillariidae: Phyllocnistidae) en los cultivos de cítricos de Andalucía (Sur España) : Biología, ecología y control de la plaga. *Bol. San. Veg. Plagas*, 20 : 815-826.
- Garrido, A.V., 1995.** *Phyllocnistis citrella* Stainton, biological aspects and natural enemies found in Spain – IOBC WPRS Bull., 18 (5): 1 – 14.
- Garrido, A.V. et Gascon, L.I., 1995.** Distribución de fases inmaduras de *Phyllocnistis citrella* Stainton, según el tamaño de la hoja. *Boletín. De Sanidas . Vegetal. Plagas* 21, 559-571.
- Garrido, A.V., 1996.** Differences in the morphology of male and female pupae of *phyllocnistis citrella* (Lepidoptera, gracillariidae), (IVIA). E-46 113-Montcada (Spain), 603-606.
- Gill, L.S., Nyawuame, H.G.K. and Ehikhametalor, A.O., 1992.** Effects of crude oil on the growth and anatomical features of *Chromolaena odorata* (L.) K. and R. *Chromolaena Odoranta Newslett.*, 6: 1-6.
- Gillespie, J.P., Kanost, M.R., Trenczek, T., 1997.** Biological mediators of insect immunity. *Ann. Rev. Entomol.* 42, 611–643.
- Goettel, M.S., 1992.** Des champignons comme agent de lutte biologique. In: PIBadam, CAB International, IITA, La lutte biologique contre les acridiens, Nigeria, p. 122-131.
- Gohar, M., Faegri, K., Perchat, S., Ravnum, S., Okstad, O. A., Gominet, M., Kolsto, A. B. & Lereclus, D., 2008.** The PlcR virulence regulon of *Bacillus cereus*. *PLoS One* 3 (7); e 2793.
- Gohar, M., Gilois, N., Graveline, R., Garreau, C., Sanchis, V. & Lereclus, D., 2005.** A comparative study of *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus anthracis* extracellular proteomes. *Proteomics* 5(14), 3696–3711.
- Grafton-Cardwell, E., Morse, J. G., O'Connell, N. V., Phillips Kallsen C. E., et Haviland D. R., 2009.** *Citrus leafminer*. University of California IPM Online. <http://www.ipm.ucdavis.edu/PMG/r107303211.html> (20.04.2012).

- Grafton-Cardwell, E. E., Godfrey, K. E., Headrick, D. H., Mauk, P. A., and Pena, J. E., 2008.** Citrus leafminer and citrus peelminer. UC ANR Publ. No. 8321. 12 p.
- Greathead, D.J., Kooyman, C., Launois-Luong, M.H., Popov, G.B., 1994.** Les ennemis naturels des criquets du Sahel. Ed. Cirad/Prifas, Collection Acridologie Opérationnelle, Montpellier, 147p.
- Greathead, D. J. 1992b.** Natural enemies of tropical locusts and grasshoppers: their impact and potential as biological control agent. pp105-121 in Lomer and Prior Biological control of locusts and grasshoppers. Wallingford, CAB international.
- Greathead, D. J., 1992a.** Biological control as a potential tool for locust and grasshopper control. In Biological Control of Locusts and Grasshoppers. Lomer, C.J. and Prior C. (eds.). C.A.B. International, Wallingford, UK, 4-7.
- Guerout, R., 1974.** Apparition de *Phyllocnistis citrella* Stainton en Afrique de l'ouest. Fruits, 29 (7-8): 519–523.
- Guthrie, N., Vandenberg, T., Manthey, J. A., Hasegawa, S., Manners, G., 2000.** The effectiveness of the *Citrus* juice components on the inhibition on human breast cancer proliferation. Int. Citrus Congress, Florida., abstract 72, p. 61.
- Hajek, A. E., 1997.** Ecology of terrestrial fungal entomopathogens. Adv. Microb. Ecol., 15, 193-249.
- Hajek, A. E., Filotas, M. J., & Ewing, D. C., 2002.** Formation of appressoria by two species of lepidopteran-pathogenic Entomophthorales. Can. J. Bot., 80, 220-225.
- Hajek, A. E., & Eastburn, C. C., 2003.** Attachment of germination of Entomophaga maimaiga conidia on host and non-host larval cuticle. J. Invertebr. Pathol., 82, 12-22.
- Hall, R. A. et Papierok, B. 1982.** Fungi as biological control agents of arthropods of agricultural and medical importance. Parasitology 84, 205-40.
- Harats, D., Chevion, S., Nahir, M., Norman, Y., Sagee, O., Berry, B., 1998.** Citrus fruit supplementation reduces lipoprotein oxidation in young men ingesting a diet high in saturated fat: presumptive evidence for an interaction between vitamins C and E in vivo. American Journal of Clinical Nutrition., 67, 240-245.
- Hawksworth, D.L., Sutton B.C., Ainsworth, G.C., et James, P.W., 1983.** Dictionnaire de Ainsworth et Bisby des champignons, 7th ed., Commonwealth Mycol.inst., Kew, United kingdom.445p.
- Heimpel, A. M. et Angus, T. A., 1963.** Diseases caused by certain spore forming bacteria, in Insect Pathology: An Advanced Treatise. Vol. 2, Steinhaus, E. A ., Ed., Academic Press, New York, 21.

- Heimpel, A. M. et Angus, T. A., 1963.** Diseases caused by certain spore forming bacteria, in Insect Pathology: An Advanced Treatise. Vol. 2, Steinhaus, E. A., Ed., Academic Press, New York, 21.
- Heimpel, A. M., 1955.** Investigations of the mode of action of strains of *Bacillus cereus* Frankland and Frankland pathogenic for the larch sawfly, *Pristiphora erichsonii* (Htg.), Can. J. Zool., 33, 311.
- Heimpel, A. M., 1967.** A critical review of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* Berliner and other crystalliferous bacteria. Ann. Rev. Entomol., 12, 287.
- Henk, D. A., & Vilgalys, R., 2007.** Molecular phylogeny suggests a single origin of insect symbiosis in the Pucciniomyces with support for some relationships within the genus *Septobasidium*. Am. J. Bot., 94, 1515-1526.
- Henke, M. O., de Hoog, G. S., Gross, U., Zimmermann, G., Kraemer, D., & Weig, M., 2002.** Human deep tissue infection with an entomopathogenic *Beauveria* species. J. Clin. Microbiol., 40, 2698-2702.
- Heppner J.B. and Fasulo, T.R., 2010.** Citrus Leafminer, *Phyllocnistis citrella* Stainton (Insecta: Lepidoptera: Phyllocnistinae) EENY-038. University of Florida, Florida, USA: Florida Cooperative Extension Service Institute of Food and Agricultural Sciences. pp1-5.
- Heppner J.B., 1993.** Citrus leafminer, *Phyllocnistis citrella* (Lepidoptera : Gracillariidae : Phyllocnistinae) in Florida. *Tropic. Lepidoptera*, 4 : 49-64.
- Heppner J.B., 1998.** Citrus leafminer, *Phyllocnistis citrella* (Lepidoptera: Gracillariidae), DPI. Entomologycircular n°359. 38, p3.
- Hibbett, D. S., Binder, M., Bischoff, J. F., Blackwell, M., Cannon, P. F., Eriksson, O. E., Huhndorf, S., James, T., Kirk, P. M., Lücking, R., Lumbsch, H. T., Lutzoni, F., Matheny, P. B., McLaughlin, D. J., Powell, M. J., Redhead, S., Schoch, C. L., Spatafora, J. W., Stalpers, J. A., Vilgalys, R., Aime, M. C., Aptroot, A., Bauer, R., Begerow, D., Benny, G. L., Castlebury, L. A., Crous, P.W., Dai., Y. C., Gams, W., Geiser, D. M., Griffith, G. W., Gueidan, C., Hawksworth, D. L., Hestmark, G., Hosaka, K., Humber, R. A., Hyde, K. D., Ironside, J. E., Kořljalg, U., Jyrtznabm, C. P., Larsson, K. H., Lichtwardt, R., Longcore, J., Miadlikowska, J., Miller, A., Moncalvo, J. M., Mozley-Standridge, S., Oberwinkler, F., Parmasto, E., Reeb, V., Rogers, J. D., Roux, C., Ryvarden, L., Sampaio, J. P., Schuëbler, A., Sugiyama, J., Thorn, R. G., Tibell, L., Untereiner, W. A., Walker, C., Wang, Z., Weir, A., Weiß, M., White, M. M., Winka, K., Yao, Y. J., & Zhang, N. (2007).** A higher-level phylogenetic classification of the fungi. mycol. res., 111, 509-547.

- Hodge, K. T., Krasnoff, S. B., & Humber, R. A., 1996.** *Tolypocladium inflatum* is the anamorph of *Cordyceps subsessilis* Mycologia, 88, 715-719.
- Höfte H. and Whiteley H. R., 1989.** Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. Microbiol. Rev. 53, 242-255.
- Holder D. J. and Keyhani N. O., 2005.** Adhesion of the entomopathogenic fungus *Beauveria (Cordyceps) bassiana* to substrata. *Appl Environ Microbiol* **71**, 5260–5266.
- Holder, D. J., & Keyhani, N. O., 2005.** Adhesion of the entomopathogenic fungus *Beauveria (Cordyceps) bassiana* to substrates. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71, 5260-5266.
- Howard, R.J., and Valent, B., 1996.** Breaking and entering: Host penetration by the fungal rice blast pathogen *Magnaporthe grisea*. *Annu. Rev. Microbiol.* 50, 491–512.
- Hoy MA, Nguyen R. 1997.** Classical biological control of the Citrus leafminer *Phyllocnistis citrella* Stainton. *Tropical Lepidoptera* 8: 1-19.
- Huang M.L., Lu Y. S., Qiu Z.S., Zhou Q.M., Men Y.J. et Lin S.G., 1989.** Life history of *Phyllocnistis citrella* Stainton, and its occurrence. *Acta Phyt. Sin.* 16 : 159–162.
- Huang, M. D et Li S.X., 1989.** The damage and economic threshold of *Citrus* leafminer, *Phyllocnistis citrella*, STAINTON, to *Citrus*. Guangzhou, Acad. Studies on the integrated management of *Citrus* insect pests; pp. 84-89.
- Humber, R. A., 1989.** Synopsis of a revised classification for the Entomophthorales (Zygomycotina). *Mycotaxon*, 34, 441-460.
- Humber, R. A., 1997.** Fungi: identification. In L. A. Lacey (Ed.), *Manual of Techniques in Insect Pathology* (pp. 153-185). San Diego:Academic Press.
- Humber, R. A., 2008.** Evolution of entomopathogenicity in fungi. *J. Invertebr. Pathol.*, 98, 262-266.
- Humber, R. A., 2012.** Identification of entomopathogenic fungi. *Manual of techniques in invertebrate pathology*. Published by Elsevier Ltd. pp151-187.
- Humber, R.A., Hansen K. S., Wheeler M.M., 2012.** ARSEF Entomopathogenic Fungal Cultures: catalog of species, USDA-ARS Biological Integrated Pest Management Research 516 P.
- Hunt, T. R., Moore, D., Higgins, P. M., & Prior, C., 1994.** Effect of sunscreens, irradiance and resting periods on the germination of *Metarhizium flavoviride* conidia. *Entomophaga*, 39, 313-322.
- Hutton, P. O. et Burbutis, P. P. 1974.** Milky disease and Japanese beetle in Delaware. *Journal of Economic Entomology.* 67: 247-9.

- Ignoffo, C. M., 1973.** Effects of entomopathogens on vertebrates. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 217, 141-172.
- Ignoffo, C. M. 1970.** Proceedings of the Tall Timbers Conference on Ecology of Animal Contributions by Habitat Management, Tallahassee, Florida. Tall Timbers Research Station: 47-57.
- Ignoffo, C. M., & Garcia, C., 1992.** Influence of conidial color on inactivation of several entomogenous fungi (Hyphomycetes) by simulated sunlight. *Environ. Entomol.*, 21, 913-917.
- Ignoffo, C.M. and Hostetter, D. L., 1977.** Environmental stability of microbial insecticides. *Misc. Publ. Entomol. Soc. Am.* 10: 1-80.
- Inglis, G. D., Goettel, M. S., & Johnson, D. L., 1995.** Influence of ultraviolet light protectants on persistence of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*. *Biol. Control*, 5, 581-590.
- Inglis, G. D., Goettel, M. S., Butt, T. M., & Strasser, H., 2001.** Use of hyphomycetous fungi for managing insect pests. In T. M. Butt, C. Jackson & N. Magan (Eds.), *Fungi as Biocontrol Agents: Progress, Problems and Potential* (pp. 23-69). Wallingford: CABI.
- INPV, 2013.** Lutte biologique contre la mineuse des agrumes lutte biologique contre la mineuse des agrumes *Phyllocnistis citrella*. http://www.inpv.edu.dz/new_inpv/IMG/pdf/Siteweb_MFC.pdf. 15/12/2013
- Jacas, J. A, Garrido, A., 1996.** Differences in the morphology of male and female pupae of *Phyllocnistis citrella* (Lepidoptera: Gracillariidae). *Fla. Entomol.*, 79:603-606.
- Jaccoud, D. B., Hughes, W. O. H., & Jackson, C. W., 1999.** The epizootiology of a *Metarhizium* infection in mini-nests of the leafcutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. *Entomol. Exp. Appl.*, 93, 51-61.
- Jacques, P., Taylor, A., Hankinson, S., Willet, W., Mahnken, B., Lee Y., Vaid K., Lahav M. 1997.** Long-term vitamin C supplement use and prevalence of early age-related lens opacities. *American Journal of Clinical Nutrition*, 66, 911-916.
- James, T. Y., Letcher P. M., Longcore, J. E., Mozley-Standridge, S. E., Porter, D., Powell, M. J., Griffith, G. W., & Vilgalys, R., 2006.** A molecular phylogeny of the flagellated fungi (Chytridiomycota) and description of a new phylum (Blastocladiomycota). *Mycologia* (98) 860-871.
- Jaronski, S.T., 2010.** Ecological factors in the inundative use of fungal entomopathogens. *BioControl*, 55, 159-185.
- Jones, J., 2001.** *Citrus* leafminer. University of Arizona, College of Agriculture & Life

- Jourdeuil, P., Grison, P. et Fraval, A., 1991.** La lutte biologique: un aperçu historique. La lutte biologique. Dossier de la Cellule environnement de l'INRA N°5, pp11-35.
- Kaaya, G.P. and Darji, N., 1989.** Humoral immunity in tsetse: Differences in response due to sex and age of tsetse, species and doses of immunizing agents and the *in vitro* effects of temperature and bacterial factors. *Developmental and Comparative Immunology* 10: 627 – 628.
- Kalsbeek, V., Mullens, B. A., & Jespersen, J. B., 2001.** Field studies of Entomophthora (Zygomycetes:Entomophthorales)-induced behavioural fever in *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) in Denmark. *Biol. Control*, 21, 264-273.
- Keller, S., 1991.** Arthropod-pathogenic Entomophthorales of Switzerland. II. *Erynia*, *Eryniopsis*, *Neozygites*, *Zoopthora*, and *Tarichium*. *Sydowia*, 43, 39-122.
- Keller, S., 2002.** The genus *Entomophthora* (Zygomycetes, Entomophthorales) with a description of five new species. *Sydowia*, 54, 157-197.
- Kermarrec, A., Febvay, G., & Decharme, M., 1986.** Protection of leafcutting ants from biohazards: is there a future for microbiological control? In C. S. Lofgren & R. K. VanderMeer (Eds.), *Fire Ants and Leaf-Cutting Ants: Biology and Management* (pp. 339-356) Boulder: Westview Press.
- Khachatourians, G., 1986.** Production and use of biological pest control agents. *Trends Biotech* 4: pp120-124.
- Khyami, H. & Ateyyat, M., 2002.** Efficacy of Jordanian isolates of *Bacillus thuringiensis* against the citrus leafminer *Phyllocnistis citrella*. *International Journal of Pest Management* 48, pp. 297-300.
- Klowden, M. J., 2007.** *Physiological Systems in Insects* (2nd ed.). San Diego: Academic Press. 288p.
- Knapp, J., Pena, J., Stansly, P., Heppner, J. et Yang, Y., 1994.** The *Citrus* leafminer, *Phyllocnistis citrella*, a new pest of *Citrus* in Florida. *Fla. Coop. Ext. Ser.* IFAS, University of Florida, Gainesville, 8 p.
- Knapp, J.L., Albrigo, L.G., Browning, H.W., Bullock R.C., Heppner, J.B., Hall, D.G., Hoy, M.A., Nguyen, R., Pena, J.E. et Stansly, P.A., 1995.** *Citrus* leafminer, *Phyllocnistis citrella* Stainton: Current Status in Florida- 1994. *Fla. Coop. Ext. Ser.* IFAS : 35. University of Florida, Gainesville, 26 p.
- Krieg, A., 1987.** Diseases caused by bacteria and other prokaryotes. In: Fuxa, J. R. and Tanada, Y. (eds), *Epizootiology of Insect Diseases*. John Wiley & Sons, Chichester, pp. 323-55.

- Kurtzman, C. P., Fell, J. W., & Boekhout, T., 2011.** The Yeasts: A Taxonomic Study (5th ed.). Amsterdam: Elsevier, 2080 p.
- Kushner, D. J. et Heimpel, A. M., 1957.** Lecithinase production by strains of *Bacillus cereus* Fr. and Fr. pathogenic for the larch sawfly *Pristiphora erichsonii* (Htg.). *Can. J. Microbiol.* 3. 547.
- Kushner, D. J. et Heimpel, A. M., 1957.** Lecithinase production by strains of *Bacillus cereus* Fr. and Fr. pathogenic for the larch sawfly *Pristiphora erichsonii* (Htg.). *Can. J. Microbiol.* 3. 547.
- Lacey, L.A., Goettel, M.S., 1995.** Current developments in microbial control of insect pests and prospects for the early 21st century. *Entomophaga*, 40 (1), 3-27.
- Lacey, L. A., Fransen, J. J., and Carruthers, R. I., 1996.** Global distribution of naturally occurring fungi of *Bemisia*, their biologies and use as biological control agents. In: *Bemisia 1995: Taxonomy, Biology, Damage, and Management'* (Gerling, D. and Mayer, R., Eds.), pp. 401- 433. Intercept, Andover.
- Ladaniya, M. S., 2007.** Nutritive and medicinal value of *Citrus* fruits. In: Ladaniya, M. S., eds. *Citrus fruit biology, technology and evaluation*. Academic Press. 501-514.
- Latge, J.-P., Sampedro, L., Brey, P., et Diaquin, M., 1987.** Aggressivenessn of *Conidiobolus obscurus* against the pea aphid: influence of cuticular extracts on ballistospore germination of aggressive and nonaggressive strains. *J. Gen. Microbiol.*, 133, 1987-1997.
- Latif, A., and Yunus, C. M., 1951.** Food plants of *Citrus* leafminer in Punjab, *Bull. Ent.Res.* (London), 42, pp.311-316.
- Launois-Luong, M.H., Rachadi, T. et J.D., 1994.** Les biopesticides en lutte antiacridienne. *Insecte N°92*.pp1-5.
- Lebdi Grissa, K., Skander, M. , Mhafdhi, M., & BelHadj, R ., 2010.** Lutte intégrée contre la mineuse de la tomate, *Tuta absoluta* Meyrick (Lepidoptera: Gelechiidae) en Tunisie *Faunistic Entomology* 63 (3), 125-132.
- Lereclus, D., Arantes, O., Chaufaux, J. and Lecadet, M.M., 1989.** Transformation and expression of a cloned d-endotoxin gene in *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 60 211-218
- Liu, M., Chaverri, P., & Hodge, K. T., 2006.** A taxonomic revision of the insect biocontrol fungus *Aschersonia aleyrodis*, its allies with white stromata and their *Hypocrella* sexual states. *Mycol. Res.*, 110, 537-554.

- Liu, M., Rombach, M.C., Humber, R.A., & Hodge, K.T., 2005.** What's in a name? *Aschersonia insperata*: a new pleoanamorphic fungus with characteristics of *Aschersonia* and *Hirsutella*. *Mycologia*, 97, 246-253.
- Locke, M., 2001.** The Wigglesworth Lecture: Insects for studying fundamental problems in biology. *J. Insect Physiol.*, 47, 495-507.
- Loussert R., 1989.** Les agrumes production. Ed. sci. Univ., Vol. 2, Liban, 280p.
- Lucas Espada, A., 1995.** El minador de las hojas de los citricos *Phyllocnistis citrella* Stainton, estrategias para un control eficaz. *Levante Agrícola*. (330), 28-30.
- Luz, C. and Fargues, J., 1997.** Temperature and moisture requirement for conidial germination of an isolate of *Beauveria bassiana*, pathogenic to *Rhodnius prolixus*. *Mycopathologia* 138:117-125.
- Luz, C., Fargues, J., & Romana, C., 2003.** Influence of starvation and blood meal-induced moult on the susceptibility of nymphs of *Rhodnius prolixus* Stål (Hem., Triatominae) to *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. infection. *J. Appl. Entomol.*, 127, 153-156.
- Mahaney, W. C., Dohm, J. M., Baker, V. R., Newsom, H. E., Malloch, D., Hancock, R. G. V., Campbell, I., Sheppard, D., & Milner, M. W., 2001.** Morphogenesis of Antarctic paleosols: Martian analogue. *Icarus*, 154, 113-130.
- Mc Mullen, M.P. and Stack, R.W., 1983.** Effect of isolation techniques and media on the differential isolation of *Fusarium* species. *Phytopathology*, 73 :458-462.
- Mazih A., 1995.** Etat d'accueil des connaissances sur la mineuse des agrumes *Phyllocnistis citrella* Staiton. (Lepidoptera: Gracillariidae) au maroc et dans le pays récemment envahis, stratégie de lutte et de recherche future 6 th international symposium. *Phytoma-Espana*, citrus Health in the méditerranéen area.phytoma.16p.
- McCauley, V. J. E., Zacharuk, R. Y., & Tinline, R. D., 1968.** Histopathology of green muscardine in larvae of four species of Elateridae (Coleoptera). *J. Invertebr. Pathol.*, 12, 444-459.
- McCoy, C. W., Samson, R. A., & Boucias, D. G., 1988.** In C. M. Ignoffo (Ed.), *CRC Handbook of Natural Pesticides. Entomogenous fungi*, Vol. 5 (Part A) (pp. 151-236). Boca Raton: CRC Press.
- McCoy, A., Quintela, E.D. et Faria, M., 1990.** Environnemental Persistence of Entomopathogenic Fungi. In, *New direction in biological control*. R.R. Baker and P.E. Dunn (eds), A.R. Liss, New York.p. 139-159.
- Meca, A., Sepúlveda, B., Ogoña, J. C., Grados, N., Moret A., Morgan, M., & Tume, P., 2009.** In vitro pathogenicity of northern Peru native bacteria on *Phyllocnistis citrella*

- Stainton (Gracillariidae: Phyllocnistinae), on predator insects (*Hippodamia convergens* and *Chrisoperma externa*), on *Citrus aurantifolia* Swingle and white rats. Spanish Journal of Agricultural Research, 7(1), 137-145
- Meikle, W. G., Mercadier, G., Girod, V., Derouane, F., And Jones, W. A., 2007.** Les micro-champignons, nouvel espoir dans la lutte biologique contre *Varroa destructor*. Abeilles & cie. n°118 pp 14-19.
- Michelakis, S.E. et Vacante, V., 1997:** The *Citrus* leafminer status in Greece. *IOBC/WPRS Bull.*, 20 : 81–82.
- Miller, L.K., Lingg A.J. and Bulla L.A. Jr. 1983.** Bacterial, viral and fungal insecticides. *Science* 219:715-721.
- Mohammadi Sharif, M., Hadizadeh, A.R., and Tajick Ghanbary, M.A., 2010.** Evaluating Toxicity of Extracted Destruxin from *Metarhizium anisopliae* against *Citrus* Leafminer, *Phyllocnistis citrella*. *American Journal of Environmental Sciences* 6 (4): 379-382.
- Monteny, N., 1990.** Influence de facteurs biotiques et abiotiques, induits et naturels, sur l'efficacité larvicide de *Bacillus sphaericus* Neide, 1904.thèse de docteur en sciences. Université Paris sud centre d'Orsay.142p
- Morris, O. N. 1983.** Microorganisms isolated from forest insects in British Columbia. *J. Entomol. Sci. BC.* 80: 29-36.
- Nagamine, W.T., Heu, R.A., 2003.** Citrus leafminer, *Phyllocnistis citrella* Stainton : <http://www.hawaiiag.org/hdoa/npa/npa00-01-clminer2.pdf> (25 06 2010).
- Nielsen, C., Agrawal, A. A., & Hajek, A. E., 2010.** Ants defend aphids against lethal disease. *Biol. Lett.*, 6, 205-208.
- Notini, G., Mathlein, R., & Lihnell, D., 1944.** Green mycosis caused by *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. I. Green mycoses as a biological means of insect control. II. Physiological investigations on the green mycosis fungus. *Rev. Appl. Mycol.*, 25, 161-162.
- O'Donnell, K., Humber, R. A., Geiser, D. M., Kang, S., Park, B., Robert, V. A. R. G., Crous, P. W., Johnston, P. R., Aoki, T., Rooney, A. P., & Rehner, S. A., 2011.** Phylogenetic diversity of insecticolous fusaria inferred from multilocus DNA sequence data and their molecular identification via the Internet at FUSARIUM-ID and Fusarium MLST. *Mycologia*, 103. in press.
- OIE, 2008.** Varroose des abeilles mellifères. Manuel terrestre de l'organisation mondiale de la santé animale. Pp463-468.

- Ortu, S., G. Delrio, and Lentini, A., 1995.** (La minatrice serpentina degli agrumi in Italia: *Phyllocnistis citrella* Stainton (Lep.: Gracillariidae: Phyllocnistinae) Informatore Fitopatologico 45 (3): 38-41.
- Padmanaban, B., 1994.** Screening of *Citrus* germplasm for controlling *Citrus* leafminer, *Phyllocnistis citrella*, STAINTON (Lepido : Phyllocnistidae) Indian journal of Agricultural Sciences 64 (10), pp. 723 -726.
- Pandey, N.D. et Pandey Y. D., 1964.** Bionomics of *Phyllocnistis citrella* Stn. (Lepidoptera: Gracillariidae). Indian Journal of Entomology (New Delhi), 26: 417-423.
- Pava-Ripoll M., Angelini C. Fang W. Wang S. Posada F. J., and St. Leger R., 2011.** The rhizosphere-competent entomopathogenic *Metarhizium anisopliae* expresses a specific subset of genes in plant root exudate. Microbiology 157: 47 – 55.
- Pedrini, N., Crespo, R., & Juarez, M. P., 2007.** Biochemistry of insect epicuticle degradation by entomopathogenic fungi. Comp. Biochem. Physiol. C, 146, 124-137.
- Perchat S.A, Buisson C.A, Chaufaux J.A, Sanchis V.A, Lereclus D. A., Gohar M. A.B., 2005.** *Bacillus cereus* produces several nonproteinaceous insecticidal exotoxins. Journal of Invertebrate Pathology (90).pp. 131–133.
- Poinar, G.O. & Thomas, G.M., 1985.** Laboratory guide to insect pathogens and parasite, Plenum Presses, New York, 329 p.
- Praloran J. C- 1971.** Les agrumes maisonneuve et larose ed.paris, 565p.
- Priyatno, T. P. & Ibrahim, Y.B., 2002.** Free fatty acids on the integument of the striped flea beetle, *Phyllotreta striolata* F., and their effects on conidial germination of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus*. Pertanika J. Trop. Agric. Sci., 25, 115-120.
- Quillici, S., Franck, A., Vincennot, D. et Montagneux B., 1995.** Un nouveau ravageur des agrumes à la Réunion, la mineuse des agrumes *Phyllocnistis citrella* Stainton, *Phytoma*, 474 : 37–40.
- Rammane, K., Hongpattarakere, T., 2011.** Effects of tropical Citrus essential oils on growth, aflatoxin production, and ultrastructure alterations of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. Food and Bioprocess Technology. 4, 1050-1059.
- Ramoska, W.A., 1984.** The influence of relative humidity on *Beauveria bassiana* infectivity and replication in the ching bug, *Blissus leucopterus*. J . Invertebr Patho.43:389-394.
- Rangel, D. E. N., Anderson, A. J., & Roberts, D. W., 2008.** Evaluating physical and nutritional stress during mycelial growth as inducers of tolerance to heat and UV-B radiation in *Metarhizium anisopliae* conidia. Mycol. Res., 112, 1362-1372.

- Rangel, D. E. N., Braga, G. U. L., Anderson, A. J., & Roberts, D. W. , 2005.** Variability in conidial thermotolerance of *Metarhizium anisopliae* isolates from different geographic regions. *J. Invertebr. Pathol.*, 88, 116-125.
- Rapilly, F., 1968.** Les techniques de mycologie en pathologie végétale. *Ann. Epiphyt.*, Institut National de la Recherche Agronomique, 19, 101 p.
- Read, N. D., Fleißner, A., Roca, M. G., & Glass, N. L., 2010.** Hyphal fusion. In K. A. Borkovich & D. J. Ebbole (Eds.), *Cellular and Molecular Biology of Filamentous Fungi* (pp. 260-273). Washington, DC: American Society for Microbiology Press.
- Rehner, S.A., Minnis, A.M., Sung, G.H., Luangsa-ard, J.J., Devotto, L., & Humber, R.A., 2011).** Phylogeny and systematics of the anamorphic, entomopathogenic genus *Beauveria*. *Mycologia*, 103, 1055-1073.
- Riba, G. et Marcandier.S, 1984.** Influence de l'humidité relative sur l'agressivité des souches de beauveria bassiana (Bals) Vuillemin et de metarhizium anisoplaie (metsh.) Sorokin Hyphomycetes pathogenes de la pyrale du maïs *Ostrinia nubilalis* Hubn. *Agronomie* 4: 189-194.
- Rizqi, A., M. Nia, M. Abbassi and A., Rochd. 2003.** Establishment of exotic parasitoids of *Citrus* leafminer, *Phyllocnistis citrella*, in *Citrus* groves in Morocco. *IOBC/WPRS Bulletin* 26(6): 1-6.
- Roberts, D. W. et Campbell A. S., 1977.** Stability of entomopathogenic fungi. *Misc Publ. Entomol Soc. Am.* 10: 19-76.
- Roddam, L.F., & Rath, A.C., 1997.** Isolation and characterization of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* from subantarctic Macquarie Island. *J. Invertebr. Pathol.*, 69, 285-288.
- Rosengaus, R.B., Maxmen, A.B., Coates, L.E., & Traniello, J.F.A., 1998.** Disease resistance: a benefit of sociality in the dampwood termite *Zootermopsis angusticollis* (Isoptera: Termopsidae). *Behav. Ecol. Sociobiol.*, 44, 125-134.
- Roy, H. E., Steinkraus, D., Eilenberg, J., Hajek, A. E., & Pell, J. K., 2006.** Bizarre interactions and endgames: entomopathogenic fungi and their arthropod hosts. *Annu. Rev. Entomol.*, 51, 331-357.
- Sabine, B.N.E. , 1971.** Citrus leafminer. *Queensland Agr. J.*, 97: 127–129.
- Saharaoui, L., Benzara, A. et Doumandji-Mitiche, B., 2001:** Dynamique des populations de *Phyllocnistis citrella* Stainton (1856) et impact de son complexe parasitaire en Algérie. Note technique. *Fruits*, 56 : 403–413.

- Saik, J. E., L. A. Lacey et C. M. Lacey., 1990.** Safety of microbial insecticides to vertebrates - domestic animals and wildlife. In: Safety of microbial insecticides. Laird, M., L. A. Lacey & E. D. Davidson edd. CRC Press Inc., Florida: 116-130.
- Samson, R.A., Evan, S. H.C. et Latg, J.P., 1988.** Atlas of entomopathogenic fungi. Springer, Berlin Heidelberg New York.
- Samuels, K.D.Z., Pinnock, D.E. et Bull, R.M., 1990.** Scarabeid larvae control in sugarcane using *M. anisopliae*. Journal of invertebrate pathology. 55 : 135-137.
- Sasscer, E.R. 1915.** Important insect pests collected on imported nursery stock in 1914. J. Econ.Ent. 8:268-270.
- Sato, H., Ban, S., Masuya, H., & 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.
- Schabel, H.G., 1976.** Green muscardine disease of *Hylobius pales* (Herbst) (Coleoptera: curculionidae). Z. Angew.entomol. 81, 413-421.
- Schneider-orelli, O., 1947.** Entomologisches praktikum-Einführung in die land-un forstwirtschaftliche insektenkunde.Sauerlander and co., aarau, Germany.
- Schoch, C. L., Sung, G.-H., Lo´pez-Gira´ldez, F., Townsend, J. P., Miadlikowska, J., Hofstetter, V., Robbertse, B., Matheny, P. B., Kauff, F., Wang, Z., Gueidan, C., Andrie, R. M., Trippe, K., Ciuffetti, L. M., Wynns, A., Fraker, E., Hodkinson, B. P., Bonito, G., Groenewald, J. Z., Arzanlou, M., de Hoog, G. S., Crous, P. W., Hewitt, D., Pfister, D. H., Peterson, K., Gryzenhout, M., Wingfield, M. J., Aptroot, A., Suh, S.-O., Blackwell, M., Hillis, D. M., Griffith, G. W., Castlebury, L. A., Rossman, A. Y., Lumbsch, H. T., Lücking, R., Büdel, B., Rauhut, A., Diederich, P., Ertz, D., Geiser, D. M., Hosaka, K., Inderbitzin, P., Kohlmeyer, J., Volkmann-Kohlmeyer, B., Mostert, L., O’Donnell, K., Sipman, H., Rogers, J. D., Shoemaker, R. A., Sugiyama, J., Summerbell, R. C., Untereiner, W., Johnston, P. R., Stenroos, S., Zuccaro, A., Dyer, P. S., Crittenden, P. D., Cole, M. S., Hansen, K., Trappe, J. M., Yahr, R., Lutzoni, F., & Spatafora, J. W. 2009.** The Ascomycota tree of life: a phylum-wide phylogeny clarifies the origin and evolution of fundamental reproductive and ecological traits. Syst.Biol., 58, 224-239.
- Schrank, A., & Vainstein, M.H., 2010.** *Metarhizium anisopliae*, enzymes and toxins. Toxicon, 56, 1267-1274. Sciences, Arizona: USA, <http://cals.arizona.edu/crops/citrus/insects/leafminer.htm>

- Shah, P. A., Douro-Kpindou, O.-K., Sidibe, A., Daffe, C. O., van der Pauuw, H., & Lomer, C. J. (1998).** Effects of the sunscreen oxybenzone on field efficacy and persistence of *Metarhizium flavoviride* conidia against *Kraussella amabile* (Orthoptera: Acrididae) in Mail, West Africa. *Biocontrol Sci. Technol.*, 8, 357-364.
- Shapiro, J.P., Schroeder, W.J., & Stansly, P.A., 1998.** Bioassay and efficacy of *Bacillus thuringiensis* and anorganosilicone surfactant against the citrus leafminer (Lepidoptera: Phyllocnistidae). *The Florida Entomologist* **81**, p. 201-210.
- Silvy, C. et Riba, G. 1989.** Biopesticides contre maladies, insectes, mauvaise herbe. Dossier de l'environnement, N° J 9, pp 157-20.
- Singer, S., 1981.** Potential of *Bacillus Sphaericus* and related spore-forming bacteria for pest control. In: Burgess, H. D. (ed.) *Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970-1980*. Academic Press, New York, pp. 283-98.
- Sinha, M. K., Batra, R. C., et Uppeld, K., 1972.** Role of citrus leaf-miner (*Phyllocrinistis citrella* Stainton), on the prevalence and severity of citrus canker (*Xanthionus citri* (Hasse) Dowson). *Madras agric. J.* 59: 240-245.
- Smith, R.J. and Grula, E.A., 1982.** Toxic components on the larval surface of the corn earworm (*heliopsis zea*) and their effects on germination and growth of *Beauveria bassiana*. *J.invertebr.Pathol.*39:15-22.
- So, F.V., Guthrie, N., Chambers, A.F., Moussa, M., Carroll, K.K., 1996.** Inhibition of human breast cancer cell proliferation and delay of mammary tumorigenesis by flavonoids and citrus juices. *Nutrition and Cancer.* 26, 167-181.
- Sohi , G.S., et Anohmu , S., 1968.** Relationship between citrus leaf-miner (*Phyllocnistis citrella* Stainton) injury and citrus canker (*Xanthomonas citri* (Hasse) Dowson) incidence on citrus leaves. *J. Res. Punjab agric. Univ.* 5: 66-69.
- Solomon, M.E., 1951.** Control of humidity with potassium hydroxide, sulphuric acid, or other solutions. *Bulletin of Entomological Research*, 42, 543-554.
- Soper, R. S., Shimazu, M., Humber, R. A., Ramos, M. E. & Hajek, A. E., 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.
- Sosa-Gomez, D. R., Boucias, D. G., & Nation, J. L., 1997.** Attachment of *Metarhizium anisopliae* to the southern green stink bug *Nezara viridula* cuticle and fungistatic effect of cuticular lipids and aldehydes. *J. Invertebr. Pathol.*, 69, 31-39.
- Sosthène, K.K.H., 2011.** Study of the effect of waxes on the biological activity of essential oils against *Penicillium italicum* Wehmer and *P. digitatum* Sacc, two postharvest

- pathogens of citrus fruits. Thèse de docteur en sciences agronomiques et ingénierie biologique. Université de Liège, Belgique. 170p
- St. Léger, R.J., Cooper, R.M. et Charnley, A.K., 1991.** Characterization of chitinase and chitinase produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. J Invertebr Pathol 58:415-426.
- Stainton, M.T., 1956.** Description of three species of India micro-lepidoptera Trans. FNT.SOC.London 3:301-304
- Starnes, R.L., Liu, C.L. et Marone P.G., 1993.** History, use and future of microbial insecticides. Amer. Entomol. 39: 83-91.
- Stathers, T.E., D, Moore., & Prior, C., 1993.** The effects of different temperatures on the viability of *Metarhizium flavoviride* conidia stored in vegetable and mineral oils. J. Invertebr. Pathol. 62: 111-115.
- Steinhaus, E. A., 1956.** Principles of insect pathology. McGraw Hill Book. Co. Inc., Toronto. 757p. Steinhaus, E. A., 1963. Insect pathology advanced treatise. Academic Press. New York, vol. 1: 661p., vol.2: 689p.
- Sung, G.-H., Hywel-Jones, N. L., Sung, J.-M., Luangsa-ard, J. J., Shrestha, B., & Spatafora, J.W., 2007.** Phylogenetic classification of Cordyceps and the clavicipitaceous fungi. Stud Mycol., 57, 5-59.
- Sung, G.-H., Hywel-Jones, N. L., Sung, J.-M., Luangsa-ard, J. J., Shrestha, B., & Spatafora, J. W., 2007.** Phylogenetic classification of Cordyceps and the clavicipitaceous fungi. Stud. Mycol., 57, 5-59.
- Taylor, J.W., 1995.** Making the Deuteromycota redundant: a practical integration of mitosporic and meiosporic fungi. Can. J. Bot., 73S, S754-S759.
- Tevini, M. 1993.,** Molecular biological effects of ultraviolet radiation. In M. Tevini (Ed.), UV-B Radiation and Ozone Depletion: Effects on Humans, Animals, Plants, Microorganisms, and Materials (pp. 1-15). Boca Raton: Lewis Publishers.
- Timmer, L.W., Garnsey, S.M. & Broadbent, P., 2003.** Diseases of *Citrus*, in: Ploetz, R.C. (Eds.), *Diseases of tropical fruit crops*. CABI Publishing, Wallingford, pp 163-195.
- To, W.N., Gudauskas, R.T., Harper, J.D., 1975.** Pathogenicity of *Bacillus cereus* isolated from *Trichoplusia ni* larvae. J. Invertebr. Pathol 26, 135-136.
- Tosi, S., Caretta, G., & Humber, R. A., 2004.** *Conidiobolus antarcticus*, a new species from continental Antarctica. Mycotaxon, 90, 343-347.

- Tourmanoff, C. 1953.** Description de quelques souches entomophytes de *Bacillus cereus* Frank. and Frank. avec remarques sur leur action et celle d'autres bacilles sur le jaune d'oeuf, Ann. Inst. Pasteur, 85, 90.
- Tucker, D. L., Beresford, C. H., Sigler, L., & Rogers, K., 2004.** Disseminated *Beauveria bassiana* infection in a patient with acute lymphoblastic leukemia. J. Clin. Microbiol., 42, 5412-5414.
- Van Lenteren , J.C., 1997.** Benefits and risks of introducing exotic macro-biological central agents into Europe. *Bulletin OEPP/EPPC*, 27, 15-27.
- Veen, K. H. (1968).** Recherches sur la maladie, due à *Metarhizium anisopliae* chez le criquet pelerin. Mededel. Landbouwhogeschool Wageningen, 68, 1-77.
- Vega, F.E., Jackson, M.A., & McGuire, M.R., 1999.** Germination of conidia and blastospores of *Paecilomyces fumosoroseus* on the cuticle of the silverleaf whitefly, *Bemisia argentifolii*. Mycopathologia, 147, 33-35.
- Vega, F.E., & Dowd, P. F., 2005.** The role of yeasts as insect endosymbionts. In F. E. Vega & M. Blackwell (Eds.), *Insect- Fungal Associations: Ecology and Evolution* (pp. 211-243). New York: Oxford University Press.
- Vega, F. E., Meyling, N.V., Luangsa-ard, J..J. and Blackwell, M., 2012.** Fungal Entomopathogens. *Insect Pathology*. Elsevier Inc.150p.
- Vercher, R., Costa-Comelles, J., Marzal, C. Et García-Marí, F., 2005.** Recruitment of native parasitoid species by the invading leafminer *Phyllocnistis citrella* (Lepidoptera: Gracillariidae) on citrus in Spain. *Envir. Entomol.*, 34 (5) : 1129-1138.
- Vey, A., & Fargues, J., 1977.** Histological and ultrastructural studies of *Beauveria bassiana* infection in *Leptinotarsa decemlineata* larvae during ecdysis. J. Invertebr. Pathol., 30, 207-215.
- Vidal, C., Fargues, J., & Lacey, L. A., 1997.** Intraspecific variability of *Paecilomyces fumosoroseus*: effect of temperature on vegetative growth. J. Invertebr. Pathol., 70, 18-26.
- Vincent, C., et Coderre, D., 1992b.** La lutte biologique à la croisée des chemins. In C. Vincent et D. Coderre : *La lutte biologique*. Gaëtan Morin, Québec, 645-650.
- Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernandez-Lopez, J., Perez-Alvarez, J., 2008.** Antifungal activity of lemon (*Citrus lemon* L.), mandarin (*Citrus reticulata* L.), grapefruit (*Citrus paradisi* L.) and orange (*Citrus sinensis* L.) essential oils. *Food Control*. 19, 1130-1138.
- Waage, J., 1997.** Global developments in biological control and the implications for Europe. *Bulletin OEPP/EPPC*, 27, 5-13.

- Wang, C., & St. Leger, R. J., 2007a.** The MAD1 adhesin of *Metarhizium anisopliae* links adhesion with blastospore production and virulence to insects, and the MAD2 adhesin enables attachment to plants. *Eukaryot. Cell*, 6, 808-816.
- Wang, C., & St. Leger, R. J., 2007b.** The *Metarhizium anisopliae* perilipin homolog MPL1 regulates lipid metabolism, appressorial turgor pressure, and virulence. *J. Biol. Chem.*, 282, 21110-21115.
- Warren, G.W., Koziel, M.G., Mullins, M.A., Nye, G.J., Carr, B., Desai, N.M., Kostichka, K., Duck, N.B., Estruch, J.J., 1996.** Novel Pesticidal Proteins and Strains. World Intellectual property organisation. Patent WO 96/10083
- White, M. M., James, T. Y., O'Donnell, K., Cafaro, M. J., Tanabe, Y., & Sugiyama, J. 2006.** Phylogeny of the Zygomycota based on nuclear ribosomal sequence data. *Mycologia*, 98, 872-884.
- Willis, J. H., Iconomidou, V. A., Smith, R. F., & Hamodrakas, S. J., 2005.** Cuticular proteins. In L. I. Gilbert, K. Iatrou & S. S. Gill (Eds.), *Comprehensive Molecular Insect Science*, Vol. 4 (pp. 79-109). Oxford: Elsevier.
- Wilson, K., & Reeson, A. F., 1998.** Density-dependent prophylaxis evidence from Lepidopterae baculovirus interactions? *Ecol. Entomol.*, 23, pp.100-101.
- Wilson, K., Cotter, S. C., Reeson, A. F., & Pell, J. K., 2001.** Melanism and disease resistance in insects. *Ecol. Lett.*, 4, 637-649.
- Wilson, K., Thomas, M. B., Blanford, S., Doggett, M., Simpson, S. J., & Moore, S. L., 2002.** Coping with crowds: density-dependent disease resistance in desert locusts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99, 5471-5475.
- Wraight, S. P., Jackson, M. A., & de Kock, S. L., 2001.** Production, stabilization and formulation of fungal biocontrol agents. In T. M. Butt, C. Jackson & N. Magan (Eds.), *Fungi as Biocontrol Agents* (pp. 253e287). Wallingford: CABI Publishing.
- Wright, R.J. & Roberts, D., 1987.** Insect control effort with fungi. *Developments in industrial microbiology* 28, p. 77-87.
- Yanagawa, A., Yokohari, F., & Shimizu, S., 2008.** Defense mechanism of the termite, *Coptotermes formosanus* Shiraki, to entomopathogenic fungi. *J. Invertebr. Pathol.*, 97, 165-170.
- Yek, S.-H., & Mueller, U. G., 2011.** The metapleural gland of ants. *Biol. Rev.*, 91, 201-224.
- Zacharuk, R. Y., 1970.** Fine structure of the fungus *Metarhizium anisopliae* infecting three species of larval Elateridae (Coleoptera). III. Penetration of the host integument. *J. Invertebr. Pathol.*, 15, 372-396.

- Zare, R., Gams, W., & Evans, H. C., 2001.** A revision of *Verticillium* section *Prostrata*. V. The genus *Pochonia*, with notes on *Rotiferophthora*. *Nova Hedwigia*, 73, 51-86.
- Zhang, A., OLeary, V.C., et Quarles, W., 1994.** Chinese IPM for citrus leafminer, *IPM*
- Zimmermann, G., 1982.** Effect of high temperatures and artificial sunlight on the viability of conidia of *Metarhizium anisopliae*. *J. Invertebr. Pathol.*, 40, 36e40. *Practitioner*, 16 (8):10-12.
- Zimmermann, G., 2007.** Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. *Biocontrol Sci. Technol.*, 17, 553-596.

Annexe 1

Tableau 1 : Mortalité corrigée (%) des larves de *P. citrella* traitées par *Metarhizium anisopliae* var *anisopliae*.

	1	2	3	4	5	6	7	8
10^6	6,67	50	31,03	62,50	98,18	100		
10^5	10	23,33	79,31	85,72	92,72	96,37	100	
10^4	5	21,67	36,21	69,65	92,72	96,37	100	
10^3	0	15	74,14	82,14	85,46	90,91	90,74	100
10^2	0	0	22,42	23,21	25,46	25,46	51,86	77,78

Tableau 2 : Mortalité corrigée (%) des larves de *P. citrella* traitées par *Fusarium semitectum*

	1	2	3	4	5	6	7
10^6	10	50	75	90	100	100	100
10^5	5	35	70	85	90	95	100
10^4	5	30	60	75	75	95	95
10^3	0	20	40	45	55	60	70
10^2	0	15	20	25	30	50	55

Tableau 3 : Mortalité corrigée (%) des larves de *P. citrella* traitées par *Aspergillus flavus*

	1	2	3	4	5	6	7	8
10^6	6,67	10,66	13,33	18,33	39,66	69,65	96,37	100
10^5	1,67	2,67	3,66	5	6,9	64,29	87,27	96,4
10^4	0	1,67	2,66	3,33	1,73	17,85	54,54	92,69
10^3	0	1,33	2,33	3,33	1,73	12,49	43,63	85,49
10^2	0	0	0	0	0	0	0	45,46

Tableau 4 : Mortalité corrigée (%) des larves de *P. citrella* traitées par *Metarhizium anisopliae* var *acridum*

	1	2	3	4	5	6	7	8
10^6	6,67	18,33	69,65	96,37	100			
10^5	1,67	5	64,29	87,27	96,40	100		
10^4	0	3,33	17,85	54,54	92,69	96,30	100	
10^3	0	3,33	12,49	43,63	85,49	94,44	96,30	97,33
10^2	0	0	5,36	27,27	45,46	55,56	81,48	85,56

Tableau 5 : Mortalité corrigée (%) des larves de *P. citrella* traitées par *Metarhizium flavoviride* var *minus*

	1	2	3	4	5	6	7
10^6	23,33	87,93	100				
10^5	15	27,59	89,29	98,18	100		
10^4	6,67	25,86	73,21	92,72	100		
10^3	3,33	24,14	55,35	92,72	96,37	98,14	100
10^2	0	20,69	41,07	87,27	96,37	98,14	100

Tableau 6: Mortalité corrigée(%) des larves de *P. citrella* traitées par *Beauveria bassiana*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
10^6	35	60	62	71	73	78	85	87	87
10^5	35	53	62	65	71	76	84	86	87
10^4	10	43	51	55	65	70	72	74	75
10^3	10	20	46	50	55	60	65	65	67
10^2	10	12	16	24	24	26	27	27	27

Tableau 7 : Mortalité corrigée (%) des œufs de *P. citrella* traités par *Aspergillus flavus*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
10^2	0	1	3	4	6	8,08	10,10	11,11	14,14
10^4	0	1	4	6	8	8,99	11,99	14,99	17,99
10^6	0	2	4	7	9	11,11	15,15	18,18	21,21

Tableau 8 : Mortalité corrigée (%) des œufs de *P. citrella* traités par *Metarhizium anisopliae* var *anisopliae*.

	1	2	3	4	5	6	7	8
10^2	0	2	4	6,06	9,09	11,11	15,15	2,72
10^4	0	3	6	10,10	14,14	17,17	21,21	3,05
10^6	2	6	10	14,14	18,18	25,25	27,27	3,31

Tableau 9 : Mortalité corrigée (%) des œufs de *P. citrella* traités par *Fusarium semitectum*

	1	2	3	4	5	6	7
10^2	0	7	15	15,79	16,67	22,22	27,78
10^4	0	25	50	21,05	24,44	38,89	44,44
10^6	5	35	70	84,21	88,89	94,44	100

Tableau 10 : Mortalité corrigée (%) des œufs de *P. citrella* traités par *Metarhizium flavoviride* var *minus*

	1	2	3	4	5
10^2	0	0	0	0	1
10^4	0	85	85	90	100
10^6	0	10	95	95	100

Tableau 11 : Mortalité corrigée (%) des œufs de *P. citrella* traités par *Beauveria bassiana*

	1	2	3	4	5
10^2	0	0	0	0	1
10^4	0	20	20	20	50
10^6	0	20	20	20	80

Tableau 12 : Mortalité corrigée (%) des œufs de *P. citrella* traités par *Metarhizium anisopliae* var *acridum*

	1	2	3	4	5
10^2	0	0	0	1	0
10^4	0	0	40	50	80
10^6	0	20	50	70	100

Annexe 2

Tableau1 : Effet des températures sur la croissance mycélienne (mm) de *Metarhizium flavoviride* var *minus*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
05°C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10°C	0	0	2,5	5,17	8,5	10,33	13,17	17,83	20,17	21,33
15°C	0	10	12,83	15,33	18	20,67	23	25,83	29	32,83
20°C	0	12,5	25	27,5	33,67	36,5	39,5	40		
25°C	0	20	27,83	36,17	39,67	40				
30°C	0	22	33,67	39,5	40					
35°C	0	23	35,83	40						
40°C	0	0	0	5,83	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5

Tableau 2: Effet des températures sur la croissance mycélienne (mm) de *Metarhizium anisopliae* var *acridum*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
5°C	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10°C	0	10	12,5	14,83	17,33	20	23,17	25,5	28,17
15°C	0	17,17	19,67	21,67	23	25,17	28,17	30,33	33,17
20°C	0	22,5	24,83	27,67	30,33	32,67	35,17	37,33	40
25°C	0	22,83	25,5	29,33	32,83	34,83	37,33	39,67	40
30°C	0	27,5	30	35	40				
35°C	0	25,33	29,67	35,5	40				
40°C	0	0	1,17	3,5	5	5	5	5	5

Tableau 3 : Effet des températures sur la croissance mycélienne (mm) de *Beauveria bassiana*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
05°C	0	0	0	0	0	0,17	0,17	0,33	0,33	0,33	0,33
10°C	0	0	2,5	4,5	6,17	7,83	9	10,5	12,5	14,33	17
15°C	0	1,5	3,83	5,33	9,33	11,5	15,17	21,67	26,33	31	33,83
20°C	0	10	19	27,33	30,67	33,83	35,33	37,83	40		
25°C	0	5	6,67	9,33	17,17	21,33	25	34	37,5	40	
30°C	0	1,5	3,83	5,33	7,17	9,17	10,67	16,83	20,33	32,17	40
35°C	0	0	1,33	4,83	6,17	9,33	10,83	13	15,33	24,17	28
40°C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tableau 4 : Effet des températures sur la croissance mycélienne (mm) de *Fusarium semitectum*

	1	2	3	4	5	6	7	8
05°C	0	0	0	0	0	0	0	0
10°C	0	0	0	0	1	2,5	3,5	5
15°C	0	2	4	10	14,83	17,83	20,67	24,17
20°C	0	3	5	9,83	16	23,83	30	34,5
25°C	0	3,5	11	20,5	33,83	36	38,5	40
30°C	0	3,17	8	12,5	16,33	21,83	30,5	39,33
35°C	0	2,67	8	10,5	15	18	19,5	23,33
40°C	0	0	0	0	0	0	0	0

Tableau 5 : Effet des températures sur la vitesse de croissance (mm/j) des souches fongiques testées

Températures	<i>M.flavoviride</i>	<i>M.anisopliae</i>	<i>B.bassiana</i>	<i>F.semitectum</i>
05°C	0	0	0,02	0
10°C	1,72	4,33	0,58	0,57
15°C	5,11	5,75	1,85	1,33
20°C	9,17	7,58	0,77	2,64
25°C	12,06	8,21	2,02	0,88
30°C	13,17	10	1,40	3,29
35°C	13,33	10	0,75	1,19
40°C	1,94	1,25	0	0

Tableau 6: Effet des taux d'humidités sur la croissance mycélienne (mm) de *Metarhizium flavoviride* var *minus*

	1	2	3	4	5	6	7
14%	0	0	0	0	0	0	0
50%	0	0	0	0	0	0	0
73%	5	17	23,5	35,5	39	40	40
80%	2,5	10,5	18,5	27	31,5	37,5	38,5
84%	2	8,5	12,5	17,5	27	35	37,5
95%	2	7,5	12,5	14,5	23,5	32,5	32,5
100%	0	2,5	5	10	10	10	12,5

Tableau7: Effet des taux d'humidités sur la croissance mycélienne (mm) de *Metarhizium anisopliae* var *acridum*

Jours	1	2	3	4	5	6
Humidités						
14%	0	0	0	0	0	0
50%	0	0	0	0	0	0
73%	7,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5
80%	10	15	15	15	15	15
84%	17,5	17,5	32,5	32	32	32
95%	18,5	26,5	31,5	32	32	32,5
100%	0	0	0	0	0	0

Tableau 8: Effet des taux d'humidités sur la croissance mycélienne (mm) de *Beauveria bassiana*

Jours	1	2	3	4	5	6
Humidités						
50%	0	0	0	0	0	0
73%	7,5	12,5	12,5	13,5	13,5	14
80%	11,5	18	20	25	27	27,5
84%	11,5	18	20	26,5	28	28
95%	11,5	17,5	21,5	29	30	30
100%	12,5	27,5	30	32	32	32

Tableau 9: Effet des taux d'humidités sur la croissance mycélienne (mm) de *Fusarium semitectum*

Jours	1	2	3	4	5	6
Humidités						
50%	0	0	0	0	0	0
73%	1	1	1	1	1	1
80%	2	2,5	2,5	2,5	4	4
84%	4	4	4	4	4	4
95%	12,5	15,5	21,5	32	34	34
100%	14	22,5	32,5	32,5	32,5	32,5

Tableau 10 : Effet des taux d'humidité sur la vitesse de croissance (mm/j) des souches fongiques testées

Humidités	<i>M. flavoviride</i>	<i>M. anisopliae</i>	<i>B. bassiana</i>	<i>F. semitectum</i>
14%	0	0	0	0
50%	0	0	0	0
73%	7	1,67	1,83	0,08
80%	7	1,67	3,33	0,33
84%	6,6	4,33	3,50	0,17
95%	6,1	4,5	3,92	4,50
100%	2	0	4,5	4,08

Tableau 11: Effet des niveaux de pH sur la croissance mycélienne (mm) de *Metarhizium flavoviride* var *minus*

Jours	2	3	4	5	6	7
pH						
4,6	7,5	11,5	17,5	30	32,5	32,5
5,1	6,5	11	17	29	31,5	31,5
5,9	6	11	16	27	31,5	31,5
6,8	6	10	15,5	26	30,5	30,5
7,1	6	9,5	15	25	29	29,5
8,1	6,5	10	15,5	26	30	30
4,1	6	9,5	15	25	29	30

Tableau 12: Effet des niveaux de pH sur la croissance mycélienne (mm) de *Metarhizium anisopliae* var *acidum*

Jours	2	3	4	5	6	7
pH						
5,1	20	32,5	32	32	32	32
5,9	20,5	33	33	33	33	33
6,8	20	32,5	32,5	32,5	32,5	32,5
7,1	20	32,5	32	32	32	32
8,1	20,5	33	33	33	33	33
4,1	20	32,5	32	32	32	32,5

Tableau 13: Effet des niveaux de pH sur la croissance mycélienne de *Beauveria bassiana*

Jours	1	2	3	4	5	6	7
pH							
5,1	8	15	22	31	32,5	34	34
5,9	8,5	15,5	22,5	30,5	32,5	33,5	33,5
6,8	7,5	15	21	30,5	31,5	34	34
7,1	7	15,5	21	30,5	31,5	34,5	34,5
8,1	6,5	15	21	30,5	31,5	34,5	34,5
4,1	7	15,5	21	30,5	31,5	34,5	34,5

Tableau 14: Effet des niveaux de pH sur la croissance mycélienne (mm) de *Fusarium semitectum*

Jours	1	2	3	4	5	6	7
pH							
4,1	7,5	15	17,5	20	25	32,5	36
4,6	7,5	15,5	19,5	21	26,5	35	38
5,1	9	15	17,5	20	25	32,5	38,5
5,9	8	14,5	17	21	26	34	39
6,8	7,5	15	17,5	20	25	32,5	36
7,1	7,5	15,5	19,5	21	26,5	35	38
8,1	9	15	17,5	20	25	32,5	38,5

Tableau 15: Effet des niveaux de pH sur la vitesse de croissance (mm/j) des souches fongiques testées

pH	<i>M.flavoviride</i>	<i>M.anisopliae</i>	<i>B.bassiana</i>	<i>F.semitectum</i>
4,1	5,25	4,58	4,25	4,75
4,6	5,08	4,17	4,33	5,08
5,1	5	4,25	4,17	4,92
5,9	4,92	4,17	4,42	5,17
6,8	4,75	4,08	4,58	4,75
7,1	4,58	4,25	4,67	5,08
8,1	4,83	4,17	4,58	4,92

Tableau 16 : Effet de la lumière et l'obscurité sur la croissance mycélienne (mm) de *Metarhizium flavoviride* var *minus*

	1	2	3	4	5	6	7
lumière	0,5	2,3	4,8	7,5	8,5	8,5	8,5
obscurité	0,5	2,3	5	7	8	8	8

Tableau 17: Effet de la lumière et l'obscurité sur la croissance mycélienne (mm) de *Metarhizium anisopliae* var *acridum*

	1	2	3	4	5	6	7
lumière	0,8	2,5	4,8	7,3	8,5	8,5	8,5
obscurité	0,8	2,5	4,6	7,4	8,5	8,5	8,5

Tableau 18: Effet de la lumière et l'obscurité sur la croissance mycélienne de *Beauveria bassiana*

	1	2	3	4	5	6	7
lumière	0,6	2,3	4,6	7,2	8	8,4	8,5
obscurité	0,6	2,3	4,6	7,2	8	8,1	8,4

Tableau 19 : Effet de la lumière et l'obscurité sur la croissance mycélienne (mm) de *Fusarium semitectum*

	1	2	3	4	5	6	7
lumière	0,3	1,5	3	5	7	8	8,5
obscurité	0,2	1,3	2,6	4,5	6,5	7,5	7,5

Tableau 20: Effet de la lumière et l'obscurité sur la vitesse de croissance (mm/j) des souches fongiques testées

	<i>M. flavoviride</i>	<i>M. anisopliae</i>	<i>B. bassiana</i>	<i>F. semitectum</i>
Lumière	10	9,63	7,4	6,5
Obscurité	9,38	9,63	6,4	5,5

Tableau 21: Effet des températures sur la sporulation ($\times 10^6$ spores/ml) des souches fongiques testées

Températures	MA	MF	B	F
05°C	0	0	0	0
10°C	0	0	1.2	0
15°C	5	7	10	5
20°C	8	12	18	19
25°C	13	15	15	23
30°C	20	19	12	16
35°C	15	23	0.08	0
40°C	3	4	0	0

Tableau 22: Effet des niveaux de pH sur la sporulation ($\times 10^6$ spores/ml) des souches fongiques testées

pH	MF	MA	B	F
4,1	8,8	8,2	8	8,2
4,6	8,9	8,3	8	8,2
5,1	8,9	8,7	8	8,2
5,9	8,9	8,8	8	8,2
6,8	9	8,6	8,1	8,3
7,1	9,1	8,5	8,3	8,6
8,1	8,8	8,4	8,1	8,3

Tableau 23: Effet des taux d'humidités sur la sporulation ($\times 10^6$ spores/ml) des souches fongiques testées

Humidités	MA	MF	B	F
14%	0	0	0	0
50%	0	0	0	0
73%	5	18	2	0,8
80%	9	15	7	1,8
84%	12	13	10	2,9
95%	18	12	13	15
100%	17	12	16	18

Tableau 24 : Effet de la lumière et l'obscurité sur sporulation ($\times 10^6$ spores/ml) des souches fongiques testées

	MF	MA	B	F
lumière	23	20	23	24
obscurité	18	15	20	14

Annexe 3

Tableau 1 : Analyse de variance de l'effet de température sur la croissance mycélienne des quatre souches fongique testées.

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
Var.Totale	1683,502	95	17,721				
Var.Facteur 1	540,269	7	77,181	76638,65	0		
Var.Facteur 2	642,905	3	214,302	212794,9	0		
Var.Inter F1*2	500,264	21	23,822	23654,63	0		
Var.Residuelle 1	0,064	64	0,001			0,032	0,89%

Facteur 1 : étages de température ; Facteur 2 : Espèces fongiques

Tableau 2: Analyse de variance de l'effet de l'humidité sur la croissance mycélienne des quatre souches fongique testées.

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
Var.Totale	501,633	83	6,044				
Var.Facteur 1	230,546	6	38,424	519,465	0		
Var.Facteur 2	94,939	3	31,646	427,831	0		
Var.Inter F1*2	172,005	18	9,556	129,187	0		
Var.Residuelle 1	4,142	56	0,074			0,272	11,35%

Facteur 1 : niveaux d'humidités ; Facteur 2 : Espèces fongiques

Tableau 3: Analyse de variance de l'effet du pH sur la croissance mycélienne des quatre souches fongique testées.

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
Var.Totale	174613	83	2103,771				
Var.Facteur 1	12657,22	6	2109,536	1,001	0,43452		
Var.Facteur 2	6024,172	3	2008,057	0,953	0,42304		
Var.Inter F1*2	37910,45	18	2106,136	0,999	0,47453		
Var.Residuelle 1	118021,1	56	2107,52			45,908	476,23%

Facteur 1 : pH ; Facteur 2 : Espèces fongiques

Tableau 4: Analyse de variance de l'effet de la lumière et de l'obscurité sur la croissance mycélienne des quatre souches fongique testées.

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
Var.Totale	67,922	23	2,953				
Var.Facteur 1	2,574	1	2,574	510,978	0		
Var.Facteur 2	64,264	3	21,421	4252,164	0		
Var.Inter F1*2	1,002	3	0,334	66,33	0		
Var.Residuelle 1	0,081	16	0,005			0,071	0,88%

Facteur 1 : Lumière/obscurité; Facteur 2 : Espèces fongiques

Tableau 5 : Analyse de variance de l'effet de température sur la sporulation des quatre souches fongique testées.

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
Var.Totale	6017,836	95	63,346				
Var.Facteur 1	3948,705	7	564,101	124,197	0		
Var.Facteur 2	133,683	3	44,561	9,811	0,00003		
Var.Inter F1*2	1644,761	21	78,322	17,244	0		
Var.Residuelle 1	290,687	64	4,542			2,131	26,54%

Facteur 1 : étages de températures; Facteur 2 : Espèces fongiques

Tableau 6: Analyse de variance de l'effet de l'humidité sur la sporulation des quatre souches fongique testées.

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
Var.Totale	3990,404	83	48,077				
Var.Facteur 1	2814,641	6	469,107	771,284	0		
Var.Facteur 2	248,867	3	82,955	136,392	0		
Var.Inter F1*2	892,836	18	49,602	81,553	0		
Var.Residuelle 1	34,06	56	0,608			0,78	10,04%

Facteur 1 : niveau d'humidité ; Facteur 2 : Espèces fongiques

Tableau 7: Analyse de variance de l'effet du pH sur la sporulation des quatre souches fongique testées.

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
Var.Totale	10,482	83	0,126				
Var.Facteur 1	0,841	6	0,14	12,934	0		
Var.Facteur 2	8,216	3	2,739	252,791	0		
Var.Inter F1*2	0,819	18	0,046	4,201	0,00002		
Var.Residuelle 1	0,607	56	0,011			0,104	1,23%

Facteur 1 : pH ; Facteur 2 : Espèces fongiques

Tableau 8: Analyse de variance de l'effet de la lumière et de l'obscurité sur la croissance mycélienne des quatre souches fongique testées.

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
Var.Totale	417,958	23	18,172				
Var.Facteur 1	260,042	1	260,042	66,394	0		
Var.Facteur 2	50,125	3	16,708	4,266	0,02145		
Var.Inter F1*2	45,125	3	15,042	3,84	0,03003		
Var.Residuelle 1	62,667	16	3,917			1,979	10,30%

Facteur 1 : Lumière/ obscurité ; Facteur 2 : Espèces fongiques

Annexe 4

Tableau 1: Effet des espèces de champignons isolées à partir des nymphes de *P. citrella* sur la mortalité de ses larves.

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
Var.Totale	86971,37	53	1640,969				
Var.Facteur 1	35110,95	2	17555,48	78768,88	0		
Var.Facteur 2	39309,74	5	7861,948	35275,42	0		
Var.Inter F1*2	12542,65	10	1254,265	5627,705	0		
Var.Residuelle 1	8,023	36	0,223			0,472	1,07%

Facteur 1 : Espèces fongiques ; Facteur 2 : concentrations

Tableau 2: Effet des espèces de champignons isolées à partir des adultes de *S. gragaria* sur la mortalité des larves de *P. citrella*.

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
Var.Totale	59825,53	53	1128,784				
Var.Facteur 1	29308,34	2	14654,17	135052800	0		
Var.Facteur 2	15755,46	5	3151,092	29040470	0		
Var.Inter F1*2	14761,72	10	1476,172	13604400	0		
Var.Residuelle 1	0,004	36	0			0,01	0,03%

Facteur 1 : Espèces fongiques ; Facteur 2 : concentrations

Tableau 3: Effet des espèces de champignons isolées à partir des nymphes de *P. citrella* sur la mortalité de ses oeufs.

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
Var.Totale	25747,29	35	735,637				
Var.Facteur 1	7979,076	2	3989,538	358,511	0		
Var.Facteur 2	10389,23	3	3463,076	311,201	0		
Var.Inter F1*2	7111,911	6	1185,318	106,516	0		
Var.Residuelle 1	267,074	24	11,128			3,336	15,03%

Facteur 1 : Espèces fongiques ; Facteur 2 : concentrations

Tableau 4: Effet des espèces de champignons isolées à partir des adultes de *S.gragaria* sur la mortalité des oeufs de *P. citrella*.

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
Var.Totale	70376,05	35	2010,744				
Var.Facteur 1	1935,5	2	967,75	3845,961	0		
Var.Facteur 2	65768,01	3	21922,67	87123,48	0		
Var.Inter F1*2	2666,5	6	444,417	1766,168	0		
Var.Residuelle 1	6,039	24	0,252			0,502	1,18%