

Minist



*publique Algérienne Démocratique et Populaire  
Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique*



**Université Larbi Ben M'hidi - Oum El Bouaghi-  
Faculté : Sciences exactes et sciences de la nature et de la vie.  
Département : Sciences de la nature et de la vie**

**Thèse**  
**Présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat en sciences  
de la nature**  
**Option : Microbiologie Appliquée**

*Thème*  
**Application des champignon  
entomopathogènes sur les pucerons du blé.**

**Présentée par : ABDELAZIZ Ouidad.**

**Membre du jury :**

- **Président :**  
ZELLAGUI Amar .....Pr. Université Larbi Ben M'hidi - Oum El  
Bouaghi.
- **Rapporteur :**  
SENOUSSI Mohamed Mourad .....Pr. Université Larbi Ben M'hidi - Oum El  
Bouaghi.
- **Co-rapporteur :**  
OUFROUKH Amar .....Dr. INRA . Constantine.
- **Examineurs :**  
DEHIMAT Laid.....Pr. Université Frères Mentouri Constantine.  
NECIB Youcef .....Pr. Université Frères Mentouri Constantine.  
HAMITOU Mokhtar ..... MCA. Université Larbi Ben M'hidi - Oum El  
Bouaghi

**Année universitaire : 2018-2019**

## Remerciements

Je tiens à témoigner ma sincère gratitude à mon directeur de thèse, Pr. **SENOUSSI Mohamed Mourad**, pour sa disponibilité et pour m'avoir soutenu et supporté ces quelques années. Qu'il trouve ici ma reconnaissance la plus profonde et le témoignage de mon plus profond respect.

Avec une rigueur et un intérêt constant, Mr. **OUFROUKH Ammar** Maître de conférence à l'unité de recherche de Constantine (INRA) a dirigé ce travail avec beaucoup d'enthousiasme en me faisant bénéficier de ses compétences scientifiques.

Mes sincères remerciements sont adressés au Pr. **ZELLAGUI Amar** de m'avoir fait l'honneur de présider le jury.

Je tiens également à remercier Les Pr. **DEHIMAT Laid** ; Pr. **NECIB Youcef** et **MC. HAMITOU mokhtar** d'avoir accepté de juger ce travail.

J'adresse aussi mes vifs remerciements à Monsieur **Ismail KARACA**, Directeur de laboratoire protection des végétaux à l'université Sciences Appliquées. Isparta, Turquie, d'avoir accepté de m'accueillir à plusieurs reprises au sein de son laboratoire et de son équipe. Ce séjour à Isparta a été pour moi l'occasion de découvrir un autre laboratoire, d'acquérir de nouvelles techniques, de croiser et discuter avec beaucoup de personnes.

Je tiens à remercier tous les membres de l'équipe de l'INRA de Constantine

Par crainte d'oublier de nommer certaines personnes, j'adresse mes remerciements à celles et ceux qui m'ont accompagné de près ou de loin jusqu'à aujourd'hui. J'ai une pensée pour celles et ceux qui m'ont donné le goût de la Biologie et surtout pour les personnes qui m'ont accompagné durant toutes ces années de thèse et qui m'ont permis de mener à bien ce travail en me faisant vivre des moments inoubliables.

Je terminerai en adressant un très grand merci à ma famille pour son soutien sans faille et de tous les instants.

Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des abréviations	

<b>Introduction</b> .....	<b>1</b>
---------------------------	----------

## **Synthèse Bibliographique**

### **Chapitre I : Présentation de la plante hôte « le blé »**

<b>1. Définition et origine</b> .....	<b>4</b>
<b>2. Importance de blé</b> .....	<b>4</b>
<b>3. Le cycle de développement du blé</b> .....	<b>5</b>
3.1. Période végétative.....	6
a- Phase germination – levée.....	6
b- Phase levée – tallage.....	6
c- Phase tallage-montaison.....	6
3.2. Période de reproduction.....	6
a- Phase de la montaison.....	6
b- Phase de l'épiaison.....	6
3.3. Période de maturation.....	7
<b>4. Les insectes ravageurs du blé</b> .....	<b>7</b>
4.1. Les punaises .....	7
4.2. Les vers blancs.....	8
4.3. Les criocères.....	8
4.4. La Mouche de Hesse.....	9
4.5. Les pucerons .....	9
4.6. Autres insectes ravageurs du blé.....	10

### **Chapitre 2 : Les pucerons**

<b>1. Généralités</b> .....	<b>11</b>
<b>2. Systématique</b> .....	<b>11</b>
<b>3. Caractères morphologiques des pucerons</b> .....	<b>12</b>
3.1. La tête.....	13
3.2. Le thorax .....	14
3.3. L'abdomen.....	14
<b>4. Cycle de vie</b> .....	<b>14</b>
<b>5. Les relations des insectes phytophages avec leurs plantes hôtes</b> .....	<b>16</b>
5.1. La spécificité des insectes à leur plante hôte.....	18
<b>6. Interaction plante- pucerons</b> .....	<b>19</b>
6.1. Dégâts causés par les pucerons.....	19

6.1.1. Les dégâts directs.....	20
6.1.2. Les dégâts indirectes .....	20
a. Miellat et fumagine.....	19
b. Transmission des virus Phytopathogènes.....	19
➤ Les virus circulaires (persistants) ou virus de stylet.....	20
➤ Les virus non circulaire .....	21
➤ Virus non persistants.....	20
➤ Virus semi-persistants .....	21
<b>8. Lutte contre les pucerons.....</b>	<b>21</b>
8.1. Lutte préventive .....	22
8.2. Lutte curative.....	22
8.2.1. Lutte chimique.....	22
8.2.2 .La lutte biologique.....	22
❖ La lutte microbiologique par les champignons entomopathogènes.....	22

### **Chapitre 3 : Champignons entomopathogènes** **24**

<b>1. Généralité sur les Champignons .....</b>	<b>25</b>
<b>2. Champignons entomopathogènes .....</b>	<b>25</b>
2.1. Mode d'action .....	26
a. L'adhésion.....	26
b. La germination.....	27
c. La pénétration et la dissémination .....	27
2.2. Les métabolites des champignons entomopathogènes .....	<b>28</b>
2.2.1. Les enzymes .....	<b>30</b>
2.2.1.1. Protéase .....	<b>30</b>
➤ Protéases fongiques.....	
2.2.1.2. Chitinases .....	<b>32</b>
2.2.2. Les toxines .....	<b>32</b>

### **Matériel et Méthodes**

<b>1. Localisation géographique de la région et de la station d'étude.....</b>	<b>34</b>
2.. Choix de la zone d'étude .....	35
<b>3. Caractérisation climatique.....</b>	<b>35</b>
3.1. La température.....	35
3.2. La précipitation .....	37
3.3. L'humidité relative moyenne (%).....	38
3.4. Le vent .....	40
<b>4. Caractérisation physico-chimique des sols de la zone d'étude</b>	<b>40</b>
<b>5. Etude Mycologique .....</b>	<b>40</b>
5.1. Isolement des moisissures.....	40
5.2. Purification des moisissures .....	41
5.3. Identification des moisissures .....	41
5.3.1. Identification macroscopique .....	41
5.3.2. Identification microscopique .....	41
<b>6. Test d'entomopathogénicité.....</b>	<b>42</b>

6.1. Matériels biologiques utilisés .....	42
6.1.1. Les pucerons <i>Metoplophium dirhodum</i> (Walker).....	42
6.1.2. Les isolats fongiques.....	43
6.2. Préparation des suspensions sporale et dénombrement des spores .....	43
6.3. Essai biologique.....	43
6.4. Analyse statistique .....	44
7. Etude des isolats sélectionnés .....	44
7.1. Etude macroscopique et microscopique .....	44
7.2. Tests d'entomopathogénicité .....	45
<b>8. Production des Enzymes .....</b>	<b>45</b>
8.1. Les souches fongiques .....	45
8.2. Activité protéolytique .....	46
8.2.1. Mise en évidence des activités protéolytiques.....	46
8.2.2. Protéase alcaline .....	46
8.2.2.1. Méthode de fermentation.....	46
a. Préparation de l'inoculum .....	46
b. Préparation de milieu de culture.....	46
c. Conduite des fermentations.....	47
8.2.2.2. Mesure du pH.....	47
8.2.2.3. Dosage de l'activité protéolytique alcaline.....	48
8.2.3. Dosage de l'activité protéolytique acide.....	49
8.3. Chitinase .....	50
8.3.1. Préparation de la chitine colloïdale .....	50
8.3.2. Mise en évidence des activités chitinolytique .....	51
8.3.3. La conduite de fermentation .....	51
8.3.4. Dosage de l'activité chitinolytique.....	51
8.3.5. Mesure du pH.....	52
<b>9. Production des Toxines .....</b>	<b>52</b>
9.1. Pré-culture.....	52
9.2. Fermentation.....	52
9.3.Extraction.....	53
9.3.1. Biomasse .....	53
9.3.2. Mesure du pH.....	53
9.3. Identification des toxines .....	53
9.3.1. Analyse par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC).....	53
4.3.2. Analyse par la résonance magnétique nucléaire (RMN) .....	54

## **Résultats et Discussion**

<b>1. Caractérisation physico-chimique des sols de la zone d'étude</b> .....	<b>55</b>
<b>2. Etude mycologique .....</b>	<b>56</b>
2.1. Isolement, purification et identification des champignons.....	56
<b>3. Test d'entomopathogénicité.....</b>	<b>63</b>
<b>4. Etude des isolats sélectionnés .....</b>	<b>67</b>
4.1. Identification des isolats .....	67
4.1.1. Identification macroscopique .....	67
4.1.2. Identification microscopique .....	67

<b>5. Test d'entomopathogénicité des isolats sélectionnés.....</b>	<b>71</b>
5.1. <i>Aphis fabae</i> .....	71
5.2. <i>Macrosiphum rosea</i> .....	72
5.3. <i>Mysuz persicae</i> .....	73
<b>6. Production des Enzymes</b>	<b>75</b>
6.1. Protéase .....	75
6.1.1. Protéase alcaline .....	75
6.1.1.1. Mise en évidence de l'activité protéolytique.....	75
6.1.1.2. Fermentation des souches sélectionnées.....	76
a. Résultats de l'activité protéolytique .....	76
b. Résultats du pH.....	78
6.1.2. Protéase acide .....	79
6.1.2.1. Résultats du pH.....	79
6.1.2.2. Activité enzymatique.....	80
6.2. Chitinase.....	81
6.2.1. Mise en évidence de l'activité chitinolytique .....	81
6.2.2. Résultats de l'activité de chitinase .....	82
6.2.3. Résultats du pH.....	83
<b>7. Toxines .....</b>	<b>84</b>
7.1. Fermentation .....	84
7.2. Résultats du pH.....	85
7.3. Résultats de la biomasse .....	85
7.4. Les résultats HPLC.....	86
7.5. Les résultats RMN .....	91
<b>Conclusion générale .....</b>	<b>93</b>
<b>Références .....</b>	<b>96</b>
<b>Résumés .....</b>	<b>I</b>
<b>Annexe.....</b>	<b>I</b>
<b>Valorisation des travaux de thèse.....</b>	

*Liste des figur*

<b>Titre</b>	<b>Page</b>
<b>Figure 1</b> : Cycle de développement du blé .....	<b>5</b>
<b>Figure 2</b> : Morphologie d'un puceron .....	<b>13</b>
<b>Figure 3</b> : Représentation schématique du cycle de vie des pucerons .....	<b>15</b>
<b>Figure 4</b> : Cycle biologique des champignons entomopathogènes .....	<b>28</b>
<b>Figure 5</b> : Situation géographique de la station d'étude.....	<b>34</b>
<b>Figure 6</b> : Site d'échantillonnage .....	<b>34</b>
<b>Figure 7</b> : Variation des températures minima et maxima du moi de mai 2014	<b>36</b>
<b>Figure 8</b> : Variation des températures minima et maxima du moi de mai 2015	<b>36</b>
<b>Figure 9</b> : Variation des moyennes des précipitations en( mm) en mai2014 et mai 2015	<b>37</b>
<b>Figure 10</b> : Variation des moyennes de l'humidité relative (%)de mai 2014 et mai 2015	<b>38</b>
<b>Figure 11</b> : Vitesses moyennes du vent (km/h).....	<b>39</b>
<b>Figure 12</b> : <i>Metopolophium dirhodum</i> ( Wlker) (Hemiptera : Aphididea).....	<b>42</b>
<b>Figure 13</b> : Pucerons utilisés .....	<b>45</b>
<b>Figure 14</b> : <i>Ocniridia voleximii</i> .....	<b>47</b>
<b>Figure 15</b> : Courbe d'étalonnage de la tyrosine ( protéase alcaline ).....	<b>49</b>
<b>Figure 16</b> : Courbe d'étalonnage de la tyrosine ( protéase acide)....	<b>50</b>
<b>Figure 17</b> : Courbe d'étalonnage de N-acétyl glucosamine .....	<b>52</b>
<b>Figure 18</b> : Fréquences des différents genres fongiques isolés à partir des sols 2014 et 2015 .....	<b>59</b>
<b>Figure 19</b> : Effet des traitements entomopathogènes sur <i>Metopolophium dirhodum</i> .....	<b>63</b>
<b>Figure 20</b> : Effets entomopathogènes sur <i>Aphis fabae</i> .....	<b>71</b>
<b>Figure 21</b> : Effets entomopathogènes sur <i>Macrosiphus rosea</i> .....	<b>72</b>
<b>Figure 22</b> : Effets entomopathogènes sur <i>Myzys persicea</i> .....	<b>73</b>
<b>Figure 23</b> : Evolution de zones de lyse obtenue.....	<b>75</b>
<b>Figure 24</b> : Activité protéolytique après fermentation (protéase alcaline).....	<b>76</b>
<b>Figure 25</b> : Activité protéolytique après fermentation (protéase acide).....	<b>80</b>
<b>Figure 26</b> : Evolution de zones de lyse obtenue sur milieu MCC.....	<b>81</b>
<b>Figure 27</b> : Activité chitinolytique après fermentation .....	<b>82</b>

<b>Figure 28</b> : Développement morphologique de trois souches sur milieu de fermentation (PDB).....	<b>84</b>
<b>Figure 29</b> : Evolution de biomasse.....	<b>86</b>
<b>Figure 30</b> : Chromatogramme HPLC de <i>B.bassiana</i> .....	<b>87</b>
<b>Figure 31</b> : Chromatogramme HPLC de <i>C.cladosporioides</i> .....	<b>88</b>
<b>Figure 32</b> : Chromatogramme HPLC de <i>V.alfalfae</i> .....	<b>89</b>

*Liste des tableaux*

Titre	Page
<b>Tableau1</b> : Les insectes ravageurs de blé .....	<b>10</b>
<b>Tableau2</b> : Classification des protéases .....	<b>31</b>
<b>Tableau 3</b> : Résumé des différents échantillons effectués .....	<b>40</b>
<b>Tableau 4</b> : Programme gradient utilisé pour l'analyse et la séparation des toxines.	<b>45</b>
<b>Tableau 5</b> : Les analyses physico-chimique des sols de la zone d'étude.....	<b>56</b>
<b>Tableau 6</b> : Isolement des souches fongiques.....	<b>56</b>
<b>Tableau 7</b> : Fréquence des différents isolats identifiées de sol prélevés(2014et2015)...	<b>58</b>
<b>Tableau8</b> : Fréquence des différents isolats identifiées de sols prélevés du mois de mais 2014.....	<b>60</b>
<b>Tableau 9</b> : Fréquence des différents isolats identifiées de sols prélevés du mois de mais 2015.....	<b>61</b>
<b>Tableau10</b> : Variance ANOVA de 11 souches fongiques contre <i>Metopolophium dirudhum</i> .....	<b>64</b>
<b>Tableau11</b> : Etude macroscopique des souches fongiques.....	<b>68</b>
<b>Tableau12</b> : Etude microscopique des souches fongique.....	<b>69</b>
<b>Tableau 13</b> : Les valeurs d'échelle de la densité de population de <i>A.fabae</i> .....	<b>71</b>
<b>Tableau 14</b> : Les valeurs d'échelle de la densité de population de <i>M.rosea</i> .....	<b>73</b>
<b>Tableau 15</b> : Les valeurs d'échelle de la densité de population de <i>M.persicea</i> .....	<b>74</b>
<b>Tableau 16</b> : Résultats du pH pour la protéase alcaline .....	<b>78</b>
<b>Tableau 17</b> : Résultats du pH pour la protéase acide.....	<b>79</b>
<b>Tableau 18</b> : Résultats du pH pour la chitinase.....	<b>83</b>
<b>Tableau 19</b> : Résultats du pH pour les toxines .....	<b>85</b>
<b>Tableau 20</b> : Résultats HPLC avec différentes d'onde d'absorbance .....	<b>90</b>

# *Liste des abréviations*

- **BYDV** : *Barley Yellow Dwarf Viruses*.
- **DMSO** : DiMethyl Sulfoxyde.
- **DNS** : 3,5- DiNitroSalicylique.
- **Est** : Estérase.
- **F**: *Factor (value)*
- **FAO** : *Food and Agriculture Organisation of the united Nations* .
- **GLC NAc** : N-acétyl Glucosamine.
- **GST** : Glutathion S-Transférase.
- **HPLC** : *High Performance Liquide Chromatography*.
- **INRAA** : Institut National de la Recherche Agronomique en Algérie .
- **JNO** : Virus de la Jaunisse nanisant de l'orge.
- **MCC** : milieu Chitine Colloïdale.
- **MFO** : Oxydase à la fonction mixte .
- **P** : *Probability*
- **PDA** : *Potato-Dextrose- Agar* .
- **PDB** : *Potato-Dextrose-Broth* .
- **RMN** : Résonance Magnétique Nucléaire.
- **Rpm** : Rotation Par Minute.
- **SRPV** : Station Régionale de Protection des Végétaux.
- **TCA** : *Trichloroacetic acid* .
- **U** : Unité ( $\mu\text{g}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{ml}^{-1}$ ).
- **URC** : Unité de Recherche de Constantine.
- **UV** : Ultra-violet.

# *Introduction*



## Introduction

Les pucerons sont considérés comme les insectes phytophages causant les plus grandes pertes économiques au vu de leurs caractères morphologiques et biologiques qui en font des ravageurs majeurs des cultures (**Blackman et Eastop, 1984**). En effet, leur petite taille caractéristique, leur potentiel biotique élevé (**Hulle et al., 1999**) et leur polymorphisme (**Dixon, 2000**) leur permettent l'accomplissement des fonctionnalités de reproduction, de dispersion et de survie en fonction des conditions du milieu, leur conférant, ainsi, des pullulations spectaculaires et difficilement prévisibles (**Myazaki, 1987 ; Robert, 1988**). Toutefois, pour lutter contre ces insectes on a eu toujours recours à la lutte chimique ce qui a conduit progressivement à des problèmes d'ordres génétiques, environnementaux et sanitaires (**Roush et McKenzie, 1987**). Actuellement un certain nombre de méthodes alternatives ont pu être développées en vue de diminuer l'utilisation d'intrants chimiques. En culture par exemple l'utilisation d'insectes auxiliaires fonctionne bien et devient une pratique courante. Aussi, certaines souches de virus et de bactéries sont également valorisées et développées au sein de produits insecticides largement utilisés en agriculture (tel exemple de la « Bactospeine » utilisée contre la processionnaire du pin). Une autre piste qui est en train de se développer actuellement et qui s'avère très intéressante et efficace, c'est le développement et l'utilisation de microorganismes antagonistes notamment des champignons pathogènes d'insectes ou « entomopathogènes ». Ces derniers occupent une place particulière en pathologie des invertébrés et dans la recherche d'organismes capables de réguler les pullulations d'invertébrés nuisibles, en santé végétale, humaine ou animale. Néanmoins, ces champignons bien qu'efficaces ont souvent une activité très dépendante des conditions environnementales notamment climatiques (**Ferron et al., 1991 ; Lacey et al., 1996**).

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

De nombreux facteurs affectent ainsi l'efficacité des champignons entomopathogènes. Leur potentiel comme agents de lutte biologique résulte des propriétés des populations de l'hôte

et du pathogène ainsi que des conditions du milieu. Certains de ces facteurs sont liés d'une part au pathogène : « virulence et spécificité de l'hôte (qui sont deux éléments essentiels dans le choix d'un bon candidat à la lutte microbiologique), potentiel épizootiques, capacité de survie et polymorphisme génétique des populations fongique », d'autre part ils dépendent de l'hôte : « variabilité de la sensibilité des populations hôte, facteurs des populations d'hôtes (densité de populations), comportement et nutrition, enfin, la sensibilité extrême aux conditions environnementales (rayonnement solaires, température, humidité) est le principal inconvénient des champignons entomopathogènes ». Ces facteurs influencent la persistance de l'activité insecticide du champignons, la viabilité des conidies sur le feuillage traité et la sporulation sur le cadavre de l'insecte (Sabbahi, 2008).

Dans ce contexte, notre contribution dans cette étude est orientée vers un objectif visant à évaluer l'effet « entomopathogène » des champignons isolés à partir de sol agricole sur les pucerons et la « production des enzymes (chitinase et protéase) et des métabolites secondaire (toxines) ».

La première partie de notre travail est consacrée à la description de données bibliographiques relatives la culture du blé, aux champignons entomopathogènes, aux puceron d'une manière générale et enfin aux enzymes et aux métabolites produits par les champignons.

La seconde partie qui est consacrée au travail expérimental est structurée en quatre chapitres composés chacune d'une partie illustrant les différentes techniques utilisées et d'une autre partie exposant, comparant et discutant les résultats obtenus.

- ❖ Le chapitre 1 concerne l'isolement des champignons à partir de sol agricole céréalière de la région de Constantine et leur caractérisation et identification par l'utilisation de technique microscopique photonique.
- ❖ Dans le chapitre 2, nous nous intéressons à la mise en évidence de l'activité insecticide des *champignons isolés* sur les pucerons de *Metopolophium dirhodum* et la sélection des souches entomopathogènes (>50%) et étude de leur activité insecticide sur les pucerons *Aphis fabae*, *Macrosiphum roseum* et *Myzus persicae*.
- ❖ Dans le chapitre 3, nous abordons l'étude de la production des enzymes de protéase (alcaline et acide) et chitinase à partir de *Beauveria bassiana*, *Cladosporium cladosporioides* et *Verticillium alafalfae*.
- ❖ Le dernier chapitre regroupe les étapes de production et de caractérisation des métabolites secondaires (toxines) élaborées par *Beauveria bassiana*, *Cladosporium cladosporioides* et *Verticillium alafalfae* par application de la technique chromatographique liquides à haute performance (HPLC), et analyse structurale de

ces métabolites par des techniques de La spectroscopie RMN (Résonance magnétique nucléaire).

Enfin, ce travail est clôturé par une conclusion générale et la mise en évidence des perspectives de recherche.

*Synthèse*

*Bibliographique*

# Chapitre I : Présentation de la plante hôte « Le blé »

## 1. Définition et origine

Le blé est une monocotylédone de la famille des *Poaceae* appartenant au genre *Triticum*. Cette plante annuelle produit un fruit sec indéhiscant, le caryopse. Le blé tendre (*Triticum aestivum*) et le blé dur (*Triticum durum*) sont les deux espèces les plus cultivées dans le monde. Le blé tendre est constitué de trois génomes possédant chacun 7 paires de chromosomes homéologues, soit 42 chromosomes au total. Il possède une structure génomique hexaploïde (AA BB DD) et le blé dur une structure tétraploïde (AA BB). Le blé tendre d'un point de vue phylogénétique est issu de deux hybridations interspécifiques suivi d'un doublement chromosomique. Le croisement entre *Triticum monococcum* (A) et un Aegilops (B) a donné un individu de structure génomique (AB) avec 14 chromosomes. Après doublement chromosomique est apparu *Triticum turgidum* ssp. *Dicoccoides* (AA BB), ancêtre du blé dur. Le second croisement interspécifique a eu lieu entre *Triticum turgidum* ssp. *Dicoccoides* et *Aegilops tauschii* (D) ce qui a donné un individu (ABD) possédant 21 chromosomes. Ce dernier a lui aussi subi un doublement chromosomique (AA BB DD) et est l'ancêtre de *Triticum aestivum* (Gill et Kimber, 1974 ; Chen et Gill, 1984 ; Chapman, 2009).

## 2. Importance du blé

Les céréales occupent à l'échelle mondiale une place primordiale dans le système agricole. Elles sont considérées comme une principale source de la nutrition humaine et animale (Slama *et al.*, 2005). Parmi les céréales, le blé occupe la première place pour la production mondiale et la deuxième après le riz, comme source de nourriture pour les populations humaines, il assure 15% de ses besoins énergétiques (Bajji, 1999). Le blé est cultivé principalement dans les pays du bassin méditerranéen à climat arides et semi-arides là où l'agriculture est en dehors de ces conditions sur développement naturel. L'augmentation de la température couplée à la baisse des précipitations, en plus la désertification (Abeledo *et al.*, 2008). Actuellement, l'Algérie est un grand importateur de blé et se trouve dépendante du marché international. Cette situation risque de se prolonger sur plusieurs années, faute de rendements insuffisants et des besoins en consommation sans cesse croissants devant une forte évolution démographique (Chellali, 2007).

### 3. Le cycle de développement du blé

On distingue trois périodes importantes dans le cycle végétatif du blé : une période végétative, une période de reproduction et une période de maturation (Figure 1).

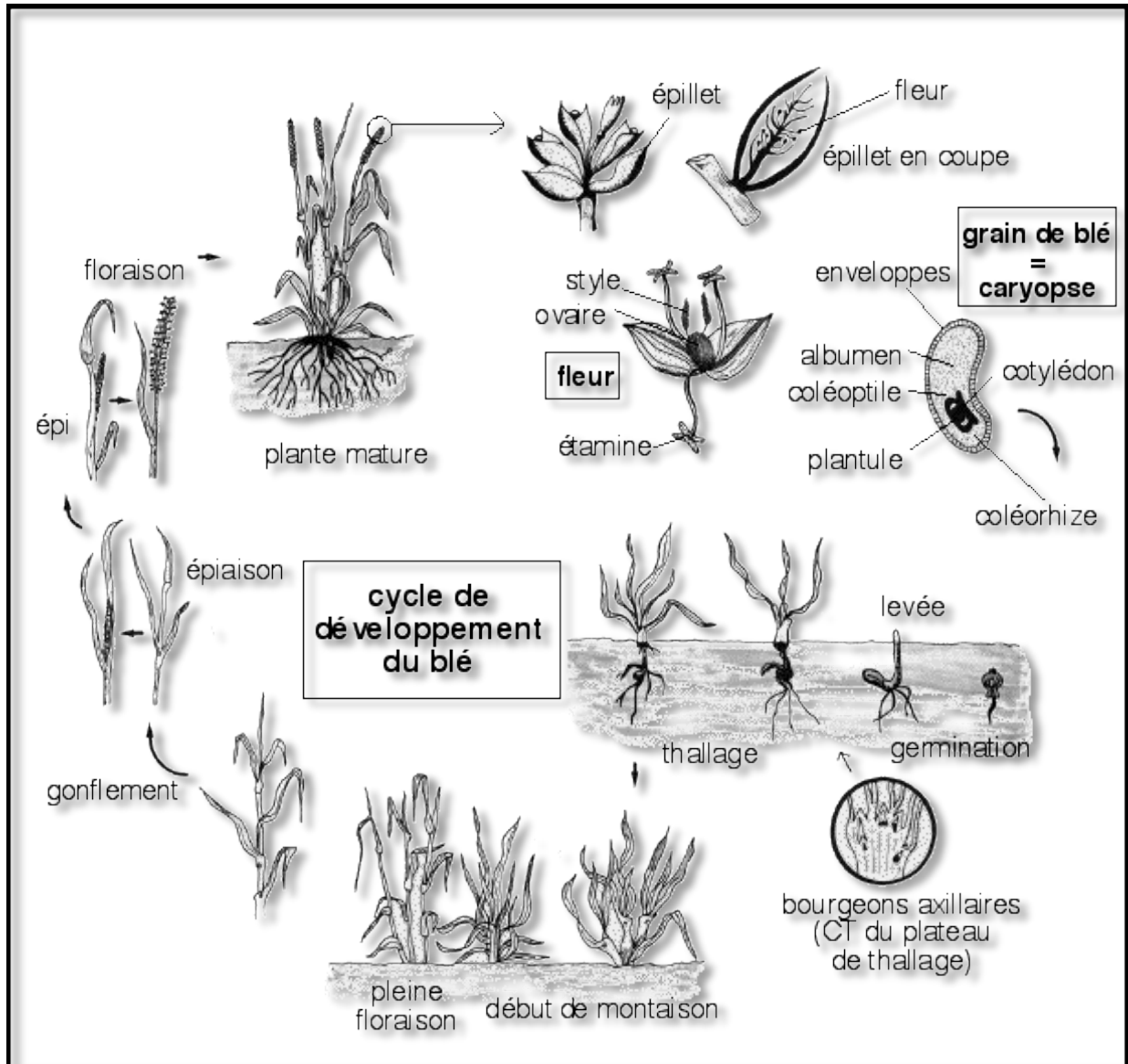


Figure 1 : Cycle de développement du blé (Henry et DeBuyser, 2000)

#### 3.1. Période végétative

Elle s'étend du semis au début de la montaison, elle est subdivisée en plusieurs phases.

### **3.1.1. Phase germination - levée**

La germination commence quand le grain a absorbé environ 25 % de son poids d'eau. Les téguments se déchirent, la racine principale, couverte d'une enveloppe appelée Coleorhize, apparaît, suivie par la sortie de la première feuille, couverte d'une enveloppe appelée Coléoptile, à la surface du sol, puis apparaissent d'autres racines et feuilles. La durée de cette phase varie avec la température de 8 à 15 jours (**Gate, 1995**).

### **3.1.2. Phase levée – tallage**

On peut distinguer pendant cette phase à travers le coléoptile, un filament ou rhizome, termine par un renflement qui va se gonfler de plus en plus pour former le plateau de tallage qui se forme presque au niveau de la surface du sol. Le plateau de tallage s'épaissit et des racines secondaires se développent très vite. Des nouvelles feuilles apparaissent et à chacune correspond l'apparition d'une talle. La place des épillets fait par un simple étranglement sur la partie supérieure du végétal (**Masle-Meynard, 1980**).

### **3.1.3. Phase tallage-montaison**

La différenciation des épillets se poursuit par étranglements successifs du cône formateur de l'épi. Les talles herbacées se forment activement (**Clement et Prats, 1971**).

## **3.2. Période de reproduction**

Elle s'étend de la montaison à la fécondation :

### **3.2.1. Phase de la montaison**

Au cours de cette phase, un certain nombre de talles herbacées vont évoluer vers des tiges couronnées d'épis, tandis que d'autres commencent à régresser. La croissance en taille et en matière sèche est alors active. Cette phase se termine au moment de la différenciation des stigmates. La durée de cette phase est de 29 à 30 jours (**Clement et Prats, 1971**).

### **3.2.2. Phase de l'épiaison**

La vitesse de croissance de la plante est maximale. Cette phase correspond à l'élaboration d'une grande quantité de la matière sèche, à l'organisation détaillée des épillets et à la fécondation. La durée de cette phase est d'environ 32 jours. Cette phase est suivie par le grossissement du grain qui devient mou et le dessèchement de presque toutes les feuilles. Sa durée est de 16 à 17 jours (**Masle-Meynard, 1980**).

### 3.3. Période de maturation

Elle correspond à l'accumulation de l'amidon dans les grains et à la migration très active des réserves (glucides et protéines) vers le grain. La durée de cette période est de 25 à 26 jours en moyenne (Gate, 1995).

## 4. Principaux problèmes du blé

Le blé souvent le sujet à des nombreux aléas de l'environnement et suivi à une multitude de stress à tout abiotiques (sel, sécheresse, température,..) que biotiques (champignons, bactéries, virus, ravageurs,..) qui peuvent être les cause principales amputables à l'amélioration du blé. Parmi ces derniers, les insectes ravageurs. Les insectes ravageurs sont la forme de vie normale la plus diversifiée des écosystèmes terrestres. La plupart d'entre eux sont inoffensifs et font partie intégrante des écosystèmes naturels, tant par le nombre d'espèces que par leur rôle écologique (Le Gall, 2009 ; Regnière, 2009 ).

En ajoutant leurs méfaits à ceux des maladies cryptogamiques, des rongeurs, des virus et des nématodes, les insectes sont nos concurrents directs, ils convoitent nos production agricoles. On trouve parmi , l les insectes des espèces utiles , voir indispensable, les pollinisateurs parasites et prédateurs , recycleurs de matière organique (Chambon , 1988 ; Kumar, 1991).

De nombreuses espèces d'insectes ravageurs peuvent attaquer les céréales et causer une diminution de la production. Parmi ceux-ci, on trouve : les pucerons, les punaises, les mouches, les larves de taupin, les sauterelles, vers gris et vers blancs, les noctuelles (Xue, 2011).

### 4. 1. Les insectes ravageurs du blé

#### 4.1.1. Les punaises

Les punaises des céréales sont des hétérotrophes qui causent d'importants dégâts sur les champs de blé, ils sont souvent constatés au tallage, à l'épiaison et avant la maturité di grain et qui ont pour conséquence majeur une réduction de la valeur boulangère du blé destiné à la panification (Ouffroukh et Hamadi, 1993 ; Fourar et Fleurat-Lessard , 1997 ).

Parmi les punaises, *Aelia et Eurygaster* sont les genres les plus redoutables en Algérie. L'espèce *Aelia garmari* constitue un danger permanent dans les régions céréalières (Hauts plateaux de l'Ouest et du Centre, Hautes plaines de l'Est)(Gaffour-Bensabbane , 1981).

Les gites d'hivers des *Aelia* d'Algérie se situent sur les mêmes étages bioclimatiques que les céréales.

Pour lutter contre les punaises, les auteurs ci-dessus cités, préconisent la lutte chimique par voie aérienne et terrestre et des méthodes culturales pour la destruction des gîtes d'hivers.

#### **4.1.2. Les vers blancs**

Les vers blancs sont des larves qui s'attaquent aux racines et à la base de tiges des céréales (Duval, 1993). Les attaques de céréales par ce ravageur commencent en automne à la levée, la nuisibilité sur culture se poursuit et s'intensifie au début du printemps. Les larves de ce ravageur subissent trois stades pendant leur cycle et la larve du troisième stade qui est la plus destructrice (Ouffroukh et Hamadi, 1993).

En Algérie, les Melolonthini et plus particulièrement *Geotrogus deserticola* (Balnch), au Sud-ouest commet de gros dégâts sur les racines des végétaux et notamment sur les céréales (Mesbah *et al.*, 2002). Les fortes précipitations favorisent la remonté en surface des larves de vers blancs sur les parcelles de céréales dans les régions de l'Ouest. Les parcelles attaquées sont reconnues par la présence de larges taches sombres, les plates jaunissent et déprissent (Duval, 1993).

La lutte contre les vers blancs se fait en premier lieu par l'utilisation de semences traitées ce sont des semences enrobées de périodes et l'application de produits chimiques sur les parcelles touchées durant le printemps lorsque les larves sont à leur troisième stade. Le seuil d'intervention arrêté par l'INPV (Institut National de la Protection des Végétaux) est 4-7 larves/m<sup>2</sup>. Une lutte préventive est aussi préconisée, les façons culturales les plus indiquées contre les vers blanc pour limiter les dégâts sont : la rotations ; le travail du sol , la compaction par le pâturage , le contrôle de l'humidité du sol par l'espacement des arrosages pour assécher la surface du sol et décourager la ponte des femelles (Duval, 1993).

#### **4.1.3. Les criocères**

Les criocères sont des coléoptères chrysomelides que l'on trouve sur les céréales (blé, avoine, orge et seigle) (Raynal, 1989). L'espèce la plus dangereuse pour les céréales est *Oulema melanopus* (Raynal, 1989 ; Offert *et al.*, 2004). C'est une espèce à une seule génération dont les larves s'alimentent des feuilles pendant le printemps et les squelettisent entièrement et forment de longues trainées blanches à transparentes (VanDuyn, 2005).

Au cours des expérimentations sur l'entomofaune des céréales dans certaines régions de l'Algérie *O.melanopus* a été inventorié parmi ces ravageurs (**Hamadi,1998 ; Mohand Kaci, 2001**). Pour lutter contre les criocères, des traitements chimiques par pulvérisation sont préconisés, les produits chimiques utilisés sont : la Deltamethrine, le Diméthoate et le Cypermethrine ( **Pastre et Roa, 1993**).

#### **4.1.4. La Mouche de Hesse**

Elle est appelée également la Cécidomyie destructrice (*Mayetiola destructor*) Elle est signalée en Afrique du Nord. Les larves attaquent les graines basales du blé, de l'orge et du seigle, ou elles forment un renflement bulbeux, provoquant le jaunissement et la mort des feuilles (**Baidani et al., 2002 ; Lhaloui et al., 2010**).

La Mouche de Hesse peut avoir six générations par an Les adultes de la première génération font leur apparition dans le courant du mois d'avril. Ils pondent sur les jeunes blés et leurs larves se développent assez rapidement (**Nsarellah et Lhaloui, 2006**).

Parmi les moyens de lutte donnés par les auteurs picotes l'utilisation de variétés de blé résistantes, la destruction des larves et des pupes en utilisant des insecticides ainsi que la rupture du cycle évolutif de l'insecte en pratiquant un assolement judicieux (**El Bouhssini , 1996 ; Najimi , 2002 ; ElKhelifi, 2003 ; Wise et al.,2006**).

#### **4.1.5. Les pucerons**

Les pucerons occasionnent des dégâts important sur les céréales. Ces insectes piqueurs sucent la sève des plantes, infectent une salive toxique et aussi vecteurs efficaces provoquant des épidémies de maladies virales importantes sur céréales (**Bouchet, 1984 ; Vanduyn et Weisz,2005**). Pour leur développement, les pucerons des céréales dépendent étroitement du milieu ambiant. La température agit sur le taux de multiplication et sur l'envol des ailés (**Bouchet, 1984**).

Les trois principales espèces de pucerons nuisibles des céréales sont *Sitobion avenea*, qui est une espèce très redoutable sur céréales au printemps, *Metopolophium dirhodum* et *Rhopalosiphon padi* , l'agent principale de la transmission du virus de la jaunisse nanisante de l'orge (JNO) en automne (**Bouchet , 1984 ; Leclant, 1999 ; Beaute, 2007 ;Sahraoui,2009**).

La nuisibilité des pucerons des céréales à pailles peut se manifester à deux périodes de la végétation de celle-ci : au stade relativement jeune, principalement en automne, quand il s'agit de l'inoculation du BYDV (*Barley Yellow Dwarf Viruses*), le virus de la jaunisse nanisante de l'orge (JNO) et à la l'épiaison quand il s'agit des dégâts commis par les pucerons des épis ( **Leclant, 1999**).

Pour la lutte contre les pucerons, des études faites en Algérie ont montré qu'il existe des ennemis naturels tels que les coccinelles et les syrphes qui se nourrissent essentiellement de pucerons. **Sahraoui et Gourreau (1999)**, **Mohand Kaci (2001)** citent des espèces de coccinelles et de syrphes qui sont parfaitement acclimatées dans toutes les régions d'Algérie et qui sont : *Coccinella algerica*, *Hippodamia (Adonia) variegata*, *Coccinella undecimpunctata*, *Scymus (Pullus) subvillosus*, *Scymus interrupteurs* et *Scymus levaillanti* sont des espèces très communes au Sud de l'Algérie (Ouargla, Biskra, El Oued).

Pour le contrôle des pucerons des céréales, l'implantation des rosiers à proximité des champs, en encourageant la diversité et l'abondance des prédateurs des pucerons (Coccinelles et Syrphes) et la présence de haies empêchant le déplacement des auxiliaires, sont des méthodes de contrôle efficaces préconisées par **Wratten et al., (2003)**

#### 4.1.6. Autres insectes ravageurs du blé

Les insectes pouvant aussi commettre des dégâts sur le blé sont indiqués dans le tableau 1.

**Tableau 1:** Les insectes ravageurs de blé selon **Doumandji et al.,(1994)**.

Ordre Nom scientifique	Nom commun	Nom scientifique	Nom scientifique
<b>Orthoptères</b>	Criquet pèlerin	<i>Schistocerea gregaria</i>	Toute la plante
	Criquet migrateur	<i>Locusta migratoria</i>	Feuilles et tiges
<b>Coléoptères</b>	Ver blanc	<i>Zabrus tenebriodes</i>	Feuilles et tiges
<b>Hémiptères</b>	Punaise.	<i>Eurygaster sp</i>	Epis
<b>Lépidoptères</b>	Noctuelle des céréales	<i>Spodoptera sp.</i>	Epis
	Noctuelle terricole	<i>Agrotis segetum</i>	Tige et feuilles
	Noctuelle	<i>Sesamia nanagroides</i>	Epis
<b>Thysanoptères</b>	Thrips	<i>Angullulina tritici</i>	Epis

## Chapitre 2 : Les pucerons

---

### 1. Généralités

Les pucerons ou aphides constituent un groupe d'insectes extrêmement répandus dans le monde (Hullé *et al.*, 1998). C'est dans les zones tempérées que l'aphidofaune est plus diversifiée (Ortiz-Rivas *et al.*, 2004). Alors que ces insectes sont rares dans les régions tropicales et subtropicales (Dedryver *et al.*, 2010 ; Peccoud *et al.*, 2010).

Les pucerons sont apparus, il y a environ 280 millions d'années et leur diversification est concomitante avec la radiation des angiospermes (Bonnemaison, 2010). Ils ont colonisé la plupart des plantes à fleurs mais aussi les résineux, quelques fougères et mousses (Turpeau-AitIghil *et al.*, 2011).

La plupart sont inféodés à une seule espèce végétale mais certaines font preuve d'une polyphagie étendue (Fraval, 2006).

Les pucerons sont un sérieux problème en agriculture malgré qu'ils forment un petit groupe (Dedryver *et al.*, 2010), près de 250 espèces sont des sérieux ravageurs des cultures et des forêts (Illuz, 2011).

### 2. Systématique

Les aphides ou pucerons sont classés dans le Super-ordre des Hémiptéroïdes, appartiennent à l'ordre des Hemiptera au sous-ordre des Aphidinea, et à la Super-famille des Aphidoidea (Fraval, 2006). Cette dernière se subdivise en deux grandes familles qui sont les Chermisidae et les Aphididae.

Les Chermisidae sont divisées en huit sous-familles; celles des Telaxidae, des Pemphigidae, des Lachnidae, des Chaitoridae, des Callaphididae, des Aphididae, des Adelgidae et des Phylloxeridae (Bonnemaison, 1962). La famille des Aphididae est divisée en trois sous-familles, celle des Blatichaitophorinae, des Pterocommatinae et des Aphidinae. Les espèces de cette dernière sont réparties entre deux tribus, les Aphidini et les Macrosiphini (Ortiz-Rivas et Martínez-Torres, 2010).

Blackman et Eastop (2007) rapportent que la sous-famille des Aphidinae est la plus grande et contient une proportion élevée de pucerons se nourrissant de plantes herbacées. Selon Cœur d'acier *et al.* (2007), les pucerons plus nuisibles appartiennent au genre *Aphis linnaeus* qui est considéré comme le plus grand genre d'aphides dans le monde.

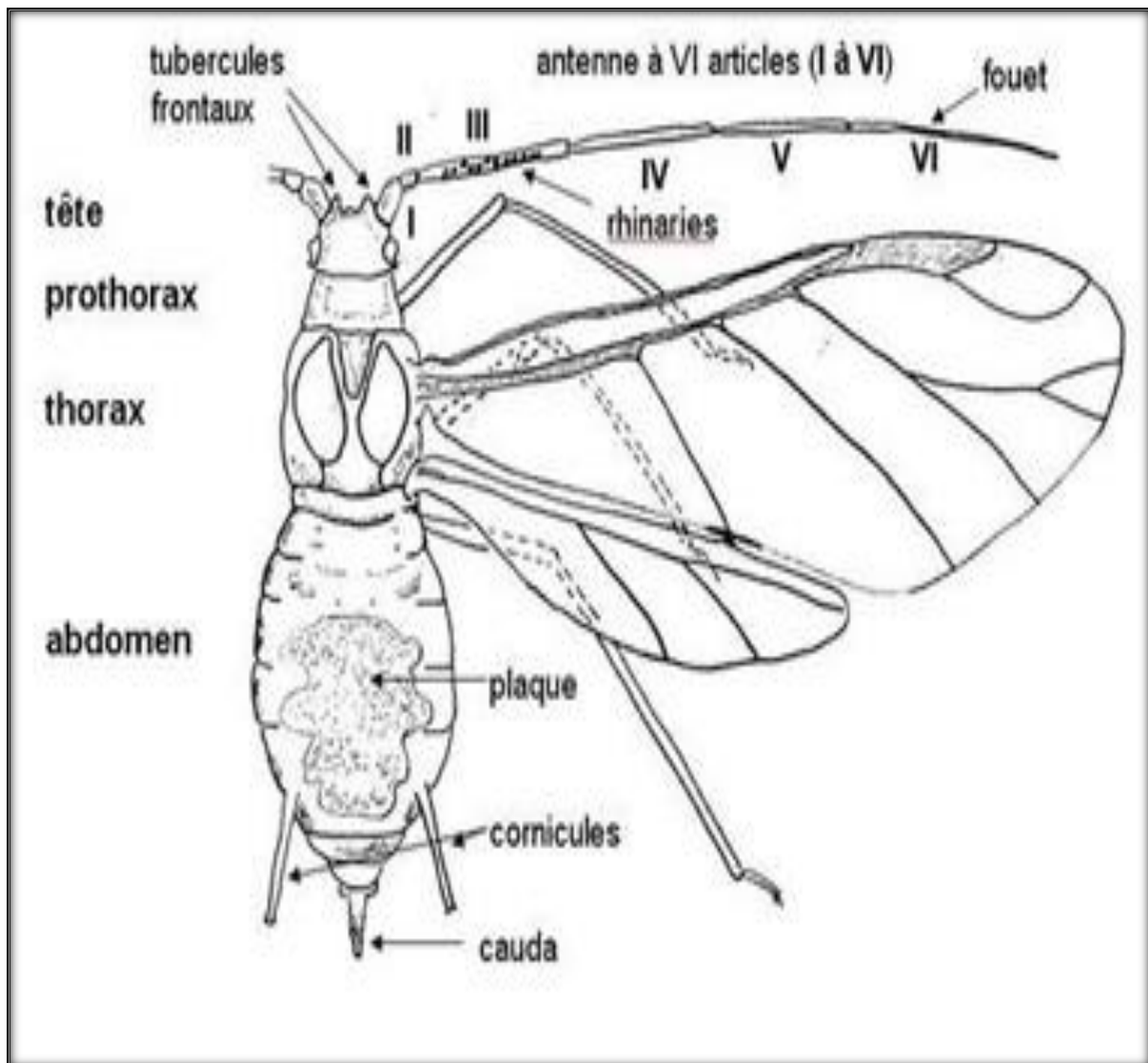
D'après Illuz (2011), les pucerons sont classés comme suit :

- Règne : Animalia
- Phylum : Arthropode
- Classe : insecta
- Ordre ; Hemiptera
- Sous-ordres : Sternorrhyncha
- Super famille : Aphidoidea
- Famille : Aphididae ;
  - Adelgidae ;
  - Eriosomatidae ;
  - Phylloxeridae.

### 3. Caractères morphologiques des pucerons

Les pucerons sont des insectes aux téguments mous de petite taille, mesurant entre 2 à 4mm avec un corps ovale un peu aplati (**Tanya, 2002**). Ce dernier est partagé en trois parties bien distinctes (la tête, le thorax, et l'abdomen) (Figure 2).

En général, la cuticule de l'insecte est une barrière structurellement et chimiquement complexe pour la pénétration du champignon. L'épi-cuticule contient une protéine stable au phénol et est couverte d'une couche cireuse contenant des acides gras, des lipides et des stérols. La pro-cuticule contient de nombreuses fibrilles de chitine enfouies dans une matrice protéinique. Celle-ci peut représenter jusqu'à 70% du poids sec de la cuticule (**Andersen, 1979**).



**Figure 2 : Morphologie d'un puceron (Hullé et Chaubet , 2010).**

### **3.1. La tête**

Généralement, elle est bien séparée du thorax chez les formes ailées, mais non chez les aptères ; elle porte deux antennes de longueur très variable de 3 à 6 articles, qui sont insérées directement sur le front ou sur les tubercules frontaux plus ou moins proéminents. Certains articles antennaires possèdent des organes sensoriels appelés les sensoria ; leurs partie distale amincie est nommée fouet ou processus terminalis à l'arrière de l'œil composé (Tanya, 2002 ; Fraval, 2006).

### 3.2. Le thorax

Il comprend trois segments : le prothorax, le mésothorax, et le métathorax, porte 3 paires de pattes et primitivement deux paires d'ailes. Cependant, chez la plupart des espèces des pucerons coexistent des formes adultes ailées et des formes adultes aptères. D'après **Turpeau-AitIghil et al. (2011)**, chez certaines espèces, la nervation des ailes peut être caractéristique ; les ailes antérieures présentent plusieurs nervures. Ce sont toutes des nervures simples, sauf la nervure médiane qui se manifeste chez la plupart des espèces.

**Selon Godin et Boivin (2002)**, cependant la nervation peut être:

- Non ramifiée;
- Ramifiée, une seule fois;
- Ramifiée, deux fois.

### 3.3. L'abdomen

L'abdomen porte généralement dans sa partie postérieure une paire de cornicules (ou siphons) de forme et de longueur très variables, Parfois pourvues d'une réticulation ou surmontées d'une collerette (**Hullé et al., 1998**). Les cornicules manquent dans quelques genres et parfois même selon les formes dans une même espèce (**Mondor et Roitberg , 2002**).

Le dernier segment abdominal, la queue (cauda) plus ou moins développée et de forme variable selon les espèces (**Fredon, 2008**).

## 4. Cycle de vie

Le cycle de vie des pucerons témoigne de l'étonnante plasticité adaptative de ce groupe d'insectes caractères qui contribue de manière considérable à leur succès en tant que ravageurs plantes .

Les pucerons peuvent être divisés en deux groupes en fonction de leur cycle de vie :

1. Les espèces dites monoecique qui se nourrissent sur les espèces de plantes Vivaces ou Herbacées tout au long de l'année ;
2. Les espèces dites dioeciques ou hétéroeciques qui , au cours de leur cycle biologique , changent d'hôte et migrent d'un hôte primaire ( Souvent des plantes ligneuses , en hiver) vers une ou plusieurs espèces secondaires ( telles des plantes herbacées durant l'été) (**Dixon, 1998**).

Seulement environ 10% des espèces de pucerons sont dioeciques (**Eastop, 1986**), mais certaines d'entre elles ,comme *Aphis fabae* et *Myzus persicae* se retrouvent en abondance dans la nature . La migration des colonies de pucerons d'une plante hôte à l'autre est facilitée par la production de forme ailée à la fin du printemps et durant l'automne.

Au cours d'un cycle annuel de vie, les pucerons d'une même espèce, voire d'un même clone, peuvent compter de nombreuses formes ou morphes. Ces différents morphes coexistent dans une colonie de pucerons et les différences que l'on observe entre elles peuvent avoir une origine génétique ou être induites par les conditions environnementales (Figure 3) (Eaton, 2009).

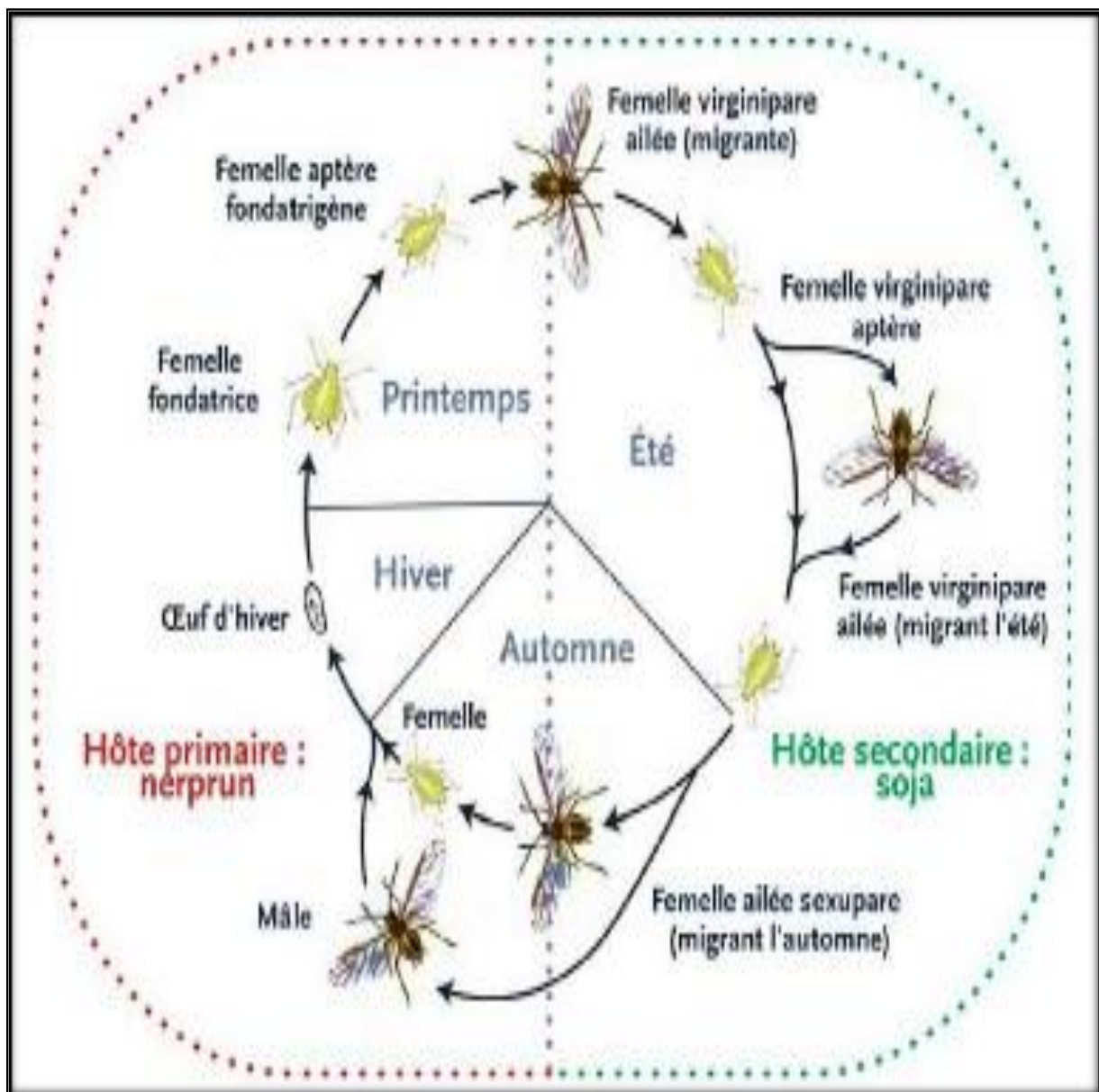


Figure 3 : Représentation schématique du cycle de vie des pucerons (Alain, 2006)

## 5. Les relations des insectes phytophages avec leurs plantes hôtes

Le régime phytophage chez les insectes est peu répandu. Sur les 25 taxons d'arthropodes terrestres, seulement 10 d'entre eux ont évolué vers la phytophagie partielle ou complète. S'alimenter de plantes nécessite différentes adaptations à plusieurs niveaux, comme par exemple, l'habileté à surmonter les défenses chimiques et physiques (ex. poils) des plantes. La proportion des différents acides aminés varie grandement entre les tissus des insectes et ceux des plantes (**Strong et al., 1994**). Les végétaux sont pauvres en acides aminés azotés et en lipides. Cette différence entre les insectes et leur ressource alimentaire se reflète dans la faible biomasse assimilée et transformée en tissus de croissance. Des études ont démontré que seulement 2 à 38 % de la matière végétale ingérée par un insecte est efficacement transformée. Malgré l'obstacle évident que représente la déficience en azote, les insectes ont développé une série de comportements et d'adaptations physiologiques pour augmenter au maximum l'assimilation de matières provenant des plantes. Certains groupes d'insectes, comme les Isoptères et les Curculionidae, vivent en symbiose avec des microorganismes qui digèrent la cellulose et la rendent assimilable. D'autres s'alimentent de parties des plantes contenant le plus d'azote (**Strong et al., 1994**).

Les insectes phytophages n'ont pas tous le même type de relation avec leurs plantes hôtes. Certains insectes sont polyphages, d'autres oligophages ou monophages. La polyphagie chez les insectes se définit comme étant la capacité des insectes à s'alimenter sur une grande variété d'ordres de plantes et parfois même de plusieurs classes (**Jolivet , 1992 ; Jolivet , 1998**). L'oligophagie représente la relation qui existe entre les plantes d'une même famille et certains insectes. De plus, les insectes qui s'alimentent de plantes de groupes complètement différents au cours des stades successifs de leur vie sont aussi oligophages. Par exemple, certains lépidoptères du genre *Coleophora*, qui, au stade larvaire, ne s'alimentent que de plantes du genre *Labiatae*, puis à l'automne migrent sur des herbacées de différentes espèces (**Jolivet, 1992**).

Les insectes qui, autant aux stades larvaires qu'au stade adulte s'alimentent d'une seule espèce de plante sont dit monophages. La polyphagie semble avoir été le type le plus primitif de relation trophique des insectes avec leurs plantes hôtes. L'oligophagie et la monophagie seraient apparues suite au développement graduel de mutations restrictives et d'adaptations étroites avec leurs plantes hôtes (**Jolivet , 1992**).

Une question vient à l'esprit : pourquoi certains insectes ont évolué en se restreignant à quelques espèces de plantes malgré le fait que celles-ci représentent une ressource peu assimilable, Lorsque l'on décrit la relation entre les plantes et les insectes, on parle de coévolution plantes-insectes. La coévolution est le changement évolutif réciproque entre les

espèces où il y a des interactions. Par exemple, l'espèce A induit une réponse comportementale à la pression de sélection imposée par l'espèce B et l'espèce B change son comportement en réponse au changement de l'espèce A (**Strong et al., 1994**). Lorsque les insectes ont choisi des plantes comme ressource alimentaire cela a, par le fait même, exercé une pression de sélection sur les plantes, diminuant ainsi leur fitness. Ceci a contraint les plantes à mettre au point des moyens de défenses, surtout chimiques, pour se protéger des insectes. La pression de sélection a conduit les insectes à mettre au point des moyens de détoxiquer les produits chimiques contenus dans les plantes, leur ressource alimentaire. Ceux-ci avaient un avantage certain à contourner les défenses des plantes. Cela leur permettait d'utiliser une niche écologique peu exploitée par les autres vertébrés, car les produits chimiques utilisés par les plantes étaient aussi répulsifs et toxiques pour eux. Le mécanisme le plus important de détoxification des différents produits chimiques contenus dans les plantes, mis au point par les insectes, est un groupe d'enzymes nommées les “ oxydases à fonction mixte (MFO) ” (**Brattsten , 1979; Feyereisen , 1999**).

La fonction principale de ces enzymes est la transformation de composés liposolubles (comme le sont la majorité des toxines produites par les plantes) en produits hydrosolubles facilement excrétés par les insectes. Ces enzymes permettent aussi de synthétiser ou de dégrader des composés ecdystéroïdes et l'hormone juvénile. Ces substances sont nécessaires au développement et à la reproduction des insectes. Les MFO sont associées au réticulum endoplasmique de la membrane des cellules du tractus alimentaire, des corps gras et des tubules de Malpighi. Les MFO sont très polymorphes, ce qui offre un champ d'action très large. Des études sur la résistance des insectes aux insecticides ont démontré qu'après quelques générations, les insectes deviennent résistants à certains insecticides, non pas par l'acquisition de nouveaux enzymes de détoxification mais par une activité accrue des MFO (**Futuyma , 1983 ; Feyereisen , 1999** ). De tels résultats ont permis de mieux comprendre la coévolution des insectes et des plantes. À l'origine, les insectes ont pu coloniser une grande diversité de plantes en calibrant leurs enzymes de façon à détoxiquer les toxines produites par leurs plantes hôtes (**Futuyma , 1983**). Par contre, le fonctionnement des MFO entraîne des coûts énergétiques. La polyphagie chez les insectes induit un taux d'activité des MFO plus élevé que l'oligophagie et la monophagie (**Strong et al., 1994**). Malgré cela, plusieurs groupes d'insectes sont demeurés polyphages. Il faut garder en tête que les relations trophiques dans un regroupement écologique ne s'arrêtent pas aux simples interactions alimentaires (**Rhodes , 1979**). Les insectes doivent interagir avec leurs spécifiques avec qui ils entrent en compétition pour la nourriture. De plus, ils doivent faire face à la compétition interspécifique, à la

prédation et aux conditions environnementales. Chez les insectes qui ont évolué vers la monophagie, la pression de sélection exercée par les facteurs autres que la toxicité des plantes a probablement favorisé l'évolution vers une spécialisation pour une espèce de plante particulière. En plus, certains insectes monophages, comme le papillon monarque *Danaus plexippus* (L.), peuvent emmagasiner, dans leurs tissus, les substances toxiques des plantes et s'en servir comme leur propre moyen de défense. L'atteinte d'un équilibre est recherché tant chez les insectes polyphages que les oligophages et les monophages. C'est ce qui explique en partie l'évolution vers ces trois comportements alimentaires différents (**Cloutier , 1999 ; Jolivet , 1998**).

### **5.1. La spécificité des insectes à leur plante hôte**

On a vu plus haut qu'une des raisons majeures du grand succès évolutif des insectes est leur capacité de détoxifier les divers produits chimiques contenus dans les plantes. Ces mêmes produits chimiques sont impliqués dans la spécificité des insectes à leur(s) plante(s) hôte(s). De plus, lorsque les insectes sont spécifiques à une plante, ils doivent y retrouver certaines caractéristiques nutritionnelles essentielles. Certains modèles d'optimisation démontrent que la diète optimale pour un insecte doit lui permettre de réaliser correctement son cycle vital, le plus rapidement possible. Elle doit aussi lui permettre de conserver un bon fitness et assurer la survie de sa progéniture (**Janieke , 1990**). Après avoir localisé leurs plantes hôtes (voir détails plus loin), soit par des stimuli visuels, chimiques ou les deux, les insectes doivent vérifier le contenu en substances chimiques de la plante. C'est aussi à ce niveau que se joue la spécificité (**Vanloon , 1996 ; Jolivet , 1998**). La perception des substances chimiques chez les adultes se fait surtout au niveau des cellules de la Galea des maxilles. **VanLoon , (1996)** cite des travaux de laboratoire réalisés par **Mitchell et Harrison (1995)** qui ont permis de démontrer que la chrysomèle du navet, *Entomoscelis americana* Brown, une espèce de coléoptère ravageur des crucifères, possède une cellule nerveuse spécifique au sucrose et une autre cellule nerveuse spécifique au glucosinolate.

L'intégration du signal transmis par ces deux cellules stimule ou inhibe l'alimentation (**Vanloon , 1996**).

Les papillons du genre *Pieris* possèdent, en plus des cellules sensibles à des composés stimulant la ponte, des cellules sensibles aux produits inhibiteurs de l'oviposition. C'est le ratio entre ces deux produits qui déterminera le comportement de ponte des femelles. Un

système analogue chez les coléoptères adultes n'a pas encore été mis en évidence . Chez les larves, la spécificité à la plante hôte se fait au niveau des sensilles neuronales styloconiques des maxilles (**Vanloon , 1996**).

La spécificité d'un insecte à une plante hôte a bien sûr un fondement génétique et celui-ci change selon l'interaction des différentes forces évolutives (**Carrière et Roitberg , 1995**). Par exemple, une corrélation génétique positive entre l'acceptation d'une plante hôte adéquate qui est en plus toxique, peut contribuer au maintien de cet hôte dans la diète de l'insecte. Un renforcement de ce comportement peut provenir de la rareté de l'hôte et du déclin des populations de l'ancien hôte .Plusieurs autres facteurs peuvent influencer la spécificité d'un insecte à une plante hôte. Entre autres, l'abondance locale d'une seule espèce de plante peut favoriser la spécialisation de l'insecte (**Carrière et Roitberg , 1995**).

## **6. Interaction plante- pucerons**

Les pucerons ailés sont capable de localiser leurs plantes hôtes à distance en mettant en jeu des stimuli visuels, olfactifs e gustatif (**Webster et al., 2008**).

Les stimuli visuels correspondent à des couleurs, les pucerons sont très sensible pour la couleur et reconnaissent la couleur des feuilles de leur plante hôte (**Döring et Chittka, 2007 ; Wiwart et Sadej , 2008**).

Une fois au contact de la plante , les pucerons font appel à la gustation en introduisant leurs styles dans la plante hôte jusqu'à ce que la composition de la sève soit reconnue , la gustation joue un rôle dans l'acceptation ou de la plante par le puceron (**Will et Vambel, 2006 ; Guerrieri et Digilio, 2008**).

### **6.1. Dégâts causés par les pucerons**

Les pucerons sont des parasites majeurs des végétaux dans le monde, avec des conséquences économiques négatives sur l'agriculture, les forêts et l'horticulture (**Fournier, 2010**). Ils peuvent causer de graves pertes aux plantes cultivées (**Qubbaj et al., 2004**).D'après **Christelle (2007) et Eaton (2009)**, les pertes que causent les pucerons sont de deux types:

#### **6.1.1. Les dégâts directs**

Le puceron est un des ravageurs majeurs des cultures. Ils posent de nombreux problèmes sur les cultures par les dégâts causés, La perforation des tissus végétaux blesse la plante, en réaction à cette agression on observe souvent une modification des tissus végétaux comme

l'enroulement des feuilles colonisées qui réduit la surface photosynthétique et finalement induit une baisse de rendement. L'exploitation de la sève et l'injection de salive toxique affaiblissent la plante (**Miles, 1968 ; Miles, 1989**).

### **6.1.2. Les dégâts indirectes**

Les dégâts indirects des pucerons sont essentiellement de deux ordres qui sont:

#### **6.1.2.1. Production de Miellat et fumagine**

Les produits non assimilés de la digestion de la sève, riches en sucre, sont éjectés sur la plante sous forme de miellat. Cette substance peut contrarier l'activité photosynthétique de la plante soit directement en bouchant les stomates, soit indirectement en favorisant le développement de champignons saprophytes. Ceux-ci provoquent des fumagines qui entravent la respiration et l'assimilation chlorophyllienne ou souillent les parties consommables (fruits par exemple) et les rendent ainsi impropres à la commercialisation (**Christelle, 2007; Giordanengo et al., 2010**).

#### **6.1.2.2. Transmission des virus Phytopathogènes**

Les pucerons sont également vecteurs de virus de plantes. L'injection de salive est également à l'origine de la transmission de maladies virales ou parasitaires. Les pucerons constituent ainsi le plus important groupe d'insectes vecteurs de virus phytopathogènes, en transmettant au moins 275 virus (**Rabatel, 2011**).

##### **a. Les virus circulants (persistants) ou Virus de stylet**

Les virus transmis selon ce mode sont transportés de façon interne, mais jamais ils ne se répliquent durant leur passage dans le milieu intérieur du vecteur. Ils doivent traverser différentes barrières membranaires: au niveau du tube digestif pour entrer, et des glandes salivaires pour sortir de leur vecteur. Le virus ingéré avec la sève phloémique lors de la prise de nourriture du vecteur traverse les cellules épithéliales de l'intestin vers l'hémocèle (phase d'acquisition) et se diffuse dans l'hémolymphe jusqu'aux glandes salivaires. Il traverse les cellules de ces glandes, et est injecté dans la plante hôte avec la salive lors d'une nouvelle piqûre (phase d'inoculation) (**Hébrard et al, 1999; Brault et al., 2010**).

##### **b. Les virus non circulants**

Les virus non circulaires sont acquis et transmis au cours des piqûres brèves; des piqûres d'une durée de cinq secondes suffisent mais les meilleurs résultats sont obtenus pour des durées comprises entre 15 et 60 secondes. Si la durée de la période d'acquisition

augmente, ces virus peuvent être transmis immédiatement après qu'ils ont été acquis, sans qu'une période de latence soit nécessaire mais le puceron ne demeure pas longtemps infectieux après quelques minutes après avoir rencontré une plante saine.. Ce type de virus regroupe les virus non-persistants et les virus semi-persistants (**Raccah et Fereres, 2009**).

#### **c. Virus non persistants**

Selon **Raccah et Fereres (2009)**, les virus de ce type sont acquis par les pucerons dans les tissus libériens en même temps que la sève prélevée pour leur alimentation. Le temps requis pour atteindre le liber varie naturellement selon les espèces aphidiennes. Il est fréquemment d'une demi-heure et excède une heure le plus souvent.

#### **d. Virus semi-persistants**

Ces virus ne peuvent généralement pas être acquis au cours de piqûres brèves mais au contraire les chances de transmission augmentent parallèlement avec la longueur de la durée de la période d'acquisition. Il semble que ce type de virus adhère à l'intérieur du canal alimentaire ou il s'accumule puis il est relâché progressivement où il s'accumule puis il est relâché (**Braulte et al., 2010**).

## **8. Lutte contre les pucerons**

Le niveau des populations de pucerons dans les cultures est extrêmement variable d'une année à l'autre et peut évoluer très rapidement au sein d'une même culture. Il dépend bien sûr des capacités reproductives propres aux différentes espèces mais aussi de facteurs extérieurs dépendant de l'environnement physique et biologique. Ces facteurs peuvent être très nombreux, ce qui explique les différences rencontrées dans les tentatives de modélisation de leur influence sur le développement des populations de pucerons (**Hullé et al, 1999**).

### **8.1. Lutte préventive**

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

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

## **8.2. Lutte curative**

### **8.2.1. Lutte chimique**

Pour réduire les dégâts d'insectes, l'utilisation des pesticides reste le moyen le plus largement utilisé et le plus efficace aujourd'hui (**Ferrero, 2009**).

Selon **Hullé et al (1999)**, les principes de la lutte chimique sont:

- L'empêchement d'acquisition du virus lors de piqûres d'essai par l'utilisation d'huiles végétales non phytotoxiques.
- Le choix des produits: ils doivent être avant tout sélectifs afin de préserver la faune utile. Ces produits doivent aussi être dotés d'un effet de choc élevé, et d'une bonne rémanence, en plus ils doivent appartenir à des familles chimiques différentes afin d'éviter ou de retarder le phénomène de résistance. Il est préférable que le choix porte sur des produits systémiques qui touchent même les pucerons protégés par l'enroulement des feuilles.

### **8.2.2 .La lutte biologique**

D'après l'organisation internationale de la lutte biologique contre les animaux et les plantes nuisibles **Hautier (2003) ; Lambert (2005) et Maisonhaute (2009)**, la lutte biologique est l'utilisation des organismes vivants (insectes, bactéries, nématodes,...) ou de leurs dérivés pour contrôler les populations de nuisibles et empêcher ou réduire les pertes ou dommages causés aux cultures.

#### **❖ La lutte microbiologique par les champignons entomopathogènes**

Les champignons pathogènes d'insectes occupent une place particulière en pathologie des invertébrés et dans la recherche d'organismes capables de réguler les pullulations d'invertébrés nuisibles, en santé végétale, humaine ou animale.

Néanmoins, ces champignons bien qu'efficaces ont souvent une activité très dépendante des conditions environnementales notamment climatiques (**Ferron et al., 1991 ; Lacey et al., 1996**).

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.

Paradoxalement, les études jusqu'alors développées se sont surtout penchées sur des aspects plutôt éco-pathologiques et morphologiques. Elles ont négligé ou se sont peu intéressées aux contraintes climatiques par exemple à travers des approches écologiques ou génétiques. La dépendance de ces pathogènes aux contraintes climatiques est à prendre

en considération dans le choix et la sélection d'isolats (mycoïsecticides) à introduire dans des zones où le climat est souvent différent de celui d'où ces champignons sont originaires. Par ailleurs, une amplification des phénomènes d'émergence et de réémergence de certains bio-agresseurs est l'une des conséquences du changement climatique. Ces ravageurs invasifs présentent un haut potentiel d'adaptation à leur nouvel environnement et un remarquable pouvoir de résistance aux insecticides. Ils sont souvent mal connus par les agriculteurs des zones nouvellement infestées et mal maîtrisés par les stratégies de lutte classiques employées. Ceci mène alors à un véritable contexte de crise phytosanitaire, problème d'autant plus grave quand ces ravageurs touchent à des cultures stratégiques et économiquement importantes (**Ferron *et al.*, 1991 ; Lacey *et al.*, 1996**).

## Chapitre 3 : Champignons entomopathogènes

---

### 1. Généralité sur les Champignons

Les champignons (fungi ou mycètes) constituent un groupe d'organismes hétérotrophes ubiquistes, riches de quelques 120000 espèces, présentant des structures et des caractéristiques biologiques extrêmement diversifiées, adaptés au mode de vie saprophyte, parasitaire ou symbiotique (**Semal *et al.*, 1993 ; Kirk *et al.*, 2001**).

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

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

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

Comme chez les bactéries, la digestion des grosses molécules chez les mycètes doit commencer dans le milieu extérieur car seules les molécules de taille relativement petites peuvent franchir la paroi et gagner le cytoplasme (**Davet, 1996**). Les molécules complexes ou polymères doivent auparavant être dégradés en monomères par des enzymes excrétées ou

liées à la paroi. Ces enzymes extracellulaires sont largement exploitées par la bio-industrie (**Botton et al., 1990**).

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

## **2. Champignons entomopathogènes**

Le mot « champignons entomopathogènes » ou « champignons qui provoquent des maladies aux insectes » est limité aux genres ou aux espèces de champignons qui peuvent être des agents pathogènes d'arthropodes tels que des insectes ou des acariens. Les premières observations sur les maladies de ces invertébrés ont été faites en Chine et la plus ancienne publication sur ce sujet remonte à 1726 avec la description de l'espèce *Cordyceps sinensis* récoltée sur des larves d'un lépidoptère (**Samson et al., 1988**).

L'utilisation de certains de ces champignons a donné des résultats satisfaisants contre plusieurs espèces d'insectes (**Yee et Lacey, 2005 ; Ekesi et al., 2003**). Les genres *Metarhizium* et *Beauveria* sont les plus utilisés en lutte biologique. Aussi, *Metarhizium anisopliae* a fait l'objet de nombreux travaux relatifs au mode d'infestation du champignon (**Hajek et St Leger, 1994**), les mécanismes de la toxicité de l'insecte (**Clarkson et Charnley, 1996**) et la pénétration des spores à travers la cuticule de l'hôte (**Brooks et al., 2004**). Plusieurs produits phytosanitaires commerciaux destinés à la lutte contre différents types de ravageurs des cultures ont été extraits à partir de ce champignon. Ces produits sont caractérisés par la présence de toxines appelées destruxines, sécrétées essentiellement par *M. anisopliae* (**Vey et al., 2001**).

### **2.1. Mode d'action**

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

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

Les champignons peuvent infecter les insectes par pénétration directe à travers la cuticule (Clarkson et Charnley, 1996), au contact de la cuticule de l'insecte, la spore germe et pénètre au travers du tégument en combinant des pressions mécanique et enzymatiques (St Leger, 1993). Le champignon croit rapidement dans l'hémocoel. Les insectes sensibles au champignon meurent généralement dans un délai de 3 à 10 jours. Quand l'insecte meurt, le champignon entre dans un stade hyphal, colonise les organes internes puis sporule à la surface de l'insecte. Le cycle infectieux est généralement le même pour tous les champignons entomopathogènes le processus de pénétration est l'étape la plus importante de la pathogénèse. Le mode d'infection des champignons entomopathogènes se divise en quatre étapes distinctes : l'adhésion, la germination, la pénétration, la multiplication et la dissémination (Figure 4) (Ferron *et al.*, 1991).

### **2.1.1. L'adhésion**

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

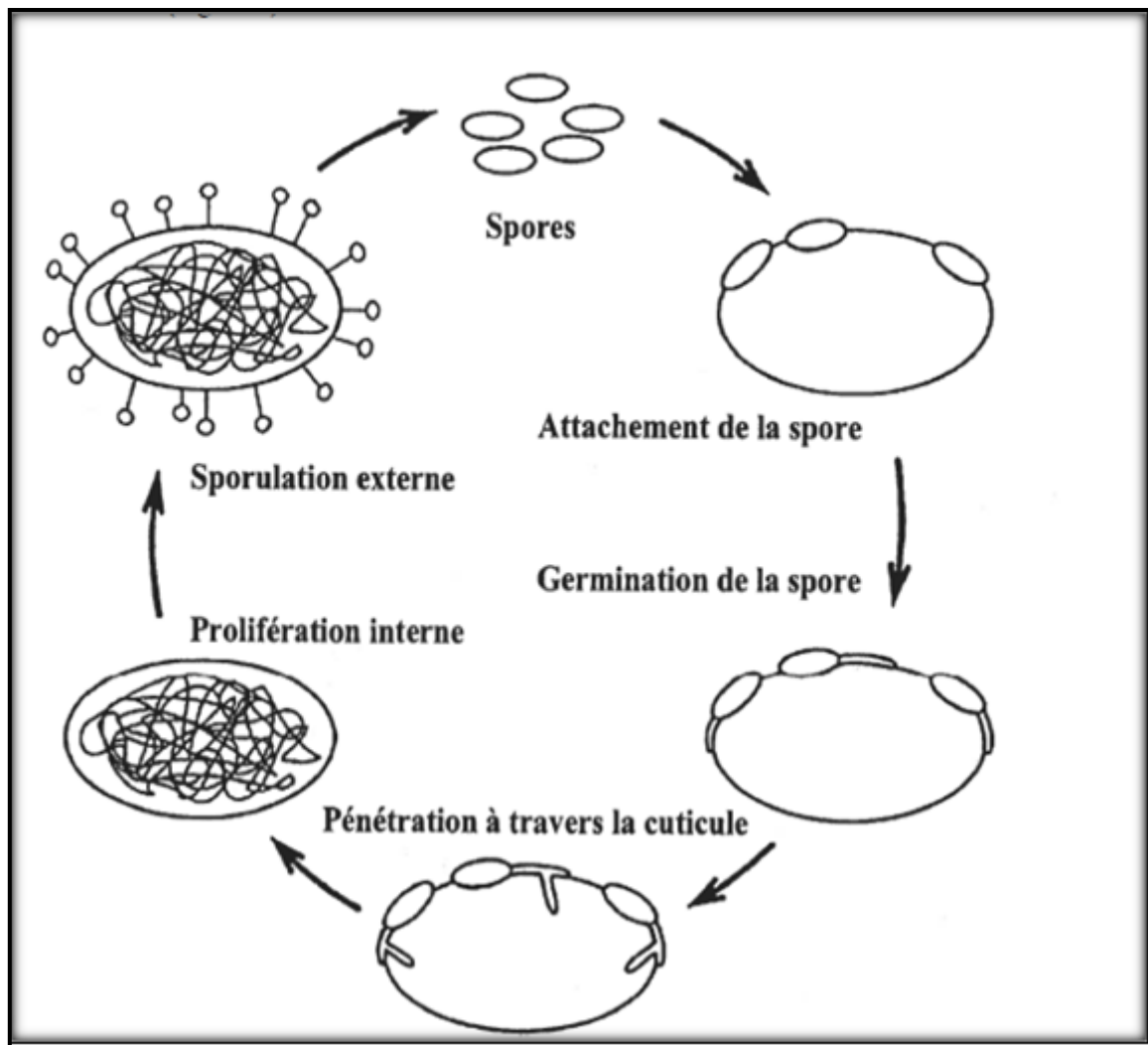
### **2.1.2. La germination**

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

### **2.1.3. La pénétration, multiplication et la dissémination**

A l'intérieur de l'hôte, le champignon commence son développement et sa propagation dans les tissus de l'insecte. La réussite de l'attaque dépend, entre autre, de la capacité de l'entomopathogène à dépasser les mécanismes de défense employés par l'hôte (quinines et mélanines) pour faire face à cette attaque (**Latge et Monsign, 1988**). La colonisation de l'hôte dépend alors de la capacité du champignon à surmonter la réponse immunitaire ou de l'insecte à se défendre (mélanisation, réponse cellulaire, etc.). Après une phase de développement du champignon dans l'hémocoel, les tissus (corps gras, tissu intestinal, tube de Malpighi) sont attaqués, provoquant l'arrêt du processus d'alimentation de l'insecte, du stade de l'insecte, de sa taille et de la température ambiante.

Il n'est pas surprenant, vu la complexité de la cuticule, que les champignons entomopathogènes aient besoin d'une série d'enzymes hydrolytiques pour assurer la pénétration cuticulaire et fournir la nourriture nécessaire à la croissance. On connaît surtout la protéase. Cette enzyme a une forte activité sur la cuticule des insectes et est la protéine prédominante produite pendant la formation de l'appressorium (**St Léger *et al.*, 1993**). Lorsque l'insecte meurt, le champignon sécrète un antibiotique, l'oosporine, qui lui permet de surmonter la compétition des bactéries intestinales. Il s'ensuit une momification du cadavre transformé en sclérote, phase nommée saprophyte (Figure 4).



**Figure 4** : Cycle biologique des champignons entomopathogènes (Ferron *et al.* ,1991).

## 2.2. Les métabolites des champignons entomopathogènes

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

Les microorganismes ne produisent pas leurs métabolites secondaires avant d'avoir terminé leur phase de croissance et d'avoir entamé la phase stationnaire, appelé idiophase.

En effet, le métabolite secondaire peut être un produit d'un métabolite primaire du même microbe (Calvo *et al.*, 2002 ; Tortora *et al.*, 2003 ) qui se forme (le métabolite primaire) au

moment où les cellules se divisent durant la phase de croissance logarithmique appelée trophophase (**Tortora et al., 2003**).

Les métabolites secondaires englobent tout produit à activités antibiotiques, pharmaceutiques, immunosuppressive et toxiques (mycotoxine et phytotoxine) (**Jae-Hyuk et Keller, 2005 ; Keller et Woobok, 2005**).

Chez les mycètes, la production de métabolites secondaires est un processus couplé au développement morphologique en particulier à la phase de sporulation (**Hapwood, 1988 ; Mapleston et al., 1992 ; Stone and Williams, 1992 ; Demain et Fang, 2000 ; Calvo et al., 2002**). De ce fait, les métabolites secondaires peuvent avoir certaines activités :

- 1- Métabolites qui activent la sporulation (acide linoléique et ses dérivés produit par *Aspergillus nidulans*) (**Champ et al., 1987 ; Champ et El-Zayat, 1989 ; Mazur et al., 1991 ; Calvo et al., 2002**) ;
- 2- Pigments nécessaires (mélanine) pour la formation des spores sexuelles et asexuelle (**Kawamura et al., 1999**) ;
- 3- Métabolites toxiques secrétés par des colonies à la période approximative de la sporulation (la biosynthèse des mycotoxines) (**Trail et al., 1995 ; Hapwood, 1988 ; Alspaugh et al., 1997**).

Ultérieurement, les métabolites secondaires peuvent :

1. Retarder la germination des spores jusqu'à ce que les conditions environnementales soient favorables ;
2. Protègent les spores en dormance contre des amibes ;
3. Eliminer dans l'environnement immédiat des microorganismes concurrents pendant la germination (**Demain et Fang, 2000**).

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

Ce processus constitue chez les mycètes un régulateur global de métabolites secondaires appelé Lae A. En effet, ce facteur a été identifié chez *A. nidulans* et plus récemment chez *A. fumigatus*. Cette découverte a permis d'augmenter ou diminuer la production des métabolites secondaires chez un mycète en modulant l'expression de Lae A. Par exemple, l'over expression du gène Lae A augmente considérablement la production de pénicilline chez *A. nidulans* et la production de lovastatine chez l'*A. terreus* et la suppression de Lae A chez *A.*

*fumigatus* élimine la production du gliotoxine et d'autres métabolites secondaires et diminue la virulence de ce mycète pathogène (Woobok et Keller, 2004 ; Keller et Woobok, 2005).

### **2.2.1. Les enzymes**

L'excrétion par un agent pathogène d'un enzyme qui attaque l'hôte en avant du mycélium est le mécanisme parasitaire le mieux connu. On sait maintenant que l'équipement enzymatique des Champignons parasites est si complet qu'ils peuvent agir sur le métabolisme d'à peu près tous, sinon tous, les constituants chimiques de leurs hôtes, à l'exception de la cutine (Pedrini *et al.*, 2010 ; Zhang *et al.*, 2012 ; Pedrini *et al.*, 2013).

#### **2.2.1.1. Protéase**

Les protéases sont des enzymes qui catalysent l'hydrolyse des protéines, en scindant la liaison peptidique qui lie deux acides aminés dans une chaîne peptidique. Les protéases sont divisées en deux groupes selon leur site d'action, soit les protéases intracellulaires ou extracellulaires. Les protéases intracellulaires sont importantes pour une variété de processus cellulaires et métaboliques. Les protéases extracellulaires sont importantes pour l'hydrolyse des protéines dans l'environnement extérieur de la cellule (Kalisz, 1988). Ces dernières sont plus intéressantes à utiliser en industrie, car elles ne nécessitent pas d'étape de lyse cellulaire pour en faire l'extraction. Une centrifugation suffit pour les séparer des cellules. Les protéases se différencient également selon leur mode d'action en : endopeptidases et exopeptidases. Les deux types de protéases sont divisés en plusieurs classes et sous-classes (Tableau 2).

**Tableau 2 : Classification des protéases (Rao *et al.*, 1998).**

Type de protéase	Classes et sous-classes
<b>Exopeptidases</b>	Aminopeptidases -Peptidyle peptidases -Dipeptidyle peptidases -Tripeptidyle peptidases Carboxypeptidases -Sérine carboxypeptidases -Métallo-carboxypeptidases -Cystéine carboxypeptidases
<b>Endopeptidases</b>	Protéases sérines Protéases cystéines ou protéases thiols Protéases aspartiques ou protéases acides Métallo-protéases

➤ **Protéases fongiques**

Les enzymes fongiques représentent 40% du marché mondial des enzymes industrielles. Les protéases constituent les enzymes les plus importantes qui peuvent être produites par plusieurs genres fongiques tels qu'*Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Geotrichum*, *Fusarium*, *Rhizomucor*, *Endothia*, etc. Ce groupe d'enzymes dispose de possibilités d'applications biotechnologiques très étendues. Actuellement elles sont de plus en plus utilisées en boulangerie, dans l'industrie alimentaire humaine et animale, dans les détergents pour lessives, dans l'industrie des tanneries et l'industrie pharmaceutique (Frazier, 1967 ; Ul-haq *et al.*, 2003)

**2.2.1.2. Chitinases**

Les champignons filamenteux possèdent une famille très large de chitinases (Adams, 2004) qui sont classées en deux groupes. Les enzymes du premier groupe partagent des similarités structurales avec des chitinases de plantes et sont putativement associées à la paroi cellulaire, suggérant un rôle dans le remodelage de la paroi durant la croissance. Les chitinases du deuxième groupe sont plutôt proches des chitinases de bactéries, impliquées dans la dégradation de chitine exogène considérée comme source d'énergie et de nutriments. Chez *Aspergillus fumigatus*, celles appartenant au premier groupe sont plus abondantes que celles du deuxième groupe. Chaque chitinase du premier groupe contient un domaine riche en

serine/threonine et une ancre GPI putative, suggérant son ancrage à la membrane plasmique ou à la paroi cellulaire. La disruption du gène de premier groupe ChiA d'*Aspergillus nidulans*, conduit à une diminution de la fréquence de germination des spores et à un faible taux de croissance (Takaya *et al.*, 1998). Chez les oomycètes, la seule chitinase caractérisée, est la chitinase sécrétée AaChi1 d'*Aphanomyces astaci*, parasite de l'Ecrevisse, qui est potentiellement impliquée dans la dégradation de la cuticule de l'hôte (Andersson et Cerenius, 2002).

### 2.2.2. Les toxines

Au cours de l'attaque, le système immunitaire tente de résister aux champignons entomopathogènes et certaines enzymes de détoxification à l'intérieur de l'insecte. Cet système joue un rôle dans la protection des insectes de l'impact négatif des agents pathogènes et leurs toxines. Quand les insectes sont attaqués par ces pathogènes, les enzymes de détoxification agissent une régulation des métabolites comme les hormones, les phéromones et autres substances biologiquement actives. Estérase (EST) et la glutathion S-transférase (GST) sont les enzymes les plus courantes dans la détoxification des xénobiotique (Zibae *et al.*, 2009).

On sait que les attaques des champignons entomopathogènes implique par les métabolites secondaires parce que ces dernières sont toxiques pour les insectes (Sokolova *et al.*, 1999 ; Xia *et al.*, 2000 ; Xia *et al.*, 2001), aussi bien , les champignons entomopathogènes et leurs toxines peuvent induire des immuno-réaction et des changements dans l'activité des enzymes de détoxification chez l'hôte.

Plusieurs mycotoxines ont été identifiées et/ou isolées de filtrats de cultures ou de mycélium de: *Beauveria*, *Métarhizium*, *Nomuraea*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Verticillium*, *Paecilomyces*, *Isaria*, *Cordyceps* et *Entomophtora* (Ignoffo, 1988).

Parmi les mycotoxines déjà purifiées, on distingue: les destruxines: l'hyphomycète *Métarhizium anisopliae* appartenant à la classe des Deuteromycètes produit plusieurs composés toxiques tels que :

- La prodestruxine, les destruxines A, B, C, D et la desmethyldestruxine B, les destruxines E1' A1' A.z, B1' B2' C2, D1 ' O2 et E1 produite · par *Métarhizium anisopliae* (Païs *et al.*, 1981). s'attaque aux Orthoptères, Coléoptères, Lépidoptères, Hémiptères, Hyménoptères et Arachnides (Ignoffo, 1988). Il s'attaque aussi aux Diptères (Mohamed et Nelson, 1985).

- La cordycépine (3'-déoxyadénosine): c'est une toxine produite par le *Pyrenomycète clavicipitale et Cordyceps militaris* appartenant à la classe des Ascomycotina. Plus de 250 espèces de *Cordyceps* ont été trouvées sur des espèces de Diptères, Hyménoptères, Coléoptères, Lépidoptères, Hémiptères, Isoptères et Araignées **(Ignoffo, 1988)**.
- Les Aflatoxines: Ce sont des toxines produites par *Aspergillus flavus* et *A. parasiticus*. On distingue les aflatoxines B I' B2' G1 et G2. *A. flavus* est un organisme ubiquiste qui constitue un contaminant d'aliments et de produit des aflatoxines **(Wright, 1982)**. D'autre part, ces substances constituent pour les vertébrés des cancérigènes hépati-ques **(Vey, 1970)**. Un mélange d'aflatoxines provoque une réduction de fertilité chez les moustiques (*Aedes aegypti*) **(Wright et al., 1982)**. Chez les lépidoptères, les orthoptères et les coléoptères, les aflatoxines administrés à fortes doses provoquent une paralysie et des cas de mortalité rapide **(Vey, 1970)**.
- Lesv isarolides, le diketomorpholine bassiatine et l'oosporine, un dibenzoquinone de couleur rouge **(Xu et al., 2008)**.
- La mycotoxine Beauvericine codée par le gène *bbBeas* de *B.bassiana* est toxiques pour certaines larves d'insectes comme les vers à soie (*Bombix mori,L*) **(Xu et al., 2008)**.
- Les cyclosporines A et B et des peptides cycliques comprennent les activités immunodéprimées contre les larves de moustiques **(Weiser et Matha, 1998)**.

# *Matériels et Méthodes*

## 1. Localisation géographique de la zone d'étude

Ce travail a été réalisé dans la station URC (Unité de Recherche de Constantine)/INRAA de Constantine (Institut National De La Recherche Agronomique d'Algérie) située à une altitude moyenne de 640m, latitude :  $36^{\circ} 20' 10''$  N et longitude  $06^{\circ} 38' 45''$  E (Figure 5 et 6). Celle-ci, est hébergée au niveau de la SRPV (Station Régionale de la Protection de Végétaux de Constantine, sise de Route de Batna.

Constantine est située entre  $36^{\circ} 17'$  de latitude et  $6^{\circ} 37'$  de longitude en plein centre Est algérien, précisément à 245 km des frontières algéro-tunisiennes et à 431 km de la capitale Alger vers l'Ouest, à 89 km de Skikda vers le Nord et à 235 km de Biskra vers le Sud ([www.andi.dz](http://www.andi.dz)).



**Figure 5:** Situation géographique de la station d'étude (Google earth).



**Figure 6:** Echantillons (sol et pucerons)

## 2. Choix de la zone d'étude

Les critères de choix de la zone d'étude sont :

- L'accessibilité au terrain
- Les conditions favorables de l'environnement (surtout les conditions climatiques)
- La richesse floristique du terrain ( Au bord de l'Oued Rhumel)
- L'importance de la présence des pucerons dans cette zone.

## 3. Caractéristiques climatiques

Le climat est un facteur principal qui joue un rôle fondamental de contrôle de la distribution des êtres vivants et de la dynamique des écosystèmes (**Lévêque, 2001; Faurie et al., 1998 ;2003**). Les réactions des êtres vivants face aux variations des facteurs physicochimiques du milieu intéressent leur morphologie, leur physiologie et leur comportement (**Dajoz, 2003**).

Parmi les données utilisées pour caractériser l'état climatique de notre région d'étude par rapport à notre travail nous avons identifié selon le site ([www.infoclimat.fr](http://www.infoclimat.fr)) la meilleure période propice qui est le mois de Mai.

## 4. Caractérisation physico-chimique des sols de la zone d'étude

Les prélèvements de sol au nombre de 3 prélèvements/ site sont réalisés à l'aide d'une tarière tout en écartant la couche supérieure (3 à 5cm) (Tableau 3) (**Buhot, 1973 ; Mihail et Alcoren, 1987 ; Saadoune et Momani, 1997**). Les sols prélevés sont ensuite recueillis dans des sacs en plastique stériles soigneusement fermés puis ramenés au laboratoire où ils subiront différents traitements : séchage à l'air ambiant ou à l'étuve à la température de 37°C, élimination des gros débris et cailloux, tamisage et homogénéisation.

La conservation des échantillons (sol) pour l'analyse physico-chimique, est effectuée à température ambiante pour une période maximale de six mois (**Mathieu et Pierrtain, 2003**).

L'analyse physico-chimique des échantillons du sol a été élaborée par le Laboratoire de chimie des sols, Agence National des Ressources Hydrauliques, Antenne Régionale Est, Constantine (Zone Industrielle Palma Constantine).

Nos échantillons ont été prélevés sur un sol destiné à porter un blé tendre de la variété ( HD1220) sur trois sites.

Ces analyses portent notamment :

- Dosage d'azote ;
- Dosage de carbone ;
- Dosage de la matière organique ;
- Conductivité (Salinité) ;
- pH.

## **5. Etude Mycologique**

### **5.1. Isolement des moisissures**

Une suspension de l'échantillon est constituée par 1 g de sol et 10 ml d'eau physiologique stérile (solution mère). La suspension est agitée pendant 10 minutes à l'aide d'un agitateur Vortex. Une série de dilutions décimales ( $10^{-1}$  jusqu'à  $10^{-5}$ ) a été réalisée, toutefois seulement trois dilutions  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  et  $10^{-5}$  sont retenues pour les isollements des moisissures (**Waksman, 1922**). Par la suite, un volume de 1 ml de chaque dilution est déposé dans une boîte de Pétri contenant le milieu PDA (Potato- Dextrose- Agar), additionnés d'un antibiotique, le Chloramphénicol, à raison de 10mg/L (Annexe1). Les boîtes sont homogénéisées, par agitation manuelle de manière circulaire, sur un plan horizontal, puis sont incubées à 28°C pendant 15 jours (**Botton et al. 1990**).

### **5.2. Purification des moisissures**

La purification concerne principalement les colonies dont les caractères cultureux sont différents. Il s'agit donc de prélever quelques spores ou une petite bouture mycélienne à la marge du thalle et de l'ensemencer de manière aseptique dans des boîtes de Pétri contenant le milieu PDA. Afin d'obtenir un développement typique du champignon, l'inoculation est réalisée en un seul point au centre de la boîte (**Botton et al. ,1990**).

### **5.3. Identification des moisissures**

#### **5.3.1. Identification macroscopique**

L'examen macroscopique des souches isolées, permet de déterminer les caractères cultureux suivants : la croissance et le développement du champignon, le diamètre de la colonie, sa texture, la couleur du thalle, la couleur du revers ainsi que son odeur (**Harrigan et Mc Cance, 1976 ; Botton et al., 1990 ; Rinaldi et al., 1998**).

### **5.3.2. Identification microscopique**

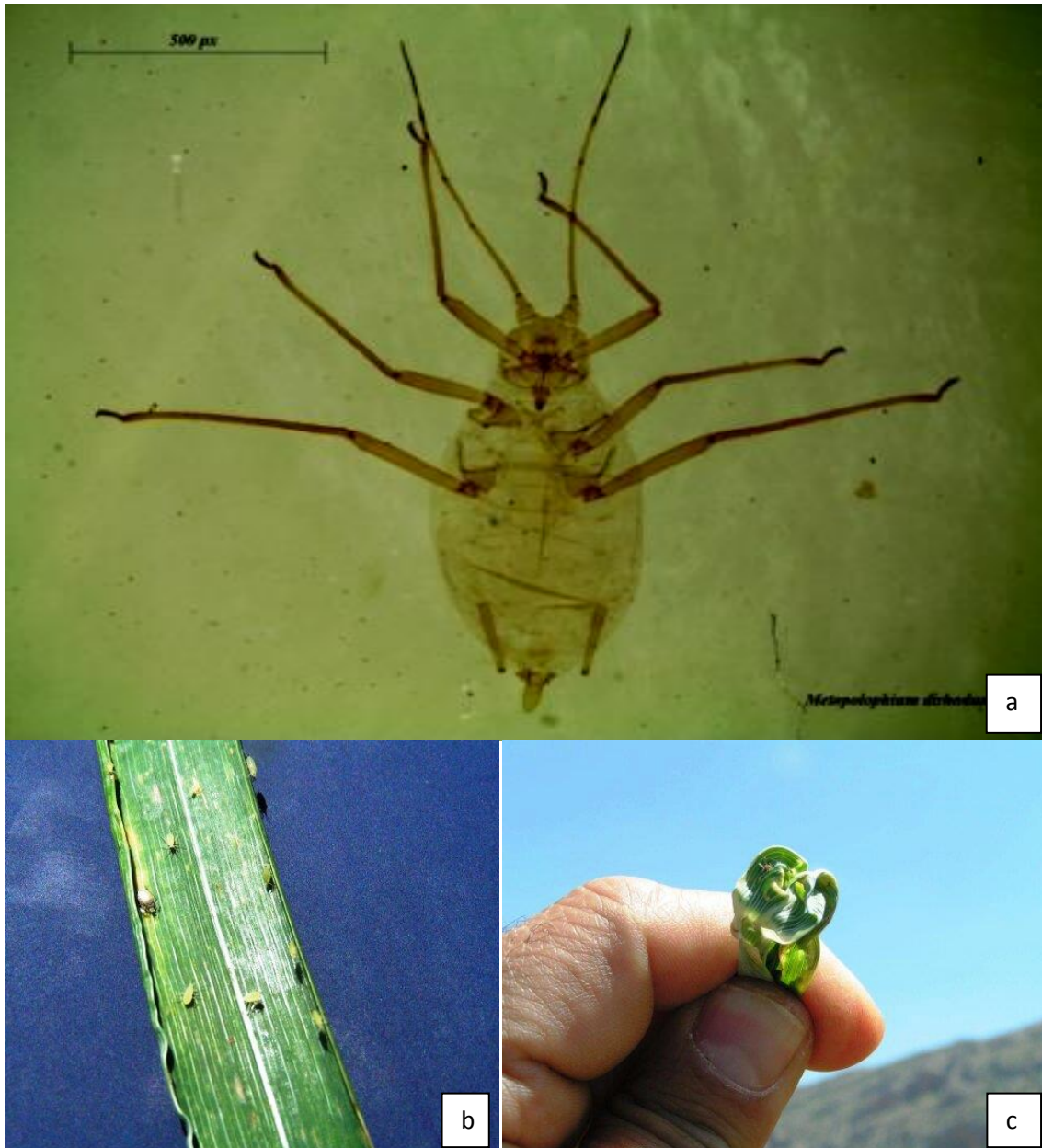
L'observation microscopique s'effectue sur un petit fragment mycélien soigneusement prélevé à la marge du thalle à l'aide d'une Anse de Platine stérile. Le fragment prélevé est ensuite coloré au Lactophène Bleu de Cotton (Annexe 1) (**Packer et Thomas, 1990**), ce qui permet ainsi de détecter la présence et la nature du mycélium, la présence ou l'absence du septum, les caractéristiques des fructifications et les spores etc. (**Samson et al., 1988 ; Hawksworth et al., 1994 ; DeHoog and Guarro, 1995 ; Gams et al., 1998**).

## **6. Test d'entomopathogénicité**

### **6.1. Matériels biologiques utilisés**

#### **6.1.1. Les pucerons *Metopolophium dirhodum* (Walker)**

Des collectes régulières d'aptères de *Metopolophium dirhodum* (Walker) (Hemiptera: Aphididae), ont été effectuées sur une culture de blé tendre (HD.1220) (*Triticum aestivum* L.) en Mai 2014 et Mai 2015 (Figure 7) .



**Figure 7:** *Metapolophium dirhodum* (Walker) (Hemiptera: Aphididae) (URC Constantine); a : *Metapolophium dirhodum* après montage ; b et c : Les dégâts de *Metapolophium dirhodum*.

### 6.1.2. Les isolats fongiques

Il s'agit de Onze (11) isolats fongiques ( *Alternaria sp* , *Aspergillus sp* , *Beauveria sp* , *Botrytis* , *Cladosporium sp* , *Fusarium sp* , *Metarhizium sp* , *Penicillium sp* , *Rhizoctonia sp* , *Trichoderma sp* et *Verticillium sp* ) rencontrés lors des nos différents isolement.

## 6.2. Préparation des suspensions sporales et dénombrement des spores

La suspension de spores est préparée par addition de 10 ml d'eau distillée stérile contenant 0,05% de Tween 80 à la souche cultivée âgée de deux semaines sur PDA en boîte de Pétri. Ensuite, les spores sont raclées superficiellement en utilisant une anse de platine sous des conditions aseptiques (Sandhya *et al.*, 2005).

A 1 ml de suspension de spores préalablement agitée, on ajoute 9ml d'eau tweenée ; la solution mère ainsi obtenue permet de préparer la gamme étalon. Le nombre de spores dans chaque dilution est déterminé par la technique de dénombrement en utilisant la cellule de Mallassez (Guiraud, 1998). L'examen s'effectue au microscope au grossissement x 40. La courbe d'étalonnage est établie par mesure de l'absorbance de chaque dilution à 750 nm au spectrophotomètre (SHIMADZU. Japon) en fonction du nombre de spores comptées sur la cellule. Avant chaque inoculation, le nombre de spores est estimé par référence à la courbe d'étalonnage puis, la suspension est diluée de manière à obtenir un nombre de spores de  $10^7$  spore/ml (Sumantha *et al.*, 2008; Paranthaman *et al.*, 2009; Murthy et Naidu, 2010).

## 6.3. Essai biologique

Afin de déterminer les propriétés biocides des différents isolats, nous avons adopté la méthode d'inoculation directe par trempage (Butt et Goettel, 2000) technique recommandée par la FAO comme méthode standard de la détection et de mesure de la résistance des pucerons aux insecticides (FAO, 1979; Furk *et al.*, 1990; Javed *et al.*, 1994) et particulièrement pour mesurer la toxicité des champignons par contact (Butt et Goettel, 2000).

Pour chaque isolat et notamment vis-à-vis *Metopolophium dirhodum*, les pucerons sont trempés pendant 10 secondes dans la suspension du champignon préparée à une concentration de l'ordre de  $10^7$  spores/ml (Gannasi *et al.*, 2006). Par la suite, sur des sections rectangulaires de feuilles de blé, désinfectées au préalable avec l'eau de Javel, puis rincées plusieurs fois à l'eau distillée, les pucerons traités sont répartis, à raison de 5 individus par boîte de Pétri avec six répétitions par traitement. Quant aux pucerons témoins, ils ont été trempés dans de l'eau distillée stérile contenant 0,05% de Tween 80 avant d'être répartis de la même manière. Ainsi, l'évaluation du pouvoir pathogène est réalisée sur la base de 30 pucerons pour chaque espèce fongique. Les insectes traités ont été maintenus à une température de 25°C et l'humidité 60%.

La mortalité des individus traités est contrôlée pendant 1<sup>er</sup>, 3<sup>ème</sup>, 5<sup>ème</sup> et 7<sup>ème</sup> jours jusqu'à la mort de tous les individus, il est à noter que les sections foliaires sont remplacées régulièrement chaque deux jours par de nouvelles sections foliaires désinfectées et rincées. À

chaque contrôle, les insectes morts sont éliminés avant la sporulation du pathogène pour éviter la transmission horizontale de l'infection dans une même boîte.

#### 6.4. Analyse statistique

Les propriétés insecticides des onze isolats ont été estimées par le pourcentage de mortalités obtenues. Les différences entre les traitements utilisées sont déterminées en utilisant une analyse de variance à une variable de classification, à l'aide du logiciel statistique SPSS (version 17.00 Software.2006. SPSS.Inc.Chicago.il, USA). Le pourcentage de mortalité est calculé et corrigé par la formule d'**Abbott (1925)**.

$$\text{La mortalité \%} = \frac{(\text{pucerons vivants des témoins} - \text{pucerons vivants traités}) \times 100}{\text{Pucerons vivants des témoins}}$$

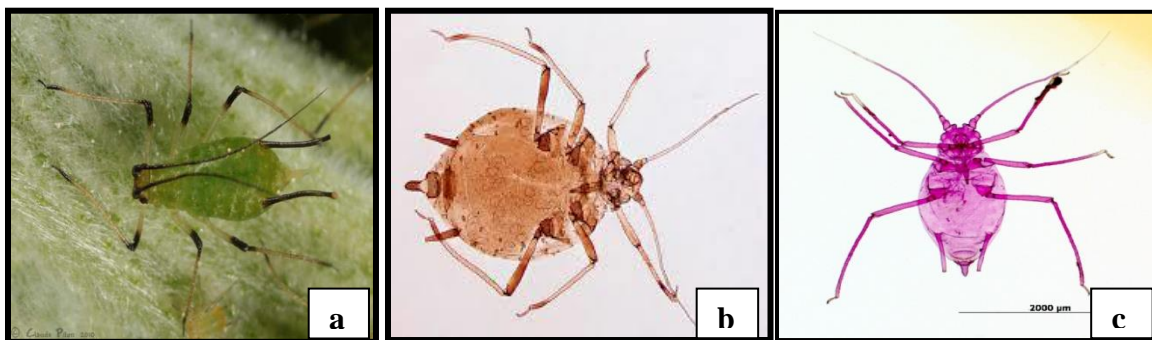
### 7. Etude des isolats sélectionnés

#### 7.1. Etude macroscopique et microscopique

A l'aide de l'anse de platine, la bouture mycélienne des trois principaux isolats (*Beauveria sp*, *Clasporium sp* et *Verticillium sp*) qui ont développé une activité insecticide importante contre *M.dirhudum* (>50%) , sont ensemencés sur milieu PDA , puis incubées à 28 °C. La croissance des colonies et leur couleur sont observées du premier jusqu'au 6<sup>eme</sup> jour d'incubation.

#### 7.2. Tests d'entomopathogénicité

Les pucerons *Aphis fabae*, *Macrosiphum rosea* et *Mysus persicae* sont utilisés comme des insectes test (Figure 8), les tests sur les pucerons en question ont été effectués par le laboratoire de protection des végétaux. Faculté d'agronomie, Université des Sciences Appliquées.. Isparta. Turquie. Selon les techniques mentionnées précédemment (5.Test d'entomopathogénicité)



**Figure 8** : Pucerons utilisés ; **a** :*Macrosiphum rosea* (Hulle et al, 1999) ; **b** :*Aphis fabae* (Graham,2005) ; **c** : *Mysus persicae* (Bakroune,2012).

## **8. Production des Enzymes**

Les enzymes industrielles proviennent de source végétale, animale ou microbienne. L'extraction à partir des plantes et des animaux est cependant limitée par des paramètres difficiles à contrôler. En effet, les principaux avantages des enzymes de production par rapport aux enzymes d'extraction sont une production indépendante des contraintes saisonnières et géographiques, une possibilité d'utilisation de matières premières bon marché, des rendements de production pouvant être augmentés de façon importante par l'amélioration des souches microbiennes et l'optimisation des conditions de production (**Scriban, 1993**).

### **8.1. Les souches fongiques**

Les trois souches principales de moisissures utilisées dans ce travail et qui ont été isolées à partir du sol agricole sont identifiées comme étant *Beauveria bassiana*, *Cladosporium cladosporioides* et *Verticillium alfalfae* (**Samson et al., 1988 ; Hawksworth et al., 1994 ; DeHoog and Guarro, 1995 ; Gams et al., 1998**).

### **8.2. Activité Protéolytique**

#### **8.2.1. Mise en évidence des activités protéolytiques**

Les souches revivifiées ont été ensemencées sur milieu de culture sélectif : lait gélosé à 20% (Annexe 1) par inoculation d'un disque fongique d'environ 6mm, puis incubées à 28°C pendant 3 jours (**Larsen et al., 1998**). Le diamètre des zones hydrolyse de chaque colonie des trois souches testées et la comparaison entre elles, nous a permis de sélectionner la plus protéolytique.

Ce test d'activité protéolytique est basé sur la diffusion des protéases secrétées par les souches fongiques dans le milieu de culture, et la dégradation de la caséine du lait autour de la colonie. Ce fait s'explique par l'observation directe d'un halo translucide (anneau de protéolyse) autour de la colonie fongique avec un diamètre proportionnel à la quantité des protéases libérées. L'activité est significative si le diamètre de l'halo est supérieur ou égal à 3 mm. Chaque opération (repiquage et mesure) a été réalisée en trois répétitions (**Harrigan et McCance, 1976**).

## 8.2.2. Protéase alcaline

### 8.2.2.1. Méthode de fermentation

#### a. Préparation de l'inoculum

L'inoculum correspond à la suspension sporale de la souche fongique utilisée. Cette dernière est préparée par addition de 10 ml d'eau physiologique stérile à la souche âgée de 15 jours sur milieu PDA, en boîte de Pétri ; à l'aide d'une anse de platine stérile, on gratte légèrement la surface de la gélose afin de mettre en suspension les spores fongiques, ensuite, cette suspension a été récupérée en utilisant une micropipette sous des conditions stérile.

Avant chaque inoculation, le nombre de spores est estimé par référence à la courbe d'étalonnage puis la suspension est diluée de manière à obtenir un nombre de spores égal à  $10^7$ /ml (Sumantha *et al.*, 2008; Paranthaman *et al.*, 2009; Murthy et Naidu, 2010)

#### b. Préparation de milieu de culture

Le milieu de culture est préparé à partir de farine de criquets *Ocniridia volxemii* (Figure 9), qui nous ont été gracieusement fournis par le [laboratoire de Biosystematique et Ecologie des Arthropodes](#) (Faculté des Sciences de la nature et de la Vie, Université des Frères Mentouri Constantine).

Les criquets sont séchés à l'air libre (25 – 30°C) pendant 3 - 4 jours puis broyés à l'aide d'un moulin électrique ménager (Katapodis *et al.*, 2006) de manière à obtenir une farine avec des particules équivalent à 0,5 mm de diamètre pour une culture liquide (Murthy et Naidu, 2010).



Figure 9 : *Ocniridia volxemii* (Benkenana , 2012)

La farine de criquet est diluée dans de l'eau distillée avec une concentration de 4%. Le pH du milieu est ajusté à 4.5. Les milieux sont répartis en Erlenmeyer de 250 ml à raison de 50 ml par Erlen puis autoclavés à 121°C pendant 20 min.

### **c. Conduite des fermentations**

Chaque souche de moisissure sélectionnée a été inoculée avec 1 ml de sa suspension sporale ( $10^7$  spore /ml) dans un Erlenmeyer contenant le bouillon de production (Farine de criquet). Les Erlenmeyer sont incubés à 28°C sous agitation à 120 rpm dans un incubateur agitateur (type : IKA® 4000 i control) pendant 3 jours. Les expérimentations sont réalisées en trois répétitions. Après fermentation, les bouillons de culture ont été filtrés à travers le papier Whatman n°1 préalablement séché et pesé. Le filtrat clair ainsi obtenu représente l'extrait enzymatique brut. Il a été congelé pour les dosages protéolytiques. A la fin des fermentations, les paramètres (pH et activité protéolytique) sont estimés.

#### **8.2.2.2. Mesure du pH**

Le pH du filtrat est mesuré à l'aide d'un pH mètre

#### **8.2.2.3. Dosage de l'activité protéolytique alcaline**

Les protéases catalysent l'hydrolyse des protéines et les polypeptides en libérant des acides aminés libres et des peptides simples qui se trouvent dans la phase soluble. Les molécules non hydrolysées sont précipitées par le TCA (TriChloroacetic Acid). La tyrosine est un acide aminé présent dans toutes les protéines, que l'on utilise comme standard de dosage colorimétrique de l'activité protéasique à l'aide du réactif de *Folin-Ciocalteu*. Celui-ci réagit avec la tyrosine et le tryptophane pour donner par réduction un complexe bleu.

Le mélange réactionnel est préparé par addition de :

- Extrait enzymatique décongelé juste avant le dosage..... 1 ml
- Tampon Tris-HCl (0,2M / 0,1 M), pH 8 .....1,5 ml
- Substrat (solution de caséine 2,5% dans le citrate de sodium à 0,02 M) 2,5 ml

Après agitation et incubation 1 heure au bain-marie à 40°C, la réaction est arrêtée par addition de 5 ml de TCA froid (4%). Le mélange est laissé au repos pendant 30 minute dans un bain de glace ou à 4°C (Beynon et Oliver, 2004 ; Wu *et al.*, 2006 ; Devi *et al.*, 2008) ; ce qui entraîne la précipitation des macromolécules, y compris l'enzyme et la caséine non hydrolysées (Sandhya *et al.*, 2005). Il est ensuite filtré sur papier Whatman n° 1.

Les composés azotés non protéiques solubles dans le filtrat sont dosés par la méthode d'Anson (1938). 0,5 ml du filtrat sont mélangés avec 2,5 ml de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  à 2% dans le NaOH

(0,1N). Après agitation et incubation pendant 15 minutes à température ambiante, 0,25 ml de réactif de *Folin-Ciocalteu* dilué au 1/4ème sont ajoutés. Les mélanges sont bien agités et laissés au repos à température ambiante et à l'obscurité pendant au moins 30 min (**Sumantha et al., 2006; Paranthaman et al., 2009**).

L'absorbance de la coloration bleu développée est lue à 750 nm ; l'activité est calculée par référence à une courbe d'étalonnage établie en utilisant la tyrosine comme standard avec une concentration de la solution mère de 100 µg/ml (Annexe 3).

Une unité (U) de protéase est l'équivalent de 1 µg de tyrosine libérée pendant 1 heure de temps par 1 ml d'une solution d'enzyme (Annexe 2). Le blanc est préparé de la même manière, sauf que le TCA est rajouté avant le substrat. Chaque dosage est réalisé trois fois.

### **8.2.3. Dosage de l'activité protéolytique acide**

La méthode de fermentation est identique à celle mentionnée précédemment Le dosage de l'activité protéolytique est réalisé en deux étapes :

La 1ère étape étant la réaction enzymatique ; dont le mélange réactionnel est constitué de :

- 1ml de l'extrait brut.
- 1.5ml du tampon citrate / sodium 0.05M, pH 5.5.
- 2.5ml de la solution de la caséine à 2.5% dissoute dans du citrate de sodium 0.02M.

Après 1 heure d'incubation au bain-marie à 40°C, la réaction est arrêtée par addition de 5 ml de TCA (4%). Les composés azotés non protéiques solubles dans le filtrat sont dosés par la méthode d'**Anson (1938)**. La lecture se fait à 750 nm; l'activité est calculée par référence à une courbe d'étalonnage (Annexe 2), établie en utilisant la tyrosine comme standard avec une concentration de la solution mère de 100 µg/ml.

## **8.3. Chitinase**

### **8.3.1. Préparation de la chitine colloïdale**

La chitine étant insoluble dans l'eau et les solvants organiques, elle doit être transformée en chitine colloïdale pour permettre une dispersion homogène en suspension ou sur milieu gélosé. Un protocole modifié de **Murthy et Bleakley (2012)** est utilisé pour la préparation de la chitine colloïdale.

Dans un bécher de 1000 ml, vingt grammes de poudre de chitine sont traités avec 300 ml d'HCl concentré. Ce dernier est ajouté lentement sous agitation continue pendant 60 min sous une hotte chimique à température ambiante (25 °C). La suspension est ensuite traitée avec 2

litres d'eau distillée refroidie, puis incubée pendant une nuit à 4 °C pour précipiter la chitine colloïdale.

La suspension est alors passée à travers deux couches de papier filtre à café, logés dans un entonnoir. Trois litres d'eau du robinet (pH~ 8,0) sont ensuite passées à travers la chitine colloïdale retenue dans le filtre à café, jusqu'à atteindre un pH neutre. La chitine colloïdale obtenu est pressée entre Les papiers filtres (pour éliminer l'humidité supplémentaire) est re-suspendue dans de l'eau distillée à raison de 2% (P/V), stérilisée, puis conservée à 4 °C (Murthy et Bleakley, 2012).

### **8.3.2.. Mise en évidence des activités chitinolytique**

Les trois souches revivifiées ont été ensemencées sur agar blanc additionné de chitine colloïdale 20% (MCC) (Annexe 1). Les boîtes de Pétri sont incubées à 28 °C et sont observées après deux, trois et quatre jours d'incubation.

### **8.3.3. La conduite de fermentation**

La méthode de fermentation est identique à celle mentionnée précédemment (8.2.2.1. Méthode de fermentation)

### **8.3.4. Dosage de l'activité chitinolytique**

L'activité chitinolytique est déterminée en utilisant la méthode de dosage des sucres réducteurs par le DNS (acide 3,5-DiNitroSalicylique) (Miller , 1959). Le mélange réactionnel est composé de 1 ml d'extrait enzymatique brut auquel on ajoute 1 ml de chitine dans un tampon d'acétate de sodium (50 mM, pH 5,0) (Annexe3) (0,2 g de chitine dans 2 ml de tampon). Le mélange est incubé dans un bain marie agitateur pendant 30 min à 50 °C. Après centrifugation à 5000 rpm pendant 15 min, prélever 1 ml du surnageant et rajouter 3 ml du réactif DNS (Annexe 3) afin de stopper la réaction. Le tout est porté au bain marie à 100 °C pendant 5 min puis refroidis dans un bain de glace. L'absorbance est mesurée au spectrophotomètre à 540 nm. La quantité de sucres réducteurs libérés est calculée en fonction du courbe étalon du N- Acétyle-Glucosamine (GlcNAc) utilisé comme référence (Annexe 3) (Toharisman *et al.*, 2005). Une unité de l'activité enzymatique est définie comme la quantité d'enzyme qui catalyse la libération de 1 µmol de N-acétylglucosamine par ml en 1 min, dans ces conditions.

### **8.3.5. Mesure du pH**

Le pH du filtrat est mesuré à l'aide d'un pH mètre

## **9. Production des toxines**

### **9.1. Pré-culture**

Les souches *Beauveria bassiana*, *Cladosporium cladosporioides* et *Verticillium alfalfae* ont été cultivées sur boîte de Pétri contenant le milieu PDA, puis incubées durant 14 jours à 28°C. Les spores correspondantes ont été collectées dans de l'eau tweenée (0.05% tween 80%) puis diluées pour obtenir une suspension d'environ  $10^7$  spore/ml. 1ml de la suspension a été ensemencé dans 50ml du milieu PD liquide (PDB) incubé 21 jours à 28°

### **9.2. Fermentation**

Le milieu extrait de pomme de terre liquide (PDB) (Annexe 4) a été choisie comme un milieu spécifique pour une production optimale des métabolites secondaires. La fermentation a été réalisée dans des Erlenmeyer de 250ml contenant 50 ml du milieu de fermentation. Le pH du milieu est ajusté à 5.5.

Chaque Erlenmeyer contenant le milieu a été inoculé par 1ml ( $10^7$  spore/ml) des prés cultures puis incubé à 28°C pendant 21jours sans agitation. Les expérimentations ont été réalisées en trois répétitions (**Hu et al., 2007**).

### **9.3. Extraction**

Après une durée d'incubation de 21 jours à 28°C, le contenu de chaque Erlenmeyer est filtré sur papier Whattman n°1,

Les métabolites présents dans le filtrat ont été extraits par partition de phase en mettant en contact les 100 ml de filtrat avec 100 ml d'éthyle acétate.

L'éluant contenant les métabolites secondaires a été recueilli puis évaporé à une température 40°C en utilisant l'appareil rotatif évaporation sous vide (BUCHI Heating Bath B-491). Enfin, nous avons recueilli de nouveau le résidu à l'aide de l'Acétonitrile pour l'usage de l'HPLC (CLHP) ou (Chromatographie Liquide Haute Performance) et la RMN (Résonance Magnétique Nucléaire) en utilisant le solvant DMSO (DiMéthylSulfOxyde) déterré (**Vinyaga Moorthi et al., 2015**).

#### **9.3.1 Biomasse**

Pour déterminer le poids sec du mycélium, l'échantillon est filtré sur papier Wattman 3. Le mycélium est lavé deux fois avec de l'eau distillée, séché à 105° C, jusqu' à poids constant.

#### **9.3.2 Mesure du pH**

Le pH du filtrat est mesuré à l'aide d'un pH mètre

## 9.4. Identification des toxines

### 9.4.1. Analyse par la [chromatographie](#) en phase liquide à haute performance ( HPLC)

Le système chromatographique utilisé au laboratoire de Chimie analytique (Centre de Recherche en Biotechnologie- Constantine) se compose d'un système de pompage avec un formeur de gradient, une colonne et d'un injecteur. Les différents éléments sont reliés à un micro-ordinateur permet de piloter automatiquement les différents composants du système chromatographique (Agilent Technologie 1299 Laboratory) .

Un système de gradient de solvant, inspiré a été développé afin d'établir des profils de métabolites secondaires des souches utilisées. La phase mobile est composée de deux solvants: le solvant A (Eau acidifiée 0.1%) et le solvant C (Acétonitrile). Au temps  $t = 0$ , la part du solvant C représente 0% de la phase mobile pour augmenter de façon linéaire pendant 10 minutes afin d'atteindre 20%, 40%, 60%, 80% et 100% de la phase mobile avec les longueurs d'onde UV 210, 220 et 260 nm (Annexe 4) .

Enfin, les conditions initiales du système chromatographique ont été rétablies en dix minutes supplémentaires afin de rincer et de rééquilibrer la colonne (Tableau 4). Une colonne C18 SB C18 a été utilisée comme phase stationnaire. 2 ml d'extrait resuspendu et filtré ont été injectés automatiquement dans le système de chromatographie, pour chaque échantillon considéré avec un débit de 0,5ml/min.

**Tableau 3:** Programme gradient utilisé pour l'analyse et la séparation des toxines

Temps (min)/Solvant	A* (%)	C *(%)
0.00	100	0.0
10.00	80	20
20.00	60	40
30.00	40	60
40.00	20	80
60.00	0.0	100
65.00	100	0.0

**A\* : Eau Distillée, C\* : Acétonitrile**

#### **9.4.2. Analyse par La résonance magnétique nucléaire (RMN)**

La résonance magnétique nucléaire ou RMN est une technique utilisée pour l'analyse des structures de nombreuses molécules chimiques. Elle sert principalement à la détermination structurale des composés organiques. Les principaux noyaux étudiés sont le proton ou  $^1\text{H}$ , le carbone treize ou  $^{13}\text{C}$ , le phosphore ou  $^{31}\text{P}$ , le fluor  $^{19}\text{F}$ , l'azote  $^{15}\text{N}$ ...

Les spectres de résonance magnétique nucléaire, en mode  $^1\text{H}$ , sont réalisés sur un appareil Bruker 250MHz (Unité d'analyses physico-chimiques, département Chimie, Université Frères Mentouri, Constantine).

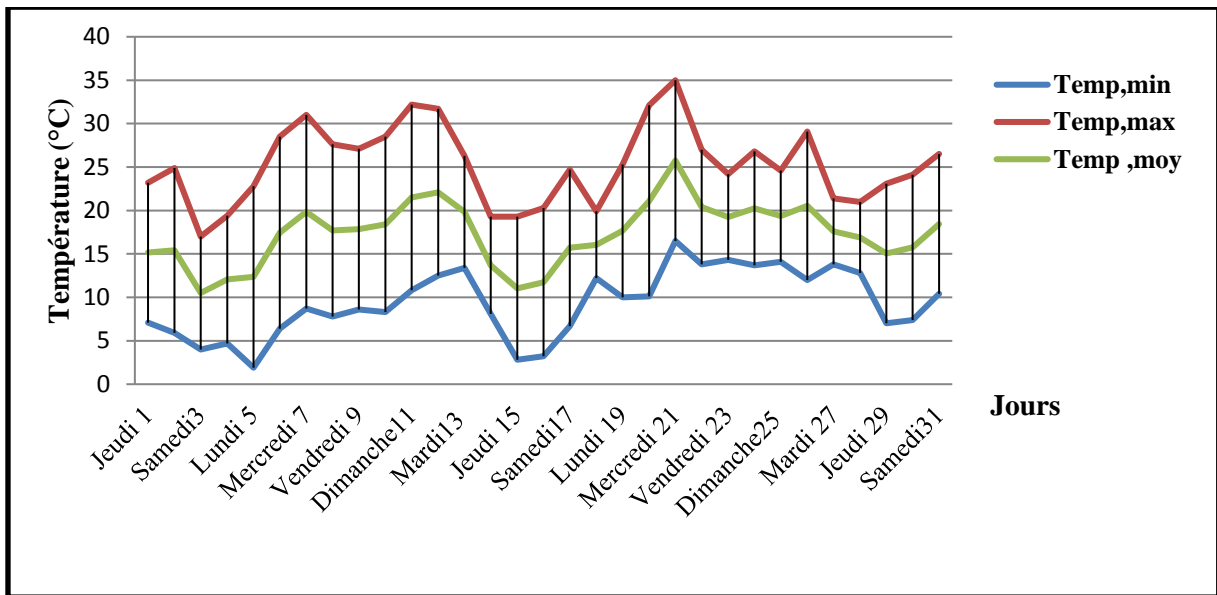
# *Résultats et Discussion*

# 1. Caractéristiques climatiques

## 1.1. La température

D'après **Ramade (2003)**, la température représente un facteur limitant de toute première importance, elle contrôle l'ensemble des phénomènes métaboliques et conditionne de ce fait la répartition de la totalité des espèces et des communautés d'êtres vivants dans la biosphère.

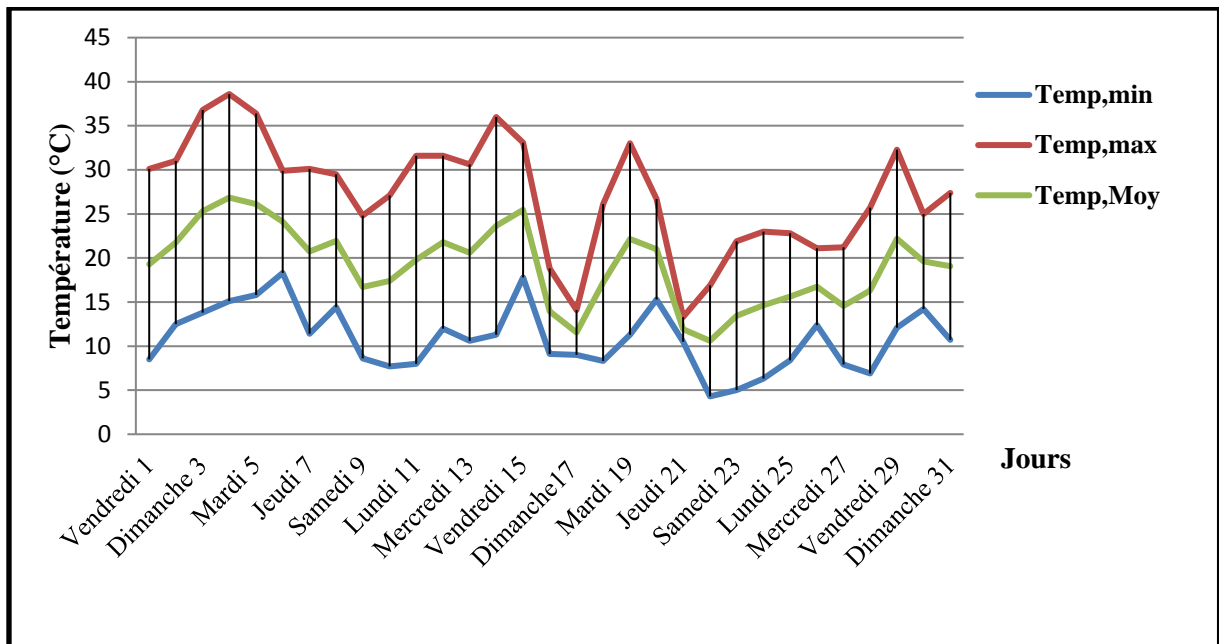
Les valeurs de température (°C) des mois de mai 2014 et 2015 enregistrées au niveau de la région de Constantine sont présentées dans la figure (10 et 11).



**Figure 10 :** Variation des températures minima et maxima du mois de mai 2014

Au cours de la période expérimentale, les valeurs enregistrées montrent que le jour Samedi 3 mai 2014 est le plus froid avec une température moyenne de 10.5°C, tandis que le jour le plus chaud est enregistré le Mercredi 21 mai le plus chaud avec une température moyenne maximale de 25°C (Figure 10).

Par ailleurs et en comparaison avec l'année 2015, il ressort que le jour le plus froid enregistré une température moyenne de 10.5°C (Vendredi 22 mai 2015) alors que le jour le plus chaud affiche une température moyenne de 26.85°C (Lundi 4 mai 2015) (Figure 8).



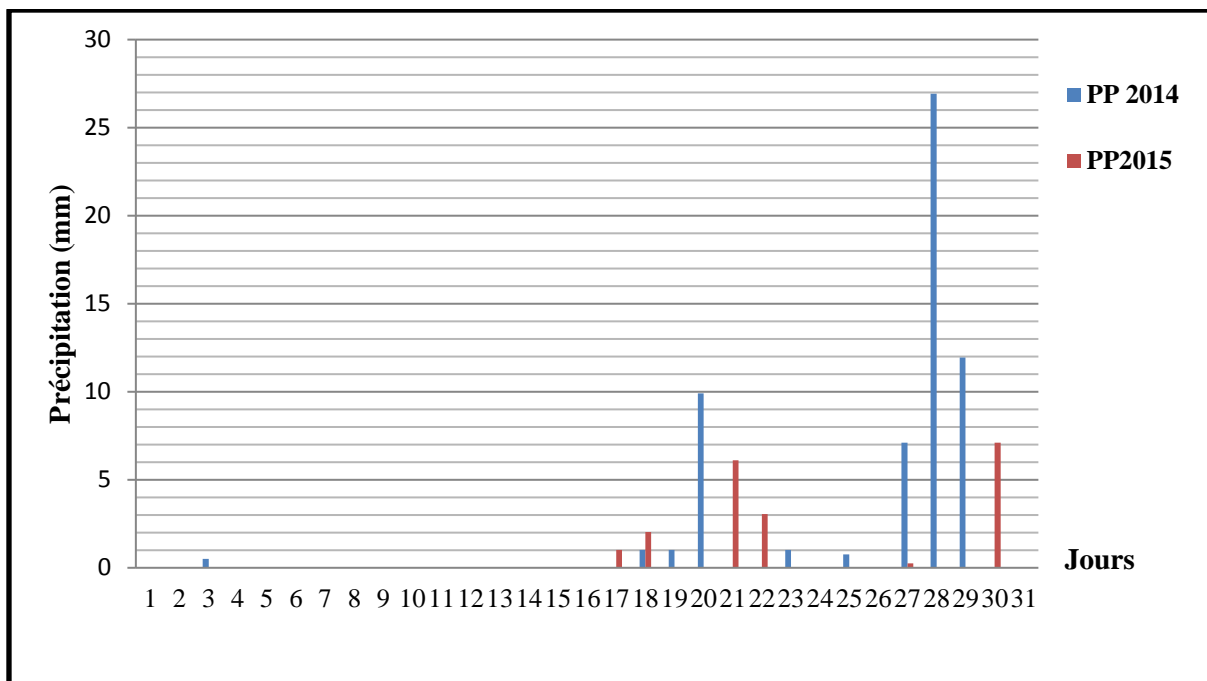
**Figure 11** : Variation des températures des minima et maxima du mois de mai 2015

## 1.2. Les précipitations

La pluviométrie désigne la quantité totale de précipitation (pluies, grêle, neige) reçus par unité de surface et unité de temps ( **Ramade, 2003**). Avec la température, les précipitations représentent les facteurs les plus importants du climat. La quantité de précipitations est exprimée en millimètres, elle représente l'épaisseur de la couche d'eau qui resterait sur une surface horizontale s'il n'y avait ni écoulement ni évaporation ( **Faurie et al., 2003**).

La figure (12) ci-dessous présente que le mois de mai 2014 se caractérise par une faible pluviométrie, variant entre 0 et 26.92 mm, les pluies tombent d'une manière irrégulière.

Ils ressort de ces données que le total de précipitation en mai 2015 dans la région de Constantine est très faible, et est caractérisé par une irrégularité remarquable avec une pluviométrie moyenne de 7.11 mm au 30 mai.

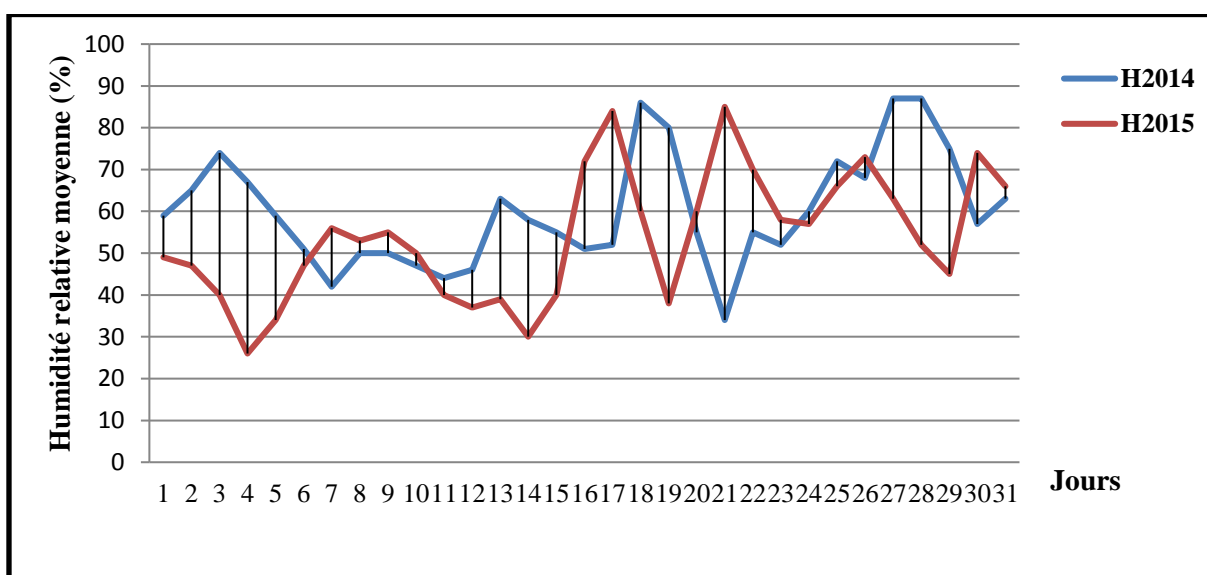


**Figure 12:** Variation des moyenne des précipitation ( en mm) en mai 2014 et mai 2015

### 1.3. L'humidité relative moyenne (%)

L'hygrométrie désigne la teneur en vapeur d'eau dans l'atmosphère (Ramade, 2003). Cette humidité, selon Faurie *et al.* (2003) dépend d'autres facteurs climatiques tels que la pluviométrie, la température et le vent .

Les valeurs d'humidité relatives moyennes enregistrées au niveau de la région d'étude sont notées dans la figure (13).



**Figure 13 :** Variation des moyennes de l'humidité relative (%) de mai 2014 et mai 2015.

Il ressort donc que Les jours les plus humides du mois de mai 2014 sont les 27 et 28 mai avec un taux moyen d'humidité de 87%. , par contre le 21 mai représente le jour le moins humide avec un taux 34%.

Par ailleurs le 21 du mois de mai 2015 s'avère le jour le plus humide avec un taux d'humidité de 85%.Le taux d'humidité le plus faible enregistré est noté le 4 du mois de mai avec un taux d'humidité de 26%.

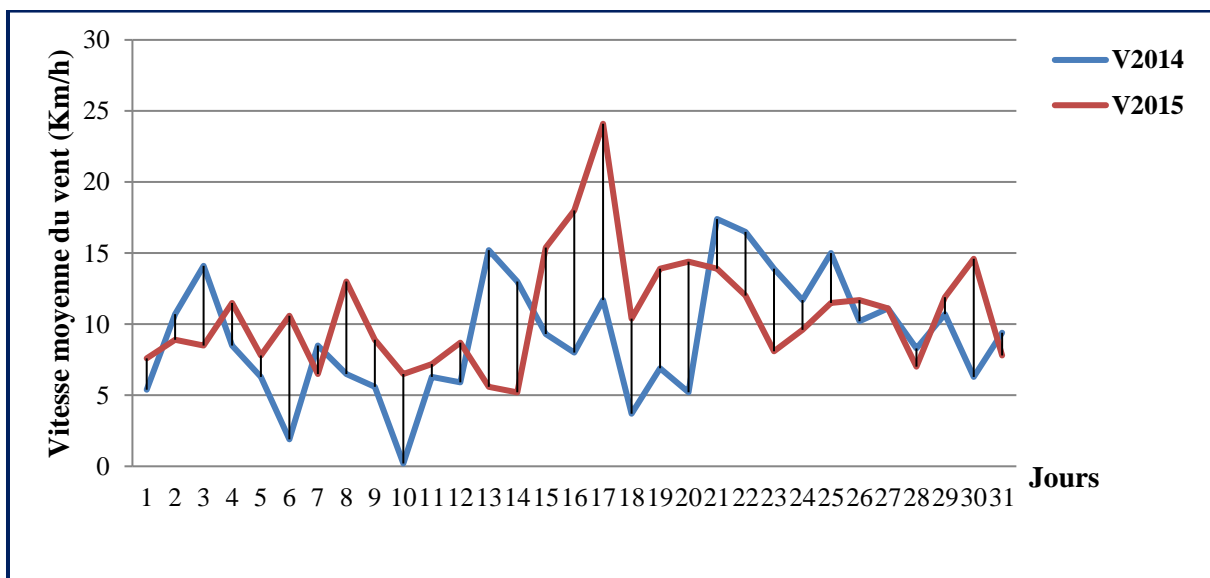
Les arthropodes terrestres sont des animaux de petite taille qui ont peu de chance de survivre dans un air sec, sauf s'ils trouvent de l'eau à l'état liquide dans leurs aliments, ou bien s'ils disposent de mécanismes physiologiques de rétention hydrique, ou bien encore s'ils peuvent récupérer une partie de vapeur d'eau atmosphérique (**Dajoz, 1985**).

Le développement des insectes est largement dépendant de différents facteurs climatiques et en premier lieu de la température, mais également de l'humidité de l'air (**Dierl et Ring, 1992**).

#### 1.4. Le vent

Le vent est un facteur climatique secondaire. Il a un pouvoir desséchant en augmentant l'évapotranspiration. Il a aussi un pouvoir de refroidissement considérable et il est également un agent de dispersion des animaux et des végétaux.

**Ramade (2003)** rapporte que sous l'influence des vents violents, la végétation est limitée dans son développement. Les moyennes de la vitesse du vent (Km/h) sont présentées dans la figure (14)



**Figure 14 :** Vitesses moyennes du vent (Km/h)

Ainsi les vitesses moyennes enregistrées en mai 2014 varient entre 0.2 et 17.4 Km/h . Les jours les plus ventés sont 21 et 22 mai avec des vitesses moyennes de 17.4 et 16.5 Km/h respectivement. La vitesse maximale du vent en mai 2015 a été enregistrée en 17 mai avec une moyenne de 24.1Km/h . Par contre, la minimale a été relevée en 7mai (9.5Km/h).

Ainsi Parmi les effets les plus importants du vent on enregistre la dissémination des insectes sur plusieurs milliers de Kilomètres de distance (**Dajoz, 1985; Lévêque, 2001**). Ces transports sur de longues distances, constituent pour certaines espèces des modes de colonisation efficaces (**Lévêque, 2001**).

## 2. Caractérisation physico-chimique des sols de la zone d'étude

Nos échantillons ont été prélevés sur un sol destiné à porter un blé tendre de la variété ( HD1220) sur trois sites.

Les analyses des échantillons de sols portent notamment sur:

- Dosage d'azote ;
- Dosage de carbone ;
- Dosage de la matière organique ;
- Conductivité (Salinité) ;
- pH

Les résultats des analyses physico-chimiques des sols sont consignés dans le tableau 5 ci-après. D'après les résultats obtenus et les normes citées par **Baize (2000)**, nous constatons que le pH du sol de notre parcelle d'étude est basique pour les deux prélèvements réalisés en mai 2014 et en mai 2015. La conductivité (CE) variant entre 500 à 1200 $\mu$ s/cm, indique que notre sol est légèrement salé (**Durand,1983**).

Selon les normes citées par **Soltner (1989)** , les sols des deux prélèvements sont moyennement pourvus en matière organique entre 2 et 3% (  $2 < M.O < 3$ ) respectivement. Par ailleurs ,ces résultats sont classés selon les normes citées par **Brady et Weil,(2002)**, comme « Histosol » : sol très riche en matières organiques » (12-57g/100g ) .Il est à noter aussi que la teneur en carbone organique de la couche supérieure (0-15cm ) de nos sols varie entre 11.9 à 16.8%, de même que les normes citées par **Soltner (1992)**, indiquent que nos échantillons sont riches en azote (>0.25%).

Les échantillons de sol possédant un pH neutre à légèrement basique (pH=8.13 ) favorisent plutôt le développement des populations bactériennes par rapport aux populations fongiques qui sont plutôt acidophiles (pH optimum 4-6) (**Nicklin et al., 2000**). Cependant, *Botton et al.*,

(1990) mettent en évidence une croissance dans une large gamme de pH allant de 4.5 à 8.0 pour les moisissures. En plus de l'adaptation du microorganisme à son biotope, la croissance ou la présence de certaines souches peuvent être expliquées par la richesse des sols étudiés en matières organiques apportée par des résidus des végétaux et d'animaux (2.40% pour le sol du mois de mai 2014 et 2.45% pour celui du mois de mai 2015 (Tableau 4). Par ailleurs, la croissance de cette flore fongique est expliquée par un rapport C/N favorable à la prolifération des moisissures. **Barker et Worgan, (1981)**, **Botton et al., (1990)** préconisent un rapport C/N de 10/1. Nos résultats montrent un rapport C/N=4.11 pour le sol du mois de mai 2014 et 4.15 pour le sol du mois de mai 2015. Ce qui confirme apparemment les résultats de nos analyses de sol.

**Tableau 4:** Les analyses physico-chimiques des sols de la zone d'étude

	Prélèvements (Mai 2014)			Prélèvements (Mai 2015)		
	« A »	« B »	« C »	« D »	« E »	« F »
<b>pH</b>	8.00	8.19	8.22	8.14	8.15	8.07
<b>Conductivité (millimhos/ cm)</b>	0.80	0.60	0.60	1.20	0.90	0.90
<b>Carbone %</b>	16.8	11.9	13.3	13.3	14.2	15.3
<b>Azote %</b>	3.32	3.31	3.58	3.54	3.37	3.38
<b>Matière Organique %</b>	2.889	2.046	2.287	2.287	2.442	2.631

### 3. Etude mycologique

#### 3.1. Isolement, purification et identification des champignons

L'isolement des moisissures est fait à partir du sol agricole de la région de Constantine. Sur 6 échantillons prélevés, nous avons isolé 62 souches réparties en fonction des sites d'échantillonnage (Tableau 5).

**Tableau 5** : Isolement des souches fongiques .

Année	Site	Dilutions	Isolats fongiques
Mai 2014	1(A)	10 <sup>-3</sup>	4 (A1, A2, A3,A4)
		10 <sup>-4</sup>	2 (A5 , A6)
		10 <sup>-5</sup>	7 (A7, A8 ,A9 ,A10, A11, A12 ,A13)
	2(B)	10 <sup>-3</sup>	5 (B1, B2, B3 ,B4, B5)
		10 <sup>-4</sup>	3 (B6, B7, B8)
		10 <sup>-5</sup>	3 (B9, B10 , B11)
	3 ( C)	10 <sup>-3</sup>	4 (C1 ,C2 ,C3 ,C4)
		10 <sup>-4</sup>	4 (C5, C6 ,C7, C8)
		10 <sup>-5</sup>	4 (C9 , C10, C11, C12)
Mai 2015	1 (D)	10 <sup>-3</sup>	2 (D1 , D2)
		10 <sup>-4</sup>	1 (D3)
		10 <sup>-5</sup>	1 (D4)
	2 (E )	10 <sup>-3</sup>	8( E1, E2 ,E3 ,E4 ,E5, E6, E7 ,E8)
		10 <sup>-4</sup>	2 (E9 , E10)
		10 <sup>-5</sup>	2 (E11, E12)
	3 (F)	10 <sup>-3</sup>	7 (F1, F2, F3 ,F4, F5, F6 ,F7)
		10 <sup>-4</sup>	3 (F8, F9, F10)
		10 <sup>-5</sup>	0

Nous observons une densité de souches fongiques mesurées à 36 isolats (58.06%), dans le sol prélevée du mois de mai 2014. Ce résultat s'explique par un climat humide et subhumide, une température moyenne de 17.75°C et une pluviométrie de 0mm-26.92mm . En effet, les moisissures ont besoin de l'eau pour absorber des nutriments et sont par conséquent, restreints à des environnements humides (**Boiron, 1996**). Les échantillons du mois de mai 2015 renferment beaucoup moins de souches fongiques, 26 souches fongiques (41.94%) , le pourcentage relativement faible s'explique par un climat sec qui se caractérise par une faible pluviométrie , variant entre 0 et 7.11 mm . Dans ces conditions, un  $a_w$  de 0.65 ( $A_w$  : activité de l'eau) est la limite de la disponibilité en eau pour que les moisissures croissent (**Raimbault, 1983 ; Guiraud, 1998**).

62 isolats fongiques ont été obtenus des échantillons du sol des différents sites prospectés.

En effet, des trois échantillons du sol prélevés en 2014 , nous avons obtenu 36 isolats fongiques représentant 8 genres : *Aspergillus*, *Beauveria* , *Botrytis* , *Fusarium*, *Metharizium* *Penicillium*, *Trichoderma* et *Verticillium* .

Par ailleurs, la recherche des 3 échantillons en 2015 a permis l'obtention de 26 souches fongiques appartenant à 7 genres : *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium* et *Rhizoctonia*. Le genre majoritaire est *Fusarium* avec une fréquence de 30.65%, suivi par 16.13% ,suivi par *Penicillium* avec 11.29 %. Les genres *Alternaria* et *Rhizoctonia* sont équivalents avec une fréquence de 4.84% et enfin les genres *Beauveria* , *Botrytis* , *Cladosporium* , *Metharizium* et *Verticilium* représentent les genres les moins représentatifs avec 1.61%.

Les résultats obtenus montrent que l'année 2014 est la plus peuplée (58.06 %) par apport à l'année 2015 qui représente un pourcentage de 41.94% (Tableau 6).

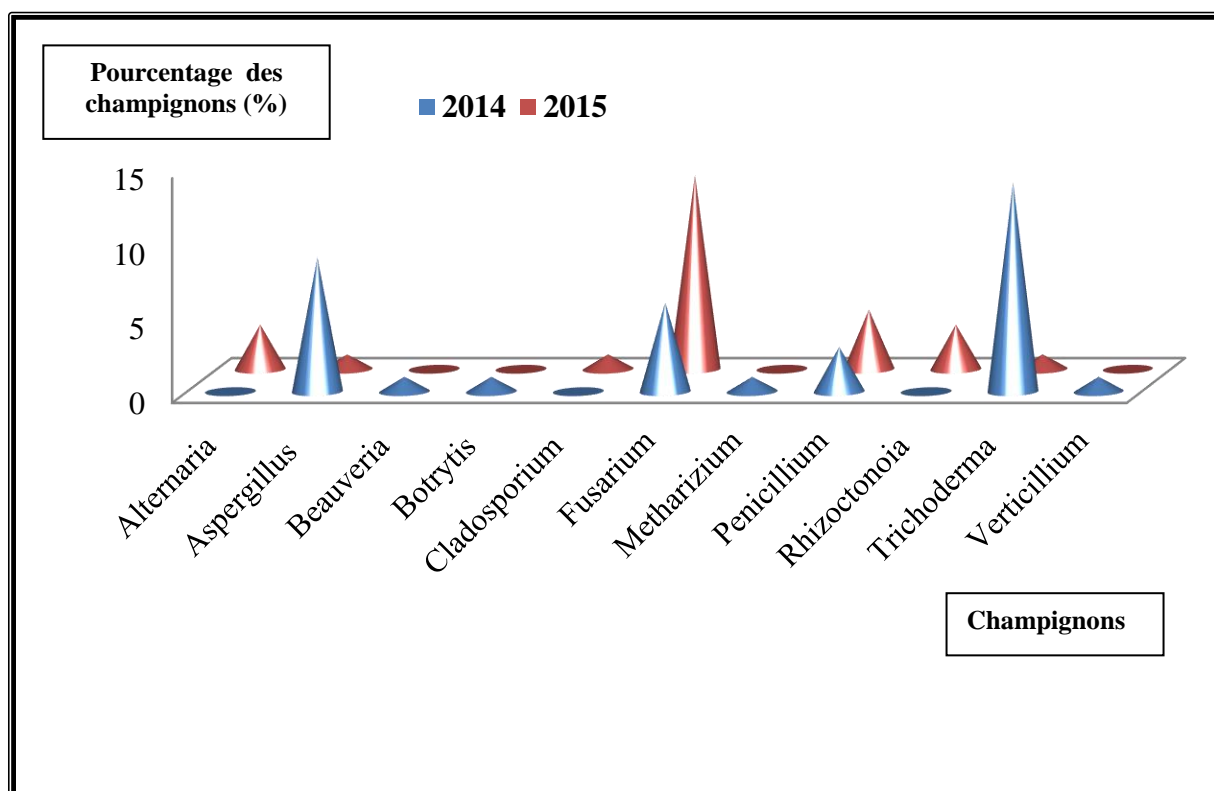
**Tableau 6 :** Fréquences des différents isolats identifiées de sols prélevés (2014 et 2015).

<b>Isolat</b>	<b>2014</b>	<b>2015</b>	<b>Total</b>	<b>Fréquence %</b>
<i>Alternaria</i>	0	3	<b>3</b>	<b>4,84</b>
<i>Aspergillus</i>	9	1	<b>10</b>	<b>16,12</b>
<i>Beauveria</i>	1	0	<b>1</b>	<b>1,61</b>
<i>Botrytis</i>	1	0	<b>1</b>	<b>1,61</b>
<i>Cladosporium</i>	0	1	<b>1</b>	<b>1,61</b>
<i>Fusarium</i>	6	13	<b>19</b>	<b>30,61</b>
<i>Metharizium</i>	1	0	<b>1</b>	<b>1,61</b>
<i>Penicillium</i>	3	4	<b>7</b>	<b>11,29</b>
<i>Rhizoctonoia</i>	0	3	<b>3</b>	<b>4,84</b>
<i>Trichoderma</i>	14	1	<b>15</b>	<b>24,19</b>
<i>Verticillium</i>	1	0	<b>1</b>	<b>1,61</b>
<b>Totale</b>	<b>36</b>	<b>26</b>	<b>62</b>	<b>100</b>

De l'ensemble des résultats obtenus, il ressort *que le genre majoritaire est Fusarium* avec une fréquence de 30.65%, suivi par le genre *Trichoderma* avec 24.2% , puis le genre *Aspergillus* qui représente 16.13% ,suivi par *Penicillium* de l'ordre de 11.29 %. Les genres *Alternaria* et *Rhizoctonia* sont équivalents avec une fréquence de 4.84% et enfin les

genres *Beauveria* , *Botrytis* , *Cladosporium* , *Metharizium* et *Verticillium* représentent les genres les moins représentatifs avec 1.61%. (Tableau 7).

La comparaison des résultats entre les deux années d'étude (Tableau 7), révèle la présence de quatre (4) genres en commun, à savoir : *Aspergillus*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Penicillium*, et *Trichoderma*, . Les genres *Beauveria* , *Botrytis* , *Metharizium* et *Verticillium* n' ont été signalés que dans les échantillons de sols prélevés en 2014 . Les genres *Alternaria* , *Cladosporium* et *Rhizoctonia* sont isolés dans les échantillons de l'année 2015 (Figure 15).



**Figure 15 :** Fréquences des différents genres fongiques isolés à partir des sols 2014 et 2015.

Il apparait par ailleurs de l'analyse global des isolats identifiés des échantillons de sol de 2014, que le genre *Trichoderma* est prédominant avec une fréquence de 38.88% représenté par 14 espèces (*Trichoderma sp<sub>1</sub>* , *Trichoderma sp<sub>2</sub>* , *Trichoderma sp<sub>3</sub>* , *Trichoderma sp<sub>4</sub>* , *Trichoderma sp<sub>5</sub>* , *Trichoderma sp<sub>6</sub>*, *Trichoderma sp<sub>7</sub>* , *Trichoderma sp<sub>8</sub>* , *Trichoderma sp<sub>9</sub>*, *Trichoderma sp<sub>10</sub>* , *Trichoderma sp<sub>11</sub>* , *Trichoderma sp<sub>12</sub>* , *Trichoderma sp<sub>13</sub>* et *Trichoderma sp<sub>14</sub>*), suivi par le genre *Aspergillus* avec 25 % représentant 8 espèces (*Aspergillus sp<sub>1</sub>* , *Aspergillus sp<sub>2</sub>* , *Aspergillus sp<sub>3</sub>* , *Aspergillus sp<sub>4</sub>* , *Aspergillus sp<sub>5</sub>* , *Aspergillus sp<sub>6</sub>* , *Aspergillus sp<sub>7</sub>* et *Aspergillus sp<sub>8</sub>*), puis le *Fusarium* (16.67 %) avec 06 espèces (*Fusarium sp<sub>1</sub>* , *Fusarium sp<sub>2</sub>* , *Fusarium sp<sub>3</sub>* , *Fusarium sp<sub>4</sub>* , *Fusarium sp<sub>5</sub>* et

*Fusarium sp<sub>6</sub>* ), puis *Penicillium* avec 8.33% représentant 3 espèces ( *Penicillium sp<sub>1</sub>* , *Penicillium sp<sub>2</sub>* et *Penicillium sp<sub>3</sub>* ). Enfin les genres *Beauveria* , *Botrytis* , *Metharizium* et *Verticillium* représentent une seule espèce avec une fréquence de 2.78 % (Tableau 7 ).

**Tableau 7 :** Fréquences des différents isolats identifiées de sols prélevés du mois de mai 2014.

<b>Isolat</b>	<b>site 1</b>	<b>site 2</b>	<b>site 3</b>	<b>total</b>	<b>Fréquence%</b>
<i>Aspergillus</i>	6	2	1	9	25
<i>Beauveria</i>	0	1	0	1	2,78
<i>Botrytis</i>	1	0	0	1	2,78
<i>Fusarium</i>	0	3	3	6	16,67
<i>Metharizium</i>	1	0	0	1	2,78
<i>Penicillium</i>	1	1	1	3	8,33
<i>Trichoderma</i>	3	4	7	14	38,88
<i>Verticillium</i>	1	0	0	1	2,78
<b>Total</b>	<b>13</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>36</b>	<b>100</b>

Les résultats des échantillons de sols 2015 ont révélé la présence de 26 isolats fongiques appartenant à 7 genres: *Alternaria*, *Aspergillus* , *Cladosporium* , *Penicillium* *Fusarium* , *Penicillium* , *Rhizoctonia* et *Trichoderma* (Tableau 8 ) ,parmi lesquels le genre *Fusarium* est prédominant avec une fréquence de 50 % représenté par 13 espèces : *Fusarium sp1*, *Fusarium sp2*, *Fusarium sp3* , *Fusarium sp4*, *Fusarium sp5*, *Fusarium sp6*, *Fusarium sp7*, *Fusarium sp8*, *Fusarium sp9*, *Fusarium sp10* , *Fusarium sp11* , *Fusarium sp12* et *Fusarium sp13*., suivi par le genre *Penicillium* qui représente 15.38 % de l'ensemble des isolats avec 4 espèces :*Penicillium sp1* , *Penicillium sp2* , *Penicillium sp3* et *Penicillium sp4* , puis les genres *Alternaria* avec 11.53 % (*Alternaria sp1*, *Alternaria sp.2* et *Alternaria sp.3*) et *Rhizoctonia* avec 11.53 % (*Rhizoctonia sp1* , *Rhizoctonia sp2* et *Rhizoctonia sp3* ), et enfin les genres : *Aspergillus s* , *Cladosprium* et *Trichoderma* représentent une seule espèce avec une fréquence de 3.85%.

**Tableau 8 :** Fréquences des différents isolats identifiées de sols prélevés du mois de mai 2015.

Prélèvement 2015	site 1	site 2	site 3	total	Fréquence %
<i>Alternaria</i>	1	2	0	3	11,54
<i>Aspergillus</i>	0	0	1	1	3.84
<i>Cladosporium</i>	0	0	1	1	3.84
<i>Fusarium</i>	0	7	6	13	50
<i>Penicillium</i>	0	3	1	4	15.4
<i>Rhizoctonia</i>	3	0	0	3	11.54
<i>Trichoderma</i>	0	0	1	1	3,84
<b>Total</b>	<b>4</b>	<b>12</b>	<b>10</b>	<b>26</b>	<b>100</b>

Ainsi , globalement au plan de nos investigations mycologiques, nous avons obtenu 62 isolats fongiques représentant 11 genres : *Alternaria*, *Aspergillus*, *Beauveria*, *Botrytis*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Metharizium*, *Penicillium*, *Rhizoctonia* , *Trichoderma* et *Verticillium* . Ces isolats représentent des souches autochtones, habituellement isolées à partir du sol (Alvarez-Rodriguez *et al.*, 2002)

Les genres majoritaires enrégistrés au cours des deux années d'étude sont *Aspergillus* (16.13%), *Fusarium* (30.65%) , *Penicillium*(11.29%) et *Trichoderma* (24.2%), Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par de nombreux auteurs au cours d'investigations microbiologiques de sols agricoles. Karaoglu et Ulker, 2006 , rapportent également que les genres majoritaires isolés à partir des sols agricoles de thé de la région Lyider-Ikizder ( Turquie) étaient *Penicillium*, *Aspergillus*, *Trichoderma* et *Fusarium*.

Jasuja *et al.* .( 2013) rapportent que les souches fongiques *Aspergillus* , *Fusarium*, *Trichoderma* et *Rhizopus* ont été isolées à partir du sol agricole des serres de la région du Rajasthan (Inde).

Tous ces genres ont été rapportés comme des souches communes isolées à partir des sols (Deming ,2002 , Onofri *et al.*, 2004).

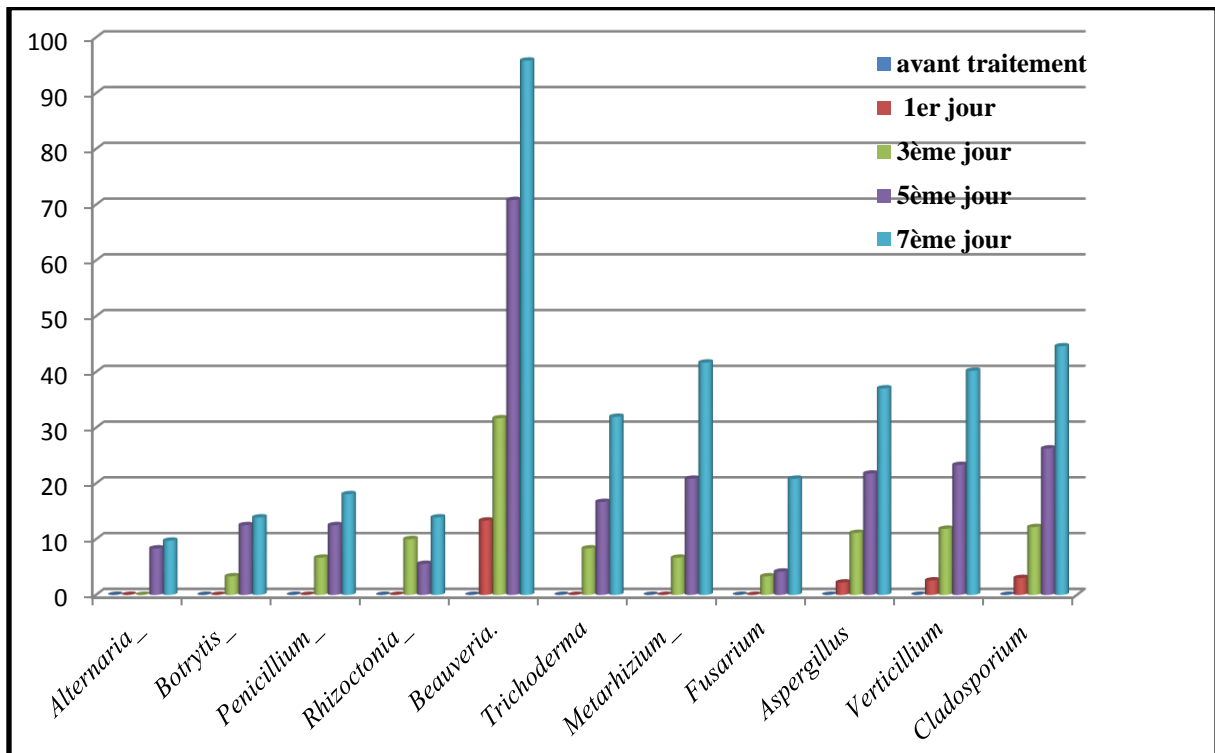
**Almi et al. (2015)** ont également rapporté l'existence de 87 isolats fongiques à partir de sols provenant de champs situés sur des sites de la région de Constantine (Ain Semara et El Baâraouia), répartis en 14 genres parmi lesquels les plus couramment présents sont : *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, et *Trichoderma*. Ces résultats, qui se rapprochent largement des résultats obtenus lors de nos isolements, sont comparables aux travaux d'investigations de **Seth et al. (2016)**, réalisés en Inde sur différents sols de différentes zones cultivées de blé pendant les périodes du 15 avril au 10 mai.2013-2014 .

Par ailleurs, **Gomez et al. (2006)** ont démontré une corrélation positive entre la diversité microbienne et le carbone organique du sol. La biomasse microbienne et la diversité sont bénéfiques pour la qualité du sol, car les microorganismes du sol jouent un rôle clé dans le cycle des éléments nutritifs. Ils accélèrent la décomposition des substances organiques et minéralisent l'azote organique et le phosphore contenus dans le fumier en formes inorganiques disponibles. Les facteurs environnementaux tels que le pH, l'humidité, la température, le carbone organique et l'azote jouent un rôle important dans la distribution de la mycoflore (**RatnaKumar et al., 2015**). Ce sont les principaux facteurs affectant la population fongique qui étaient dans les échantillons du sol .L'analyse mycoflorale était en accord avec d'autres études telles que **Ratnasri et al. (2014)** et **Megha Bhutt et al. (2015)** qui ont obtenu des isolats pour découvrir des différents sols de la zone cultivée de blé pendant la période allant du 15 avril au 10 mai 2013-2014 en Inde . Les champignons obtenus étaient *Aspergillus spp.*, *Penicillium spp.*, *Geotrichum spp.*, *Gloesporium spp.*, *Fusarium spp.*, *Mycelia sterilia*, *Arthrobotrys spp.*, *Cladosporium herbarum* dans la région d'Allahabad. Dans la région de Mirzapur, les isolats *Aspergillus spp.*, *Penicillium spp.*, *Rizoctinia spp.*, *Fusarium spp.*, *Mucor spp.* ont été enregistrés dans les zones de culture de blé. Dans la région de Varanasi, *Aspergillus spp.*, *Penicillium spp.*, *Rizoctonia spp.*, *Fusarium spp.*, *Mucor spp.*, *Alternaria spp.*, *Helminthosporium oryzae* et *Humicola grisea* ont été enregistrés dans des zones de culture de blé. *Aspergillus spp.* et *Penicillium spp.* étaient des champignons communs présents dans les trois régions Allahabad, Mirzapur et Varanasi, de l'Uttar Pradesh ( Inde) .

#### **4. Test d'entomopathogénicité**

La vérification de la pathogénicité des champignons collectés et identifiés, a été réalisée par évaluation de leur aptitude à induire l'infection et / ou des mortalités au sein des colonies aphidiennes. Aussi des tests d'entomopathogénicité réalisés à partir de onze (11) souches

entomopathogènes, ont révélé un effet de mortalité pour l'espèce aphidienne *Metapolophium dirhodum* (Figure 16).



**Figure 16 :** Effet des traitements entomopathogènes sur *Metopolophium dirudhum*

Le suivi des pucerons traités par les formulations entomopathogènes sur la base de 11 souches fongiques a permis de remarquer que la toxicité provoquée par ces traitements est différente entre elles selon les interactions champignons / pucerons .

Selon la figure 19 ,les résultats obtenus au cours des différents traitements ont engendrée une mortalité de l'ordre de 90 % par l'espèce *Beauveria*, nous enregistrons par ailleurs pour *Cladosporium* une forte sensibilité dépassant 60% ,alors qu'avec *Verticillium* elle est de l'ordre de 50 % ,cependant, une moindre pathogenicité variant à des taux de 10 à 40 % a été enregistrée sur *M.dirhudum* avec les autres entomopathogenes testes a savoir : *Aspergillus* et *Metharizium* avec 41.67%, suivie par *Trichoderma* avec 31.94%, *Penicillium* 27.78 % , *Fusarium* , 20.83% et enfin , *Alternaria* , *Botrytis* et *Rhizoctonia* ont enregistré un taux de mortalité de 13.83%. Par ailleurs, l'analyse statistique de variance (ANOVA) réalisée en fonction des jours de traitements a montrée une différence hautement significative après application au 3<sup>ème</sup> jour (Tableau 9).

**Tableau 9 :** Variance ANOVA de 11 souches fongiques contre *Metopolophium dirudhum*

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
BEFORAP P	Between Groups	,000	11	,000	.	.
	Within Groups	,000	456	,000		
	Total	,000	467			
DAA1	Between Groups	22,991	11	2,090	43,989	,000
	Within Groups	21,667	456	,048		
	Total	44,658	467			
DAA3	Between Groups	94,197	11	8,563	28,925	,000
	Within Groups	135,000	456	,296		
	Total	229,197	467			
DAA5	Between Groups	205,248	11	18,659	68,987	,000
	Within Groups	123,333	456	,270		
	Total	328,581	467			
DAA7	Between Groups	367,453	11	33,405	106,027	,000
	Within Groups	143,667	456	,315		
	Total	511,120	467			

[F<sub>3DAA</sub>=(28.925,p<0.00)], 5<sup>ème</sup> [F<sub>5DAA</sub>=(68.987,P<0.00)] et [F<sub>7DAA</sub>=(106.027,P<0.00)]

Ainsi la majorité des insectes sont sensibles aux microorganismes dont les champignons, les bactéries et les virus (Scholte *et al.*, 2004). Approximativement, 750 espèces de champignons décrites sont des pathogènes obligatoires ou facultatifs sur un ou plusieurs stades de développement des insectes dans des habitats aquatiques, terrestres et souterrains (McCoy *et al.*, 1988). En effet, en conditions naturelles, le développement des colonies de pucerons est fréquemment menacé par l'infection des champignons entomopathogènes qui sont leur première cause de mortalité (Remaudière *et al.*, 1981).

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

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

Dans notre étude, *Beauveria*, *Cladosporium* et *Verticillium* ont eu l'effet le plus puissant contre *M. dirhodum* avec un pourcentage supérieur à 50% (95,83, 63,98 et 51,83%, respectivement). En revanche, *Aspergillus* et *Metarhizium* ont montré un effet égal estimé de 41,97%. Enfin, *Trichoderma* et *Fusarium* ont eu l'effet le plus faible avec 31,44% et 20,83%, respectivement. *Beauveria* a été la plus efficace avec 90% de mortalité des pucerons après le 7<sup>ème</sup> jours d'application, ce qui est conforme aux résultats obtenus et rapportés par **Mburu et al. (2009)**, il a été montré, dans le même contexte, que cette espèce présentait un large spectre et une forte virulence, affectant l'hôte avec une simple action de contact.

Par ailleurs *Cladosporium* a exercé un effet fatal significatif à côté de *Beauveria* avec 63,93% ( $P < 0,05$ ) après le septième jour d'application. **Saranya et al. (2008)** ont montré que la suspension de conidies de *C. oxysporum* serait cause de mortalité de l'ordre de 77,5% chez les individus d'*Aphis craccivora* (Koch), lorsque la suspension sporale est utilisée à une concentration de  $10^8$  conidies / ml incorporée dans une solution de Teepol. **Bensaci et al. (2015)** ont estimé la mortalité maximale de *C. oxysporum* contre *A. fabae* à 67,96% / ml.

Dans notre étude, les résultats décrivant l'effet de *Verticillium* sur le *M. dirhodum* étaient similaires à ceux rapportés par **Chavan et al. (2008)** qui ont montré une efficacité significativement élevée dans la lutte contre les pucerons avec 68,23% à 89,54% de mortalité avec *Verticillium locanii*. L'effet de *Metarhizium*, enregistré après le 7<sup>ème</sup> jours d'application (41,67%) était différent des résultats obtenus et rapportés par **Murerwa et al. (2014)** (60-86%) dans l'étude sur l'effet de *Metarhizium. anisopliae* sur les pucerons *M. dirudum* et *R. padii*. Des résultats similaires ont été rapportés par **Won et al. (2015)** sur le puceron vert des pêches (*Mysus persicae*). De même qu'*Aspergillus* a enregistré un effet inférieur à 50% comparable avec celui décrit par **Won et al. (2015)**. Les espèces d'*Aspergillus* présentaient une grande diversité de modes de vie, y compris environnementale, industriels et agricoles; certains d'entre eux peuvent être des agents pathogènes opportunistes d'un large éventail d'organismes,

y compris les ravageurs agricoles (**Gibbons et Rokas, 2012**). Il a été rapporté par le biais d'essais de toxicité, que les espèces d'*Aspergillus* pourraient être utiles dans la lutte contre les pucerons en tant qu'agents de lutte antiparasitaire. Cependant, ces champignons saprophytes ne ciblent pas uniquement les insectes, mais peuvent également affecter les cellules immunitaires déprimées humaines, des mammifères et des oiseaux (**Tell, 2005**).

Des Souches d'*A. Flavus* non productrices d'aflatoxines et non toxicogènes sont actuellement étudiés en lutte biologique (**Ehrlich, 2014**).

Les résultats que nous avons obtenus avec *Trichoderma* présentaient un taux de mortalité estimé à 31,94%. Ces résultats sont différents de ceux rapportés par **Ganassi et al. (2001)** qui a enregistré un effet très significatif (100%) au 3<sup>ème</sup> jours d'application contre trois variétés de *Schizaphis graminum* isolé de plants de riz.

À propos de *Fusarium*, le taux de mortalité enregistré dans notre étude (20,83%) était différent avec celui obtenu par **Guesmi-Jouani et al. (2010)** qui ont signalé un taux de mortalité supérieur à 90%. L'efficacité de *Fusarium* était élevée particulièrement signalée chez les pucerons *Glover gossypii* (**Ganassi et al., 2001**).

La sélection des champignons entomopathogènes pour le contrôle biologique des insectes reste difficile, cela dépend cependant des différentes espèces, de leur susceptibilité, de leur vulnérabilité etc..vis-à-vis des champignons (**Glare et al., 2012**).

Dans notre étude, nous avons isolé 62 champignons de plusieurs échantillons de sols, parmi lesquels pas moins de onze (11) champignons entomopathogènes ont été identifiés et récupérés., Ce qui explique , que les champignons entomopathogènes peuvent être naturellement trouvés à partir des environnements proches des plantes hôtes (cultivés ou grandissant naturellement) qui hébergent des insectes phytophages.

## **5. Etude des isolats sélectionnée**

### **5.1. Identification des souches**

L'identification des souches obtenues étant basée essentiellement sur les clés de détermination décrites par la littérature (**Botton *et al*, 1990 ; Guiraud, 1998**), en se basant sur les caractères macroscopiques des colonies (aspect, couleur, forme, contour, etc.) et sur les caractères microscopiques du mycélium et des conidies ou spores (cloisonnement du mycélium, forme des spores, forme des organes de fructification, etc.) .





#### **5.1.1. Etude macroscopique**

Les caractères macroscopiques des différentes souches sont étudiés sur le milieu de culture PDA. Le Tableau (10) résume l'aspect macroscopique des colonies, leur consistance, la couleur du revers ainsi que la présence ou l'absence de pigments caractéristiques.

#### **5.2.2. Etude microscopique**



Les caractères microscopiques des souches obtenus sont résumés dans le tableau (11)



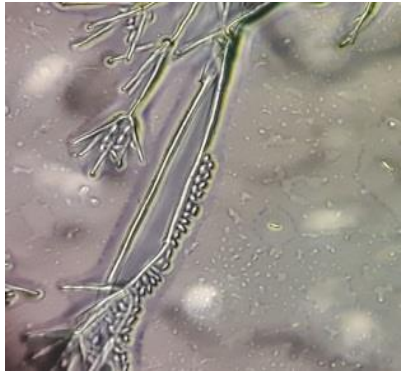
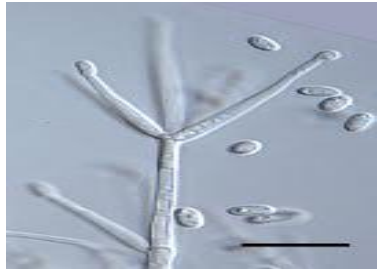
**Tableau 10** : Etude macroscopique des souches fongiques.

Souche obtenus	Description	Aspect macroscopique	
		Surface	Revers
S1	<p><b>Couleur</b> : : blanchâtre jaunâtre</p> <p><b>Aspect colonie</b> : cotonneuse</p> <p><b>Revers</b> : pas de pigment</p>		
S2	<p><b>Couleur</b> : vert au départ puis devenant rouge à pourpres</p> <p><b>Aspect colonie</b> : duveteuse à floconneuse</p> <p><b>Revers</b> : beige et au centre rouge à</p>		

	pourpre		
<b>S3</b>	<b>Couleur</b> : blanc <b>Aspect colonie</b> : cotonneuse <b>Revers</b> : pas de Pigment.		

**Tableau 11:** Etude microscopique des souches fongiques

Souches identifié	Description	Aspect microscopique (x40)	Photos références
<p><b>S1</b></p> <p><i>Beauveria</i></p> <p><i>Bassiana</i></p>	<p>-Des hyphes transparents et septés.</p> <p>-Le genre est caractérisé par un conidiophore à base renflée et à extrémité terminale en zigzag formant de petites spores unicellulaires.</p>		 <p><b>Barron, 2013</b></p>

<p>S2</p> <p><i>Cladosporium</i> <i>cladosporioides</i></p>	<p>- Les hyphes cloisonnés.</p> <p>-Les conidiophores sont également pigmentés de façon sombre.</p>		 <p>Watanuki <i>et al.</i>, (2012)</p>
<p>S3</p> <p><i>Verticillium</i> <i>Alfalfae</i></p>	<p>-Le mycélium cloisonné.</p> <p>-Des fragiles conidiophores verticillées forment des conidies ovoïdes.</p> <p>-Des microsclérotos bruns.</p>		 <p><a href="http://www.get.google.com/albumarchive">www.get.google.com/albumarchive</a>.</p> <p>(2012)</p>

## 6. Test d'entomopathogénicité des isolats sélectionnés

### 6.1. *Aphis fabae*

Le suivi des pucerons traités par les formulations entomopathogènes à base de *B.bassiana*, *C.cladosporioides* et *V.alfalfae* a permis de remarquer que la toxicité provoquée par ces traitements contre *A.fabae* dépassant 90 %. Alors qu'avec *B.bassiana*, la mortalité était de l'ordre de 97,62%. De même, les traitements ont manifesté une notable virulence envers *A.fabae* avec une mortalité de 98,15% pour *V.alfalfae*. Quant au traitement avec *C.cladosporioides*, la mortalité observée a été de 92.92% (Figure 16).

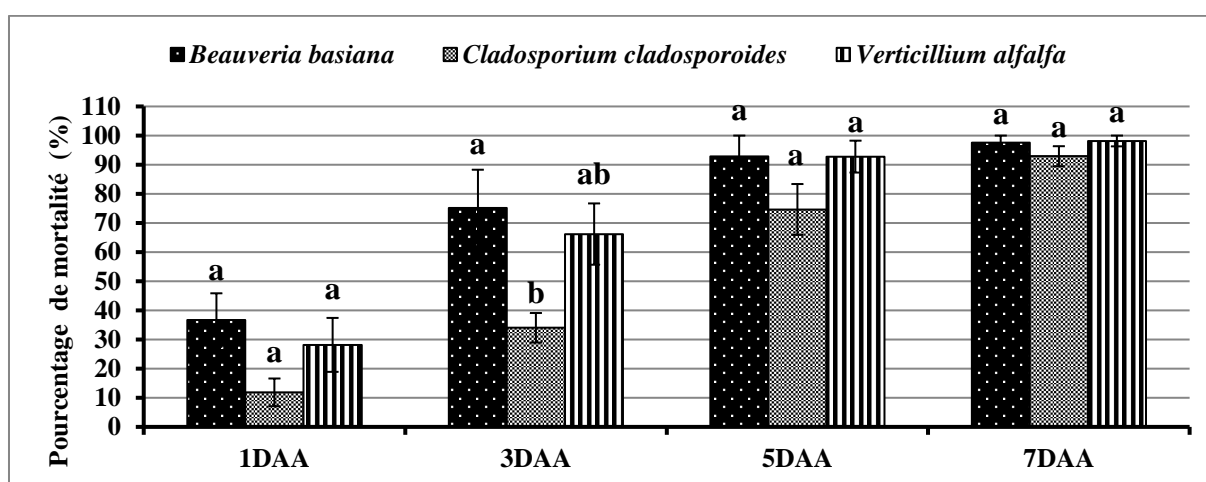


Figure 16 : Effet entomopathogènes sur *Aphis fabae*

Les résultats obtenus dans le tableau 12 montrent que la densité de population d'*Aphis fabae* la plus faible a été enregistrée par *B.bassiana* avec des 2.00, 0.500 et 0.17 en 3, 5 et 7<sup>ème</sup> jours de traitement, suivie par *V.alfalfae* avec 3.00, 0.67 et 0.17 dans les mêmes jours de traitement. Tandis que la densité la plus forte a été observée chez *C.cladosporioides* avec 6.00, 2.17 et 0.67 en 3, 5 et 7<sup>ème</sup> jours de traitement.

Tableau 12 : Les valeurs d'échelle de la densité de population d'*Aphis fabae*

Les souches fongiques	Jours d'application			
	1 <sup>er</sup>	3 <sup>ème</sup>	5 <sup>ème</sup>	7 <sup>ème</sup>
<i>B.bassiana</i>	6.17±0.79 (c)	2.00±0.93 (c)	0.5±0.5 (b)	0.17±0.17 (b)
<i>C.cladosporioides</i>	8.67±0.49 (ab)	6.00±0.45 (b)	2.17±0.70 (b)	0.67±0.33 (b)
<i>V.Alfalfae</i>	7.00±0.77 (bc)	3.00±0.93 (c)	0.67±0.49 (b)	0.17±0.17 (b)
Contrôle	9.83±0.17 (a)	0.17±0.52 (a)	9.00±0.52 (a)	0.9±0.52 (a)

## 6.2. *Macrosiphum rosea*

Les résultats du test d'inoculation de *M.rosea* par les champignons *B.bassiana*, *C.cladosporioides* et *V.alfalfae* sont représentés dans la Figure 17. Ces résultats montrent que l'effet du traitement par les champignons sur la mortalité des larves est significatif ( $P \leq 0,05$ ), comparativement au témoin.

Nous avons remarqué également que la mortalité évolue en fonction du temps; c'est à partir du troisième jour après inoculation que les premières mortalités ont été enregistrées pour l'ensemble des traitements réalisés. Pour le test d'injection directe de la solution conidienne, confectionné par *M.rosea*, c'est *B.bassiana* et *V.alfalfae* qui ont donné la mortalité la plus importante avec: 100 %, suivi par *C.cladosporioides* avec 98.33%.

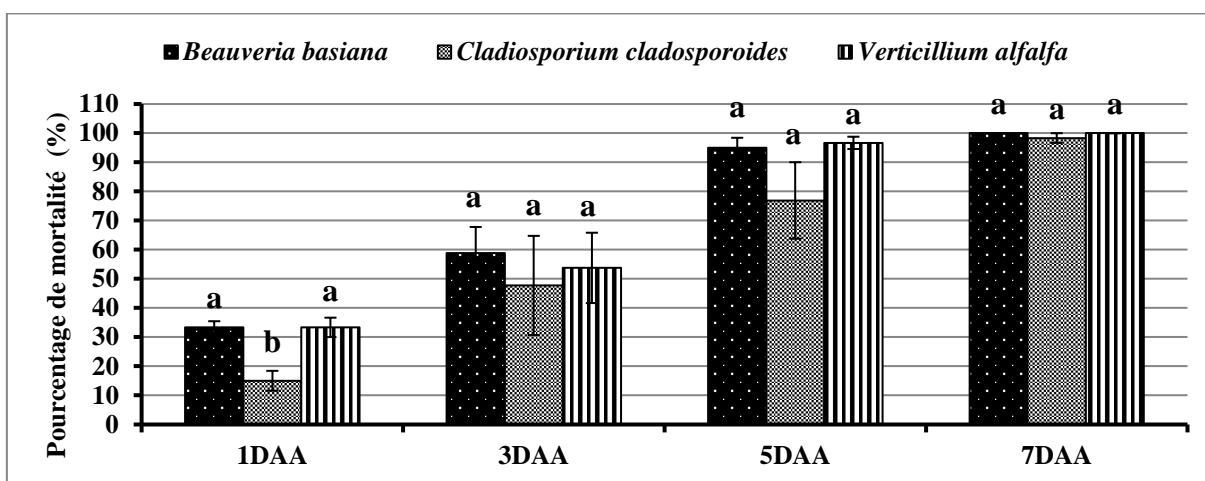


Figure 17 : Effet entomopathogènes sur *M. rosea*

Les densités de population de *M.rosea* les plus faibles en 3, 5 et 7 après traitement ont été observées chez *B.bassiana*, respectivement 3.83, 0.50 et 0.00, et les plus fortes densités de population à ces jours de traitement ont été observées chez *C.cladosporioides* 4.83, 2.00 et 0.17, respectivement. Par ailleurs, la densité de population la plus faible, avec une valeur de 0,00, était observée chez *V.alfalfae* après 7<sup>ème</sup> jours de traitement, tandis que la densité la plus forte a été enregistrée en 3<sup>ème</sup> jours de traitement avec une valeur de 4.50 (Tableau 13).

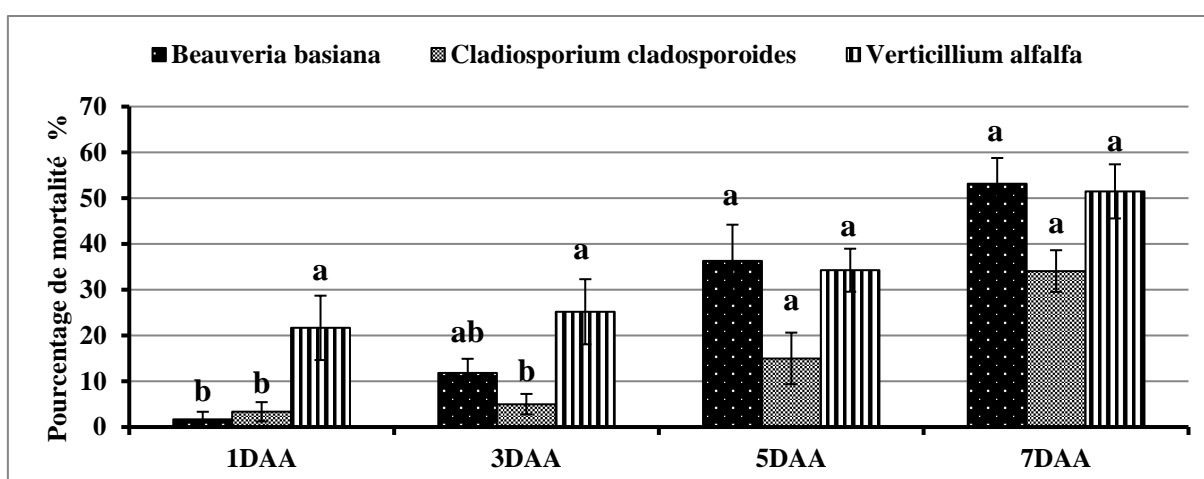
**Tableau 13 :** Les valeurs d'échelle de la densité de population de *M.rosea*

Les souches fongiques	Jours d'application			
	1 <sup>er</sup>	3 <sup>ème</sup>	5 <sup>ème</sup>	7 <sup>ème</sup>
<i>B.bassiana</i>	6.67±0.21 (c)	3.83±0.75 (b)	0.5±0.34 (b)	0.00±0.00 (b)
<i>C.cladosporiodes</i>	8.50±0.34 (b)	4.83±1.47 (b)	2.00±1.03 (b)	0.17±0.17 (b)
<i>V.Alfalfae</i>	6.67±0.33 (c)	4.50±1.23(b)	0.33±0.21 (b)	0.00±0.00 (b)
<i>Contrôle</i>	10.00±0.00 (a)	9.5±0.34 (a)	9.50±0.34 (a)	9.33±0.33 (a)

### 6.3. *Myzus persicae*

Le test d'entomopathogénicité a été enregistré envers *M.persicae* pour les différents traitements où le taux de mortalité a varié de 35 à 54% (Figure 18).

Les résultats obtenus montrent que *B.bassiana* a un fort effet sur *M.persicae* avec un pourcentage 53.15%, suivie par *V.alfalfae* qui représente un pourcentage 51.48%, puis *C.cladosporiodes* avec un pourcentage de 34.07%.



**Figure 18 :** Effet entomopathogènes sur *Myzus persicae*

Les valeurs d'échelle de la densité de population de *M.persicae* sont données dans le tableau 14. Les densités de population de pucerons au cours des traitements avec les isolats fongiques ont été comparées à celles des témoins en 1, 3, 5 et 7 jours après le traitement. Avant le traitement, les densités de population n'étaient pas significativement différentes par rapport au traitement. Les densités de population les plus faibles (8.67, 6.17 et 4.50 individus) ont été enregistrées par *B. bassiana* en 3, 5 et 7<sup>ème</sup> jours de traitement, respectivement, tandis que les plus fortes (9.33, 8.17 et 6.33 individus) ont été observées par

*C. cladosporioides* aux mêmes jours de traitement. Les densités de population sur *V. alfalfae* étaient (7.33, 6,33 et 4.67 individus) en 3, 5 et 7<sup>ème</sup> jours de traitement.

**Tableau 14** : Les valeurs d'échelle de la densité de population de *M.persicea*

Les souches fongiques	Jours d'application			
	1 <sup>er</sup>	3 <sup>ème</sup>	5 <sup>ème</sup>	7 <sup>ème</sup>
<i>B.bassiana</i>	9.83±0.17 (a)	8.67±0.33 (ab)	6.17±0.79 (c)	4.50±0.50 (c)
<i>C.cladosporioides</i>	9.67±0.21 (a)	9.33±0.21 (a)	8.17±0.40 (ab)	6.33±0.33(b)
<i>V.Alfalfae</i>	7.83±0.70 (b)	7.33±0.67(b )	6.33±0.42 (bc)	4.67±0.56 (bc)
<i>Contrôle</i>	10.00±0.00 (a)	9.83±0.17 (a)	9.67±0.21 (a)	9.67±0.21 (a)

#### 6.4. La sensibilité des espèces aphidiennes

L'analyse du taux de mortalité démontre que les espèces aphidiennes ont réagi différemment suite aux traitements. En effet, le traitement des aphides par *B. bassiana*, *C.cladosporioides* et *V. alfalfae* a engendré des mortalités spectaculaires chez les différentes espèces aphidiennes où *M.rosea* sont les plus sensibles et dont la mortalité était totale. De même, le taux de mortalité enregistré pour *A.fabea* était très élevé dépassant 95% .

Cependant, *M.persicea* a eu une réponse moins sensible avec un taux de mortalité n'atteignant pas les 55%.

D'ailleurs, l'analyse statistique chez les différentes espèces aphidiennes en fonction des traitements a distingué une différence hautement significative entre *M.persicea* ayant un taux de mortalité de l'ordre 55% comparé aux autres espèces aphidiennes qui ont présenté une mortalité supérieure à 95% suite au traitement fait à base de *B.bassiana*.

De même la suspension sporale de *V.alfalfae* a engendré des réponses similaires à celles causées par *B.bassiana*.

**Eidy et al., 2015** ont constaté que la mortalité des pucerons augmentait avec l'augmentation des concentrations de conidies et du temps après le traitement. Une mortalité de 100% a été obtenue dans les concentrations de spores  $10^7$  et  $10^8$  conidies/mL de *L. lecanii* en 4<sup>ème</sup> jour de traitement. **Abd El-Salam et El-Hawary (2011)** ont enregistré une mortalité de 100% chez l'adulte *A. carcivora* avec *L. lecanii* appliqué à une concentration de 1,0 ml de suspension de conidies ( $1 \times 10^6$  conidies / ml) après trois jours. Donc, **Sarnya et al. (2010)** ont signalé que avait causé une mortalité de 100% avec la concentration  $10^7$  et  $10^8$  conidies /ml , tandis que *B. bassiana* avait causé une mortalité de 10% à  $10^8$  conidies/ml après 7<sup>ème</sup> jours de traitement .

## 7. Production des Enzymes

### 7.1. Protéase

#### 7.1.1. Protéase alcaline

##### 7.1.1.1. Mise en évidence de l'activité protéolytique

Le choix des milieux de culture est déterminant pour l'isolement et le dénombrement des microorganismes, ainsi que dans la mise en évidence de l'activité enzymatique. Il en est de même pour le choix de la substance protéique employée comme substrat pour la production des protéases (Clarke et Steel, 1966). Ce milieu présente plusieurs avantages tels que la simplicité de préparation, la variété, la richesse en protéines et le faible coût (Smith et al., 1952). Pour cela, nous avons utilisé le milieu à base de lait gélosé comme milieu sélectif.

Les résultats obtenus après l'ensemencement sur le milieu lait gélosé présentent des zones d'hydrolyses permettant la mise en évidence de l'activité protéolytique chez trois champignons entomopathogènes (*Beauveria bassiana*, *Cladosporium cladosporioides* et *Verticillium alfalfae*). Les trois souches sont caractérisées par des zones d'hydrolyse dont le diamètre peut s'étaler de 1.3cm à 5.1cm.

Les résultats de screening montrent que *V. alfalfae* présente une grande zone de lyse avec un diamètre égal à 5,1 cm, suivie par *C. cladosporioides* avec un diamètre égale à de 2 cm puis *B. bassiana* avec un diamètre de 1.3cm (Figure19).



**Figure 19** : Evolution de zones de lyse obtenue sur :(a) *Verticillium alfalfae* ; (b) *Beauveria bassiana*; (c) *Cladosporium cladosporioides* sur milieu « lait gélosé »

Ces résultats montrent que les souches utilisées ont une activité protéolytique. Ceci prouve que les souches utilisées sont capables d'hydrolyser d'une part la caséine (protéine du lait) qui donne des acides aminés solubles utilisables, et suggère d'autre part, que les enzymes responsables de cette hydrolyse sont sécrétées dans le milieu extérieur. Il ressort donc de ses observations que les souches utilisées sont capables de production de protéases extracellulaires. Chaque souche protéolytique est capable de générer une zone de protéolyse de

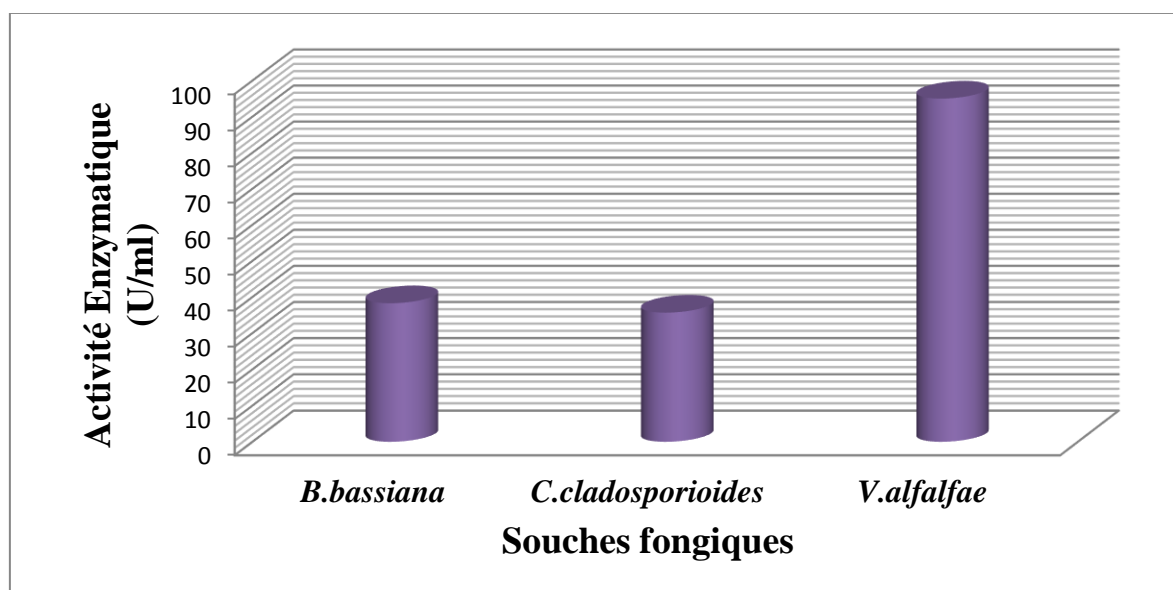
diamètre supérieure à 3 cm. Le diamètre de l'halo est proportionnel soit à la quantité de protéases libérées par les colonies, soit à la diffusion des enzymes secrétées dans le milieu pendant le temps d'incubation. Il est à noter que même en absence d'une activité protéolytique exo-cellulaire, on observe un envahissement du milieu par les moisissures. Ceci indique une utilisation des sucres totaux présents dans le lait comme source de carbone et d'énergie ou par la production d'une activité protéolytique endocellulaire (**Debananda et al., 2009**).

#### 7.1.1.2. Fermentation des souches sélectionnées

Les fermentations réalisées en Erlenmeyers de 250 ml ont permis de récupérer après 3 jours, les filtrats nécessaires de chaque souche fermentée pour l'extraction des protéases et réaliser le dosage enzymatique.

##### a. Résultats de l'activité protéolytique

Au vu des résultats obtenus la comparaison des activités protéolytiques chez les différentes souches fongiques indiquent que la production de protéase alcaline obtenue par les trois souches sur le milieu liquide à base de farine de criquet (*Ocnridia voleximii*), est très importante (Figure 20).



**Figure 20** : Activité protéolytique après fermentation (Protéase alcaline).

Par ailleurs, ces trois souches ne produisent pas la même quantité de l'enzyme ciblée; la meilleure activité obtenue (95 U/ml) est produite par la souche *V.alfalfae*, suivie par *B.bassiana* (38,26 U/ml), puis *C. cladosporioides* (35.65U/ml).

Ces résultats permettent de considérer la farine de criquet comme un substrat favorable pour la production des protéases vu sa richesse en protéines (60%) (**Clarkson et al., 2018**)

Ces résultats rejoignent ceux rapportées par **Zhao et al. (2016)** et **Purschke et al.(2018)** qui ont noté un taux de 82% de teneur en protéines pour le ver jaune et le criquet migrateur. Alternativement, les analyses sur d'autres espèces de criquets ont montré des valeurs légèrement inférieures allant de 65–75 % pour les substances insolubles, 58–69 % pour les substances solubles et 50 à 61 % pour les fractions surnageantes (**Yi et al., 2013 ; Ndiritu et al.,2017**). La chitine et la protéine liée à la chitine qui sont donc indigestibles, sont susceptibles de contribuer à la teneur en protéines des substances insoluble (**Jonas et Martinez ,2017**) . Toutefois et par ailleurs nous n'avons pas pu obtenir une bonne croissance des souches ce qui pourrait s'expliquer d'une part par une insuffisance nutritionnelle de ce milieu, du fait que la farine constitue la seule source carbonée, d'autre part par le dépassement du seuil des protéines et des acides aminées car la farine les contient déjà, il y'avait alors une régression de la croissance fongique.

Ainsi les résultats synthétisés dans la figure 20 révèlent que les souches *B.bassiana* , *C.cladosporioides* et *V.alfalfae* disposent de grandes variations entre elles au niveau de rendement en activité protéolytique . Les cuticules des insectes ont stimulé la production de protéase par *V. locanii* et *V. alboatum* , Ces résultats sont similaires à ceux rapportés par (**Barranco-Florido et al., 2002** ).

Dans la présente étude, l'activité de protéase de *B. bassiana* (38,26 U / ml) était approximativement similaire à celle rapportée par **Ito et al. ( 2007 )** , démontrant une activité protéolytique élevée après le cinquième jour de fermentation , aussi Le temps nécessaire à la production maximale de protéase ne dépend pas nécessairement des constituants du milieu. **Kucera ( 1971 )** a observé une forte libération de protéase après le 3ème jours de fermentation avec différentes sources d'azote. L'activité protéolytique de *B. bassiana* est influencée par l'âge de la culture ; Ceci est probablement dû à la limitation en éléments nutritifs ou à l'autolyse de la culture (**Braga et al. 1999** ). Les champignons pathogènes des insectes sont liés à de nombreux facteurs, tels que l'hôte, le parasitisme et l'environnement. Lors du contact initial entre le champignon et l'insecte, après le processus d'adhésion, la pénétration du pathogène fongique dans la cuticule dépend de manière significative de l'action des activités enzymatiques des entomopathogènes (**St. Leger et al. , 1987** ).

*C. cladosporioides* présente une activité protéolytique moyenne (35.65U/ml) Notre résultat est en accord avec celui obtenu par **Jakovljević ( 2016 )** qui a constaté que les activités (56,88%) de protéase alcaline de *C. cladosporioides* étaient renforcées par l'ajout de 0,5% d'un polluant ( ?) dans le milieu nutritif liquide Czapek-Dox .

### a. Résultats du pH

Les résultats du pH des 3 essais sont mentionnés dans le Tableau 15. Ils montrent une augmentation importante du pH dans les cultures liquides. Cela pourrait s'expliquer par le fait que la farine de criquet possède un excellent pouvoir tampon. C'est le cas pour la plupart des résidus agro industriels (Tomates, Soja etc..)(Chutmanop *et al.*, 2008).

Par ailleurs, le pH le plus élevé a été observé chez la souche *V.alafalfae* (7.89). Cela pourrait être dû aux productions de composants chargés positivement tel que l'ammoniaque résultant de la dégradation des protéines (García-Gómez *et al.* 2009). Ceci pourrait s'expliquer, par une grande activité protéolytique observée par la même souche sous les mêmes conditions

De ce fait, le pH du milieu est affecté par les processus métaboliques, notamment enzymatiques, C'est pour cette raison que les variations du pH sont des indicateurs des changements dans les activités métaboliques (Sandhya *et al.*, 2005).

**Tableau 15** : Résultats du pH pour la protéase alcaline

<i>Souche fermentée</i>	<b>pH avant fermentation</b>	<b>pH après fermentation</b>
<i>B.bassiana</i>	4.5	6.92
<i>C.cladosporioides</i>	4.5	6.92
<i>V.alafalfae</i>	4.5	7.89

#### 7.1.2. Protéase acide

Les fermentations réalisées en Erlen-meyers de 250 ml ont permis après trois jours, de récupérer les filtrats pour chaque souche fermentée afin d'extraire les protéases et réaliser le dosage enzymatique.

##### 7.1.2.1. Résultats du pH

Afin d'étudier l'influence du pH initial de la solution de *O.volaximii* (milieu utilisé) sur la production de la protéase de trois souches (*B.bassiana*, *C.cladosporioides* et *V.alfalfae*), des fermentations sont conduites à la température optimale pendant 3 jours. Les résultats du pH montrent une stabilité plus ou moins proche de l'alcalinité dans les cultures liquides (Tableau 16).

**Tableau 16** : Résultats du pH pour la protéase acide

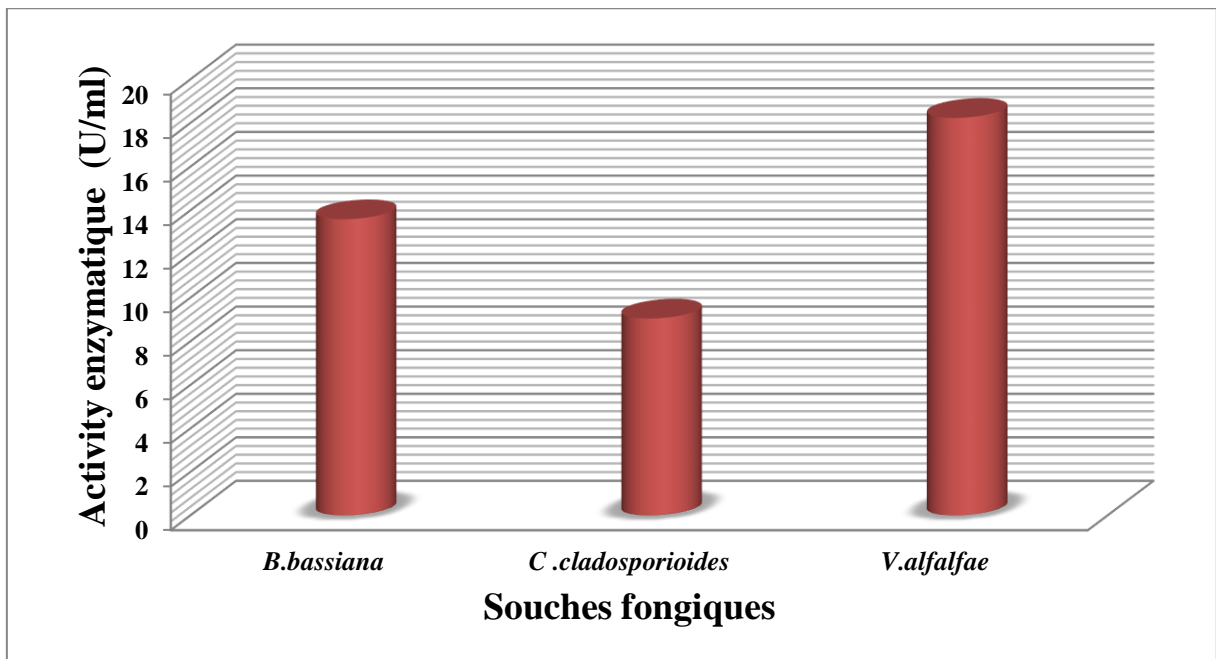
Les souches	pH avant fermentation	pH après fermentation
<i>B.bassiana</i>	pH=4.5	8.34
<i>C .cladosporioides</i>	pH=4.5	8.22
<i>V.alfalfae</i>	pH=4.5	8.97

La plupart des champignons se développent à des pH plus ou moins acides (Berthier et Valla, 1998 ).Outre la croissance des champignons, le pH joue un rôle primordial dans la production de métabolites ( **Larpent, 1991**).

Des résultats similaires ont été trouvés par **Singh et al., (1994)**, utilisant la fermentation sur milieu liquide pour produire la protéase acide d'*Aspergillus. Niger* ,de même **Mashaly et al., (1981)** mentionnent que le maximum de production de la protéase coagulante de *Mucor pusillus* s'effectue dans un milieu à pH 3,7. Par ailleurs, **Negi et Banergee, (2010)** trouvent que l'optimum de production de la protéase d'*Aspergillus awamori* est obtenu sur le même substrat humidifié par la solution de *Czapeck-Dox* à pH 5,5. **Vishwanatha et al., (2010) et Gais, (2011)** rapportent que les optimums du pH de la production des protéases d'*A. oryzae* MTTC 5341 et de *Rhizopus stolonifer* sont de l'ordre de pH 5 et pH 6 respectivement. En effet, les activités métaboliques des microorganismes sont très sensibles à la variation du pH, car ils influent fortement sur de nombreux processus enzymatiques ainsi que le transport de différents éléments nutritifs à travers la membrane cellulaire assurant la croissance et la production des métabolites (**Sandhya et al., 2005; Lazim et al., 2009; Paranthaman et al., 2009**). Ces activités métaboliques conduisent inévitablement à un changement dans l'équilibre des ions hydrogène et donc du pH du milieu de culture (**Elibol et Moreira, 2005**).

#### **7.1.2.2. Activité enzymatique**

L'activité protéolytique la plus importante a été relevée sur *V.alfalfae* (18.23 U/ml), alors que la souche *B.bassiana* a élaboré un taux de production de 13.59 U/ml . La plus faible production a été observée par la souche *C .cladosporioides* (9.04U/ml) ainsi, L'activité protéolytique varie de 9.04 U à 18.23 U (Figure 21).



**Figure 21** : Activité protéolytique après fermentation (protéase acide).

Les résultats obtenus par les trois souches sont différentes de ceux rapportés par **Chakraborty et al. (1995)** qui ont mentionné de grande quantité de protéase acide produites par (*Asprgillus .niger var tieghem*) sur substrat solide (Son de blé).

Karuna et Ayyana (1993) ont signalé que l'activité protéase maximale avec *A. oryzae* a été obtenue après 72 heures d'incubation, mais lorsque la période d'incubation était prolongée jusqu'à 120 heures, l'activité enzymatique a diminuée. La période d'incubation est donc directement proportionnelle à la production d'enzymes et d'autres métabolites dans une certaine mesure.

Les résultats obtenus de protéase alcaline et acide montre que les trois souches fongiques *B. bassiana* , *C. cladosporioides* et *V. alfalfae* peuvent élaborer les deux enzymes (Alcaline et Acide). Par ailleurs, les trois souches peuvent produire et assimiler la protéase alcaline avec des activités (UI/ml) élevées par rapport la protéase acide dans les même conditions de (pH , température et temps d'incubation).

## 7.2. Chitinase

### 7.2.1. Mise en évidence de l'activité chitnolytique

Les tests de chitinase réalisés sur le Milieu MCC (Milieu chitine colloidal) ont permis la mise en evidence de l'activité chitinolytique chez les trois champignons entomopathogènes étudiés (*Beauveria bassiana* , *Cladosporium cladosporioides* et *Verticillium alfalfae* ).

Les trois souches sont caractérisées par des zones d'hydrolyse dont le diamètre varie de 1cm à 3 cm. Les résultats de screening montrent que *V. alfalfae* donne une grande zone de lyse

avec un diamètre de 2 cm, suivie par *C. cladosporioides* avec 1 cm puis *B. bassiana* avec 0.8 cm (Figure 22)



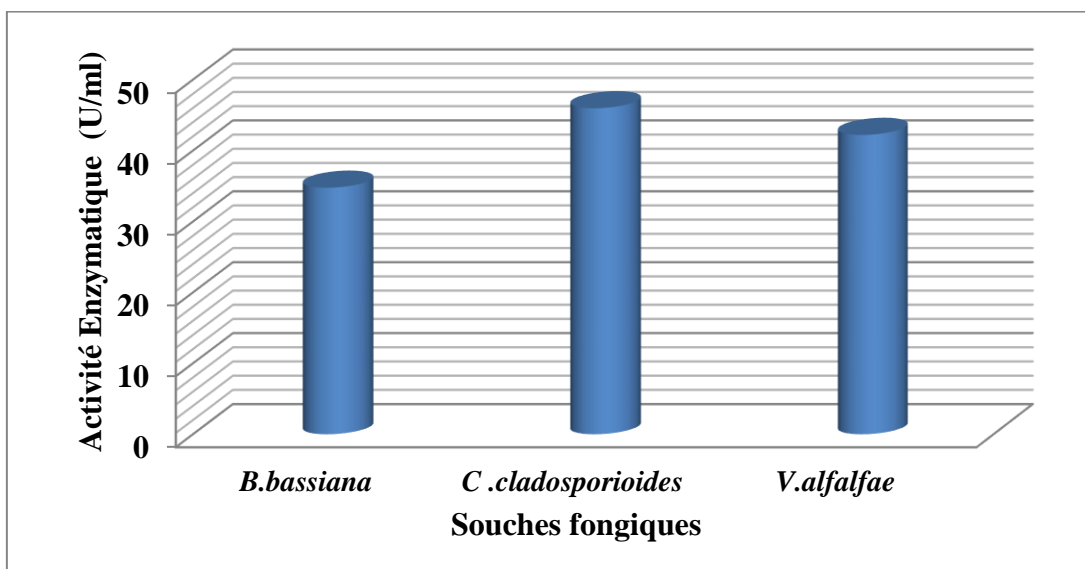
**Figure 22** : Evolution des d'hydrolyse de : , a: *Cladosporium cladosporioides*. ; b:*Beauveria bassiana* ; c: *Verticillium alfalfae*; sur milieu MCC

La dégradation de la chitine a été principalement remarquée chez le genre *V.alfalfae*.

En fait ; les chitinases ont été décelées chez *Lecanicillium lecanii* (Nguyen *et al.*,2015) *Peacilomyces variotii* (Nguyen et al., 2009) , *Beauveria bassiana* (Dhawan et Joshi , 2017 ; Fang *et al.*, 2009 ; Suresh et Chandrasekaran, 1998), et *Beauveria felina* (Patidar *et al.*, 2005).

### 7.2.2. Résultats de l'activité de Chitinase

La comparaison des quantités d'enzymes produites par les souches sélectionnées :*B.bassiana* *C cladosporioides* et *V.alfalfae* , est effectuée par fermentation sur milieu à base de farine de criquets *O.voloximii* dans des Erlenmeyer avec un taux d'inoculum de  $10^7$  spores/ml, incubées à 28°C. Aussi La production enzymatique enregistrée chez *C.cladosporioides* est assez élevée avec 45.97 U/ml suivie par celle de *V.alfalfae* avec 42.21 U/ml, puis *B.bassiana* , 34.76 U/ml (Figure 23).



**Figure 23** : Activité chitinolytique après fermentation

Ces résultats permettent de considérer la farine comme un substrat favorable pour la production de chitinase vu sa richesse en chitine. Nos résultats sont en parfait accord avec ceux indiqués par (Kaya *et al.*, 2015) La teneur en chitine représente 5.3 %-8.9 % chez les sauterelles. Les chitinases sont principalement étudiées pour leur potentiel en tant qu'agents de bio- contrôle contre les insectes, elle sont considérées parmi les enzymes importantes de dégradation de la chitine polymères des cuticule des insectes (Stoykov *et al.*, 2015 ; Dhawan et Joshi , 2017 ). Les résultats obtenus se rapprochent de ceux indiqués par, Suresh et Chandrasekaran, (2005) pour la production de la chitinase par *Beauveria bassiana* sur milieu de déchets de crevettes avec un ration 5 :1 (déchets de crevettes / eau de mer pendant 96h. ),par contre , Dhawane et Joshi (2017) rapportent une activité moyenne de chitinase (0.51U/ml par *B.bassiana* MTCC 4495, suivie par *B.bassiana* MTCC 2028 (0.49 U/ml).

Nos résultats sont en accord avec ceux indiqués par Binod *et al.*, ( 2005) ont noté que le temps d'incubation pour une meilleure production de chitinase est de 72h .Par ailleurs Lee *et al.*, ( 2009) ont également montré que l'activité de chitinase la plus élevée du *Penicillium* sp. LYG 0704 a été observée le troisième jour de la culture.

### 3.2.3. Résultats du pH

Les résultats du pH des 3 essais sont mentionnés dans le tableau 17 Ils montrent une augmentation importante du pH dans les cultures liquides.

Tableau 17 : Résultats du pH pour la chitinase

Souche fermentée	pH avant fermentation	pH après fermentation
<i>B.bassiana</i>	4.5	6.92
<i>C.cladosporioides</i>	4.5	6.92
<i>V.alafalfae</i>	4.5	7.89

Le pH augmente jusqu'à atteindre la valeur de 7.89 en fin de culture, cette augmentation du pH s'explique par la libération des acides aminés et des ions ammonium (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) dans le milieu, suite à une protéolyse intense (Botton *et al.*, 1990), aussi à l'épuisement du milieu en substrats nutritifs et au début de l'autolyse mycélienne.

Les pH optimum observés sont de 4 à 6 pour la plupart des chitinases fongiques telles que celles des espèces , *Lecanicillum* (Tikhonov *et al.*, 2002 ; Barghini *et al.*, 2013), *Talaromyces flavus* (Duo-Chuan *et al.*, 2005), *Gliocladium catenulatum* (Ma *et al.*, 2012), *M. anisopliae* (Kang *et al.*, 1999), et *Aspergillus fumigatus* (Xia *et al.*, 2009).

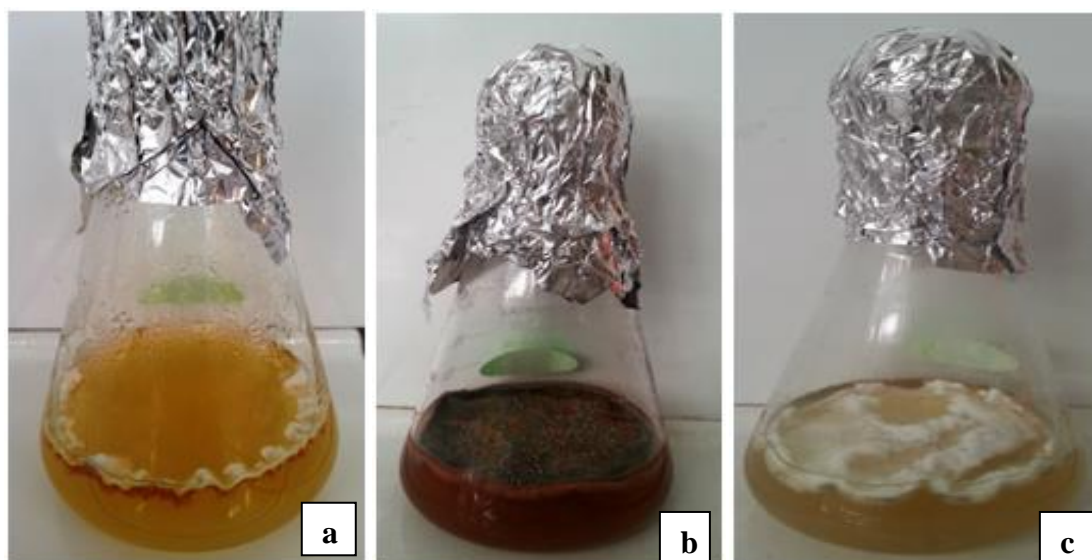
Des travaux antérieurs ont rapporté des valeurs optimales de pH pour les chitinases fongiques entre 4 et 8 (Li, 1998 ; Sahai and Manocha ,1993).

## 8. Métabolites secondaire

### 8.1. Fermentations

Après inoculation, les Erlenmeyer ont été incubés à 28°C pendant 21 jours. Au cours de notre étude, nous avons remarqué des développements morphologiques différents du mycélium des 3 champignons entomopathogènes (*B.bassiana* , *C.cladosporioides* et *V.alfalfae*). Nous avons constaté aussi que les différences de développement morphologiques du mycélium peuvent être reliées aux différences de niveau de métabolites produits intra expérimentation.

En effet, les mycélium se développent de façon homogène dans le milieu de culture en formant des filaments (un tapis) . La figure 24 illustre le développement des trois souches fongique après 21 jours de fermentation.



**Figure 24** : Développement morphologique de trois souches fongiques sur milieu de Fermentation (PDA liquide) , a : *B.bassiana* ; b : *C. cladosporioides* ; c : *V.alfalfae* .

#### 8.1.1. Résultats du pH

Les résultats du pH des 3 essais montrent une augmentation importante du pH dans les cultures liquides (Tableau 18); ceci qui indique une production d'ammoniac résultant du métabolisme des protéines après l'action des métabolites puis de l'oxydation des acides aminés au cours de leur utilisation comme source d'énergie (**García-Gómez et al., 2009**).

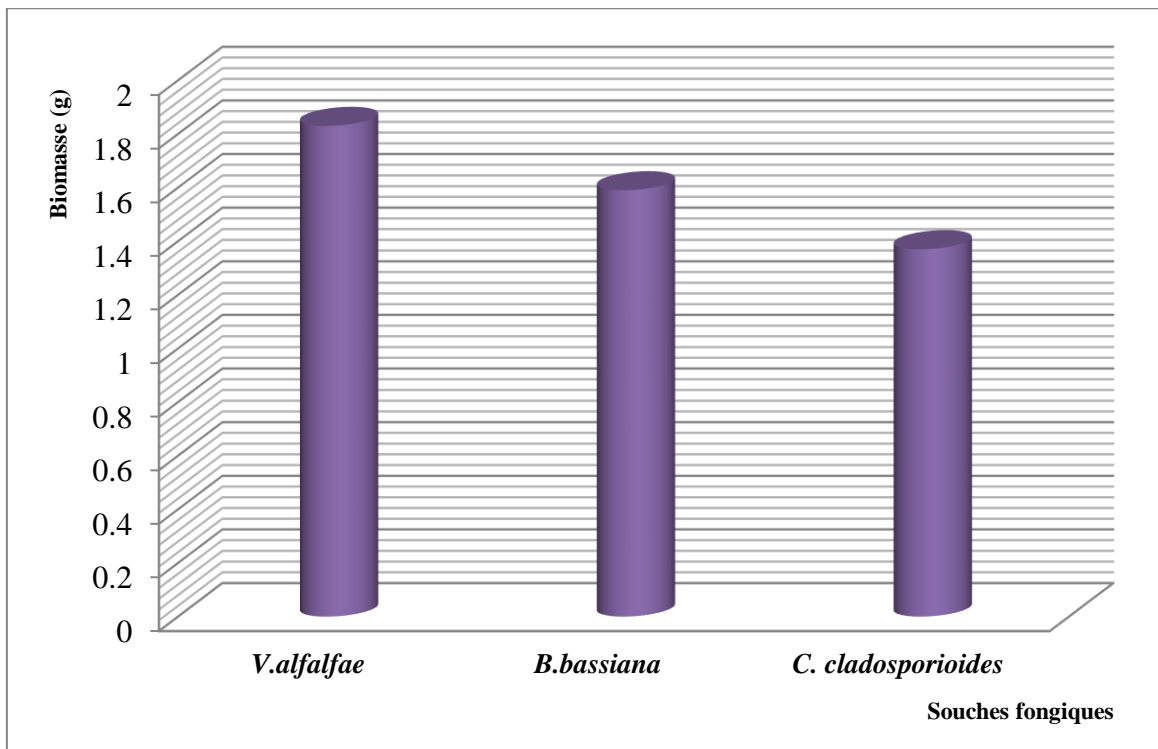
Ces résultats indiquent que le pH du milieu est affecté par les processus enzymatiques et le transport des divers composants à travers la membrane. En effet, les variations du pH sont des indicateurs des changements dans les activités métaboliques. Mais ces variations dépendent du type de fermentation (**Sandhya et al., 2005**).

**Tableau 18 : Résultats du pH pour les toxines**

<i>Souche fermentée</i>	<b>pH initial</b>	<b>pH final (après fermentation)</b>
<i>B.bassiana</i>	<b>5.5</b>	<b>6.85</b>
<i>C.cladosporioides</i>	<b>5.5</b>	<b>6.80</b>
<i>V.alfalfae</i>	<b>5.5</b>	<b>7.30</b>

### **8.1.2. Résultats de la biomasse**

Ces résultats indiquent que, l'évolution de la biomasse en fonction des souches fongiques varie entre 1.37g et 1.83g (Figure 24), par ailleurs, on remarque que les biomasses des trois souches sont différents; la meilleure biomasse obtenue (1.83g) est produite par la souche *V.alfalfae*, celle-ci est suivie par les biomasses de *B.bassiana* (1.59g), puis de *C.cladosporioides* (1.37) .



**Figure 24 :** Evolution des biomasses

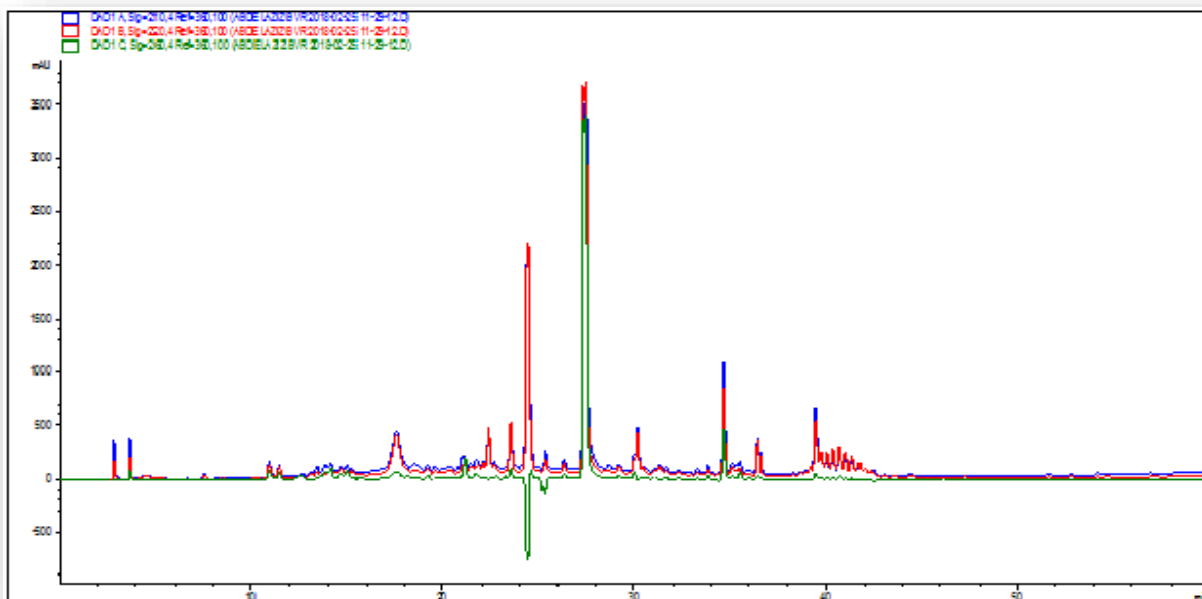
## 8.2. Les résultats HPLC

Dans le but d'obtenir une séparation satisfaisante et plus rapide des métabolites secondaires des champignons entomopathogènes on a utilisé le système HPLC en gradient d'élution linéaire, aussi la phase mobile HPLC a été testée avec l'Acétonitrile comme solvant.

Les figures 25, 26, 27 et le tableau 19 montrent les différents profils chromatographiques obtenus par analyse en HPLC des cultures des 3 souches *B.bassiana*, *C.cladosporioides* et *V.alafalfae*. Il apparaît ainsi que les métabolites secondaires des trois souches fongiques recherchés dans les surnageant de culture couvrent une large gamme de polarité et que 25 minutes sont nécessaires pour séparer l'ensemble de ces molécules. Les chromatogrammes HPLC des extraits de *Beauveria bassiana* sont présentés par la figure 25 et le tableau 19.

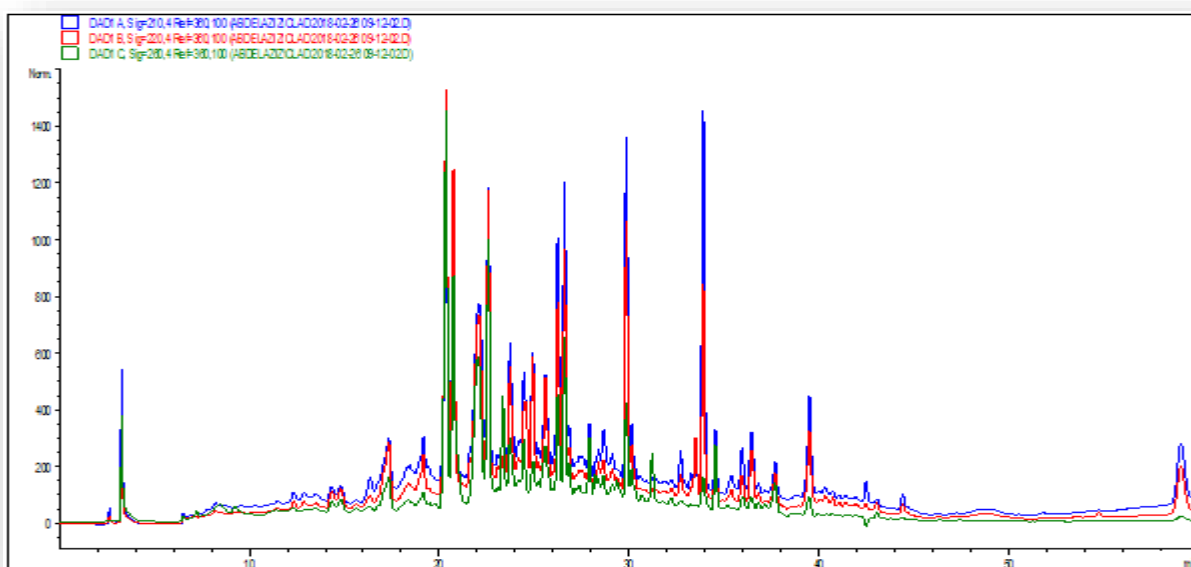
Les profils HPLC à 260, 220 et 210 nm de *B.bassiana* évoluent de la même manière, mais ne sont pas totalement identiques. En effet, dix pics sont détectés aux mêmes temps de rétention. En outre, on distingue 8 pics pour le profil  $\lambda=210\text{nm}$ , 4 pics pour le profil  $\lambda=220\text{nm}$  et un pic pour le profil  $\lambda=260\text{ nm}$  (Figure 26).

L'étude des spectres UV des pics a montré que certains de ses composés présentent les caractéristiques des flavones (caractérisés par une bande d'absorption de 254-262 nm)



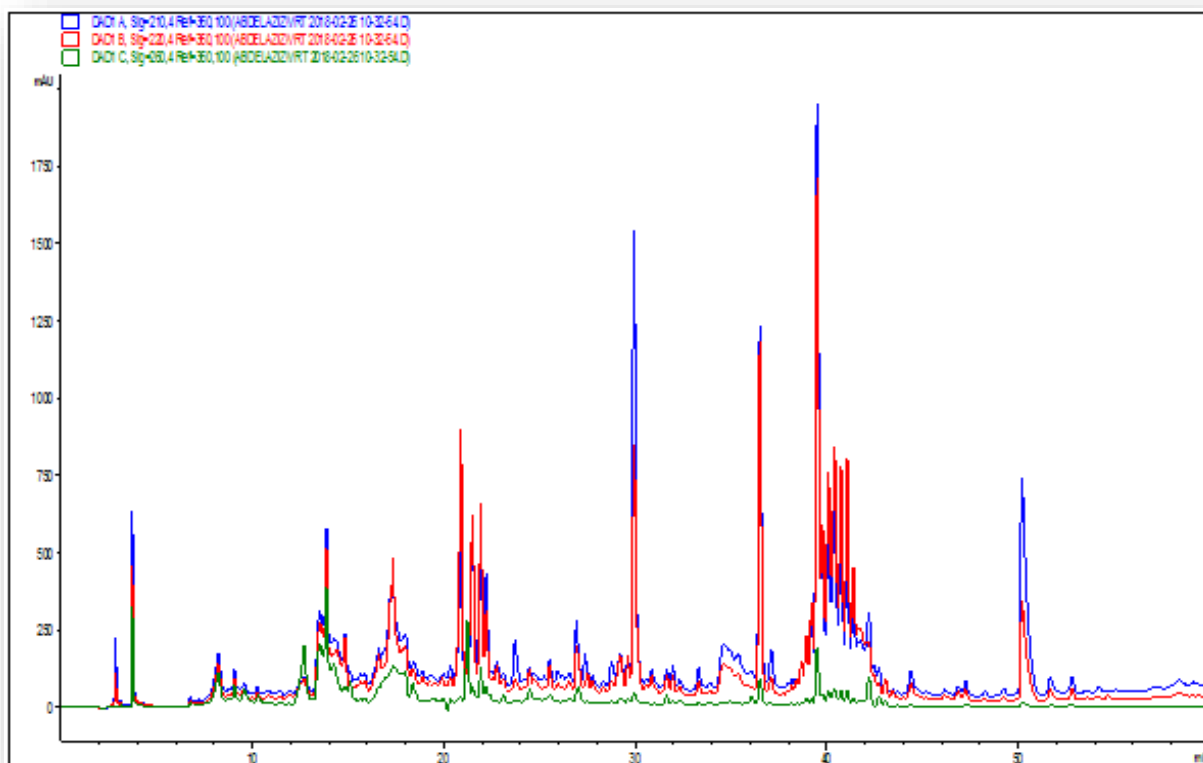
**Figure 26: Chromatogramme HPLC de *B.bassiana*.**

Par ailleurs Les chromatogrammes HPLC des extraits de *Cladosporium cladosporioides* sont présentés dans la figure 27 et le tableau 13. Ainsi le chromatogramme  $\lambda=210$  nm se distingue par la présence de 19 pics, nous noterons 18 pics pour le profil  $\lambda=220$ nm et 17 pics pour le profil  $\lambda= 260$ nm.



**Figure 27 : Chromatographie HPLC de *C.cladosporioides***

Les profils chromatographiques ont révélé la présence de plusieurs molécules différentes et ce, en se basant sur leur temps de rétention. Cette analyse a permis de détecter, dans les surnageants issus de la culture de la souche *Verticillium alfalfae* 39pics à  $\lambda=260$  nm ,65 pics à  $\lambda=220$  et 77 pics à la  $\lambda=210$ nm, cependant 36 pics ont été détectés dans les surnageants pour les trois longueurs d'onde au même tems de rétention (Figure 28 et Tableau 13).



**Figure 28: Chromatographique HPLC de *V.alfalfae***

Chaque chromatogramme est dominé par un ou plusieurs pic(s) majoritaire(s) dont les temps de rétention différent d'un profil à un autre. À titre d'exemple, le composant majoritaire apparu dans le profil chromatographique de *B.bassiana* avec un temps de rétention de 2 minutes, pourrait correspondre, selon **Keppanan et al., (2018)** au profil Protéique IF8 représentant une mycotoxine . Il nous est toutefois impossible d'identifier tous les composants majoritaires présents dans nos extraits car leurs temps de rétention ne correspondent pas à ceux enregistrés dans les autres travaux.

Étant donné que le temps de rétention d'un composant dans un mélange de molécules dépend de la nature de la phase stationnaires, de la composition de la phase mobile et des conditions analytiques, et que la séparation des composés métabolique par HPLC est conduite de différentes manières selon les auteurs et selon l'espèce étudié,( la méthode d'extraction, le

type de colonne, le solvant, le gradient, etc...), il est donc, difficile d'identifier les composants de nos extraits se basant seulement sur la littérature, et sans avoir recours à des méthodes de couplage, telles que la spectroscopie de masse (MS), les détecteurs à barrettes de diode (DAD), la résonance magnétique (RMN), etc.

À cette effet, les composants identifiés à notre niveau (beauvericine ) ne présente pas les mêmes temps de rétention comme nous l'avons signalé précédemment. À titre d'exemple, **Safavi et al ., (2013)** ont identifié la beauvericine dans l'extrait de *B.bassiana* avec des temps de rétention largement supérieur à celui obtenu dans notre travail soit 36.73 minutes et 37.04 minutes respectivement. Par ailleurs **Keppanan et al., (2018)**, ont rapporté un temps de rétention inférieur au nôtre, soit 3.701minutes .Toutefois l'objectif de notre travail ne s'articule pas sur l'identification des composants de nos substrats, ou même de définir leurs concentrations mais plutôt, sélectionner ceux dont l'abondance des composés majoritaires (aromatiques) est maximum.

**Tableau 13 : Résultats HPLC avec différentes d'onde d'absorbance**

Souche fongique	onde d'absorbance	Chromatogramme
<i>B.bassiana</i>	210 nm	
	220 nm	

	260 nm	
<i>C.cladosporioide</i>	210 nm	
s	220 nm	
	260 nm	

<i>V.alfalfae</i>	210nm	
	220 nm	
	260nm	

### 8.3. Les résultats RMN

Au cours de cette étape de notre travail après les différentes analyses HPLC de nos trois souches de champignons entomopathogènes, nous nous sommes attelés à réaliser également leurs analyses RMN protons et RMN carbone 13 (Annexe 4).

Les résultats obtenus au cours de ces analyses ne sont pas suffisantes pour identifier ou caractériser les molécules. il est donc, difficile d'identifier les composants de nos extraits se basant seulement sur HPLC et RMN, et sans avoir recours à des méthodes de couplage, telles que la spectroscopie de masse (MS), les détecteurs à barrettes de diode (DAD).... Ect.

# *Conclusion Générale*

Dans le présent travail qui pour objectif principal la lutte biologique contre les pucerons par l'utilisation de champignons entomopathogènes, nous nous sommes intéressés particulièrement à leurs aspects microbiologiques, l'étude des agents enzymatiques « protéases et chitinase » et de « la beauvericine » en tant que métabolites secondaires (toxines) notamment.

Les champignons entomopathogènes étudiés et utilisés ont été isolés à partir de sols agricoles de la SRPV (Station Régionale de la protection des végétaux.)

Les sols de cette localité sont argileux, caractérisés par leur richesse en matière organique, en carbone et en azote, leur conductivité se situe entre 0.60 et 1.20millimhos/cm et le pH du sol est basique pour les deux prélèvements réalisés en Mai 2014 et en Mai 2015.

62 isolats fongiques ont été obtenus des échantillons du sol des différents sites de prélèvements identifiés (3sites /2014 et 3 sites/2015) .En effet, des trois échantillons du sol prélevés en 2014, nous avons obtenu 36 isolats fongiques représentant 8 genres : *Aspergillus*, *Beauveria* , *Botrytis* , *Fusarium*, *Metharizium* *Penicillium*, *Trichoderma* et *Verticillium* .

Par ailleurs, l'investigation effectuée sur les 3 échantillons prélevés en 2015 a permis l'obtention de 26 souches fongiques appartenant à 7 genres : *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium* et *Rhizoctonia*. Le genre majoritaire est *Fusarium* avec une fréquence de 30.65%, suivie par le genre *Trichoderma* avec un taux de 24.2% viennent ensuite le genre *Aspergillus* qui représente 16.13% ,suivie par *Penicillium* 11.29 %, les genres *Alternaria* et *Rhizoctonia* sont équivalents avec une fréquence de 4.84% et enfin les genres *Beauveria* , *Botrytis* , *Cladosprium* , *Metharizium* et *Verticilium* représentent les genres les moins représentatifs avec un taux de1.61%.

Aussi la pathogénicité des champignons collectés et identifiés, est confirmée par l'évaluation de leur aptitude à induire l'infection et / ou des mortalités au sein des colonies aphidiennes. Ainsi des tests d'entomopathogénicité réalisés à partir de onze (11) souches entomopathogènes, ont révélé un effet de mortalité pour l'espèce aphidiennes *Metapolophium dirhodum*.

Par ailleurs, l'étude de l'effet de 11 souches fongiques au cours des différents traitements ont engendrée une mortalité de l'ordre de 90 % par l'espèce *Beauveria*, nous enregistrons par ailleurs une forte sensibilité (60%) pour *Cladosporium*, alors qu'elle est de l'ordre de 50 % pour *Verticillium* ; nous noterons cependant, une moindre pathogénicité variant de 10 à 40 % *M.dirhudum*.

Avec les autres entomopathogènes *Aspergillus* et *Metharizium* nous avons noté un taux de 41.67%, suivie par *Trichoderma* avec 31.94%, *Penicillium* 27.78 %, *Fusarium* , 20.83% et enfin , *Alternaria* , *Botrytis* et *Rhizoctonia* enregistrent un taux de mortalité de 13.83%.

Le test d'entomopathogénicité contre les pucerons *M. Dirhodum* a permis de sélectionner trois souches fongiques (*Beauveria bassiana* , *Cladosporium cladosporioides* et *Verticillium alfalfae*).

L'étude de l'effet des souches (*Beauveria bassiana* , *Cladosporium cladosporioides* et *Verticillium alfalfae*) a montré que les espèces aphidiennes ont réagi différemment suite aux différents traitements. En effet, le traitement des aphides par *B. bassiana* , *C.cladosporioides* et *V. alfalfae* a engendré des mortalités spectaculaires chez les différentes espèces aphidiennes où *Macrosiphum rosea* s'est montré le plus sensible en affichant une mortalité totale, de même que, le taux de mortalité enregistré pour *Aphis fabae* était très élevé en dépassant le taux de 95% ,mais *Myzus persicea* a eu une réponse moins sensible avec un taux de mortalité d'environ 55%.

L'activité d'hydrolyse des protéines après l'ensemencement sur le milieu lait gélosé présente des zones d'hydrolyses permettant la mise en évidence de l'activité protéolytique chez trois champignons entomopathogènes (*B. bassiana* , *C. cladosporioides* et *V. alfalfae* ). *V. alfalfae* présente une grande zone de lyse avec un diamètre égal à 5,1 cm, suivie par *C. cladosporioides* avec un diamètre égale à de 2 cm puis *B. bassiana* avec un diamètre de 1.3cm. Ainsi au vu de ce qui précède la comparaison des activités protéolytiques chez les différentes souches fongiques indiquent que la production de protéase alcaline obtenue par les trois souches sur le milieu liquide à base de farine de criquet ( *Ocnridia voleximii* ) , est très importante. Par ailleurs, ces trois souches ne produisent pas la même quantité d'enzyme ciblée; la meilleure activité obtenue (95 U/ml) est produite par la souche *V.alfalfae* , suivie par *B.bassiana* (38,26 U/ml), puis *C. cladosporioides* (35.65U/ml) .

Les résultats du pH des 3 essais montrent une augmentation importante du pH dans les cultures liquides. Cela pourrait s'expliquer par le fait que la farine de criquet possède un excellent pouvoir tampon. C'est le cas pour la plupart des résidus agro industriels.

L'activité protéase acide la plus importante a été relevée sur *V.alfalfae* (18.23 U/ml), alors que la souche *B.bassiana* a élaboré un taux de production de 13.59 U/ml. La plus faible production a été observée par la souche *C .cladosporioides* (9.04U/ml) ainsi, L'activité protéolytique varie de 9.04 U à 18.23 U et Les résultats du pH montrent une stabilité plus ou moins proche de l'alcalinité dans les cultures liquide.

Les tests de chitinase réalisés sur le Milieu MCC (Milieu chitine colloïdale) ont permis la mise en évidence de l'activité chitinolytique chez les trois champignons entomopathogènes étudiés (*B. bassiana*, *C. cladosporioides* et *V. alfalfae*).

Les résultats de screening montrent que *V. alfalfae* donne une grande zone de lyse avec un diamètre de 2 cm, suivie par *C. cladosporioides* avec 1 cm puis *B. bassiana* avec 0.8 cm. Aussi la production enzymatique enregistrée chez *C. cladosporioides* est assez élevée avec 45.97 U/ml suivie par celle de *V. alfalfae* avec 42.21 U/ml, puis *B. bassiana*, 34.76 U/ml.

La Production des mycotoxines à partir des trois souches (*B. bassiana*, *C. cladosporioides* et *V. alfalfae*) par fermentation submergée en utilisant le milieu pomme de terre liquide (PDB) le mieux préconisé dans littérature pour la biosynthèse des beauvéricine. Après une extraction du surnageant par éthyle acétate, les extraits secs actifs obtenus ont été soumis en Chromatographie en Phase Liquide (HPLC) et en RMN. .

Les profils HPLC à 260, 220 et 210 nm de *B. bassiana* évoluent de la même manière, mais ne sont pas totalement identiques. En effet, dix pics sont détectés aux mêmes temps de rétention. En outre, on distingue 8 pics pour le profil  $\lambda=210\text{nm}$ , 4 pics pour le profil  $\lambda=220\text{nm}$  et un pic pour le profil  $\lambda=260\text{ nm}$ .

Les profils chromatographiques ont révélé la présence de plusieurs molécules différentes et ce, en se basant sur leur temps de rétention. Cette analyse a permis de détecter, dans les surnageants issus de la culture de la souche *V. alfalfae* 39 pics pour le profil  $\lambda=260\text{ nm}$ , 65 pics pour le profil  $\lambda=220$  et 77 pics pour le profil à  $\lambda=210\text{nm}$ , cependant 36 pics ont été détectés dans les surnageants pour les trois longueurs d'onde au même temps de rétention. Par ailleurs Les chromatogrammes HPLC des extraits de *C. cladosporioides* se distinguent par la présence de 19 pics pour le profil à  $\lambda=210\text{ nm}$ , 18 pics pour le profil  $\lambda=220\text{nm}$  et 17 pics pour le profil  $\lambda= 260\text{nm}$ .

Ainsi à partir des spectres de RMN des trois souches fongiques, on peut pas caractériser les molécules. il est donc, difficile d'identifier les composants de nos extraits se basant seulement sur HPLC et RMN, et sans avoir recours à des méthodes de couplage, telles que la spectroscopie de masse (MS), les détecteurs à barrettes de diode (DAD)... Ect.

# Références

- Abd El-Salam ,AE and El-Hawary, FA. 2011. Lethal and pathogenic effects of *Beauveria bassiana* and *Lecanicillium lecanii* on the adult and nymph of *Aphis carvicora* Koch. *Archiv. Phytopathol. Plant Protec*, 44: 57-66.
- Abeledo L. G., Savin R., Gustavo A. and Slafer. 2008. Wheat productivity in the Mediterranean Ebro Valley: Analyzing the gap between attainable and potential yield with a simulation model. *European journal of Agronomy*. 28. 541-550p.
- Adams, D.J. (2004). Fungal cell wall chitinases and glucanases. *Microbiology* 150, 2029- 2035.
- **Alain.F.**, 2006. Fiche technique : les pucerons 1<sup>ère</sup> partie. N° 141. Paris. 8 p
- Almi H , Dehimat L, Kacem Chaouch N. 2015. The pattern of pathogen diversity and abundance in Lentil (*Lens culinaris*) fields in Constantine region, Algeria. *African Journal of Agricultural Research*. V10 (13) : 1536-1542
- Alspaught J.A., Perfect J.R and Hatman j. 1997. *Cryptococcus neoformans* mating and virulence are regulated by the G- protein Alpha subunit GPAI and *Camp. Genes.Dev*.11 :3206-3217.
- Alvarez – Ropdriguez M.L., Lopez-Ocana L., Lopez C., Rodriguez N.E ., Martinez M.J., Larriba G and Coque J-J.R. 2002 . Cork taint of wines : role of filamentous fungi Isolated from rock in the function of 2,4,6- Trichloroanisol by O methylation of 2,4,6 – Trichlorophenol. *Applied and Environmental Microbiology* . 68 (12) : 5860-5869.
- Amiri B., Ibrahim L. and Butt T. 1999. Antifeedant properties of destruxins and their potential use with the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae* for improved control of crucifer pest. *Biocontrol Science and Technology* 9, p. 487-498.
- Andersen, S.O. 1979. Biochemistry of insecte cuticle. *Annual Review of entomol*, 24: 29-61.
- Andersson, M. G. and Cerenius, L. 2002. Analysis of chitinase expression in the crayfish plague fungus *Aphanomyces astaci*. *Dis Aquat Organ*. 29, 139-47.
- Baiz D. 2000. Guide des analyses en pedologie :Choix-expression-présentation. INRA.Paris
- Bajji M. 1999. Étude des mécanismes de résistance au stress hydrique chez le blé dur : caractérisation de cultivars différant par leurs niveaux de résistance à la sécheresse et de variants somaclonaux sélectionnés *In vitro*. Thèse de doctorat. Univ. Louvain.
- Barghini, P., Moscatelli, D., Garzillo, A.M.V., Crognale, S., and Fenice, M. 2013. High production of cold-tolerant chitinases on shrimp wastes in bench-top bioreactor

- by the Antarctic fungus *Lecanicillium muscarium* CCFEE 5003: bioprocess optimization and characterization of two main enzymes. *Enzyme Microb Technol* 53: 331–338.
- Barker T W., Worgan J T. 1981. The application of air. Lift fermenters to the cultivation of filamentous fungi. *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 13 p: 77-148.
  - Barranco-Florido JE, Alatorre-Rosas R, Gutiérrez-Rojas M, Viniegra-González G, Saucedo-Castañeda G .2002. Criteria for the selection of strains of entomopathogenic fungi *Verticillium lecanii* for solid state cultivation. *Enzym Microb Technol* 30:910–915.
  - Barron G. 2013. SES, University of Guelph. <http://www.uoguelph.ca/~gbarron/MISCELLANEOUS/nov01.htm>.
  - Bensaci, O. A., H. Daoud, N. Lombarkia and K. Rouabah .2015. Formulation of the endophytic fungus *Cladosporium oxysporum* Berk. & M.A. Curtis, isolated from *Euphorbia bupleuroides* subsp. luteola, as a new biocontrol tool against the black bean aphid (*Aphis fabae* Scop.). *J. Plant Prot. Res.* 55, 80-87.
  - Berthier J. and Valla G. 2001. Production de Protéines d'Organismes Unicellulaires Cultivés sur Corn Steep Liquor et Evaluation Nutritionnelle de la Biomasse *Rev. Energ. Ren. : Production et Valorisation – Biomasse*, 11-28.
  - Binod, P., Pusztahelyi, T., Nagy, V., Sandhya, C., Szakács, G., Pócsi, I., Pandey, A., 2005. Production and purification of extracellular chitinases from *Penicillium aculeatum* NRRL 2129 under solid-state fermentation. *Enzyme Microb. Technol.* 36, 880–887.
  - Blackman RL, Eastop VF. 2007. Taxonomic issues. In: Van Emden H.F, Harrington R (eds). *Aphids as crop pests*, CAB International, USA, pp.1.
  - Blout W. 1961. Turkey “X” disease. *Turkeys* 9 (52): 55-58, 61, 77.
  - Boiron P. 1996. Organisation et biologie des champignons. Edition Nathan. P: 13-69.
  - Boiron P., 1996. Organisation et biologie des champignons. Nathan. Paris. P. 19-79.
  - Bonnemain JL. 2010. Aphids as biological models and agricultural pests. *C.r. Biologies.* 333: 461-463.
  - Bonnemaison. L., 1962 – *Les ennemis animaux des plantes cultivées*. Ed. S.E.P., Paris, 668p.

- Botton B., Breton A., Fevre M., Gauthier S., Guy P H., Larpent J P., Reymond P., Sanglier J J., Vayssier Y., Veau P. 1990. Moisissures utiles et nuisibles importance industrielle. 2ème édition. Masson. Collection Biotechnologies. P: 34-428.
- Botton B., Breton A., Fevre M., Gauthier S., Guy P H., Larpent J P., Reymond P., Sanglier J J., Vayssier Y., Veau P. 1990. Moisissures utiles et nuisibles importance industrielle. 2ème édition. Masson. Collection Biotechnologies. P: 34-428.
- Botton B., Bretton A., Fever M., Gautier S., Guy Ph., Larpent J.P., Reymond P., Sanglier J-J., Vayssier Y and Veau P. 1990. Moisissures utiles et nuisibles, importance industrielle, (edn) Masson, Paris.
- Boucias,D. G. et Pendland J. C. 1988. Nonspecific factors involved in the attachment of entomopathogenic deuteromycetes to host insect cuticle. *Appl. Environ. Microbiol.* 54(7): 1795-1805
- Brady, N. C., and R. R. Weil. 2002. The nature and properties of soils. 13th edition. Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey, USA.
- Braga GUL, Destefano RHR, Messias CL (1999) Protease production during growth and autolysis of submerged *Metarhizium anisopliae* cultures. *Rev Microbiol* 30:107–113
- Brattsten L.B. 1979. Chapitre 5: Biochemical defence mechanisms in herbivores against plant allelochemicals, dans Rosenthal G.A. et Janzen D.H. 1979. Herbivores, their interaction with secondary plant metabolites. Academic Press. New York, New York. 718 p.
- Brault. V., Uzest. M., Monsion. B., Jacquot. E., & Blanc. S., 2010 - Aphids as transport devices for plant viruses Les pucerons, un moyen de transport des virus de plante. *C. R. Biologies* 333 : 525-531.
- Brooks A. J., Aquino de Muro. A, Burree E., Moore D., Taylor,M.A & Wall. R. 2004. Growth and pathogenicity of isolates of the fungus *Metarhizium anisopliae* against the parasitic mite, *Psoroptes ovis* : effects of temperature and formulation. *Pest Manag Sci.*, 60, 1043-1049.
- Buhot D. 1973. Echantillonnage du sol. Conservation et préparation des échantillons.Problème statistiques. *Ann. Phytopath.* 5 :296-298.
- Burges, H. D.1981. Safety, safety testing and quality control of microbial pesticides. In: Burges HD, editor. Microbial control of pests and plant diseases 1970-1980. London: Academic Press, pp. 737-767.

- Calvo A.M., Wilson R.A., Bock J.W and Keller N.P. 2002. Relationship between secondary metabolism and fungal development. *Microbiol.Mol.Bio.Rev.* 66 : 447-459.
- Carrière Y. et Roitberg B.D. 1995. Evolution of host selection behaviour in insect herbivores: genetic variation and covariation in host acceptance between population of *Choristoneura rosaceana* (Family: Tortricidae), the obliquebanded leafroller. *Hereditas*. 74:357-368.
- Carruthers, R.I. and Soper R.S. 1987. Fungal diseases. In *Epizootiology of Insect Diseases*, J. R. Fuxa and Y. Tanada, eds.; New York: John Wiley and Sons.
- Chakrabarti, I., Gani, M.A., Chaki, K.K., Sur, R. & Misra, K.K. (1995) Digestive enzymes in 11 freshwater teleost fish species in relation to food habit and niche segregation. *Comp. Biochem. Physiol. A*, 112, 167–177.
- Champ S.P and El-Zayat A.A.E. 1989. Isolation of sexual sporulation hormone from *Aspergillus nidulans*. *J. Bacteriol.* 171 : 3982-3988.
- Champ S.P., Raw P. and Chang A . 1987. An endogenous inducer of sexual development in *Aspergillus nidulans* .. *J. Gen. Microbiol.* 133 : 1383- 1388.
- Chapman, G.P., 2009. Grass evolution and domestication. *Grass evolution and*
- Chater K and Bibb M. 1997. Regulation of bacterial antibiotic production, Klein Kauf AND H. Vandhoven edn. INK.
- Chavan, B.P., J. R. Kadam and Y. S. Saindane .2008. Bioefficacy of liquid formulation of *Verticillium lecanii* against aphid (*Aphis gossypii*). *Int. J. Plant Prot.*, 1(2), 69-72.
- Chellali B. 2007. Marché mondial des céréales: L'Algérie assure sa sécurité alimentaire.
- Chen, P.D., Gill, B.S. 1984. The origin of chromosome 4A and the B and G genomes
- Christelle. L. 2007 . Dynamique d'un système hôte-parasitoïde en environnement spatialement hétérogène et lutte biologique Application au puceron *Aphis gossypii* et au parasitoïde *Lysiphlebus testaceipes* en serre de melons. Thèse Doctorat., Agro Paris Tech, Paris.p 43-44.
- Chutmanop J., Chuichulcherm S., Chisti Y., Srinophakun P. 2008. Protease production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation using agroindustrial substrates. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 83; 1012–1018.
- Clarke P. H. and Steel K. J. 1966. Rapid and simple biochemical tests for bacterial identification. Academic press. London. P.111.

- Clarkson CID , Miroso MID and Birch J. 2018. Potential of Extracted Locusta Migratoria Protein Fractions as Value-Added Ingredients. *Insects* , 9, 20
- Clarkson J. M & Charnley A. K. 1996. New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects. *Trends Microbiol.*, 4, 197-203.
- Clement G. et Prats. 1971. Les céréales. Ed.J.B. Bailliers et Fils, 360p.
- Cloutier C. 1999. Fascicule Les relations plantes-insectes dans Notes de cours. Université Laval 7 p.
- Cœur d'acier A, Jousselin E , Martin J-F, Rasplus J-Y. 2007. Phylogeny of the genus *Aphis linnaeus* , 1758 (Homoptera : Aphididae ) inferred from mitochondrial DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 42 : 598-611.
- Cundliffe E. 198). How antibiotic-producing organisms avoid suicide .*Ann. Rev. Microbiol* .43 : 207-333.
- Dajoz R., 1985. Précis d'écologie. 5 ème édition, Ed. Dunod, Paris, 505 p.
- Dajoz R., 2003. Précis d'écologie. 7 ème édition, Ed. Dunod, Paris, 615.
- Davet P. 1996. *Vie microbienne du sol et production végétales*, (edn ) INRA.Paris.
- Debananda S., Pintubala K., Suchitra S., Salam N., 2009. Screening, identification of best producers and optimization of extracellular proteases from moderately halophilic alkali thermotolerant indigenous actinomycetes. *World. Appl. Sci. J.*, 7 : 907-916.
- Dedryver C A, Le Ralec A . Fabre F. (2010). The conflicting relationships between aphids and man : A review of aphids damage and control strategies.*C.R.Biologies*. 333: 539-553
- Demain A ., Aharowitz Y and Martin J.F. ( 1983). Metabolic control of secondary biosynthetic pathway. *Bitechnolgy serie*, 1983.
- Deming Y, Huaxia X, Hairong Z, Shuhai G, Xuejun M , Chungui Z, Xiangrong Q. (2002). [Microbiological Ecology during Bioremediation for Oil Contaminated Soil](#).[J]; Chinese Journal of Ecology; 01
- Dierl W. et Ring W., 1992. Guide des insectes. Ed. Delachaux et Niestlé, Paris, 237 p.
- Dixon A. F. G. 1998.Aphid Ecology, Second edition edn: Chapman & Hall.domestication, xviii + 390 pp.
- Döring TF, Chittka L. 2007. Visual ecology a critical review on the role of colours in host linding. *Arthropod. Plant interaction*. 1 :3-6.
- Doumandji B., Doumandji S., Benzara A. et Guecioueur L., 1994. Comparaison écologique entre plusieurs peuplements d'orthoptères de région de

- Duo-Chuan LI, Chen S, Jing LU. 2005. Purification and partial characterization of two chitinases from the mycoparasitic fungus *Talaromyces flavus*. *Mycopathologia*, 159, 223–9.
- Durand F .1989. *Effets de la préparation de terrain sur le type et l'abondance des espèces végétales compétitrices dans le canton d'Hébécourt, Abitibi*. Rapport. Montréal, Université du Québec à Montréal, Sciences appliquées, 97 p.
- Durand J.H., 1983 . Les sols irrigables. Etude pédologique. Ed. Imprimerie Boudin, Paris, 339 p.
- Eastop V. F. 1986. Aphid plant associations. In: *Coevolution and Systematics*. Edited by Stone AR, Hawksworth DL. Oxford: Clarendon Press; pp. 35-54.
- Eaton. A. 2009. Aphids. University of New Hampshire (UNH), *Cooperative Extension Entomology Specialist*.
- Ehrlich, K. C. 2014. Non-aflatoxigenic *Aspergillus flavus* to prevent aflatoxin contamination in crops: advantages and limitations. *Front Microbiol.*, 5, 50.
- Eidy M, Rafiee-Dastjerd H , Zargarzadeh Z, Golizadeh A and Mahdavi V. (2016). Pathogenicity of the Entomopathogenic Fungi *Beauveria bassiana* (Balsamo) and *Verticillium lecanii* (Zimmerman) Against Aphid *Macrosiphum rosae*, Linnaeus (Hemiptera: Aphididae) under Laboratory Conditions . *Jordan Journal of Biological Sciences.* V 1 : 1
- Ekesi S., Maniania N. K and Lux S. A.(2003). Effect of soil temperature and moisture on survival and infectivity to four tephritid fruit fly puparia. *J. Invertebr. Pathol.*, 83, 157-167.
- Elibol M. and Moreira A. R. 2005. Optimizing some factors affecting alkaline protease production by a marine bacterium *Teredinobacter turnirae* under solid-state fermentation. *Process Biochemistry*, 40: 1951-1956.
- Fang, W.G.; Feng, J.; Fan, Y.H.; Zhang, Y.J.; Bidochka, M.J.; Leger, R.J.S.; Pei, Y. 2009. Expressing a fusion protein with protease and chitinase activities increases the virulence of the insect pathogen *Beauveria bassiana*. *J. Invertebr. Pathol.*, 102, 155–159.
- FAObSTAT. 2007. Statistical database of the food and agriculture organization of the United Nations. <http://www.fao.org>. (Consulté le 11/01/2010).
- Faurie C., Ferra Ch., Médori P., Dévaux J. et Hemptienne J-L., 2003. *Ecologie, Approche scientifique et pratique*. 5ème édition, Ed. Lavoisier Tec & Doc, 407 p.

- Faurie C., Ferra Ch., Médori P. et Dévaux J. 1998. Ecologie approche scientifique et
- Ferrero. M. 2009 . *Le système tritrophique tomate tetranyques tisserands-Phytoseiulus longipes : Etude de la variabilité des comportements alimentaires du prédateur et conséquences pour la lutte biologique*. Thèse doctorat, Montpellier.
- Ferron, P., Fargues, J. and Riba, G. 1991. Fungi as microbial insecticides against pests. In *Handbook of Applied Mycology*. (Arora, D.K., Ajello, L., Mukerji, K.G., Eds.) Vol 2, 665-706, *Marcel Dekker*, New York.
- Ferron, P., Fargues, J. et Riba, G. 1991. Les champignons agents de lutte microbiologique contre les ravageurs. In *Handbook of Applied Mycology*, 2: 237-270.
- Feyereisen R. 1999. Insect P450 enzymes. *Annual review of entomology*. 44:507-533.
- Fornelli, F., Minervini, F and Logrieco, A. 2004. Cytotoxicity of fungal metabolites to lepidopteran (*Spodoptera frugiperda*) cell line (SF-9). *Journal of Invertebrate Pathology*, 85: 74–79.
- Fornelli, F., Minervini, F. and Logrieco, A. 2004. Cytotoxicity of fungal metabolites to lepidopteran (*Spodoptera frugiperda*) cell line (SF-9). *Journal of Invertebrate Pathology*, 85: 74–79.
- Fournier. A., 2010 - *Assessing winter survival of the aphid pathogenic fungus pandora neoaphidis and implications for conservation biological control*. Thèse Doctorat. Univ Eth Zurich.
- Fraval A . 2006. Les pucerons .Insectes . N . 141 : 3-8 .
- Frazier W.C., 1967. Food microbiology. Academic presse. London. P. 3-429.
- Fredon., 2008 . fiche technique sur les pucerons, France.
- Futuyma D.J. 1983. Chapitre 8: Selective factors in the evolution of host choice by phytophagous insects, dans Ahmad S. 1983. Herbivorous insects, host seeking behavior and mechanisms. Academic Press. Orlando, Florida. 257 p.
- Gais S. 2011. Optimisation de la production de la protéase de *Rhizopus stolonifer* sur milieu solide: purification et caractérisation. Mémoire de magister, UMBB. P. 96.
- Ganassi, S., A. Moretti, C. Stornelli, B. Fratello, A.M. Pagliai and A. Logrieco .2001. Effect of *Fusarium*, *Paecilomyces* and *Trichoderma* formulations against aphid *Schizaphis graminum*. *Mycopathologia*, 151, 131–138.
- García-Gómez M.J., Huerta-Ochoa S., Loera-Corral O., Prado-Barragán L.A. 2009. Advantages of a proteolytic extract by *Aspergillus oryzae* from fish flour over a commercial proteolytic preparation. *Food Chem.*, 112; 604–608.

- Gate P. 1995. Ecophysiologie du blé. Ed. ITCF. Technique et Documentation. Lavoisier, Paris, 419 p.
- Gibbons, J. G. and A. Rokas .2012. The function and evolution of the *Aspergillus* genome. *Trends Microbiol.*, 21, 14-22.
- Gill, B.S., Kimber, G., 1974. Giemsa c-banding and evolution of wheat. *Proceedings*
- Giordanengo. P., Brunissen. L., Rusterucci. C., Vincent. C., Bel. A. V., Dinant. S., Girousse. C., Faucher. M., & Bonnemain. J. L., 2010 - Compatible plant-aphid interactions: How aphids manipulate plant responses. *C. R. Biologies* 333 : 516–523.
- Glare, T., J. Caradus, W. Gelernter, T. Jackson, N. Keyhani, J. Köhl, P. Marrone, L. Morin and A. Stewart (2012). Have biopesticides come of age? *Trends Biotechnol.*, 30, 250–258.
- Glare, T., J. Caradus, W. Gelernter, T. Jackson, N. Keyhani, J. Köhl, P. Marrone, L. Morin and A. Stewart .2012. Have biopesticides come of age? *Trends Biotechnol.*, 30, 250–258.
- Godin. C., & Boivin. G. 2002 . Guide d'identification des pucerons dans les cultures maraîchères au Québec.
- Goettel, M. S. et St Leger R. J. 1990. Pathogenicity and growth of *Metarhizium anisopliae* stably transformed to benomyl resistance. *Curr. Genet.* 17: 129-132.
- Gomez, E., Ferreras, L., Toresani, S., 2006. Soil bacterial functional biodiversity as influenced by organic amendment application. *Bioresour. Technol.* 97, 1484–1489.
- Grove ,JF. and Pople M. 1980. The insecticidal activity of Beauvericin and the enniatin complex *Mycopathologia* 7: 103 –105.
- Guerrieri E , DiGilio MC. 2008. Aphid plant interaction a review of plant Interaction. 3(4): 223-232.
- Guesmi-Jouini, J., N. Boughalleb-M'hamdi and M. Ben Halima-Kamel.2010. Etudes préliminaires sur les champignons entomopathogènes des pucerons de l'artichaut en Tunisie. *Entomologie faunistique – Faunistic Entomology.* 63 (3), 171-181.
- Guiraud J. (1998). *Microbiologie alimentaire*. Edition Dunod, Paris. P: 8-101.
- Hajek A. E and St.leger R. J. 1994. Interactions between fungal pathogens and insect hosts. *Ann. Rev. Entomol.*, 39, 293-322.
- Hamill, R. L.; Higgens, C. E.; Boaz, H. E.; Gorman, M. 1969 *Tetrahedron Lett.*1969, 10, 4255–4258.

- Hapwood D.A. 1988. Toward's and understanding of gene switching in *Streptomyces*, the basis of sporulation and antibiotic production. *Proc. .R. .Soc.Land B.* 235: 121-138.
- Hautier. L., 2003 - Impacts sur l'entomofaune indigène d'une coccinelle exotique utilisée en lutte biologique. Diplôme d'Etudes Spécialisées en Gestion de l'Environnement., Université Libre de Bruxelles 13 : 1-99.
- Hawksworth D.L., Kirk P.M., Sutton B. and Pegler D.N. 1995. Dictionnaire of the fungi , 8<sup>th</sup> ed. CAB.International Walling Ford. United Kingdom.
- Hawksworth D.L., Kirk P.M., Sutton B.C. and Pegler D.N. 1994. Ainsworth and Bysby's dictionary of the fungi , 8<sup>th</sup> ed . International Mycological Institute, Egham. Unitted .Kingdom.
- Hébrard. E., Froissart. R., Louis. C., and Blanc. S. 1999 . Les modes de transmission des virus phytopathogènes par vecteurs. *Virologie* 3: 35-48.
- Henry Y and De Buyser J. 2000. Pour la Science, Hors-série n°26, janvier 2000, p 60-62)
- Hong Wan, Bruce E. Ankenman and Barry L. Nelson. 2003. Controlled Sequential Bifurcation: a New Factor -Screening Method for Discrete- Event Simulation. *Proceedings of the 2003 Winter Simulation Conference*, December 7-10, 565-573.
- Hsieh D.P. H. 1992. An overview of mycotoxin risks. Presentation at the symposium
- <http://www.lemaghreb.dz.com/admin/folder01/une.pdf>.
- Hullé M, Turpeau E, Leclant F, Rahn M-J. 1998. Les pucerons des arbres fruitiers : cycle biologique et activités de vol , INRA .Paris , pp.22-26.
- Hullé M , Chaubet B. 2010. La morphologie des Pucerons et les critères d'identification. INRA. Encyclop'aphids.
- Hullé. M., Turpeau-Ait Ighil. E., Robert. Y., & Monet. Y. 1999 .*Les pucerons des plantes maraichères*. Cycle biologique et activités de vol. Ed A.C.T.A. I.N.R.A. Paris.
- Illuz D. 2011. The plant-aphid universe. Cellular origine , Life in externe habitat and astrobiology. 16: 91-118.
- Inderbitzin P. Richard M. Bostock R. Michael Davis Toshiyuki Usami Harold W. Platt Krishna V. Subbarao. 2011. Morphological features of *Verticillium alfalfae*. [https://figshare.com/articles/Morphological\\_features\\_of\\_Verticillium\\_alfalfae\\_/3764](https://figshare.com/articles/Morphological_features_of_Verticillium_alfalfae_/3764)

- Ito ET, Varea-Pereira G, Miyagui MT, Pinotti MHP, Neves PMOJ .2007. Production of extracellular protease by a Brazilian strain of *Beauveria bassiana* reactivated on coffee berry borer, *Hypothenemus hampei*. Braz Arch Biol Technol 50:217–223.
- Jae-Hyuk Y . and Keller N.P. 2005. Regulation of secondary metabolite in filamentous fungi . Ann. Rev. Phytopathol. 43: 437- 458.
- Jakovljević VD, Vrvić MM .2016. Potential of pure and mixed cultures of *Cladosporium cladosporioides* and *Geotrichum candidum* for application in bioremediation and detergent industry. Saudi J Biol Sci Article in Press. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1319562X1600022X>. Accessed 13 Feb 2016.
- Jakovljević VD, Vrvić MM.2016.Potential of pure and mixed cultures of *Cladosporium cladosporioides* and *Geotrichum candidum* for application in bioremediation and detergent industry. Saudi J Biol Sci Article in Press. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1319562X1600022X>. Accessed 13 Feb 2016.
- Janieke J. 1990. Host specialization in phytophagous insects. Annual reviews of ecological systems. 21:243-273.
- Jasuja, N., Saxena, R., Chandra, S. and Joshi, S. 2013. "Isolation and Identification of Microorganism from Polyhouse Agriculture Soil of Rajasthan", African J.Microbiol. Res., Vol.7, No.41, pp 4886-4891.
- 
- Jestoi, M.; Rokka, M.; Järvenpää, E.; Peltonen, K. *Food Chem.* **2009**, *115*, 1120–1127.
- Jolivet P. 1992. Insects and plants: Parallel evolution and adaptations. Flora & Fauna handbooks. Sanhill crane press. Gainesville, Florida. 190 p.
- Jolivet P. 1998. Interrelationship between insects and plants. CRC Press. Boca Raton, Florida. 309 p. 12)
- Jonas-Levi, A.; Martinez, J.-J.I. (2017). The high level of protein content reported in insects for food and feed is overestimated. J. Food Compos. Anal., 62, 184–188.
- Kalisz H.M., 1988. Microbial proteinases. Advances in Biochemistry and Engineering Biotechnol., 36 : 1-65.
- Kang SC, Park S, Lee DG .1999 . Purification and characterization of a novel chitinase from the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*. J Invertebr Pathol 73: 276–281.

- Kang SC, Park S, Lee DG.1999. Purification and characterization of a novel chitinase from the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*. J Invertebr Pathol 73: 276–281.
- Kang, S. C., S. Park, and D. G. Lee. 1998. Isolation and characterization of a chitinase cDNA from the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*. FEMS. Microbiol. Lett. 165:267–271.
- Kang, S. C., S. Park, and D. G. Lee. 1998. Isolation and characterization of a chitinase cDNA from the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*. FEMS. Microbiol. Lett. 165:267–271.
- Karaoglu SA, Ulker S. 2006. Isolation, identification and seasonal distribution of soilborne fungi in tea growing areas of Iyidere-Ikizdere Vicinity (Rize-Turkey). J Basic Microbiol. 46: 208-218.
- Karaoglu SA, Ulker S. 2006. Isolation, identification and seasonal distribution of soilborne fungi in tea growing areas of Iyidere-Ikizdere Vicinity (Rize-Turkey). J Basic Microbiol. 46: 208-218.
- Karuna, J. and C. Ayyanna, 1993. Production of semi-alkaline protease enzyme from *Aspergillus* spp. *Proceedings of the Ninth National Convention of Chemical Engineers and International Symposium on Importance of Biotechnology in Coming Decades*. Pp: 8–11. Viskhapatnam India
- Kawamura C., Tsujimoto T. and Tsug T. 1999. Targeted disruption of melanin biosynthesis gene effects conidial development and UV tolerance in the Japanese pear pathotype of *Alternaria alternate*. Mol. Plant. Microbe. Interact. 12: 59- 63.
- Kaya, M., & Baran, T. 2015. Description of a new surface morphology for chitin extracted from wings of cockroach (*Periplaneta americana*). International Journal of Biological Macromolecules, 75, 7–12.
- Kaya, M., & Baran, T. 2015. Description of a new surface morphology for chitin extracted from wings of cockroach (*Periplaneta americana*). International Journal of Biological Macromolecules, 75, 7–12.
- Keller N.P. and Woobok.J. 2005. Aglobal regulatory of secondary metabolite biosynthesis in fungi , (edn) Warfe.
- Keppanan R , Krutmuang P, Sivaperumal S , Hussain M , Bamisile BS , Aguila L C R, Kanta Dash C K , Wang L. 2018. Synthesis of mycotoxin protein IF8 by the entomopathogenic fungus *Isaria fumosorosea* and its toxic effect against adult

- Diaphorina citri. International Journal of Biological Macromolecules. Biomac (2018), doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.09.093..
- Keppanan R , Krutmuang P, Sivaperumal S , Hussain M , Bamisile BS , , Aguila L C R, Kanta Dash C K , Wang L. (2018). Synthesis of mycotoxin protein IF8 by the entomopathogenic fungus *Isaria fumosorosea* and its toxic effect against adult *Diaphorina citri*. International Journal of Biological Macromolecules. Biomac .2018. doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.09.093..
  - Kirk P.M., Cannon P.F., David J.C., Egham U.K. and Stophes J.A. (2001). Ainsworth and Bysby's Dictionary of fungi , 9 th edn .CABI. Bioscience.UK. Center and central Bureau Voie. Utrecht. The Net.
  - Kresze G. B. 1991. Proteases during purification.Bioprocess-technol. 12 : 85-120.
  - Kucera M .1971. Toxins of the entomophagous fungus *Beauveria bassiana*. II. Effect of nitrogen sources on formation of the toxic protease in submerged culture. J Invertebr Pathol 17:211–215
  - 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.
  - Lakhdaria, (Algerie). I.N.A. El-Harrach, Alger, PP1075-1081.
  - Lambert. L. 2005. Les pucerons dans les légumes de serre : Des bêtes de sève. Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation, Québec.
  - Larpent. J.P. 1991. 'Biotechnologies des Levures', Ed. Masson, Paris, pp. 59-147.
  - Latge J. P. and Monsigny M. .1988. Visualization of exocellular lectins in the entomopathogenic fungus *Conidiobolus obscurus*. *J. Histochem. Cytochem.* 36: 1419-1424.
  - Lazim H., Mankai H., Slama N., Barkallah I., and Limam F. 2009. Production and optimization of thermophilic alkaline protease in solid-state fermentation by *Streptomyces sp.* CN902. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36: 531-537.
  - Lee, C.G., D. Hartl, G.R. Lee, B. Koller, H. Matsuura, C.A. Da Silva, M.H. Sohn, L. Cohn, R.J. Homer, A.A. Kozhich. 2009. Role of breast regression protein 39 (BRP-39)/chitinase 3-like-1 in Th2 and IL-13- induced tissue responses and apoptosis. *J. Exp. Med.* 206:1149–1166. doi:10 .1084/jem.20081271.

- Leland, JE and Behle, RW. 2005. Coating *Beauveria bassiana* with lignin for protection from solar radiation and effects on pathogenicity to *Lygus lineolaris* (Heteroptera: Miridae). *Biocontrol Science and Technology*, 15: 309–320
- Leveau J.Y. and Bouix M. 1993. Les moisissures. In Florent J Microbiologie industrielle. Les microorganismes d'intérêt industrielle. (edn) Tec et Doc- Lavoisier.
- Lévêque Ch., 2001. Ecologie de l'écosystème à la biosphère. Ed. Dunod, Paris, 502 p.
- Logrieco, A.; Moretti, A.; Castella, G.; KostECKI, M.; Golinski, P.; Ritieni, A.; Chelkowski, J. *Appl. Environ. Microbiol.* **1998**, *64*, 3084–3088.
- Logrieco, A.; Moretti, A.; Castella, G.; KostECKI, M.; Golinski, P.; Ritieni, A.; Chelkowski. **1998**. *J. Appl. Environ. Microbiol.*, *64*, 3084–3088.
- Logrieco, A.; Ritieni, A.; Moretti, A.; Randazzo, G.; Bottalico, A. **1997**. *Cereal Res. Commun.* *25*, 407–413.
- Logrieco, A.; Rizzo, A.; Ferracane, R.; Ritieni. **2002**. *A. Appl. Environ. Microbiol.* *68*, 82–85.
- Dhawan. M, N. Joshi **Enzymatic comparison and mortality of *Beauveria bassiana* against cabbage caterpillar *Pieris brassicae***. *Braz. J. Microbiol.*, 48 (2017), pp. 522-529
- Ma GZ, Gao HN, Zhang YH, Li SD, Xie SD, Wu SJ .2012. Purification and characterization of chitinase from *Gliocladium catenulatum* strain HL-1-1. *Afr J Microbiol Res* 6: 4377–4383.
- Ma GZ, Gao HN, Zhang YH, Li SD, Xie SD, Wu SJ. 2012 Purification and characterization of chitinase from *Gliocladium catenulatum* strain HL-1-1. *Afr J Microbiol Res* 6: 4377–4383.
- Maisonhaute. J.E., 2009 - Quand le paysage influence les ennemis naturels. Bulletin de la Société d'entomologie du Québec., Vol. 16, n° 2: 3-5.
- Mapleston R.A., Stone H.G. and Williams P.H. 1992. The evolutionary role of secondary metabolite. *A REVIEW. Gen.* 115:151-157.
- Martin J.F. 1998. New aspect of genes and enzymes for B- Lactam. *Biosynthesis. App. Microbiol. Biotechnol.* *50*: 1-15.
- Martin J.F. and Liras P. 1989. Organisation and expression of genes involved in the biosynthesis of antibiotics and other secondary metabolite. *Annu. Rev. Microbiopl.* *43*:173-206.

- Masle-Meynard J. 1980. L'élaboration du nombre d'épis chez le blé d'hiver. Influence de différentes Caractéristiques de la structure du peuplement sur l'utilisation de l'azote et de la lumière. Thèse de Docteur- Ingénieur. INA-PG, Paris, 274p.
- Mathieu C. et pieltin F. 2003. Analyse chimique des sols. Methodes choisies. Editions. Editions TEC and Doc.,LAVOISIER. Chapitre 1, 2, 3,6 et 10.
- Mathiew R. 1995. *Biologie Campbell*, (edn) ISBN Canada.
- Mazure P., Nakanishi K., El-Zayat A.A.E. and Champ S.P. 1991. Structure and synthesis of sporogenic psifactors from *Aspergillus nidulans* .*J. Chem.Soc. Chem. Commun* . 20: 1486- 1487.
- Mburu, D. M., L. Ochola, N. K. Maniania, P. G. N. Njagi, L. M. Gitonga, M.W. Ndung'u, A. K. Wanjoya and A. Hassanali .2009. Relationship between virulence and repellency of entomopathogenic isolates of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* to the termite *Macrotermes michaelseni*. *J. Insect Physiol.*, 55, 774-780
- Mburu, D. M., L. Ochola, N. K. Maniania, P. G. N. Njagi, L. M. Gitonga, M.W. Ndung'u, A. K. Wanjoya and A. Hassanali .2009. Relationship between virulence and repellency of entomopathogenic isolates of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* to the termite *Macrotermes michaelseni*. *J. Insect Physiol.*, 55, 774-780
- McCoy, C.W., R. A. Samson and D.G. Boucias .1988. Entomogenous Fungi. In: Handbook of Natural Pesticides: Microorganisms. (Eds.: Ignoffo et.al.). CRC Press, pp. 260.
- Megha Bhutt, Patel S., Prajapati P., and Jasral Y.T. 2015. Isolation and Identification of Soil Microflora of National parks of Gujarat, India. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* 3: 421- 429.7
- Mihail j.d. and Aloren S.M. 1987. *Macrophomina phaseolma spatila* patterns in cultivated ans sampling strategies phytopathology. **77**:1126-1131.
- Miles PW .1968. Insect secretions in plants. *Annu Rev Phytopathol* 6: 137-164.
- Mondor EB, Roitberg BD. 2002. Pea aphid, *Acyrtosiphon pisum* , cornicle ontogeny as an adaptation to differential predation risk. *Can.J.Zool.* 80 : 2131-2136.
- Murerwa, P., A. P. Futi, K. A. Wanjiku and N. K. Maniania .2014. Effect of infection by *Metarhizium anisopliae* isolate ICIPÉ 51 on developmental stage, fecundity and intrinsic rate of increase of *Rhopalosiphum padi* and *Metopolophium dirhodum*. *J. Entomol. Nematol.*, 6(11), 154-160 .
- Ndiritu, A.K.; Kinyuru, J.N.; Kenji, G.M.; Gichuhi, P.N. 2017. Extraction technique influences the physico-chemical characteristics and functional properties of edible

- crickets (*Acheta domesticus*) protein concentrate. *J. Food Meas. Charact.* 2017, 11, 2013–2021
- Neji S. and Banerjee R. 2010. Optimization of culture parameters to enhance production of amylase and protease from *Aspergillus awamori* in a single fermentation. *African Journal of Biochemistry Research*, 4(3): 73-80.
  - Nguyen VN, Oh IJ, Kim YJ, Kim KY, Kim YC, Park RD .2009. Purification and characterization of chitinases from *Paecilomyces variotii* DG-3 parasitizing on *Meloidogyne incognita* eggs. *J Ind Microbiol Biotechnol* 36: 195–203.
  - Nguyen, H. Q., Quyen, D. T., Nguyen, S. L. T., and Vu, V. H. (2015). An extracellular antifungal chitinase from *Lecanicillium lecanii*: purification, properties, and application in biocontrol against plant pathogenic fungi. *Turk. J. Biol.* 39, 6–14. doi: 10.3906/biy-1402-2
  - Nguyen, H. Q., Quyen, D. T., Nguyen, S. L. T., and Vu, V. H. 2015. An extracellular antifungal chitinase from *Lecanicillium lecanii*: purification, properties, and application in biocontrol against plant pathogenic fungi. *Turk. J. Biol.* 39, 6–14. doi: 10.3906/biy-1402-2
  - Nicklin J., Graeme-Cook K., Paget T., Killington R. 2000. L'essentiel en microbiologie. Edition Berti. p : 210-216
  - Nicklin J., Graeme-Cook K., Paget T., Killington R. 2000. L'essentiel en microbiologie. Edition Berti. p : 210-216
  - Nicklin J., Greame-Cook K., Paget T and Killington R. 1999. *Essentiel en microbiologie*, (edn) BERTI. Paris.
  - Nilanonta, C.; Isaka, M.; Kittakoop, P.; Palittapongarnpim, P.; Kamchonwongpaisan, S.; Pittayakhajonwut, D.; Tanticharoen, M.; Thebtaranonth, Y. 2000. *Planta Med*, 66, 756–758.
  - Nilanonta, C.; Isaka, M.; Kittakoop, P.; Trakulnaleamsai, S.; Tanticharoen, M.; Thebtaranonth, Y. *Tetrahedron* 2002, 58, 3355–3360
  - Onofri S, SelbmannL , Zucconi L , PaganoS. 2004. Antarctic microfungi as models for exobiology. *Planet Space Sci* 52:229–237, 10.1016/j.pss.2003.08.019
  - Ortiz-Rivas. B and Martínez-Torres. D. 2010 . *Combination of molecular data support the existence of three main lineages in the phylogeny of aphids (Hemiptera: Aphididae) and the basal position of the subfamily Lachninae*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 55 : 305–317.

- Ortiz-Rivas B, Moya A, Martinez-Torres D. 2004. Molecular Systematic of aphids (Homoptera : Aphididea) : new insights from the long –wavelength opsin gene . *Molecular phylogenetic and evolution* .30 : 24-37.
- Paranthman R., Alagusundaram K. and Indhumathi J. 2009. Production of protease from rice mill wastes by *Aspergillus niger* in solid-state fermentation. *World Journal of Agricultural Sciences*, 5 (3): 308-312.
- Paranthman R., Alagusundaram K. and Indhumathi J. 2009. Production of protease from rice mill wastes by *Aspergillus niger* in solid-state fermentation. *World Journal of Agricultural Sciences*, 5 (3): 308-312.
- Pastre et Roa . 1993. The control of insect pests in oil seed rape : deltamethrin file, PP192-201.
- Patidar P, Agrawal D, Banerjee T, Patil S .2005. Optimization of process parameters for chitinase production by soil isolates of *Penicillium chrysogenum* under solid substrate fermentation. *Proc Biochem* 40:2962–2967.
- Peccoud J, Simmon JC, VonDohlenC, Coeur d’acier A, Plantegenest M, Vanlerberghe-Masulti F, Jousselein E.(2010). Evolutionary history of aphids- plant association and their role in aphid diversification .*C.R.Biologies*. 333: 474-487.
- Pedrini N, Ortiz-Urquiza A., Huarte-Bonnet C., Zhang S. and Keyhani N. O. 2013. *Frontiers in Microbiology*, 4. 24.
- Pedrini N., Zhang S., Juarez M. P and. Keyhani N. O. 2010. *Microbiology*. 156: 2549–2557.
- Plattner, R. D.; Nelson, P. E. **1994**. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 3894–3896
- pratique. 4 ème édition, Ed. Lavoisier Tec. & Doc., Londres, Paris, New York, 399 p.
- Purschke, B.; Tanzmeister, H.; Meinschmidt, P.; Baumgartner, S.; Lauter, K.; Jäger, H. 2018. Recovery of soluble proteins from migratory locust (*Locusta migratoria*) and characterisation of their compositional and techno-functional properties. *Food Res. Int.*, 106, 271–279.
- Purschke, B.; Tanzmeister, H.; Meinschmidt, P.; Baumgartner, S.; Lauter, K.; Jäger, H. 2018. Recovery of soluble proteins from migratory locust (*Locusta migratoria*) and characterisation of their compositional and techno-functional properties. *Food Res. Int.*, 106, 271–279.
- Qubbaj. T., Reineke. A., & Zebitz. C. P. W. 2004 . Molecular interactions between rosy apple aphids, *Dysaphis plantaginea*, and resistant and susceptible cultivars of its

primary host *Malus domestica*. University of Hohenheim, Institute of Phytomedicine, Germany. p145: 145-152.

- **Rabatel.A.** 2011. Développement embryonnaire du puceron *Acyrtosiphon pisum* : caractérisation de voies métaboliques et gènes clé dans les interactions trophiques avec *Buchnera aphidicola*. Thèse de doctorat. Institut National des Sciences Appliquées de Lyon. France. 223 p.
- Raccach. B., & Fereres. A. 2009 . Plant Virus Transmission by Insects. *Encyclopedia Of Life Sciences*, John Wiley and Sons, Ltd. www.els.net.
- Raimbault M. 1983. Fermentation en milieu solide, croissance de champignons filamenteux sur substrat amylicé. p:1-42. O.R.S.T.O.M.-Paris.
- Ramade F.2003. Elément d'écologie fondamentale. 3ème édition, Ed. Dunod, Paris, 690p.
- Rao M.B., Tanksale A.M., Ghatge M.S., Deshpande V.V. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62 : 597-635.
- Ratna Kumar, P.K., Hemant, G.P.Shiny Niharika and Samuel, K. Kolli. 2015 Isolation and identification of soil micoflora in agricultural fields at Tekkali Mandal Srikakulam District. *Int. J. Adv. Pharmacol*, 14(92);484- 490.
- Ratnasri, P.V., Lakshmi, B.K.M., Ambika, D.K., and Hemalatha, K.P.J. 2014. Isolation, characterization of *Aspergillus fumigatus* and optimization of cultural conditions for amylase production. *Int. J. Res. Eng. Technol.* 2: 457-463.
- Ratnasri, P.V., Lakshmi, B.K.M., Ambika, D.K., and Hemalatha, K.P.J. 2014. Isolation, characterization of *Aspergillus fumigatus* and optimization of cultural conditions for amylase production. *Int. J. Res. Eng. Technol.* 2: 457-463.
- Remaudière, G., J. P. Latge and M. F. Michel .1981. Ecologie comparée des Entomophthoracées pathogènes de Pucerons en France littorale et continentale. *Entomophaga*, 26, 157-178.
- Rhodes D.F. 1979. Ecological and evolutionary processes dans Rosenthal G.A. et Janzen D. H. 1979. Herbivores, their interaction with secondary plant metabolites. Academic Press. New York, New York. 718 p.
- Saadoune I. and Momani I. 1997. Streptoyces from Jordan soil active against. *Agrobacterium tumefasciens*. *Actinomycets*. 8(12): 29-36.

- Safavi S. A . 2013. *In Vitro* and *In Vivo* Induction, and Characterization of Beauvericin Isolated from *Beauveria bassiana* and Its Bioassay on *Galleria mellonella* Larvae. *J. Agr. Sci. Tech. (2013) Vol. 15: 1-10.*
- Samson R.A., Evans H.C. et Latg J.P. (1988). *Atlas of entomopathogenic fungi*. Ed. Springer, Berlin Heidelberg New York. 208 p.
- Samuels K. D. Z., Pinnock D. E. 1990. Scarabeid larvae control in sugarcane using *M. anisopliae*. *Journal of invertebrate pathology*. 55 : 135-137.
- Sandhya C., Nampoothiri K.M., Pandey A. 2005. Microbial proteases. *Methods Biotechnol.*, 17; 165–179.
- Saranya, S., R. Ushakumari, S. Jacob, Babu M. Philip (2008). Efficacy of different entomopathogenic fungi against cowpea aphid, *Aphis craccivora* (Koch). *J. Biopest.*, 3 (1 Special Issue) 138 - 142.
- Sarnaya S., Ushakumari R., Jacob S. and Philip BM. 2010. Efficacy of different entomopathogenic fungi against cowpea aphid, *Aphis craccivora* (Koch). *J. Biopesticides*, 3(1): 138-142.
- Sashai, A. S. & Manocha, M. S. 1993. *FEMS Microbiol. Rev.*, 11, p.317-338 (1993).
- Scholte EJ, Knols BGJ, Samson RA, Takken W. 2004. Entomopathogenic fungi for mosquito control: a review. *J. Insect Sci.* 4/19: 1-24. ([insectscience.org/4.19](http://insectscience.org/4.19)).
- Scholte EJ, Knols BGJ, Samson RA, Takken W. 2004. Entomopathogenic fungi for mosquito control: a review. *J. Insect Sci.* 4/19: 1-24. ([insectscience.org/4.19](http://insectscience.org/4.19)).
- Senal J., Fraselle J., Impens R., Kummert J., Lepoivre Ph., Meulmans M., Seilleur P., Vandevéken J., et Viseur J. 1993. *Traité de pathologie végétale*. Gembloux. Belgique.
- Seth R k , Alam Sh, Shukla DN.2016. Isolation and identificatin of soil fungi from wheat cultivated Area of Uttar pradesh. *Journal of Plant Pathology & Microbiology* 7 :11.
- Shin, C. G.; An, D. G.; Song, H. H.; Lee, C. **2009**. *J. Antibiot.*, 62, 687–690.
- Singh A., Ghosh V. K and Ghosh P. 1994. Production of thermostable acid protease by *Aspergillus niger*. *Letters in Applied Microbiology*, 18: 177-180.
- Slama A., Ben Salem M., Ben Naceur M. et Zid E. D. 2005. Les céréales en Tunisie : production, effet de la sécheresse et mécanismes de résistance. *Sécheresse* (16) 3 :225-9.
- Smith, J. 1953. *Nature* 171,43-44
- Soltner D. 1989. Les bases de la production végétal. Tome I: Le sol, 17ème Ed. C.S.T.A., Angers, 468 p.

- Soltner D .1992. Les bases de la production végétale. Tome 1: le sol. Collection Sciences et Techniques Agricoles, 19ème édition, Sainte Gemmes sur Loire.
- Song, H. H.; Lee, H. S.; Jeong, J. H.; Park, H. S.; Lee, C. **2008**. *Int. J. Food Microbiol.*, 122, 296–301.
- St Leger, R. J. et Frank D. C. 1992. Molecular cloning and regulatory analysis of the cuticle-degrading- protease structural gene from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Eur J Biochem* 204 (3): 991-1001.
- St Leger, RJ. 1993. Biology and mechanisms of insect-cuticle invasion by deuteromycete fungal pathogens. In: Parasites and pathogens of insects (Vol. 2). Beckage NE, Thompson SN, Federici BA (eds.). Academic Press Inc., New York, USA. 211-225.
- St. Leger RJ, Charnley AK, Cooper M. 1986. Cuticle degrading enzymes of entomopathogenic fungi: mechanisms of interaction between pathogen enzymes and insect cuticle. *J Invertebr Pathol* 47:295–302
- Steyn P.S.(1980).*The biosynthesis of mycotoxins* , Acad. Press, N.Y. and London
- Stone M.J. and Williams D.H. 1992. On the evolution of functional secondary metabolites (Natural products). *Mol.Microbiol.* 6: 29-34
- Stoykov, Y. M., Pavlov, A. I., & Krastanov, A. I. 2015. Chitinase biotechnology: production, purification, and application. *Engineering in Life Sciences*, 15, 30e38. 7
- Strong D.R., Lawton J.H. et Southwood R. 1994. Insects on plants: community patterns and mechanisms. Harvard University press. Cambridge, Massachusetts. 313 p.
- Sung, G. H.; Hywel-Jones, N. L.; Sung, J. M.; Luangsa-ard, J. J.; Shrestha, B.; Spatafora, J. W. 2007. *Stud. Mycol.* 57, 5–59
- Suresh PV, Chandrasekaran M.1998. Utilization of prawn waste for chitinase production by the marine fungus *Beauveria bassiana* by solid state fermentation. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 14:655-660.
- Süßmuth, R.; Müller, J.; von Döhren, H.; Molnár, I.2011. *Nat. Prod. Rep.* 28, 99–124.
- Takaya, N., Yamazaki, D., Horiuchi, H., Ohta, A. and Takagi, M. 1998. Cloning and characterization of a chitinase-encoding gene (chiA) from *Aspergillus nidulans*, disruption of which decreases germination frequency and hyphal growth. *Biosci Biotechnol Biochem* 62, 60–65
- Tanya. D. 2002 . Aphids. Bio-Integral Resource Center, Berkeley.

- Tell, L. A. 2005. Aspergillosis in mammals and birds: impact on veterinary medicine. *Med. Mycol.*, 43, S71–S73.
- Tikhonov VE, Lopez-Llorca LV, Salinas J, Jansson HB . 2002. Purification and characterization of chitinases from the nematophagous fungi *Verticillium chlamydosporium* and *V. suchlasporium* *Fungal Genet Biol* 35:67–78.
- Tomoda, H.; Huang, X. H.; Cao, J.; Nishida, H.; Nagao, R.; Okuda, S.; Tanaka, H.; Ōmura, S. 1992. *J. Antibiot.* 45: 1626–1632.
- Tortora J., Funk B.F. and Case Ch.I. 2003. *Introduction à la microbiologie*, (edn) ISBN.Canada.
- Trail F., Mahinti N. and Linz J. 1995. Molecular biology of aflatoxine biosynthesis. *Microbiology*. 141: 755-765.
- Turner W.B et Albridge D.C. 1983. *Fungal metabolites II*, Acad. Press, N.Y. and
- Turner W.B. 1971. «Fungal metabolites» , Acad. Press, N.Y. and London.
- Turpeau- Ait Ighil E. Dedryver CA , Chaubet B, Hullé M. 2011. Les pucerons des grandes cultures : cycle biologiques et activité de vol , Quae, Paris, pp. 33.
- Ul-Haq I., Mukhtar H., Daudi S., Sikander A. and Quadeer M. A. 2003. Production of proteases by a locally isolated mould culture under lab conditions. *Biotechnology* 2 (1): 30-36.
- Vanloon J.J.A. 1996. Chemosensory basis of feeding and oviposition behaviour in herbivorous insects: a glance at the periphery. *Entomologia experimentalis et applicata*. 80:7-13.
- Vistwanatha K. S., Rao Appu A. G and Sigh S. A. 2010. Acid protease production by solid-state fermentation using *Aspergillus oryzae* MTCC 5341: optimization of process parameters. *Journal Industrial of Microbiology and Biotechnology*, 37:129-13.
- Vistwanatha K. S., Rao Appu A. G and Sigh S. A. 2010. Acid protease production by solid-state fermentation using *Aspergillus oryzae* MTCC 5341: optimization of process parameters. *Journal Industrial of Microbiology and Biotechnology*, 37:129-13.
- Wang. Y., Ma. L., Wang. J., Ren. X., & Zhu. W. 2000 . A study on system optimum control to diseases and insect pests of summer soybean. *Acta Ecologica Sinica* 20 : 502-509.

- Watanuki Z, Okada S , Chiba S, Kamei K, Suzuki W, Yamada N. 2012. [Increased Prevalence of High Anti-Cladosporium Antibody Titers in Interstitial Lung Diseases.](#) *J.Exp.Med* .226 : 287-291.
- Webster B , Bruce T, Dufour S. 2008. Identification of volatile compounds used in host location by black bean aphid. *Aphis Fabae* . *J.Chem. Ecol.* 34 : 1153-1161.
- Will T, Van Bel A JE. 2006. Physical and chemical interaction between aphids and plants *.Journal of Experimental Botany* .57(4): 729-737.
- Wiwart M , Sadej W. 2008. The effect of leaf colour of selected field bean cultivars wick diifer in attracting black plant protection research . 48 (2): 195-200.
- Won, W. L., Y. S. Tae, M. B. Sung and D. W. Soo .2015. Screening and evaluation of entomopathogenic fungi against the green peach aphid, *Myzus persicae*, using multiple tools. *J.Asia-Pac. Entomol.*, 18, 607–615.
- Woobok J. and Keller N.P. 2004. Lae A regulator of secondary metabolism in *Aspergillus sp. Eucaryotic Cell.* 3(2): 527-535.
- Xia JI, Xiong J, Xu T, Zhang CG, Zhang RI, Zhang Q, Wu S, Qiu GZ .2009. Purification and characterization of extracellular chitinase from a novel strain *Aspergillus fumigatus* CS-01. *J Cent South Unive Technol* 16: 552–557.
- Xia JI, Xiong J, Xu T, Zhang CG, Zhang RI, Zhang Q, Wu S, Qiu GZ .2009. Purification and characterization of extracellular chitinase from a novel strain *Aspergillus fumigatus* CS-01. *J Cent South Unive Technol* 16: 552–557.
- Yee W. L. and Lacey L. A. 2005. Mortality of different life stages of *Rhagoletis indifferens* (Diptera, Tephritidae) exposed to the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* *J. Entomol. Sci.*, 40, 2, 167-177.
- Yi, L.; Lakemond, C.M.M.; Sagis, L.M.C.; Eisner-Schadler, V.; van Huis, A.; van Boekel, M.A.J.S. 2013. Extraction and characterisation of protein fractions from five insect species. *Food Chem.* 141, 3341–3348.
- Zhang S., Widemann E., Bernard G., Lesot A., Pinot F., Pedrini N. and Keyhani N. O.(2012). *J. Biol. Chem.* 287: 13477–13486.
- Zhang, H., Ruan, C., Bai, X., Zhang, M., Zhu, S., and Jiang, Y. 2016. Isolation and identification of the antimicrobial agent beauvericin from the endophytic *Fusarium oxysporum* 5-19 with NMR and ESI-MS/MS. *Biomed. Res. Int.* 2016:1084670. doi: 10.1155/2016/1084670.

- Zhao, X.; Vázquez-Gutiérrez, J.L.; Johansson, D.P.; Landberg, R.; Langton, M. 2016. Yellow Mealworm Protein for Food Purposes—Extraction and Functional Properties. PLoS ONE, 11, e0147791.

# Résumés

## Résumé

62 souches fongiques ont été isolées d'échantillons de sol prélevés au niveau de la parcelle (INRA/SRPV) de Constantine au cours des campagnes agricoles 2014 et 2015. 36 isolats fongiques représentant 8 genres : *Aspergillus*, *Beauveria*, *Botrytis*, *Fusarium*, *Metharizium*, *Penicillium*, *Trichoderma* et *Verticillium* ont été isolés à partir de trois sites identifiés au cours de la campagne 2014, alors que 26 isolats représentant 6 genres: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium* et *Rhizoctonia* sont isolés à de trois autres sites identifiés au cours de la campagne 2015. La confirmation de la pathogénicité des champignons collectés et identifiés, a été réalisée par évaluation de leur aptitude à induire l'infection et/ou des mortalités au sein des colonies aphidiennes. Des tests d'entomopathogénicité de onze (11) souches entomopathogènes révèlent un effet de mortalité pour l'espèce aphidiennes *Metapolophium dirhodum*. Des mortalités de l'ordre de 90 % sont enregistrées avec le genre *Beauveria* alors que de fortes sensibilités sont observées avec les genres *Cladosporium* (60%) et *Verticillium* (50%). Cependant, une moindre pathogénicité variant de 10 à 40 % a été notée sur *M.dirhudum* avec les autres genres entomopathogènes : *Aspergillus* et *Metharizium* avec 41.67%, suivie par *Trichoderma* (31.94%), *Penicillium* (27.78 %), *Fusarium*, (20.83%) et enfin, *Alternaria*, *Botrytis* et *Rhizoctonia* ont enregistré un taux de mortalité de 13.83%. Par ailleurs, l'analyse statistique de variance (ANOVA) réalisée en fonction des jours de traitements a montré une différence hautement significative après application au 3<sup>ème</sup> jour. Les tests réalisés sur d'autres espèces de pucerons *Macrosiphum rosea*, *Myzus persicae* et *Aphis fabae*. ont montré des réactions différentes aux différents traitements allant de mortalité spectaculaire (plus de 95%) à des réactions plus ou moins sensibles (50%) selon les genres utilisés. L'activité d'hydrolyse des protéines après l'ensemencement sur le milieu lait gélosé présente des zones d'hydrolyses permettant la mise en évidence de l'activité protéolytique chez trois champignons entomopathogènes (*B. bassiana*, *C. cladosporioides* et *V. alfalfae*). Les tests de chitinase réalisés sur le Milieu MCC (Milieu chitine colloïdale) ont permis la mise en évidence de l'activité chitinolytique chez les trois champignons entomopathogènes étudiés (*B. bassiana*, *C. cladosporioides* et *V. alfalfae*) avec des zones d'hydrolyse variant de 1cm à 3 cm. De diamètre et une production enzymatique plus ou moins élevée variant de 34.76 U/ml à 45.97 U/ml selon les genres étudiées. L'analyse en HPLC des cultures des 3 souches *B.bassiana*, *C.cladosporioides* et *V.alafalfae* montre que les toxines il peut être observé que de trois souches fongiques recherchés dans les surnageant de culture couvrent une large gamme de polarité et que 60 minutes sont nécessaires pour séparer l'ensemble de ces molécules. L'étude des spectres UV des pics a montré que tous ces composés présentent les caractéristiques des molécules aromatiques. A partir les spectres de RMN des trois souches fongiques, on peut pas faire la caractérisation des il est donc, difficile d'identifier les composants de nos extraits se basant seulement sur HPLC et RMN, et sans avoir recours à des méthodes de couplage, telles que la spectroscopie de masse (MS), les détecteurs à barrettes de diode (DAD)... Ect. molécules.

**Mots clés :** Champignons entomopathogènes, pucerons, protéase, chitinase ,

## Abstract

A total of sixty two fungal strain were isolated from soil of six sites at INRA/SRPV location in Constantinedistrict, during the period 2013/2014 and 2014/2015. Among them, thirty six fungal isolates belongs to the eight fallowinggenera:*Aspergillus*, *Beauveria*,*Botrytis*, *Fusarium*,*Metharizium**Penicillium*, *Trichoderma*and*Verticillium*collected from three sites in 2014. Where the remaining twenty six fungal isolates belongs to the six genera:*Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium*and *Rhizoctonia*collected from three others sites in 2015. Pathogenic characterization of collected and identified fungal strains, was realized by evaluating their ability to induce infection or dead throughout aphidian colonies. Eleven entomopathogene strainsrevealed a dead effect for aphidian species:*Metapolophiumdirhodum*.The greatpercent of mortality was unregistered by *Beauveria* (90%) fallowed by *Cladosporium*(60%)and*Verticillium*(50%).However the other genera shows a less mortality of*M.dirhudum*(between 10 and 40%): *Aspergillus* and *Metharizium*(41.67%), *Trichoderma*'(31.94%), *Penicillium* (27.78 %), *Fusarium* , (20.83% ) and *Alternaria*, *Botrytis* et *Rhizoctonia*(13.83%) respectively. Furthermore,statistical analysis byANOVA based on the number of days oftreatment shows a significant difference after three days of application. The other test realized on the other species of aphis (*Macrosiphumrosea*, *Myzuspersicea* and *Aphis fabea*) shows a different reaction at different treatment from spectacular mortality (more than 95%) to sensible reaction (50%) according to genera used. ProteinHydrolyzeactivity afterseedinon agar media present hydrolyze zones allowed the presence of proteolyticactivity in three entomopathogen fungi:*B.bassiana*, *C.cladosporioides*and *V.alfalfae*). Chitinase tests performed on the MCC medium (colloidalchitinmedium) revealedchitinolytic activity inthethree entomopathog enic fungi studied (*B. bassiana*,*C. cladosporioides* and*V. alfalfae*) with hydrolysis zones rangi ng from 1cm to 3 cm of diameter and a more or less high enzymatic production varying from 34.76 U/ml to 45.97 U/ml according to genera studied. HPLC analysis of the three fungi strain:*B.bassiana*, *C.cladosporioides* and *V.alafalfae* shows a toxine . It could be observed that the three fungal strains wanted in the culture supernatant cover a broad range of polarity and 60 min are needed to separate all the molecule. A farther study of spectra UV peak shows that all composite present aroma characteristic. . From the NMR spectra of the three fungal strains, it is difficult to identify the components of our extracts based solely on HPLC and NMR, and without resorting to coupling methods, such as that mass spectroscopy (MS), diode array detectors (DAD) .... Ect.

**Key words:** entomopathogenic fungi, aphids, protease, chitinase

## الملخص

لقد تم عزل 62 سلالة فطرية من عينات التربة التي تم جمعها في المنطقة (INRA / SRPV) قسنطينة في السنوات 2014 و 2015. الفطريات 36 المعزولة تمثل 8 أجناس: اسبرجيلوس ، البوفيرية، بوتريتييس، الفيوزاريوم، البنسليوم، ميتهاريزيوم ، الترايشوديرما والفرتيسيليوم تم عزلهم على ثلاثة مواقع محددة خلال حملة عام 2014، في حين الفطريات 26 المنعزلة تمثل 6 انواع : الترناريا ، اسبرجيلوس ،كلادوسبوريوم ، الفيوزاريوم، البنسليوم ورايزوكتونيا تم عزلهم كذلك من ثلاثة مواقع أخرى تم تحديدها خلال حملة 2015: حيث تم التأكد من عدم وجود قدرة مسببة من طرف الفطريات التي تم جمعها وتحديدها من خلال تقييم قدرتها على إحداث العدوى و / أو الوفيات في مستعمرات المن. يعتبر اختبار ضد الحشرات من الاختبارات الأحد عشر (11) التي كشفت سلالات الحشرات المسببة للأمراض و الموت لأنواع ديرهودم ميتابولوفيوم افبيدن . قد سجلت وفيات في حدود 90% مع جنس البوفيريا في حين لوحظ حساسيات عالية مع أجناس كلادوسبوريوم (60%) والفرتيسيليوم (50%). مع ذلك، كانت هناك نسبة مرضية قليلة تتراوح بين 10 إلى 40% سجلت في م.ديرهودم مع غيرها من أجناس حشرات الميتاريزيوم بنسبة 41.67% تليهم التريكوديرما بنسبة (31.94%)، البنسليوم (27.78%)، الفيوزاريوم (20.83%) وأخيرا الترناريا، بوترييس و رايزوكتونيا سجلت معدل وفيات بنسبة 13.83 % . علاوة على ذلك، أظهر التحليل الإحصائي التباين (ANOVA) تتبعا لأيام من العلاج فرقا بعد تطبيق اليوم الثالث . أظهرت الاختبارات التي أجريت على أنواع أخرى من المن : ماكروسيفيوم , ميزوس بيرسيسيا و افيس فابيا . استجابات مختلفة للعلاجات تتراوح ما بين وفيات كبيرة (أكثر من 95%) إلى أكثر أو أقل حساسية ردود الفعل (50%) حسب الأجناس المستخدمة . كما أن النشاط البر وتتي المستعمل على بيئة أجار الحليب كشف بظهور نتائج جيدة للفطريات الممرضة للحشرات (ب.باسيانا , س.كلادوسبوريتاس و ف.ألفا). وعلاوة على ذلك, اختبارات الكيتيناز على وسط MCC (وسط الكيتين كلويدال) سمحت بتحديد نشاط كيني في ثلاثة فطريات ممرضة للحشرات (ب.باسيانا, س.كلادوسبوريداس و ف.الفا) أنتجت هالات شفاقة تتراوح أقطارها ما بين 1 إلى 3 سم , أما نسبة النشاط الكيتيني تتراوح ما بين 34.76 U / ml . عند 45.97 وحدة / مل. نضرا إلى التحليل HPLC على الفطريات الثلاث : ب. باسيانا , س.كلادوسبوريداس و ف.ألفا أشار أن لهم قدرة بإنتاج السموم ( حلقات عطرية) .من أطيف الرنين المغناطيسي النووي من سلالات الفطرية الثلاث ، من الصعب تحديد مكونات مقتطفات لدينا تعتمد فقط على HPLC و NMR ، ودون اللجوء إلى طرق اقتران ، مثل أن التحليل الطيفي الشامل (MS) ، للكشف عن مجموعة الصمام الثنائي (DAD) .... إلخ.

**الكلمات الرئيسية:** الفطريات الممرضة للحشرات، المن، الأنزيم البروتيني، الكيتيناز.

# Annexes

<b>Annexe 1 : isolement , purification et identification des champignons</b>
--

**Milieu PDA (Ronald et Atlas, 1997): pH 5.6± 0,2.**

Composants Quantités (g/L)

Pomme de terre .....200 g/l

D-Glucose .....20 g/l

Agar .....20 g/l

### **Solution de Bleu de Coton de Lactophénol (Chabasse et al., 2002)**

Phénol cristallisé pur.....	10g/l
Acide lactique.....	10g/l
Glycérine.....	20 g/l
Bleu coton C4B (ou bleu de Méthyle).....	0.25 g/l

### **Lait gélosé :**

Agar.....	20g/l
Lait 20.....	20ml

### **Milieu Chitine colloïdale**

Chitine colloïdale.....	0.2
Agar.....	20g/l

## **Annexe 2 : les enzymes**

### **1. Protéase**

#### **Préparation du mélange réactionnel**

<b>N° du tube</b>	<b>Blanc 1</b>	<b>Blanc 2</b>	<b>1</b>	<b>2</b>
<b>Réactif et solutions</b>				
<b>Extrait enzymatique</b>	-	-	0,5	0,5

(ml)				
<b>Solution de caséine (ml)</b>	2,5	2,5	2,5	2,5
<b>Vol de tampon (ml)</b>	1	1	0,5	0,5
Bien mélanger et placer au bain Marie à 40°C pendant 30 min				
<b>TCA à 4% (ml) : arrêt de la réaction</b>	5			
Filtrer les solutions sur papier filtre courant				
Le filtrat constitue la solution contenant le produit de la réaction (la tyrosine)				
<b>Produit de la réaction</b>	Blanc F1	Blanc F2	Filtrat 1	Filtrat 2

### Dosage de l'activité enzymatique

N° du tube Réactif et solutions	Blanc 1	Blanc 2	1	2
<b>Extrait enzymatique (ml)</b>	-	-	0,5	0,5
<b>Solution de caséine (ml)</b>	2,5	2,5	2,5	2,5
<b>Vol de tampon (ml)</b>	1	1	0,5	0,5
Bien mélanger et placer au bain Marie à 40°C pendant 30 min				
<b>TCA à 4% (ml) : arrêt de la réaction</b>	5			
Filtrer les solutions sur papier filtre courant				
Le filtrat constitue la solution contenant le produit de la réaction (la tyrosine)				
<b>Produit de la réaction</b>	Blanc F1	Blanc F2	Filtrat 1	Filtrat 2

Une unité de protéolyse correspond à la libération de 1 $\mu$ g de tyrosine résultante de l'hydrolyse enzymatique par heure et dans un ml d'échantillon (1 $\mu$ g/h/ml). La concentration déduite de la courbe d'étalonnage correspond à 0,5 ml d'échantillon dilué par les réactifs ajoutés au cours de la première étape. **Activité protéolytique ( $\mu$ g/h/ml)** = concentration déduite de la courbe d'étalonnage x dilution x 2 (pour ramener le volume de l'échantillon à 1ml) x 2 (pour ramener le temps à 1h).

## 2. Chitinase

### Préparation des solutions tampons

**Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> à 0.4M** : 28.392g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> dans 500 ml d'eau distillée.

**Acide citrique à 0.2M** : 21.014 g dans 500 ml d'eau distillée.

### Tampon Tris-HCl 0,2 M

Tris 0,2M                    50 ml  
HCl 0,2M                    0,2 ml  
l'eau distillée stérile    49,8 ml  
**pH= 9.0**

**Tampon Citrate-phosphate**

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,4M            52 ml  
Acide citrique 0,2M    48 ml  
**pH=5.0**

**Tampon acétate de Sodium 50 mM**

Acétate de sodium        4,10 g  
Acide acétique            2,85 ml  
glacial  
l'eau distillée stérile    1000 ml  
**pH= 5.0**

**Réactif DNS (Miller *et al.*, 1956)**

NaOH                        10 g  
Potassium Sodium        182 g  
Tartare  
3,5-Dinitrosalicylic      10 g  
Acid  
Phénol                      2 g  
Sodium sulfite            0,5 g  
Eau distillée              1000 mL

<b>Annexe 3 : les toxines</b>
-------------------------------

**1. HPLC :**

- Injection; 10ul
- Debit; 0.5ml
- Temperature colonne ; 25 C
- Colonne; Zorbax SB C18 (4.6\*150 mm, 5um).
- Gradient ; (C)ACN/ (A) eau acidifie 0.1% , 65 min
- Gradient ; (C)ACN/ (A) eau acidifie 0.1% , 65 mi

## 2. RMN

### *a. Analyse du spectre RMN des métabolites de *Beauveria bassiana**

- Des signaux  $^1\text{H}$  à  $\delta=1.618$  et  $1.636$ . Ce ci confirme la présence des alkyle tertiaire

Time [min]	A [%]	B [%]	C [%]	D [%]	Flow [mL/min]	Max. Pressure Limit [bar]
0.00	100.0	0.0	0.0	0.0	0.500	600.00
10.00	80.0	0.0	20.0	0.0	0.500	---
20.00	60.0	0.0	40.0	0.0	0.500	---
30.00	40.0	0.0	60.0	0.0	0.500	---
40.00	20.0	0.0	80.0	0.0	0.500	---
60.00	0.0	0.0	100.0	0.0	0.500	---
65.00	100.0	0.0	0.0	0.0	0.500	---

$\text{R}^1\text{R}^2\text{R}^3\text{CH}$ .

- Un signal  $^1\text{H}$  à  $\delta = 13.583$ . Cette résultat montre la présence d'acide carboxyliques.
- Un signal qui apparait à  $\delta=7.304$ . Ce ci confirme la structure des molécules aromatiques.
- Un autre signal  $^1\text{H}$  à  $\delta = 16.833$ , cette résultats indique que la présence d'une molécule aromatiques.
- Par ailleurs, le signal qui apparaît à  $\delta = 2.943$  et  $\delta=3.886$ , indique la présence d'un groupe d'alcool.
- Le signal à  $\delta = 0.237$  montre la présence de Méthane  $\text{CH}_4$ .

- Le signal à  $\delta = 0.302$ ,  $\delta = 0.549$ ,  $\delta = 0.840$ ,  $\delta = 0.951$ ,  $\delta = 1.00$  et  $\delta = 1.056$ , ces résultats indiquent la présence des alkyles primaires.
- Le signal à  $\delta = 5.267$  indique la présence d'Alcène non terminal.
- Le signal à  $\delta = 2.441$  ppm montre la présence de molécule Benzylque.

Le spectre de RMN C du composé *B.bassiana* présente vingt signaux (figure 27) :

- Des carbones méthyliques résonants entre 11.097 et 38.826 ppm.
- Des carbones méthyliques oxydés CHOH entre 68.282 et 77.671 ppm.
- Des carbones éthyliques entre 115.279 et 132.536 ppm .
- Un carbone résonne à 167.989 ppm , révèle la présence d'une fraction acide (COOH).



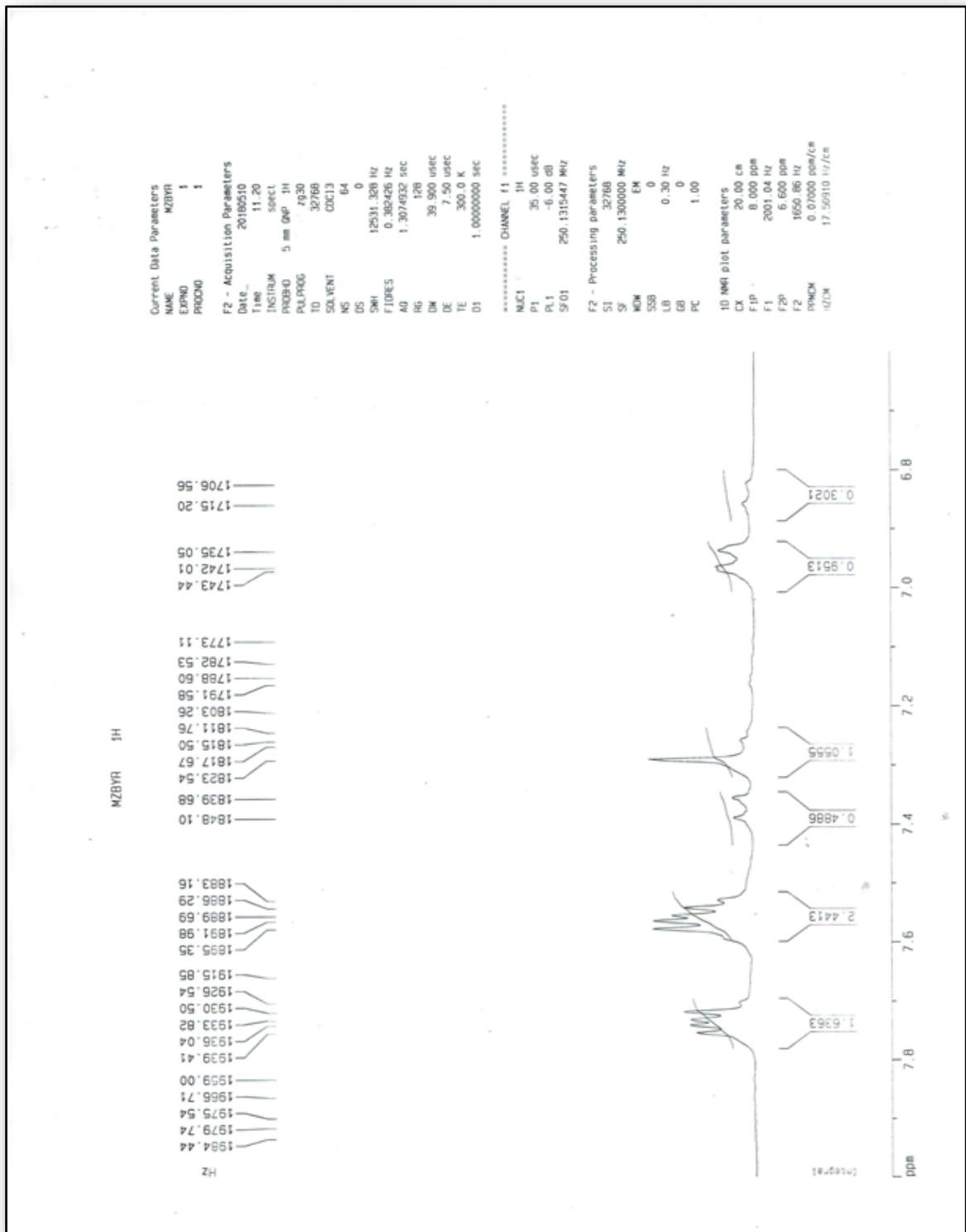


Figure 30: Spectres RMN H1 du produit de *B.bassiana*.

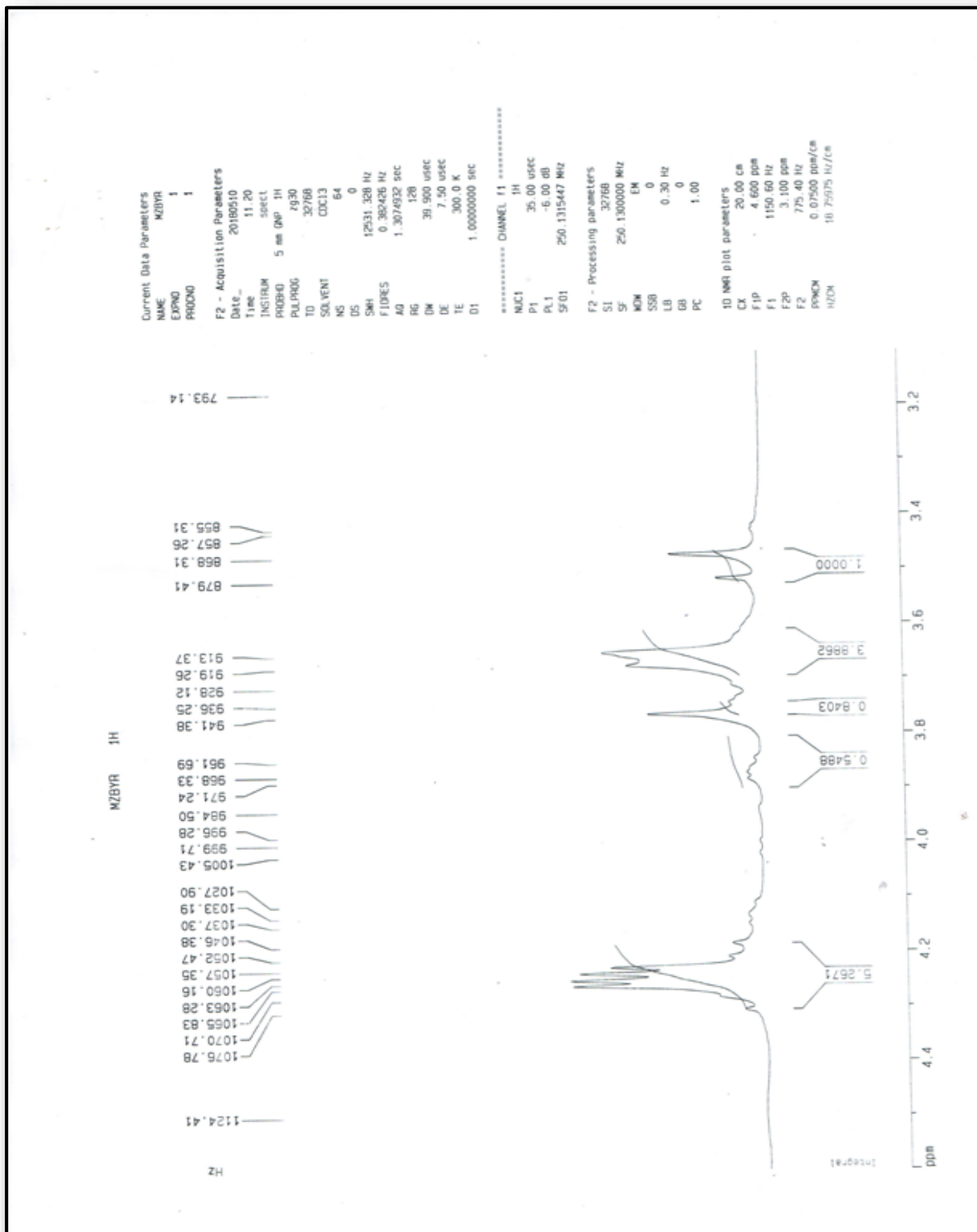


Figure 31: Spectres RMN H1 du produit de *B.bassiana*.

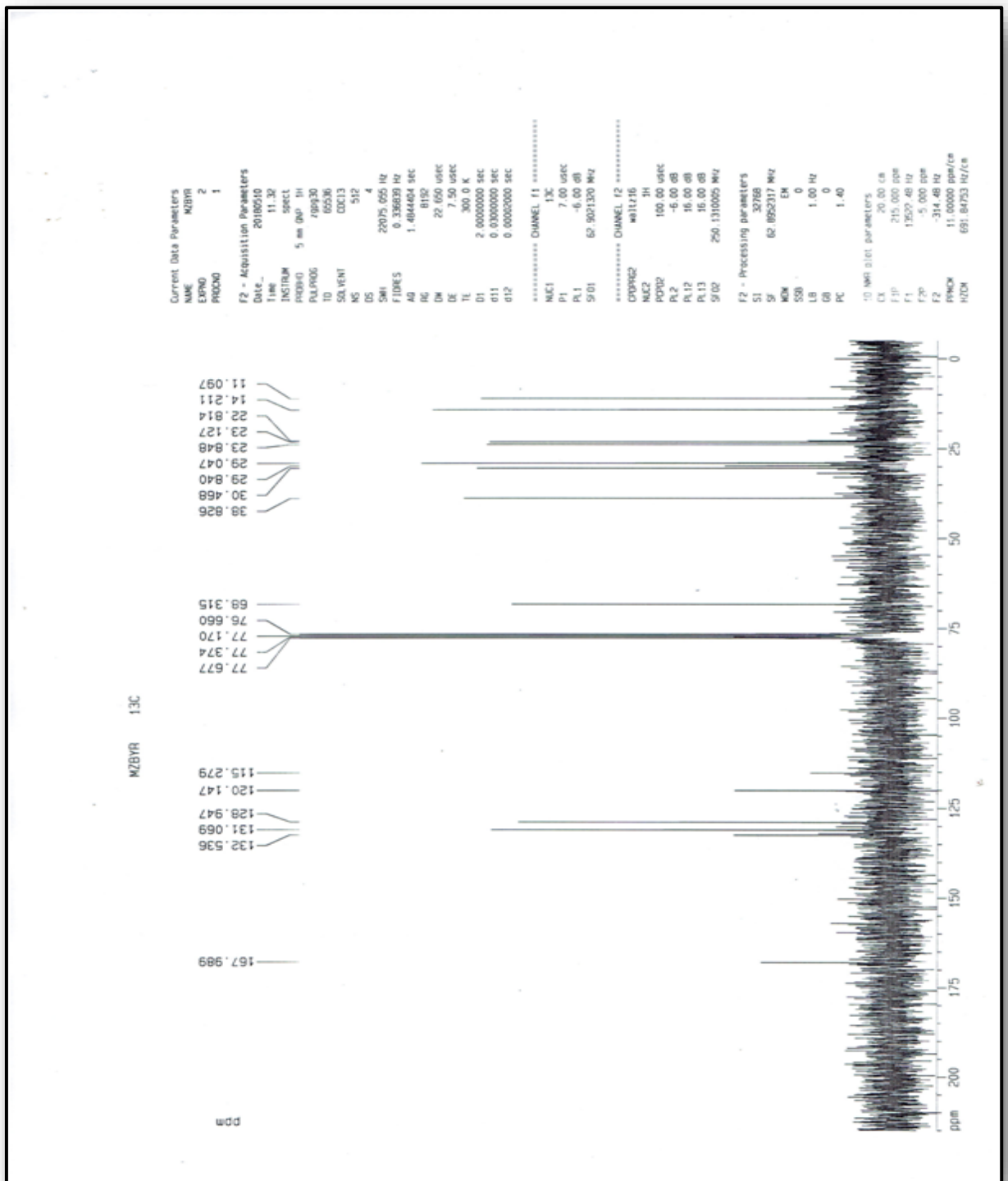


Figure 32 : Spectre RMN C<sup>13</sup> du produit de *B.bassiana*.

b. Analyse du spectre RMN des métabolites de *C.cladosporioides*

Les résultats obtenus au cours de ces analyses sont représentés dans les figures 33,34 , et 35 montrent

- Un signal sous forme d'un doublet d'intégration 1H à  $\delta = 12.798$  .Cet résultat montre la présence d'acides carboxyliques.
- Un signal sous forme de singlet qui apparaît à  $\delta=6.535$ . Ce ci confirme la structure des molécules aromatiques.
- Un autre signal 1H à  $\delta = 11.098$  .cet résultat indique que la présence d'une molécule aromatique et des aldéhydes.
- Le signal à  $\delta = 2.142$  montre la présence de Cétone  $\text{RCOCH}_3$ .
- Le signal à  $\delta =1.00$  et  $\delta =1.079$ , ces résultats indiquent la présence des alkyles primaires.
- Le signal à  $\delta =5.188$  indique la présence d'Alcène non terminal.
- Le signal à  $\delta =3.245$  montre la présence de molécule Iodoalcane.

Le spectre de RMN C du composé *B.bassiana* présente vingt signaux (figure 30) :

- Des carbones méthyliques résonants entre 11.087 et 38.808 ppm.
- Des carbones méthyliques oxydés CHOH entre 68.282 et 77.671ppm.
- Des carbones éthyliques entre 128.925 et 132.515 ppm .
- Un carbone résonne à 167.954 ppm , révèle la présence d'une fraction acide (COOH).

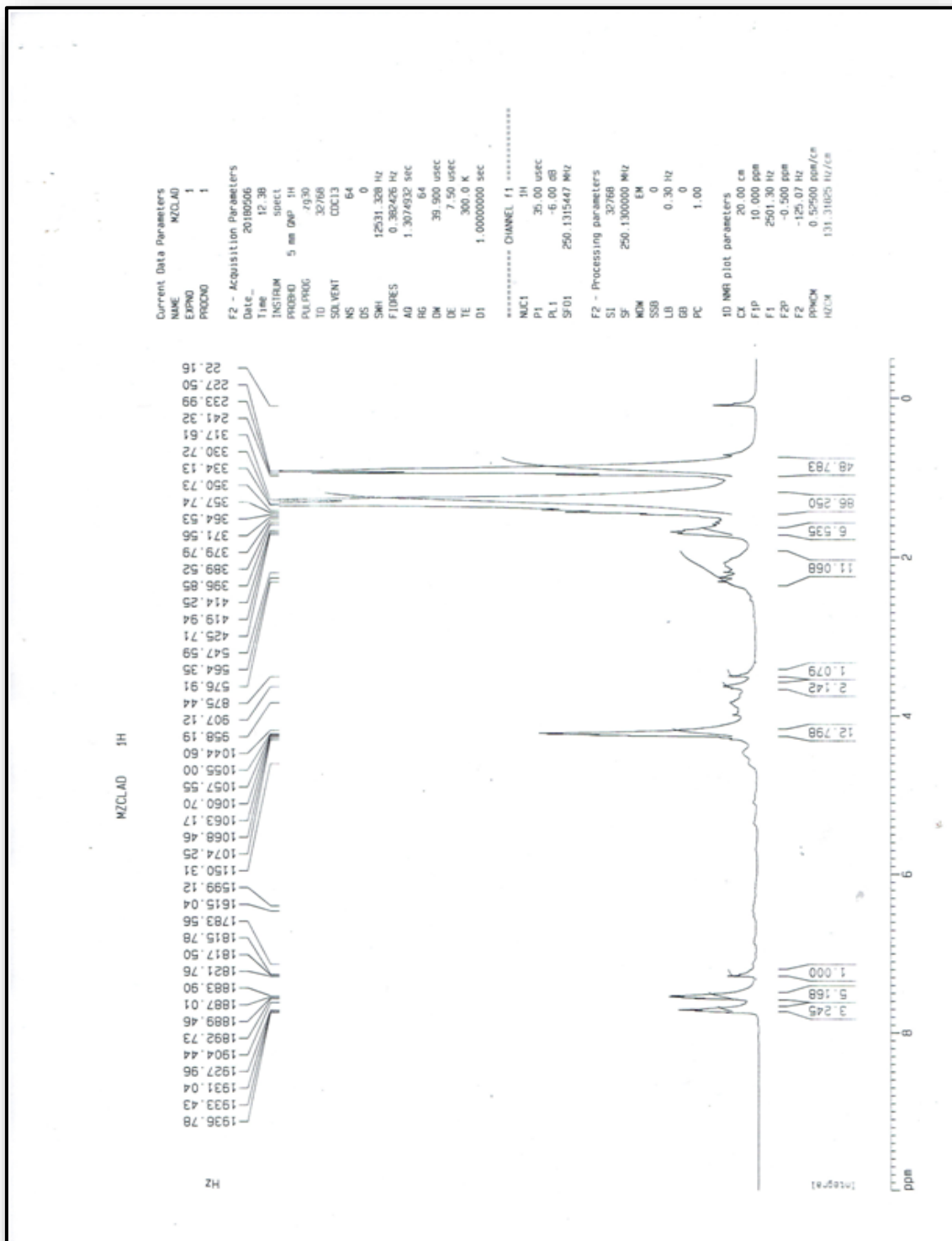


Figure 33: Spectres RMN H1 du produit de *C. cladosporioides* .

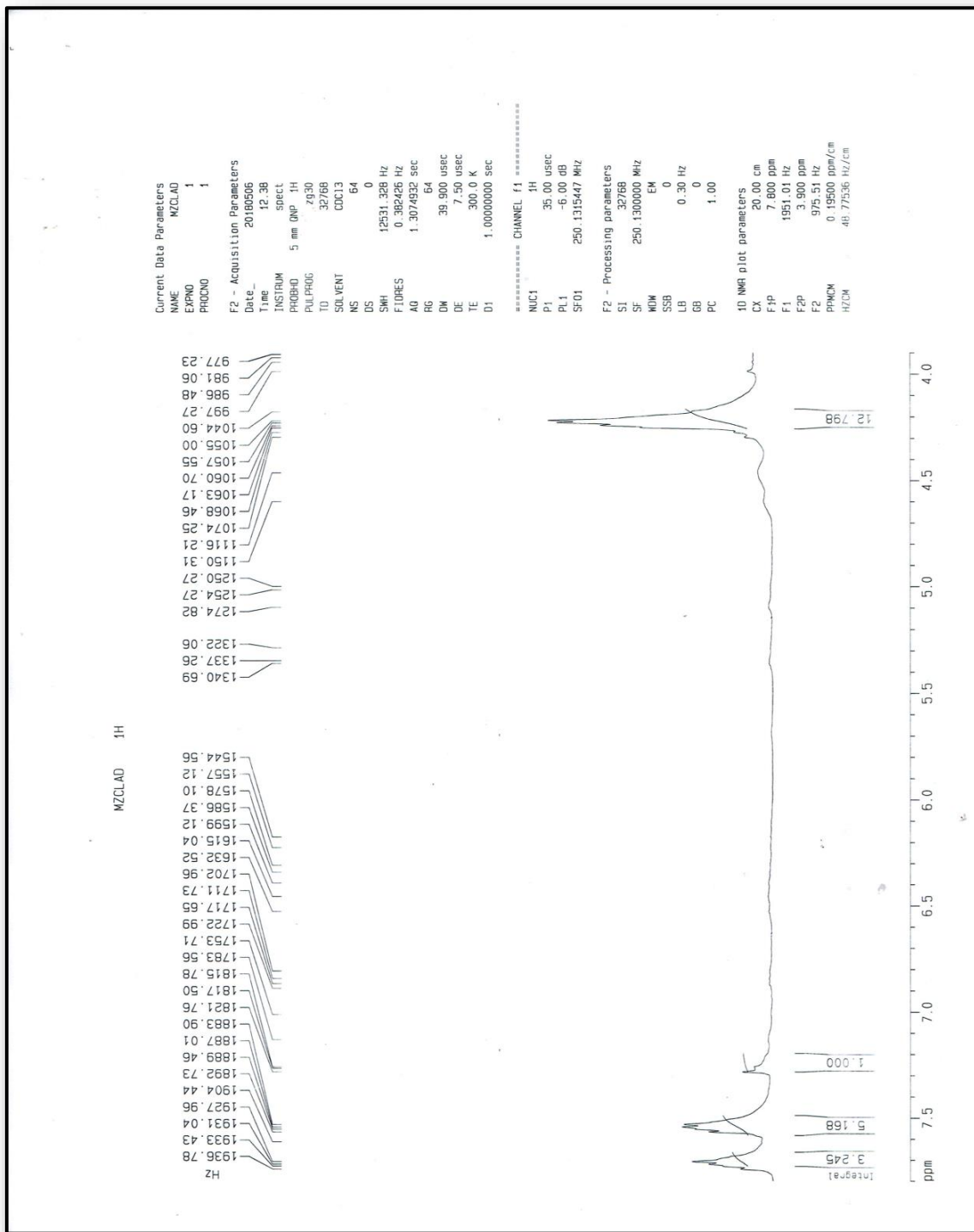


Figure 34: Spectres RMN H1 du produit de *C.cladosporioides*

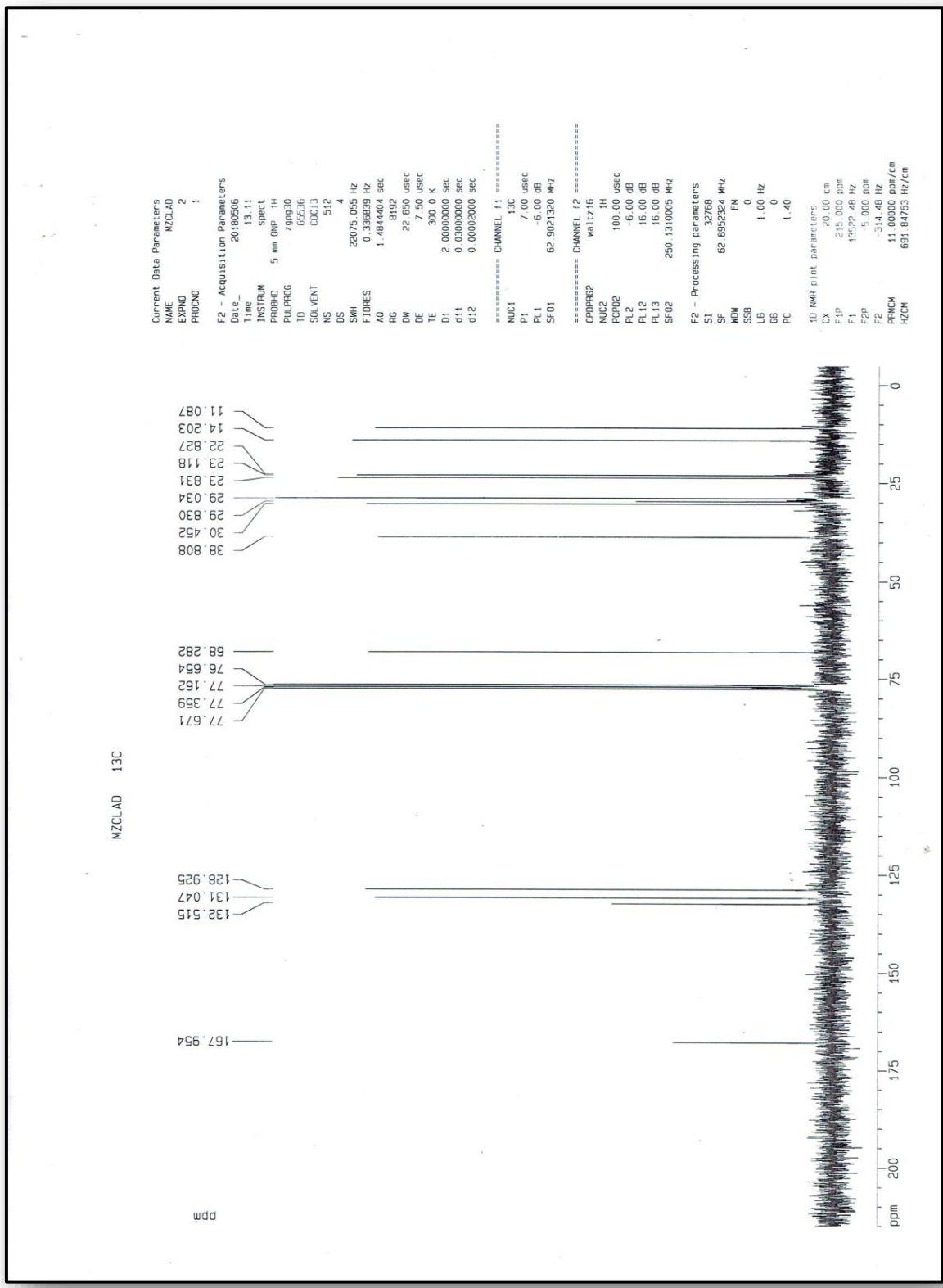


Figure 35 : Spectre RMN C13 du produit de *C.cladosporioides*

c. Analyse du spectre RMN des métabolites de *V.alfalfae*

Les résultats obtenus au cours de ces analyses sont représentées dans les figures 36, 37, 38 et 39 montrent

- Des signaux  $^1\text{H}$  à  $\delta=7.40$ ,  $5.98$  et  $7.12$ . Ce ci confirme la présence des cycles aromatiques.
- Un signal  $^1\text{H}$  à  $\delta=35.68$ . Cette résultat montre la présence  $\text{RCH}_2\text{NH}_2$ .
- Un signal qui apparaît à  $\delta=78.66$ . Ce ci confirme la structure des molécules Alcynes.
- Un autre signal  $^1\text{H}$  à  $\delta = 5.32$ , cette résultats indique que la présence d'une molécule d'Alcène.
- Par ailleurs, le signal qui apparaît à  $\delta = 2.08$  et  $\delta=1.14$ , indique la présence de méthyle ( $\text{CH}_3$ ).
- Le signal à  $\delta = 2.46.02$  montre la présence de groupe carboxyl
- Le signal à  $\delta = 10.65$ ,  $\delta = 0.79$ , , ces résultats indiquent la présence des  $\text{RCH}_3$ .
- Le signal à  $\delta =2.2$  ppm montre la présence de molécule Benzylique.

Le spectre de RMN C du composé *B.bassiana* présente vingt signaux (figure 27) :

- Des carbones de  $\text{RCH}_3$  résonants entre  $10.695$  et  $13.802$
- Des carbones de  $\text{CH}_3\text{CO}$  résonants entre  $22.492$  et  $29.881$  ppm.
- Des carbones de  $\text{RCH}_2\text{NH}_2$  entre  $31.463$  et  $40.522$ ppm.
- Des carbones Alcynes entre  $67.452$  et  $78.753$  ppm.
- Des carbones aromatiques entre  $114.817$  et  $131.871$  ppm.
- Un carbone résonne à  $167.079$  ppm, révèle la présence d'une fraction acide ( $\text{COOH}$ ).

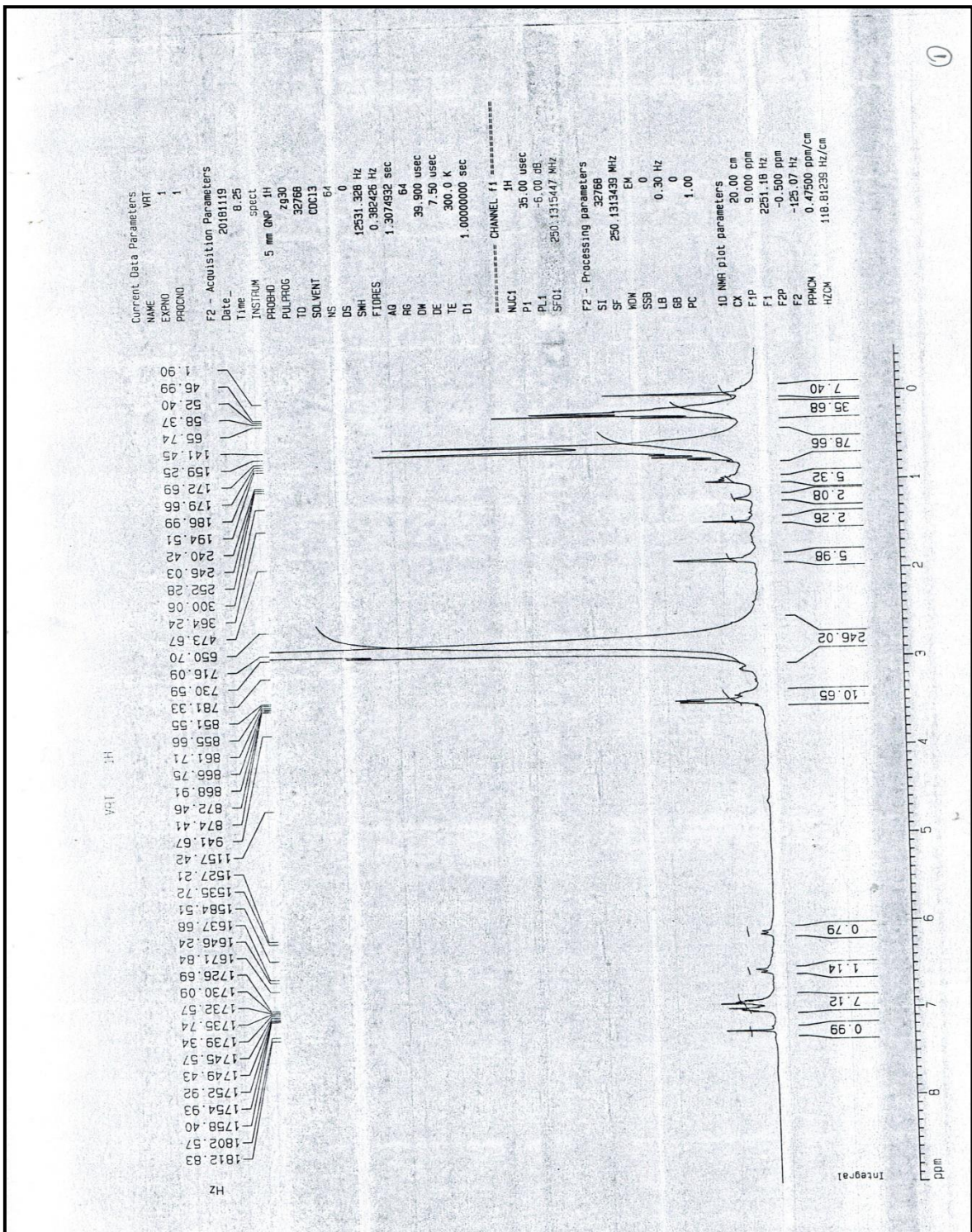


Figure 36 : Spectre RMN H<sup>1</sup> du produit de Valfalfae

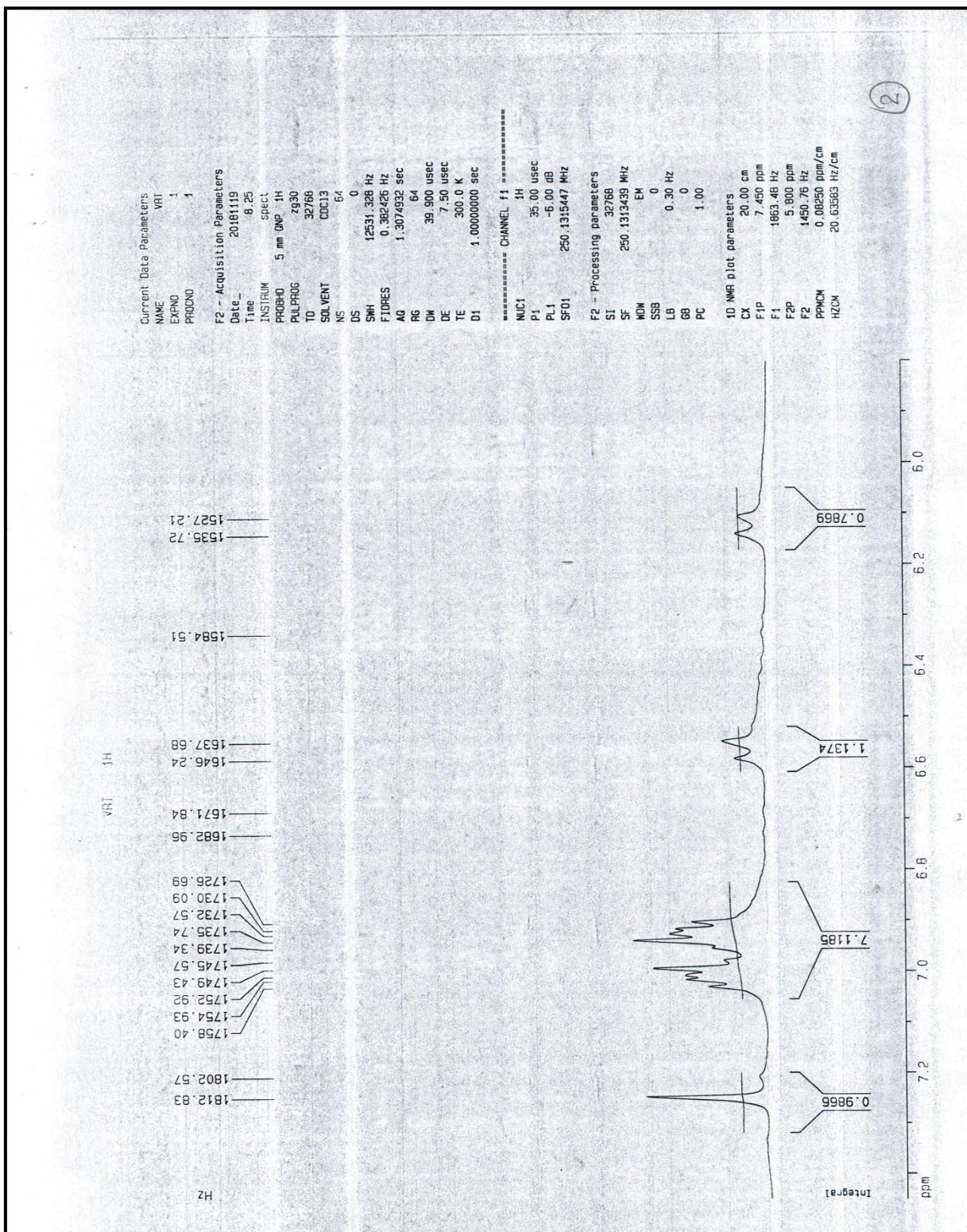


Figure 37 : Spectre RMN H<sup>1</sup> du produit de Valfalfae

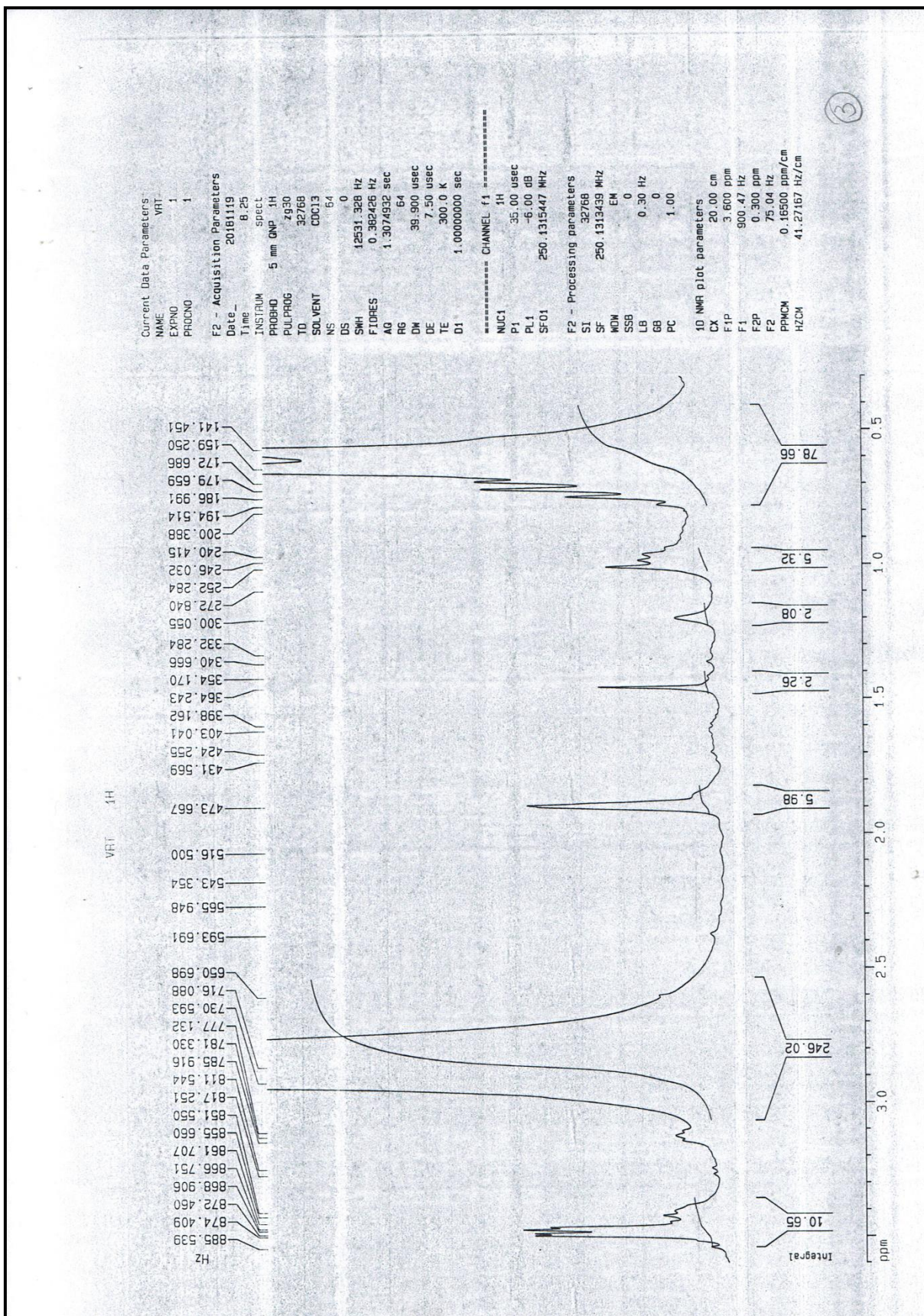


Figure 38 : Spectre RMN H<sup>1</sup> du produit de Valfalae

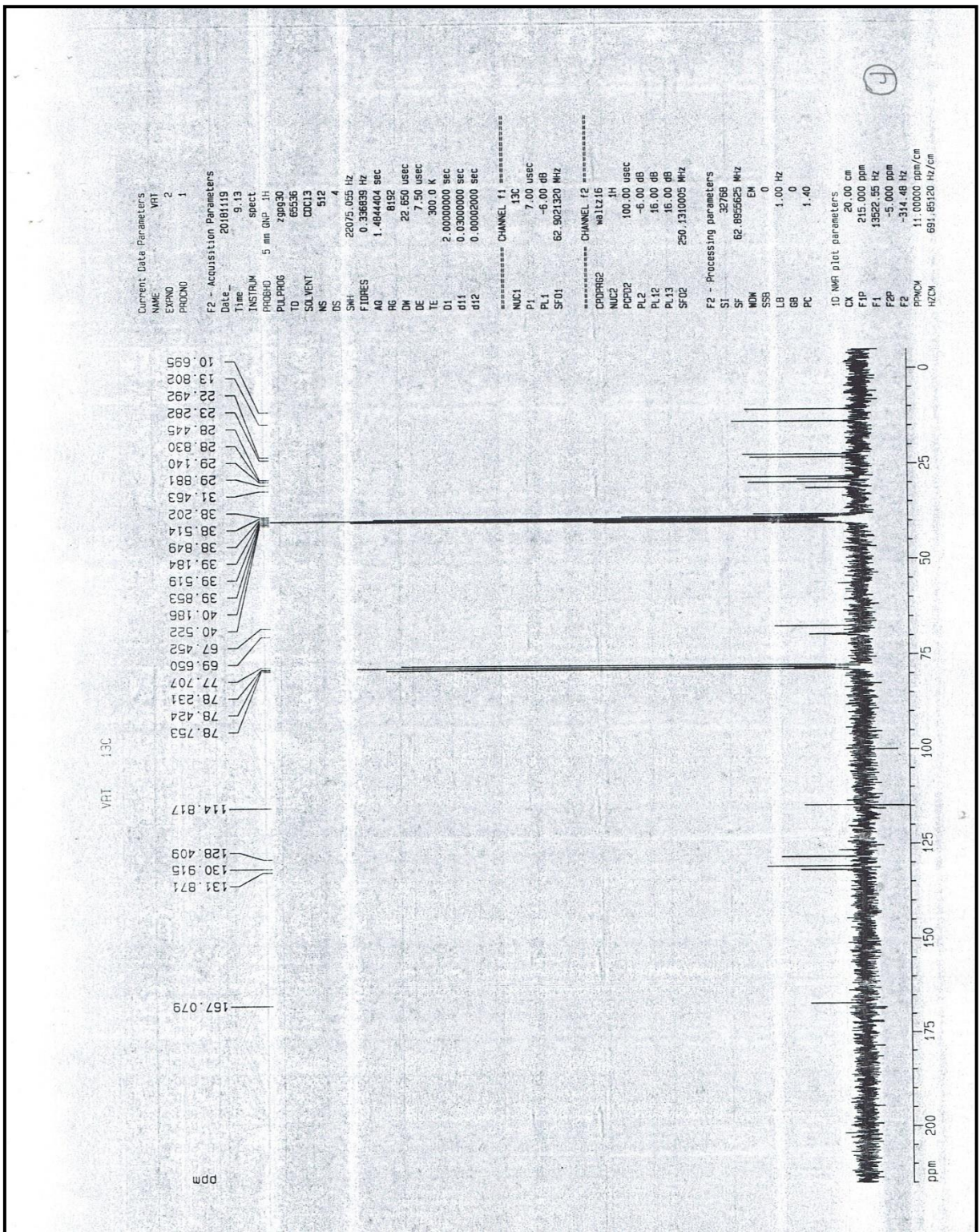


Figure 39 : Spectre RMN  $C^{13}$  du produit de *Valfalfae*

# *Valorisation des travaux des thèses*

RESEARCH

Open Access



## Pathogenicity of three entomopathogenic fungi, to the aphid species, *Metopolophium dirhodum* (Walker) (Hemiptera: Aphididae), and their Alkaline protease activities

Ouidad Abdelaziz<sup>1\*</sup>, Mohamed Mourad Senoussi<sup>2</sup>, Amar Oufroukh<sup>3</sup>, Ali Kemal Birgücü<sup>5</sup>, İsmail Karaca<sup>5</sup>, Fayza Kouadri<sup>4</sup>, Benkenana Naima<sup>6</sup> and Abderrahmane Bensegueni<sup>6</sup>

### Abstract

The aim of the present study is to investigate the effect of three entomopathogenic fungi (EPF) (*Beauveria bassiana*, *Cladosporium cladosporioides*, and *Verticillium alfalfae*) on the aphid species, *Metopolophium dirhodum* (Walker) (Hemiptera: Aphididae). The selected EPF were isolated from the agricultural soil of the National Institute of Plant Protection (INPV) in Constantine, Algeria, and were tested against the aphid insects that were collected from the same area. The aphid species *M. dirhodum* were exposed to each fungal spore suspensions  $10^7$  conidia/ml for 10 s. Percent mortality was recorded at 1, 3, 5, and 7 days post treatment. Percentage mortalities, 7 days post treatment, were 95.83, 63.98, and 51.83% by *B. bassiana*, *C. cladosporioides*, and *V. alfalfae*, respectively. The higher protease activities were observed for isolate *V. alfalfae* with 95 U/ml, followed by *B. bassiana* with 38.26 U/ml, and finally *C. cladosporioides* with 35, 65 U/ml. The results presented in this study revealed that there was no relation between high alkaline protease activities and high virulence isolates.

\*Correspondence: Ouidad Abdelaziz, o.abdelaziz@univ-bordj.dz

**Option : Microbiologie Appliquée**

**Application des champignons entomopathogènes sur les pucerons du blé.**

62 souches fongiques ont été isolées d'échantillons de sol prélevés au niveau de la parcelle (INRA/SRPV) de Constantine au cours des campagnes agricoles 2014 et 2015. 36 isolats fongiques représentant 8 genres : *Aspergillus*, *Beauveria*, *Botrytis*, *Fusarium*, *Metharizium*, *Penicillium*, *Trichoderma* et *Verticillium* ont été isolés à partir de trois sites identifiés au cours de la campagne 2014, alors que 26 isolats représentant 6 genres : *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium* et *Rhizoctonia* sont isolés à de trois autres sites identifiés au cours de la campagne 2015. La confirmation de la pathogénicité des champignons collectés et identifiés, a été réalisée par évaluation de leur aptitude à induire l'infection et/ou des mortalités au sein des colonies aphidiennes. Des tests d'entomopathogénicité de onze (11) souches entomopathogènes révèlent un effet de mortalité pour l'espèce aphidiennes *Metapolophium dirhodum*. Des mortalités de l'ordre de 90 % sont enregistrées avec le genre *Beauveria* alors que de fortes sensibilités sont observées avec les genres *Cladosporium* (60%) et *Verticillium* (50%). Cependant, une moindre pathogénicité variant de 10 à 40 % a été notée sur *M.dirhudum* avec les autres genres entomopathogènes : *Aspergillus* et *Metharizium* avec 41.67%, suivie par *Trichoderma* (31.94%), *Penicillium* (27.78 %), *Fusarium*, (20.83%) et enfin, *Alternaria*, *Botrytis* et *Rhizoctonia* ont enregistré un taux de mortalité de 13.83%. Par ailleurs, l'analyse statistique de variance (ANOVA) réalisée en fonction des jours de traitements a montré une différence hautement significative après application au 3<sup>ème</sup> jour. Les tests réalisés sur d'autres espèces de pucerons *Macrosiphum rosea*, *Myzus persicae* et *Aphis fabae* ont montré des réactions différentes aux différents traitements allant de mortalité spectaculaire (plus de 95%) à des réactions plus ou moins sensibles (50%) selon les genres utilisés. L'activité d'hydrolyse des protéines après l'ensemencement sur le milieu lait gélosé présente des zones d'hydrolyses permettant la mise en évidence de l'activité protéolytique chez trois champignons entomopathogènes (*B. bassiana*, *C. cladosporioides* et *V. alfalfae*). Les tests de chitinase réalisés sur le Milieu MCC (Milieu chitine colloïdale) ont permis la mise en évidence de l'activité chitinolytique chez les trois champignons entomopathogènes étudiés (*B. bassiana*, *C. cladosporioides* et *V. alfalfae*) avec des zones d'hydrolyse variant de 1cm à 3 cm. De diamètre et une production enzymatique plus ou moins élevée variant de 34.76 U/ml à 45.97 U/ml selon les genres étudiées. L'analyse en HPLC des cultures des 3 souches *B.bassiana*, *C.cladosporioides* et *V.alfalfae* montre que les toxines il peut être observé que de trois souches fongiques recherchés dans le surnageant de culture couvrent une large gamme de polarité et que 60 minutes sont nécessaires pour séparer l'ensemble de ces molécules. L'étude des spectres UV des pics a montré que tous ces composés présentent les caractéristiques des molécules aromatiques. A partir des spectres de RMN des trois souches fongiques, on peut pas faire la caractérisation des il est donc, difficile d'identifier les composants de nos extraits se basant seulement sur HPLC et RMN, et sans avoir recours à des méthodes de couplage, telles que la spectroscopie de masse (MS), les détecteurs à barrettes de diode (DAD).... Ect. molécules.

**Mot clés :** Champignons entomopathogènes, pucerons, protéase, chitinase .

**Membre du jury :**

**Président :**

ZELLAGUI Amar .....Pr. Université Larbi Ben M'hidi - Oum El Bouaghi.

**Rapporteur :**

SENOUSSI Mohamed Mourad .....Pr. Université Larbi Ben M'hidi - Oum El Bouaghi.

**Co-rapporteur :**

OUFROUKH Amar .....Dr. INRA . Constantine.

**Examineurs :**

DEHIMAT Laid.....Pr. Université Frères Mentouri Constantine.

NECIB Youcef .....Pr. Université Frères Mentouri Constantine.

HAMITOU Mokhtar .....MCA. Université Larbi Ben M'hidi - Oum El Bouaghi

**Présentée par :ABDELAZIZ Ouidad**

**Année universitaire : 2018-2019**