

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Constantine 1
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie



N° d'Ordre :

N° de Série :

Thèse

En vue de l'obtention du diplôme de

Doctorat 3ème cycle LMD

En Biotechnologies, Biologie et Environnement

Option : Bioprocédés et Biotechnologies, Applications Mycologiques

**Evaluation de *Metarhizium anisopliae* à titre d'agent de
lutte biologique contre les larves de moustiques**

Présentée par :

BENSERRADJ Ouafa

Soutenu : Le 13 /10/2014

Devant le jury

Président :	M ^r KACEM CHAOUCHE N.	Pr. Université Constantine 1
Directrice de thèse :	M ^{me} MIHOUBI I.	Pr. Université Constantine 1
Examineurs :	Mr BOULAHROUF A.	Pr. Université Constantine 1
	M ^r GUECHI A.	Pr. Université Farhat Abbas. Sétif
	M ^r SOLTANI N.	Pr. Université Baji Mokhtar. Annaba
Invité :	M ^r JAOUANI A.	M.C. (A). I.S.S.B.A.T. Tunisie

Année Universitaire 2014-2015

Remerciements

Je remercie Dieu tout puissant et miséricordieux de m'avoir donné santé, courage, volonté et patience pour avoir réalisé ce travail.

Avec une rigueur et un intérêt constant, Madame MIHOUBI ILHEM Professeur à l'université Constantine1 a dirigé ce travail avec beaucoup d'enthousiasme en me faisant bénéficier de ses compétences scientifiques. Je tiens à lui exprimer ma très grande reconnaissance et le témoignage de mon profond attachement pour l'attention qu'elle a portée à cette thèse, pour les encouragements, pour la confiance qu'elle m'a toujours témoignée, sa constante disponibilité et la gentillesse dont elle a fait preuve à mon égard.

J'adresse mes remerciements et exprimer ma gratitude à Mr KACEM CHAUCHE Noreddine Professeur à l'université Constantine1 qui m'a fait l'honneur d'accepter de présider ce travail sans oublier ses encouragements et ses conseils durant tout mon parcours universitaire.

Je remercie également Monsieur BOULAHROUF Abderrahmane, Professeur à l'université Constantine 1 pour avoir accepté de faire partie du jury et de juger mon travail.

Mes remerciements s'adressent également à Monsieur GUECHI Abdelhadi Professeur à l'université de Sétif et Monsieur SOLTANI Noreddine Professeur à l'université d'Annaba, pour avoir accepté d'évaluer ce modeste travail.

Merci à Mr JAOUANI Atef, Maître de conférences à l'institut Supérieur des Sciences Biologiques (I.S.S.B.A.T) de Tunis de m'honorer par sa présence dans mon jury.

Des remerciements particuliers s'adressent à Mr le Docteur ALBRIEUX Florian et son équipe de l'institut de Chimie et Biochimie Moléculaires et Supramoléculaires(ICBMS), Université Claude Bernard Lyon 1-France pour avoir accepté de m'accueillir aussi chaleureusement.

Je voudrais adresser de Sincères remerciements au Professeur PICOT Stéphane responsable du laboratoire de Mycologie Médicale, Hôpital la Croix Rousse Lyon, qui a suivi de très près la partie de biologie moléculaire de ma thèse.

Dédicaces

Je dédie ce travail en premier lieu aux êtres, les plus chers au monde : mes parents.
Quoi que je fasse je ne pourrais leur rendre ce qu'ils ont fait pour moi, si je suis arrivée là
c'est bien grâce à eux que dieu les bénisse, et leur accorde longue vie et les protège.

A mes sœurs, Dounia , Houda et Ibtissem

A mon petit frère Mohamed Wassim

A mon fiancé Mohamed Zineddine

A toute ma famille et toutes mes amies

Table des matières

Introduction générale	1
------------------------------------	---

Revue bibliographique

Chapitre I : Le champignon entomopathogène *Metarhizium anisopliae*

1. Généralités sur les champignons.....	4
2. Les champignons entomopathogènes.....	5
2.1. <i>Metarhizium anisopliae</i>	5
2.1.1. Taxonomie et classification.....	5
2.1.2. Morphologie.....	7
2.1.3 Mode d'infection.....	9
2.1.4. Production des toxines.....	13
3. Réponse immunitaire à l'infection microbienne chez l'insecte.....	14
4. Facteurs affectant l'efficacité des champignons entomopathogènes.....	15
4.1. Facteurs liés aux pathogènes.....	15
4.2. Facteurs dépendant de l'hôte.....	15
4.3. Facteurs de l'environnement.....	15
4.3.1. Rayonnement solaire.....	15
4.3.2. Température.....	16
4.3.3. Humidité.....	16
4.4. Effet du sol.....	17
5. Avantages de l'utilisation de <i>Metarhizium anisopliae</i>	18
6. Production de <i>Metarhizium anisopliae</i>	19
7. Formulation à base de champignon entomopathogène.....	20
8. Les essais biologiques et l'évaluation de l'infection	21

Chapitre II : Les Moustiques

1. Généralités sur les moustiques.....	22
1.1. Position systématiques.....	22
1.2. Bio écologie des moustiques.....	24
1.2.1. Cycle de vie.....	24
1.2.2. Comportement trophique.....	25
1.3. Intérêt dans l'écosystème.....	26
1.4. Nuisance et intérêt médical.....	26
2. Le complexe <i>Culex</i>	27
2.1. Caractères morphologiques.....	27
2.1.1. Les œufs.....	27
2.1.2. La larve.....	27
2.1.3. La nymphe.....	28
2.1.4. L'adulte.....	29
2.2. Bio écologie de <i>Culex</i>	30
2.2.1. L'œuf.....	30
2.2.2. La larve.....	30
2.2.3. La nymphe.....	31
2.2.4. L'adulte.....	32
2.3. Les principales nuisances causées par le genre <i>Culex</i>	33
2.3.1. Les piqûres.....	33
2.3.2. Transmission de maladies.....	33
3. Aperçu général sur les moyens de lutte contre les moustiques.....	34
3.1. La lutte chimique.....	34
3.2. La lutte biologique.....	36

Chapitre III : Les toxines (destruxines) élaborées *Metarhizium anisopliae*

1. Les toxines fongiques.....	38
2. Les destruxines.....	38
2.1. Définition.....	38
2.2. Nature chimique des destruxines.....	39
2.3. Toxicité des destruxines.....	40
2.4. Production des destruxines.....	44
2.5. Méthodes d'identification et de détection des destruxines.....	45
2.5.1 Chromatographie sur couche mince (CCM).....	45
2.5.2. Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC/MS).....	45

Partie expérimentale

Chapitre I : Isolement et identification du champignon entomopathogène

Metarhizium anisopliae

1. Matériel et méthodes.....	47
1.1. Prélèvement des échantillons.....	47
1.2. Milieux d'isolement.....	47
1.3. Méthode d'isolement.....	47
1.4. Purification et conservation des souches isolées.....	48
1.5. Méthodes d'identification.....	48
1.5.1. Identification macroscopique.....	48
1.5.2. Identification microscopique.....	49
1.5.2.1. Réalisation d'un montage du matériel à examiner.....	49
1.5.3. Caractérisation moléculaire des isolats de <i>Metarhizium</i>	49
1.5.3.1. Extraction de l'ADN génomique.....	49
1.5.3.2. Amplification de l'ADN fongique.....	50
1.5.3.3. Purification des produits PCR.....	52

1.5.3.4. Séquençage de l'ADN.....	52
1.5.3.5. Purification des séquences.....	53
1.5.3.6. Analyse des séquences.....	53
1.5.3.7. Comparaison des séquences avec la banque informatique.....	54
1.5.3.8. Analyse phylogénétique.....	54
1.5.3.9. Méthodes de reconstruction d'arbres phylogénétiques.....	54
2. Résultats.....	56
2.1. Isolement du champignon <i>Metarhizium anisopliae</i>	56
2.2. Identification des isolats.....	56
2.2.1. Caractères morphologiques et culturaux.....	56
2.2.2.1. Aspect macroscopique.....	57
2.2.2.2. Aspect microscopique.....	58
2.3. Amplification et séquençage de l'ARNr 18S avec des amorces universelles.....	60
2.4. Analyse phylogénétique.....	61
3. Discussion.....	63

Chapitre II : Etude de l'activité larvicide de *Metarhizium anisopliae* sur les larves de *Culex pipiens*

1. Matériel et méthodes.....	69
1.1. Matériel biologique.....	69
1.1.1. Echantillonnage.....	69
1.1.2. Méthode d'élevage.....	70
1.1.3. Conditions d'élevage.....	71
1.2. Etude de l'effet des différentes souches <i>Metarhizium anisopliae</i> sur les larves de <i>Culex pipiens</i>	71
1.2.1. Méthode d'ensemencement du champignon entomopathogène.....	71

1.2.2. Méthode de préparation de la solution entomopathogène	71
1.2.3. Réalisation des bio tests.....	72
1.2.3.1. Protocole expérimental.....	72
1.3. Analyse statistique.....	73
1.3.1. Analyse de la variance.....	73
1.3.2. Le test Newman Keuls.....	73
1.3.2. Analyse Probit.....	74
2. Résultats.....	74
2.1. La souche <i>Metarhizium anisopliae</i> (M1).....	74
2.1.1. Taux de mortalité.....	74
2.1.2. Analyse de la variance.....	76
2.1.3. Calcul de la DL ₅₀	79
2.1.4. Calcul des TL ₅₀	80
2.2. La souche <i>Metarhizium anisopliae</i> (M2).....	82
2.2.1. Taux de mortalité.....	82
2.2.2. Analyse de la variance.....	83
2.2.3. Calcul de la DL ₅₀	85
2.2.4. Calcul des TL ₅₀	86
2.3. La souche <i>Metarhizium anisopliae</i> (M3).....	88
2.3.1. Taux de mortalité.....	88
2.3.2. Analyse de la variance.....	90
2.3.3. Calcul de la DL ₅₀	91
2.3.4. Calcul des TL ₅₀	93
2.4. La souche <i>Metarhizium anisopliae</i> (M5).....	94
2.4.1. Taux de mortalité.....	94
2.4.2. Analyse de la variance.....	96
2.4.3. Calcul de la DL ₅₀	98

2.4.4. Calcul des TL ₅₀	99
3. Discussion.....	101

**Chapitre III : Production et identification des toxines (Destruxines) élaborées par
*Metarhizium anisopliae***

1. Matériel et méthodes	107
1.1. Production des destruxines.....	107
1.1.1. Préculture.....	107
1.1.2. Fermentation.....	107
1.1.3. Extraction.....	107
1.2. Identification des destruxines.....	108
1.2.1. Analyse par HPLC.....	108
1.2.2. Analyse par Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC/MS)	109
1.2.2.1. Analyses LC-ESI-MS et LC-APCI-MS.....	110
1.2.2.2. Conditions opératoires des paramètres d'ionisation.....	113
1.2.3. La spectrométrie de masse en tandem (MS/MS).....	113
2. Résultats.....	115
2.1. Fermentation.....	115
2.2. Extraction.....	116
2.3. Identification et caractérisation des destruxines.....	117
2.3.1. Analyse par HPLC.....	117
2.3.2. Analyse par LC/MS et LC/MS ² /MS.....	119
2.3.2.1. Analyse par LC/MS.....	120
2.3.2.2. Analyse par LC/MS/MS.....	131
3. Discussion.....	133

Conclusion générale et perspectives	137
Références bibliographiques	140
Annexes	166

Liste des Figures

Figure 1: (A) : observation en microscope électronique des conidies et des hyphes de *M.anisopliae*, (B) : Culture de *M.anisopliae* sur SDA, (C) Aspect microscopique de *M.flavoviride*, (D) : Culture de *M.flavoviride* sur SDA.

Figure 2: Aspect morphologique de *Metarhizium anisopliae*

Figure 3: Aspect microscopique de *Metarhizium anisopliae*

Figure 4: (A) Conidies de *M.anisopliae var anisopliae*, (B) Conidies de *M.anisopliae var majus*

Figure 5: Le cycle biologique des champignons entomopathogènes

Figure 6: Mode de pénétration des champignons entomopathogènes dans la cuticule de l'insecte

Figure 7: Insectes infectés par *Metarhizium anisopliae* (muscardine verte)

Figure 8: Les compartiments des écosystèmes terrestres où *B.bassiana* et *M.anisopliae* se produisent naturellement

Figure 9: Classification des *Culicidae*s ou moustiques

Figure 10 : Cycle biologique des moustiques

Figure 11: Aspect des œufs de *Culex sp*

Figure 12: Morphologie générale d'une larve de 4ème stade de Culicinae

Figure 13: Aspect général d'une nymphe de Culicinae

Figure 14: Morphologie du moustique adulte vu de profil

Figure 15 : Œufs de *Culex pipiens*

Figure 16 : Larves de *Culex pipiens*

Figure 17: Nymphe de *Culex* ou imago

Figure 18: *Culex* adulte ou imago

Figure 19: Structure chimique des destruxines

Figure 20 : Formule générale des destruxines

Figure 21: Structure chimique des analogues des destruxines

Figure 22: Arbre phylogénétique

Figure 23 : Gîte larvaire utilisé dans l'étude

Figure 24 : Méthode d'élevage des moustiques

Figure 25: Protocole expérimental mettant en évidence de l'effet de *Metarhizium anisopliae* sur la mortalité des larves L4 de *Culex pipiens*

Figure 26: Pourcentage de mortalité des larves de *Culex pipiens* après 10 jours de traitement par *Metarhizium anisopliae* (M1)

Figure 27: Efficacité de *Meatrhzium anisopliae* (M1) vis-à-vis des larves de *Culex pipiens*

Figure 28: Efficacité de *Meatrhzium anisopliae* (M1) dans le temps vis-à-vis les larves traitées par les différentes doses (D1, D2, D3, D4 et D5)

Figure 29: Pourcentage de mortalité des larves de *Culex pipiens* après 10 jours de traitement par *Metarhizium anisopliae* (M2)

Figure 30: Efficacité de *Meatrhzium anisopliae* (M2) vis-à-vis des larves de *Culex pipiens*

Figure 31 : Efficacité de *Meatrhzium anisopliae* (M2) dans le temps vis-à-vis les larves traitées par les différentes doses (D1, D2, D3, D4 et D5)

Figure 32: Pourcentage de mortalité des larves de *Culex pipiens* après 10 jours de traitement par *Metarhizium anisopliae* (M3)

Figure 33: Efficacité de *Meatrhzium anisopliae* (M3) vis-à-vis des larves de *Culex pipiens*

Figure 34: Efficacité de *Meatrhzium anisopliae* (M3) dans le temps vis-à-vis les larves traitées par les différentes doses (D1, D2, D3, D4 et D5)

Figure 35: Pourcentage de mortalité des larves de *Culex pipiens* après 10 jours de traitement par *Metarhizium anisopliae* (M5)

Figure 36 : Efficacité de *Meatrhzium anisopliae* (M5) vis-à-vis des larves de *Culex pipiens*

Figure 37: Efficacité de *Meatrhzium anisopliae* (M5) dans le temps vis-à-vis les larves traitées par les différentes doses (D1, D2, D3, D4 et D5)

Figure 38: Système Hplc couplé à la spectrométrie de masse

Figure 39: Principe d'un spectromètre de masse

Figure 40: (A) source d'ionisation electrospray (ESI-MS), (B) source d'ionisation à pression atmosphérique (APCI-MS)

Figure 41: Schéma d'une source électrospray

Figure 42 : Principe de fonctionnement d'un analyseur à temps de vol

Figure 43: Principe général d'un spectromètre de masse MS/MS

Figure 44: Les différents sites de fragmentation à l'intérieur d'un peptide de quatre acides aminés

Figure 45 : Développement morphologique de *Metarhizium anisopliae* sur milieu de fermentation en formant des billes

Figure 46: Extraction des métabolites secondaires de *Metarhizium anisopliae* par le dichlorométhane.

Figure 47: Extrait brut de la souche *Metarhizium anisopliae*.

Figure 48 : Les conditions analytiques du système Hplc.

Figure 49: Chromatogramme Hplc des 4 souches de *Metarhizium anisopliae*, A) la souche M1, B) la souche M3, C) la souche M2, D) la souche M5.

Figure 50: Séparation des molécules par HPLC, (a) la souche M1, (b) la souche M5.

Figure 51A : Spectres de masse obtenus par ESI-MS en mode positif pour le composé 1 de la souche M5.

Figure 51B : Spectres de masse obtenus par APCI-MS en mode positif pour le composé 1 de la souche M5.

Figure 52A : Spectres de masse obtenus par ESI-MS en mode positif pour le composé 2 de la souche M5

Figure 52B : Spectres de masse obtenus par APCI-MS en mode positif pour le composé 2 de la souche M5

Figure 53A : Spectres de masse obtenus par ESI-MS en mode positif pour le composé 3 de la souche M5

Figure 53B : Spectres de masse obtenus par APCI-MS en mode positif pour le composé 3 de la souche M5

Figure 54A : Spectres de masse obtenus par ESI-MS en mode positif pour le composé 4 de la souche M5

Figure 54B : Spectres de masse obtenus par APCI-MS en mode positif pour le composé 4 de la souche M5

Figure 55A : Spectres de masse obtenus par ESI-MS en mode positif pour le composé 5 de la souche M5

Figure 55B : Spectres de masse obtenus par APCI-MS en mode positif pour le composé 5 de la souche M5

Figure 56A : Spectres de masse obtenus par ESI-MS en mode positif pour le composé 6 de la souche M5

Figure 56B : Spectres de masse obtenus par APCI-MS en mode positif pour le composé 6 de la souche M5

Figure 57A: Spectres de masse obtenus par ESI-MS en mode positif pour le composé 7 de la souche M5

Figure 57B : Spectres de masse obtenus par APCI-MS en mode positif pour le composé 7 de la souche M5

Figure 58A : Spectres de masse obtenus par ESI-MS en mode positif pour le composé 8 de la souche M5

Figure 58B : Spectres de masse obtenus par APCI-MS en mode positif pour le composé 8 de la souche M5

Figure 59A: Spectres de masse obtenus par ESI-MS en mode positif pour le composé 9 des souches M1 et M5

Figure 59B : Spectres de masse obtenus par APCI-MS en mode positif pour le composé 9 des souches M1 et M5

Figure 60A : Spectres de masse obtenus par ESI-MS en mode positif pour le composé 10 des souches M1 et M5

Figure 60B : Spectres de masse obtenus par APCI-MS en mode positif pour le composé 10 des souches M1 et M5

Figure 61A: Spectres de masse obtenus par ESI-MS en mode positif pour le composé 11 des souches M1 et M5

Figure 61B: Spectres de masse obtenus par APCI-MS en mode positif pour le composé 11 des souches M1 et M5

Figure 62A: Spectres de masse obtenus par ESI-MS en mode positif pour le composé 12 des souches M1 et M5

Figure 62B: Spectres de masse obtenus par APCI-MS en mode positif pour le composé 12 des souches M1 et M5

Liste des Tableaux

- Tableau 1** : Position systématique des moustiques
- Tableau 2** : Différentes formes de destruxines
- Tableau 3** : Activités insecticides des différentes destruxines
- Tableau 4** : Composition du milieu réactionnel PCR
- Tableau 5** : Les cycles d'amplification employés (PCR)
- Tableau 6** : Composition du Mix EXOSAP
- Tableau 7** : Programme EXOSAP (PCR)
- Tableau 8** : Composition Kit Big Dye
- Tableau 9** : Programme PCR (Kit Big Dye)
- Tableau 10** : Les échantillons de sol et leurs sites de prélèvement
- Tableau 11** : Aspects macroscopiques des quatre souches isolées cultivées sur les milieux (ODA, PDAY et SDAY)
- Tableau 12** : Aspects macroscopiques des quatre souches isolées
- Tableau 13** : Affiliation phylogénétiques des quatre souches isolées
- Tableau 14** : Pourcentage moyen de mortalité des larves de *Culex pipiens* traitées par *Metarhizium anisopliae* (M1)
- Tableau 15** : Analyse de la variance
- Tableau 16** : Classement des moyennes pour le facteur Dose (*Metarhizium anisopliae* (M1))
- Tableau 17** : Classement des moyennes pour le facteur Temps (*Metarhizium anisopliae* (M1))
- Tableau 18** : Logarithmes décimaux des doses et Probits des taux de mortalités au 1^{ier} jour
- Tableau 19** : Transformation du temps en Logarithme décimal et les pourcentages de mortalité cumulés des larves en Probits
- Tableau 20** : Equations des droites de régressions et valeurs des TL₅₀ pour chaque dose de traitement utilisée
- Tableau 21** : Pourcentage moyen de mortalité des larves de *Culex pipiens* traitées par *Metarhizium anisopliae* (M2)
- Tableau 22** : Analyse de la variance
- Tableau 23** : Classement des moyennes pour le facteur Dose (*Metarhizium anisopliae* (M2))
- Tableau 24** : Classement des moyennes pour le facteur Temps (*Metarhizium anisopliae* (M2))

Tableau 25 : Logarithmes décimaux des doses et Probits des taux de mortalités au 3^{ème} jour

Tableau 26 : Transformation du temps en Logarithme décimal et les pourcentages de mortalité cumulés des larves en Probits

Tableau 27 : Equations des droites de régressions et valeurs des TL₅₀ pour chaque dose de traitement utilisée

Tableau 28: Pourcentage moyen de mortalité des larves de *Culex pipiens* traitées par *Metarhizium anisopliae* (M3)

Tableau 29 : Analyse de la variance

Tableau 30: Classement des moyennes pour le facteur Dose (*Metarhizium anisopliae* (M3))

Tableau 31 : Classement des moyennes pour le facteur Temps (*Metarhizium anisopliae* (M3))

Tableau 32 : Logarithmes décimaux des doses et Probits des taux de mortalités au 3^{ème} jour

Tableau 33 : Transformation du temps en Logarithme décimal et les pourcentages de mortalité cumulés des larves en Probits

Tableau 34 : Equations des droites de régressions et valeurs des TL₅₀ pour chaque dose de traitement utilisée

Tableau 35 : Pourcentage moyen de mortalité des larves de *Culex pipiens* traitées par *Metarhizium anisopliae* (M5)

Tableau 36 : Analyse de la variance

Tableau 37 : Classement des moyennes pour le facteur Dose (*Metarhizium anisopliae* (M5))

Tableau 38 : Classement des moyennes pour le facteur Temps (*Metarhizium anisopliae* (M5))

Tableau 39 : Logarithmes décimaux des doses et Probits des taux de mortalités au 1^{ier} jour

Tableau 40 : Transformation du temps en Logarithme décimal et les pourcentages de mortalité cumulés des larves en Probits

Tableau 41 : Equations des droites de régressions et valeurs des TL₅₀ pour chaque dose de traitement utilisée

Tableau 42 : Programme gradient utilisé pour l'analyse et la séparation du métabolite

Tableau 43 : Fragmentations des ions observées par APCI-QTOF-MS des destruxines

Liste des Abréviations

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ARN : Acide Ribonucléique

ARNm : Acide Ribonucléique Messenger

APCI: Atmospheric Pressure Chemical Ionization

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

CID : Collisional Induced Dissociation (Dissociation induite par collision)

DL₅₀ : Dose létale suffisante pour tuer 50% des individus

DTX : Destruxines

ESI : Electrospray Ionization

HPLC : Chromatographie liquide à haute performance

ITS : Internal Transcribed Spacer (Espaceur Interne Transcrit)

LC/MS : Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse

MS : Spectrométrie de masse

MS/MS : Spectrométrie de masse en tandem

m/z : Rapport masse sur charge

MEGA : Molecular Evolutionary Genetics Analysis

O.M.S : Organisation Mondiale de la Santé

PCR : Polymerase Chain Reaction

Q-TOF : Analyseur quadripolaire couplé à un analyseur à temps de vol

rpm: Rotation par minute

TL₅₀ : Temps léthal suffisant pour tuer 50% des individus

TOF : Analyseur à temps de vol

Introduction générale

En Algérie, comme partout dans le monde les moustiques ont toujours été considérés comme source de nuisance pour l'homme, principalement en raison du fait qu'ils peuvent être des vecteurs de maladies. Les femelles en période de reproduction ont besoin de sang pour le développement des œufs, le repas sanguin nécessaire à la maturation des œufs peut occasionner chez l'hôte une vive irritation cutanée, pouvant même aller jusqu'à de graves réactions allergiques chez certaines personnes. Ce mode d'alimentation peut également être responsable de la transmission d'agents pathogènes qui peuvent provoquer des maladies chez l'homme ou chez les animaux (Maire et Aubin, 1980; Belloncik *et al.*, 1982; Belloncik *et al.*, 1983; Wood, 1985). Parmi les espèces connues dans la transmission des maladies à l'homme, nous citons celles appartenant aux genres *Culex*, *Aedes* et *Anopheles*.

Afin de lutter contre ces insectes piqueurs, il devient de plus en plus nécessaire de chercher des moyens pour réduire les populations de ceux-ci. C'est ainsi qu'a commencé l'essor des insecticides chimiques, après la deuxième guerre mondiale, avec la découverte des propriétés du DDT (dichlorodiphényltrichloroéthane) par Paul Hermann Müller en 1939 de la famille des organochlorés. Cet insecticide de première génération a rendu de nombreux services en réduisant voire en éradiquant le paludisme dans certains pays. Des succès importants étaient tout d'abord observés parmi les plus marquants, citons les résultats obtenus dans la lutte antipaludique: de 300 millions de cas annuel en 1946, ont été réduits à 120 millions de cas en 1976 (Brown *et al.*, 1976). Par la suite, les avancées de l'industrie chimique et l'essor de l'agriculture intensive ont permis le développement d'une deuxième génération d'insecticides, représentée par trois grandes familles : les organophosphorés (téméphos, malathion), les carbamates (carbaryl, propoxur) et les pyréthrinoïdes de synthèse (perméthrine, deltaméthrine). Ces insecticides chimiques agissent tous au niveau du système nerveux des insectes, soit en bloquant l'acétylcholinestérase (organophosphorés et carbamates) soit en perturbant le fonctionnement des canaux sodium (organochlorés et pyréthrinoïdes). Cependant, les premières difficultés n'allaient pas tarder à être rencontrées : l'apparition de gènes de résistance aux différents groupes chimiques insecticides, notamment, dans de nombreuses populations Culicidiennes vectrices du paludisme, de la filariose de Bancroft et de certaines arboviroses (Chauvet, 1978).

Selon le comité d'experts des insecticides OMS (1970), chez les *Culicidae* : 19 espèces sont devenues résistantes dont 16 au DDT, 12 à la dièldrine et 9 aux composés organophosphorés (y compris *Culex pipiens* et *Aedes aegypti*). Parmi les 38 espèces d'anophèles devenues résistantes à un ou plusieurs insecticides, 36 le sont à la dièldrine et 15 au DDT (y compris *Anopheles stephensi*).

Par ailleurs, en plus des phénomènes de résistance auxquels se heurtait l'utilisation des produits chimiques (Hamon *et al.*, 1972), s'ajoutait le manque de spécificité de ces derniers. Depuis, il est devenu de plus en plus nécessaire d'accorder une priorité aux insecticides microbiologiques comme moyen de lutte contre les insectes nuisibles.

A l'heure actuelle, les recherches les plus prometteuses en matière de lutte contre les diptères piqueurs portent sur la production et l'emploi de parasites (protozoaires, nématodes) et d'agents pathogènes d'insectes piqueurs (virus, bactéries, champignons). Dans ce domaine, ces organismes sont nettement supérieurs aux prédateurs étant donné, dans la majorité des cas, qu'ils s'attaquent exclusivement aux diptères piqueurs (spécificité) et qu'ils n'ont pas à se trouver une autre source d'alimentation lorsque les diptères disparaissent, car leur cycle de vie est adapté à celui de ces derniers (Wood, 1985). Un grand nombre d'entre eux sont encore testés à titre expérimentale. Ceux-ci sont élaborés à partir d'organismes vivants, souvent pathogènes envers l'insecte visé. Mis en présence de son hôte, l'organisme provoquera la mort de l'insecte. Il peut également s'agir des métabolites fabriqués par un pathogène et qui sont introduits dans le milieu fréquenté par l'espèce cible. Contrairement aux insecticides chimiques, ces organismes pathogènes possèdent généralement une haute spécificité et ne persistent que peu de temps dans l'environnement.

Parmi ces organismes, les champignons entomopathogènes méritent une attention particulière et pourraient être utilisés dans cette lutte biologique (Lacey et Undeen, 1986). Ils jouent un rôle considérable dans la régulation des populations d'insectes (Roberts, 1973; Ferron, 1975). L'un des plus intéressants appartient à la classe des *Ascomycètes* : il s'agit de *Metarhizium anisopliae* connu comme agent pathogène sur plus de 8 ordres d'insectes (Veen, 1968; Samuels *et al.*, 1989). En effet, lors de l'invasion de l'insecte par les hyphes du champignon, des métabolites toxiques sont émis par le pathogène. Ces métabolites accélèrent la mort de l'hôte (Vey *et al.*, 1986; Ignoffo, 1988; Ravallec *et al.*, 1989). La pathogénicité de *Metarhizium anisopliae* sur les larves de moustiques a été mise en évidence par plusieurs auteurs dans le monde (Ramoska, 1981 ; Daoust et Roberts, 1982 ; Scholte *et al.*, 2004 ; Seye *et al.*, 2012).

En Algérie, de nombreux travaux ont eu pour objectif l'étude des différents moyens de lutte, biologique ou conventionnelle, utilisés contre les moustiques. Parmi ces travaux, citons ceux entrepris par Soltani *et al.*,(1999) concernant l'utilisation de deux insecticides chimiques, à savoir l'Alsyntine et le Triflumuron. Quant aux études visant l'activité larvicide des microorganismes, rappelons celle de Mansouri *et al.*,(2013) consacrée à l'utilisation de *Bacillus thuringiensis* sur les larves de *Culex pipiens*. Cependant, à notre connaissance aucun travail en Algérie concernant l'évaluation de l'activité larvicide du champignon entomopathogène *Metarhizium anisopliae* sur les larves de *Culex pipiens* n'a été publié à ce jour.

Dans ce contexte, notre contribution par cette étude est orientée vers un objectif visant à évaluer l'effet entomopathogène de ce champignon sur les larves de l'espèce *Culex pipiens*, espèce de moustique présentant le plus d'intérêt, en Algérie, en raison de sa large répartition géographique, de son abondance et de sa nuisance réelle, surtout dans les zones urbaines.

La première partie de notre travail est consacrée à la description de données bibliographiques relatives à l'entomopathogène *Metarhizium anisopliae*, aux moustiques d'une manière générale et enfin aux toxines produites par ce même champignon.

La seconde partie est consacrée au travail expérimental et est structurée en trois chapitres composés chacun 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 du champignon entomopathogène *Metarhizium anisopliae* à partir de différents sols agricoles céréaliers dans la région de Constantine et son identification par l'utilisation des techniques morphologiques et moléculaires

➤ Dans le chapitre 2, nous nous intéressons à la mise en évidence de l'activité larvicide de *Metarhizium anisopliae* sur les larves de *Culex pipiens*

➤ Le dernier chapitre regroupe les étapes de séparation et de caractérisation des toxines élaborées par *Metarhizium anisopliae* par application de la technique chromatographique liquides à haute performance (HPLC), et analyse structurale de ces toxines par des techniques de spectroscopie (Spectrométrie de masse simple et spectrométrie de masse en tandem)

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

Revue bibliographique

Chapitre I : Le champignon entomopathogène *Metarhizium anisopliae*

1. Généralités sur les champignons

Les champignons (fungi ou mycètes) constituent un groupe d'organismes hétérotrophes ubiquistes, riche de quelques 120000 espèces, présentant des structures et des caractéristiques biologiques extrêmement diversifiées, adaptées au mode de vie saprophyte, parasitaire ou symbiotique (Senal *et al.*, 1993 ; Anonyme a, 2000 ; Anonyme b, 2000 ; Kirk *et al.*, 2001).

Les champignons sont des microorganismes eucaryotes 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 champignon 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 champignons 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 s'entourent d'une paroi cellulaire rigide formée de polymère de chitine et des polymères de la cellulose, éléments chimiques qui lui confèrent une grande rigidité, une longévité et une grande capacité de résistance à la chaleur et à des pressions osmotiques élevées. De ces faits, les champignons sont donc capables de vivre dans un environnement rude (Tortora *et al.*, 2003). En effet, les champignons 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).

2. Les champignons entomopathogènes

Les agents pathogènes sont des organismes vivants pouvant engendrer une maladie à leur hôte. Les pathogènes des insectes appelés entomopathogènes comprennent : les bactéries (ex : *Bacillus thuringiensis*, *B. sphaericus*), les protozoaires (ex : *Amoebidae*), les virus (ex : Entomopox virus) et les champignons qui font l'objet de notre étude.

Parmi les micro-organismes utilisés en lutte biologique, plus de 700 espèces de microchampignons sont entomopathogènes (Starnes *et al.*, 1993) et jouent un rôle important dans la régulation naturelle des populations d'insectes (Ferron, 1978 ; Wraight et Roberts, 1987). Ils appartiennent au sous-taxon des *Mastigomycotina*, *Zygomycotina*, *Ascomycotina* et *Deuteuromycotina*. Le plus grand nombre de pathogènes se trouvent dans la classe des Zygomycètes, mais les plus utilisées en lutte biologique proviennent des Deuteromycètes (*Fungi imperfecti*). Ces derniers appartiennent aux champignons à hyphes septés, se multipliant de façon non sexuée. Les espèces des genres *Beauveria*, *Metharizium*, sont les plus utilisées en lutte biologique (Wraight et Roberts, 1987; Goettel, 1992) et ont un intérêt agronomique considérable dans la lutte biologique contre les ravageurs de cultures et sont donc l'objet d'études de plus en plus poussées.

2.1. *Metarhizium anisopliae*

Metarhizium anisopliae était le premier pathogène utilisé délibérément pour le contrôle des insectes ravageurs par le Russe Eli Metchinnicoff (le père de la lutte microbiologique) dans les années 80. Il a été isolé et identifié sur la paille de céréale près d'Odessa en Ukraine sous le nom *Anisopliae austria* ou il l'a nommé *Entomophthora anisopliae*. En 1883 Sorokin assigna ce champignon à la muscardine verte au genre *Metarhizium*. Depuis il est connu sous le nom de *Metarhizium anisopliae*.

2.1.1. Taxonomie et Classification

La classification de *Metarhizium anisopliae* a été sujette à plusieurs révisions au cours des dernières années. Par le passé, l'espèce a été classée principalement sous la division des Deutéromycètes, dans la classe des Hyphomycètes. Les membres de cette sous-division ayant comme spécificité le fait de ne jamais produire, ou très rarement, des spores sexuées.

Cette classe est en fait caractérisée par la présence de formes mycéliennes portant des spores asexuées, appelées conidies, engendrées sur des cellules conidiogènes spécialisées.

Par contre, à l'heure actuelle, la plupart des mycologistes n'acceptent plus les *Deuteromycota* et ses sous-classes comme formant un assemblage taxonomique. Plusieurs espèces de champignons ont été associées avec des membres de la division des *Ascomycota* sur une base d'homologie d'ADN, dont l'espèce *M.anisopliae* (Inglis *et al.*, 2001). Cette espèce fait dès lors partie du règne des *Mycota*, de la division des *Ascomycota* et de l'ordre des *Hypocreales*.

La classification de ce genre a été basée sur des caractères morphologiques des cellules et des conidies, et comme ces caractéristiques sont assez limitées elles ont compliqué la taxonomie. (Bidochka et Small, 2005).

- **Règne :** *Fungi*
- **Embranchement :** Dikarya
- **Sous-embranchement :** *Ascomycota*
- **Classe :** Pezizomycotina
- **Ordre :** *Hypocreales*
- **Famille :** *Clavicipitaceae*
- **Genre :** *Metarhizium*
- **Espèce :** *Metarhizium anisopliae*

La première révision de ce genre a été faite par Tulloch (1976), où il a utilisé les caractéristiques morphologiques des conidies pour distinguer entre deux formes de *Metarhizium* ; à savoir *Metarhizium flavoviride* et *Metarhizium anisopliae* (Figure1). Ce dernier a été subdivisé en deux variétés ; *Metarhizium anisopliae var anisopliae* et *Metarhizium anisopliae var majus*

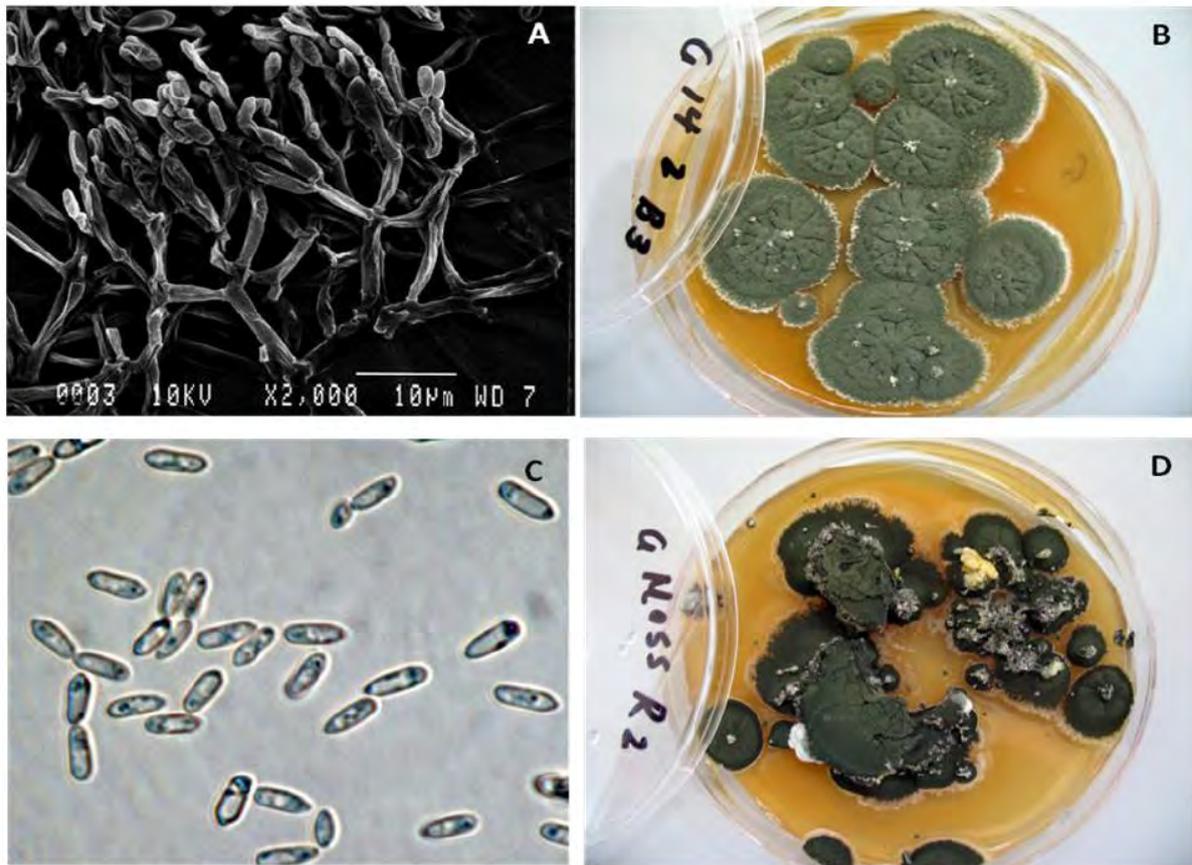


Figure 1: (A) Observation en microscope électronique des conidiophores et des hyphes de *Metarhizium anisopliae* (B) Culture de *M. anisopliae* sur Sauboraud dextrose agar (SDA) à 25 °C, (C) Aspect microscopique des Conidies de *M. flavoviride* (X100) (D) Culture de *M. flavoviride* sur Sauboraud dextrose agar (SDA) à 25°C. Photo Credits: (A) Fumio Ihara, National Institute of Fruit Tree Science, Japan. (B, D) T. Goble, Rhodes University, South Africa. (C) Dan Johnson, University of Lethbridge, Canada.

2.1.2 Morphologie

Les caractéristiques taxonomiques dominantes sont les traits morphologiques des structures de sporulation. Le genre *Metarhizium* est défini par l'agencement des chaînes porteuses de phialides, des colonies de conidies cylindriques ou légèrement ovotides, sèches et généralement de couleur verte. Les colonies sont formées d'une agrégation de ces chaînes conidiennes (Zimmerman, 2007). *Metarhizium anisopliae* apparaît blanc lorsqu'il est jeune et il devient vert foncé après la maturation des spores (Figure 2).



Figure 2 : Aspect morphologique de *Metarhizium anisopliae*
(Ihara *et al.*, 2001)

Cette espèce est caractérisée par des conidiophores de longueur variable, sont relativement courts, irrégulièrement ramifiés ou non et arrangés en groupes compacts formant une masse de spores (Figure3), les spores étant allongées avec des cotés parallèles (Bischoff *et al.*, 2009).

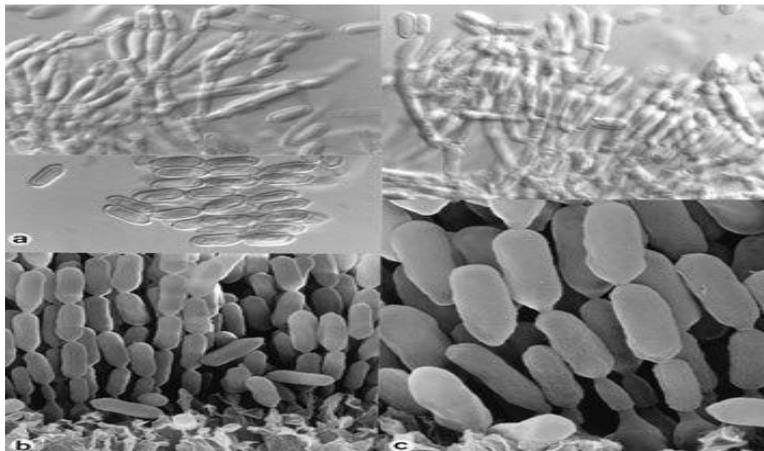


Figure 3 : Aspect microscopique de *Metarhizium anisopliae*, a. x1600; b. x2800; c. x7000
(Bischoff *et al.*, 2009)

Il existe deux formes de *Metarhizium anisopliae* dont la différence se base sur la taille des conidies : (1) la forme *Metarhizium anisopliae var. anisopliae* à spores courtes, dont les conidies mesurent de 5 à 8 μm de longueur et (2) la forme *Metarhizium anisopliae var. majus* à spores longues, dont les conidies mesurent de 10 à 14 μm de longueur (Figure 4).

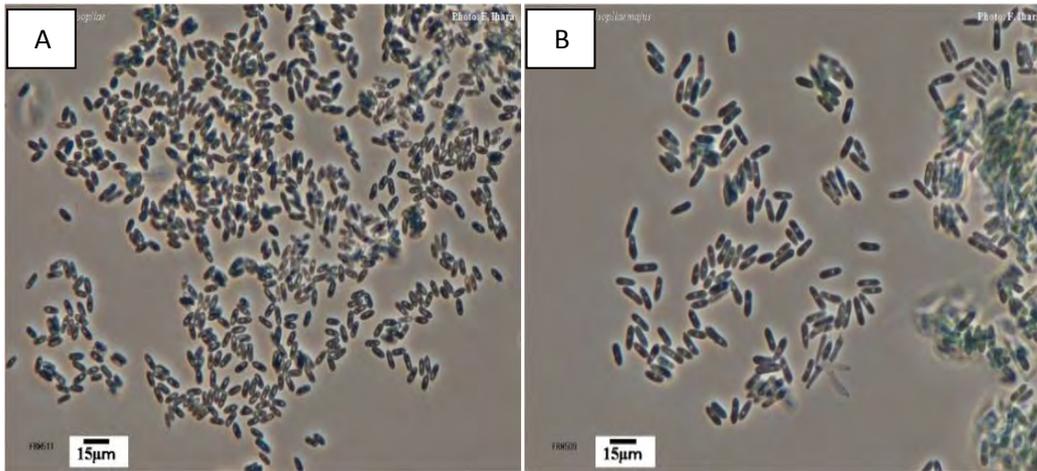


Figure 4: (A) Conidies de *Metarhizium anisopliae* var *anisopliae* , (B) Conidies de *Metarhizium anisopliae* var *majus* (Tulloch ,1976)

2.1.3. Mode d'infection

Généralement, les champignons entomopathogènes tuent ou réduisent la vigueur des hôtes qu'ils infectent. Ces ennemis naturels 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. Aussi, 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 est une barrière structurellement et chimiquement complexe pour la pénétration du champignon. L'épicuticule contient une protéine stable au phénol et est couverte d'une couche cireuse contenant des acides gras, des lipides et des stérols (Andersen, 1979). La procuticule contient de nombreuses fibrilles de chitine enfouies dans une matrice protéinique. Celle-ci peut représenter jusqu'à 70 % du poids sec de la cuticule.

Contrairement aux autres microorganismes (virus, bactéries, nématodes, protozoaires) où l'infection de l'hôte découle de leur ingestion obligatoire, 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, l'unité infectieuse du champignon, germe et pénètre au travers du tégument en combinant des pressions mécaniques et enzymatiques (St Leger, 1993).

Le champignon croît rapidement dans l'hémocoèle. Les insectes susceptibles 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 pathogenèse (Ferron *et al.*, 1993). Le mode d'infection des champignons entomopathogènes se divise en quatre étapes distinctes: **l'adhésion, la germination, la pénétration et la dissémination** (Figure 5).

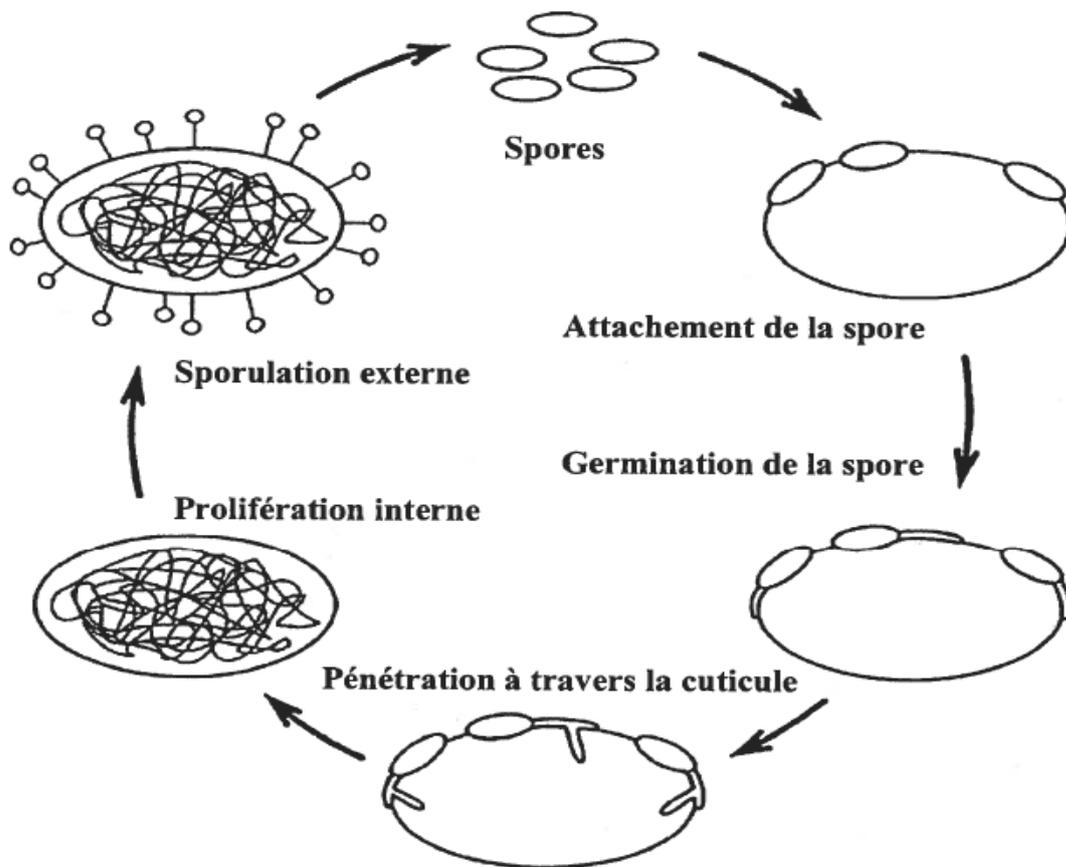


Figure 5. Schéma du cycle biologique des champignons entomopathogènes (Ferron *et al.*, 1993)

- **Phase d'adhésion** : L'adhésion est la première étape du processus d'infection. Les spores entrent en contact passivement avec les insectes à l'aide des agents naturels tels que le vent et l'eau. L'adhésion est déclenchée par un mécanisme de reconnaissance et de compatibilité des spores avec le tégument de l'insecte.

L'infection est initiée à travers le tégument de l'insecte-hôte (Khachatourians, 1991; Tanada et Kaya, 1993), mais les spores peuvent aussi entrer par le système respiratoire (Clark *et al.*, 1968), le tube alimentaire (Miranpuri et Khachatourians, 1991) et la cavité buccale (Siebeneicher *et al.*, 1992). L'attachement des spores à la cuticule est donc assujéti aux forces hydrophobiques non spécifiques et aux charges électrostatiques (Boucias *et al.*, 1988 ; Butt, 1990). Cependant, des systèmes de reconnaissance spécifiques, dont des polysaccharides fongiques extracellulaires, des lectines et des enzymes extracellulaires, ont été identifiées sur la surface de la spore et peuvent être impliqués dans l'attachement de celle-ci (Boucias *et al.*, 1991; Napolitano et Juárez, 1997). Par exemple, Grula *et al.*, (1984) ont démontré que les hémagglutinines de la surface des spores sont inhibées par différents sucres haptènes (ex. glucose, glucosamine et N-acétylglucosamine). Ainsi, l'incubation des spores avec ces sucres réduit leur affinité à l'insecte. Une fois en contact avec la cuticule, la spore produit activement un mucilage hygroscopique qui permet la modification de l'épicuticule de l'insecte facilitant la germination des spores et peut aussi créer un environnement favorable aux enzymes exo- cellulaires libérées par ces dernières (Boucias *et al.*, 1991).

➤ **Phase de germination** : La seconde phase d'infection est la germination. Celle-ci dépend de l'état physiologique de l'hôte et aussi des conditions environnementales, notamment la température et l'humidité (Butt et Becket, 1994 ; Butt *et al.*, 1994). La germination aboutit à la production d'appressoria, structures terminales servant à l'ancrage de la cuticule et favorisant la pénétration. La valeur nutritive de la cuticule joue un rôle important pour la production d'appressoria. Cependant, des études ont démontré qu'une cuticule nutritive favorise la croissance mycélienne plutôt que la pénétration (Magelhaes *et al.*, 1981 ; Ferron *et al.*, 1993). La germination *in vitro* se produit en réponse aux sources de carbone (ex. glucose, glucosamine, chitine et amidon) et/ou d'azote (St Leger *et al.*, 1986a, 1986b). Cependant, les acides gras et les lipides situés au niveau de l'épicuticule peuvent aussi influencer la germination de spores (Lecuona *et al.*, 1997). La germination dépend de la tolérance aux composants potentiellement toxiques au niveau de l'épicuticule (ex. acides gras à chaîne courte, phénols) (St Leger *et al.*, 1990) et de l'antagonisme de la fore saprophyte sur la cuticule de l'insecte (Charnley, 1989).

➤ **Phase de pénétration** : La pénétration de *Metarhizium anisopliae* dans l'hôte s'effectue généralement à travers les orifices naturels, la cuticule ou bien par l'ingestion. En présence d'un niveau élevé d'azote et de carbone, le tube germinatif continue de s'allonger et forme un hyphe (St Leger *et al.*, 1992). Comme plusieurs autres champignons filamenteux, la dureté de la surface, l'hydrophobicité, la topographie et les nutriments disponibles influencent la différenciation d'une structure infectieuse ou appressorium. Le développement de l'appressorium implique l'activation de l'AMPc et la libération de Ca_2 comme signaux moléculaires intracellulaires (St Leger *et al.*, 1990). La pénétration est réalisée par pression mécanique et hydrolyse enzymatique (Goettel *et al.*, 1989) (Figure 6).

Précisément, l'hyphe fongique sécrète des enzymes extracellulaires telles que les protéases, les lipases et les chitinases, qui attaquent et dissolvent la cuticule, permettant aux spores de pénétrer à travers la cuticule et de se développer dans le corps de l'insecte (Hajek et St Leger, 1994). Ces enzymes correspondent aux différents polymères de la cuticule, des protéines, des chitines et des lipides de l'insecte (Charnley et St Leger, 1991). Les protéases sont les plus importantes enzymes extracellulaires et jouent un rôle primordial dans la pénétration (Campos *et al.*, 2005).

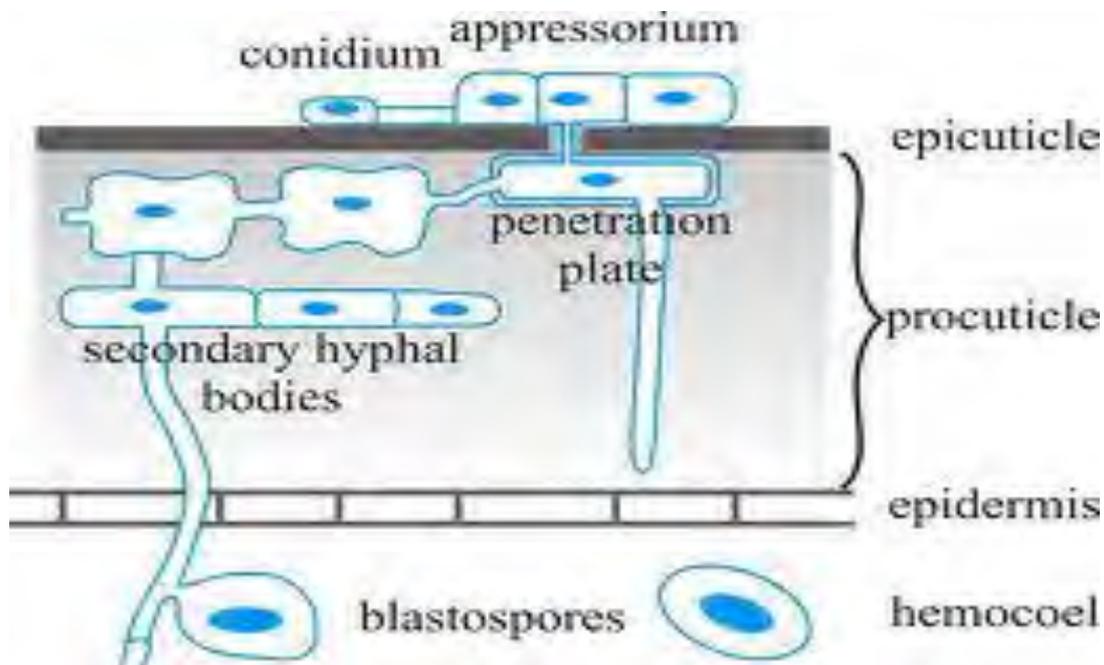


Figure 6: Mode de pénétration des champignons entomopathogènes dans la cuticule des insectes (Clarkson and Charnley, 1996)

➤ **Phase de dissémination** : Une fois que le champignon a franchi avec succès la cuticule et a percé l'épiderme adjacent de la cuticule, il entre dans le système circulatoire ouvert de l'insecte, l'hémocoèle. Le champignon se multiplie par la suite à l'intérieur de tous les organes de l'insecte-hôte et il s'accroît sous forme de blastospores. Ceci peut faciliter la dispersion et la colonisation de l'hémocoèle et optimise l'assimilation rapide des nutriments. Il semble qu'une utilisation efficace des sucres sanguins est nécessaire pour une croissance optimale du pathogène. Bien que le glucose joue un rôle central dans le métabolisme de l'insecte, il est généralement présent à très faibles concentrations.

2.1.4. Production des toxines

Une fois que le champignon atteint l'hémocoèle, il entame la production d'hyphes qui circuleront à travers l'hémolymphe pour ce faire le champignon doit surmonter les mécanismes immunitaires de l'hôte. L'espèce *Metarhizium anisopliae* produit des composés toxiques non enzymatiques tels que les Destruxines (DTX) et les cytochalasmes qui lui permettent de surmonter les mécanismes de défense de l'hôte et de proliférer (Inglis *et al.*, 2001). Les toxines ont des effets divers sur différents tissus d'insectes. Les DTX dépolarisent la membrane du muscle de l'insecte en activant les canaux calcium. En outre la fonction des hémocytes d'insectes peut être empêchée par les DTX (Bradfish, 1990).

Sous les conditions optimales la mort de l'insecte survient normalement entre 3 à 5 jours à partir du moment de l'infection.

Une fois l'insecte meurt, l'espèce produit un antibiotique : l'oosporine qui lui permet de surmonter la compétition des bactéries saprophytes dans le tube intestinal de l'insecte (Inglis *et al.*, 2001). Le champignon entame alors une phase saprophytique. Les spores sont produites par les conidiophores qui émergent du cadavre, préférentiellement au niveau inter segmentaire si les conditions environnementales sont adéquates. Le cadavre est alors couvert par un feutrage mycélien vert nommé Muscardine constitué d'hyphes et de conidiophores portant des conidies (Figure 7). La phase saprophytique ne dépend pas de l'humidité relative par contre elle est influencée par la température (Ferron, 1977).



Figure 7 : Insectes infectés par *Metarhizium anisopliae* (Muscardine verte)
(Boucias et Pendland , 1998)

3. Réponse immunitaire à l'infection microbienne chez l'insecte

Les insectes fournissent un exemple particulier d'une immunité naturelle, dite non spécifique, qui n'implique pas les lymphocytes et les anticorps comme chez les mammifères (Fugita, 2002 ; Hoffmann et Reichhart, 2002). Afin d'empêcher l'invasion par les agents pathogènes, les insectes ont développé, au cours de leur évolution, différents mécanismes de défense. D'ailleurs, la colonisation de l'hémocoèle est strictement dépendante de l'aptitude de l'agent infectieux à surmonter les mécanismes immunitaires de défense de l'insecte (Ferron *et al.*, 1993). L'arsenal défensif des insectes est constitué de barrières structurelles passives comme la cuticule. Le tégument chitineux de l'insecte constitue donc une barrière primaire efficace contre l'invasion par la majorité des micro-organismes. En absence de blessure, La principale voie d'infection des insectes par les bactéries, les virus et les parasites, est le tube alimentaire. Cependant, comme marqué précédemment, les champignons entomopathogènes ont l'habilité de pénétrer à travers la cuticule pour établir l'infection.

En plus des barrières passives, il existe une cascade de réponses actives lorsque les pathogènes ont atteint l'hémocoèle de l'insecte (Hoffmann et Reichhart, 2002). Ces réponses actives incluent la mélanisation, les réactions cellulaires (ex. phagocytose, encapsulation), les réactions humorales (ex. phénoloxidase, lectines) et la production des inhibiteurs de protéases (Gillespie *et al.*, 2000). Les antigènes microbiens sont reconnus par le système immunitaire naturel de l'insecte grâce a des unités répétitives constituées de polysaccharides trouvés dans les glycoprotéines de la surface microbienne.

4. Facteurs affectant l'efficacité des champignons entomopathogènes

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

4.1 Facteurs liés aux pathogènes

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

4.2 Facteurs dépendant de l'hôte

Il est maintenant reconnu que tous les stades de développement de l'insecte, de l'oeuf jusqu'à l'adulte, peuvent être sensibles à l'infection fongique. Par exemple *P. fumosoroseus* est trouvé à l'état naturel sur une large gamme d'hôtes (plus de 40 espèces d'insectes appartenant à 8 ordres) dont les Homoptères et parmi eux les aleurodes.

L'épizootie fongique survient généralement à de fortes densités de la population hôte favorisant ainsi la probabilité de contact entre le pathogène et l'hôte, de même qu'entre les insectes infectés et non infectés (Ferron *et al.*, 1991).

4.3 Facteurs de l'environnement

L'efficacité des champignons entomopathogènes contre les insectes est souvent influencée par des conditions environnementales.

4.3.1. Rayonnement solaire

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

Il ya des différences significatives dans la sensibilité aux radiations, les micro habitats jouent un rôle important en augmentant la persistance des conidies fongiques en fournissant l'ombre des arbres (Inglis *et al.*,2001).

Malgré son effet nocif sur la persistance des conidies, la lumière peut stimuler certaines étapes du cycle évolutif des champignons entomopathogènes cultivés *in vitro* ou *in vivo* (Silvy et Riba, 1989). De plus, afin d'assurer une protection contre ces rayons, les coelomycètes, tels que le genre *Aschersonia*, produisent des cellules conidiogènes dans des pycnides fortement pigmentés (McCoy *et al.*, 1990).

4.3.2. Température

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

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

4.3.3. Humidité

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

Un certain nombre d'études a indiqué que les conditions sèches juste après l'application des champignons entomopathogènes sont moins pathogènes car les souches de *Metarhizium* et *Beauveria* peuvent germer et infecter efficacement les insectes à une basse humidité à condition qu'il y ait suffisamment d'humidité dans les microhabitats (Inglis *et al.*, 2001). L'humidité relativement élevée dans les endroits abrités fournit un micro-environnement favorable pour le développement des spores (Liu *et al.*, 2003).

Les effets de la température et de l'humidité sont intimement reliés d'où la tolérance de quelques champignons à des températures extrêmes lorsqu'il y a plus d'humidité ou lorsque la condensation se produit aisément et la perte d'eau est réduite au minimum. Le vent peut aussi modifier de manière significative l'humidité microclimatique et considérablement influencer le comportement fongique (McCoy *et al.*, 1990).

4.4 Effet du sol

Le sol constitue un réservoir naturel pour les insectes infectés par des mycètes fongiques sur le feuillage qui plus tard tombent sur le sol (Keller et Zimmermann, 1989). En effet, les champignons dans le sol sont protégés contre la dessiccation, le rayonnement ultraviolet et les températures extrêmes (McCoy *et al.*, 1990). En général, la simple présence des microflore dans le sol peut influencer l'efficacité des entomopathogènes (Grodén et Lockwood, 1991).

Comprendre l'écologie des champignons entomopathogènes dans l'environnement, en particulier le sol est une chose importante, nécessaire pour l'application correcte de ces champignons dans le champ. Meyling et Eilenberg (2007) fournissent un diagramme schématique (Figure 8) qui détermine l'écologie de *Beauveria* et de *Metarhizium* dans le sol et comment ces espèces sont dispersées ainsi que leur cycle dans l'environnement.

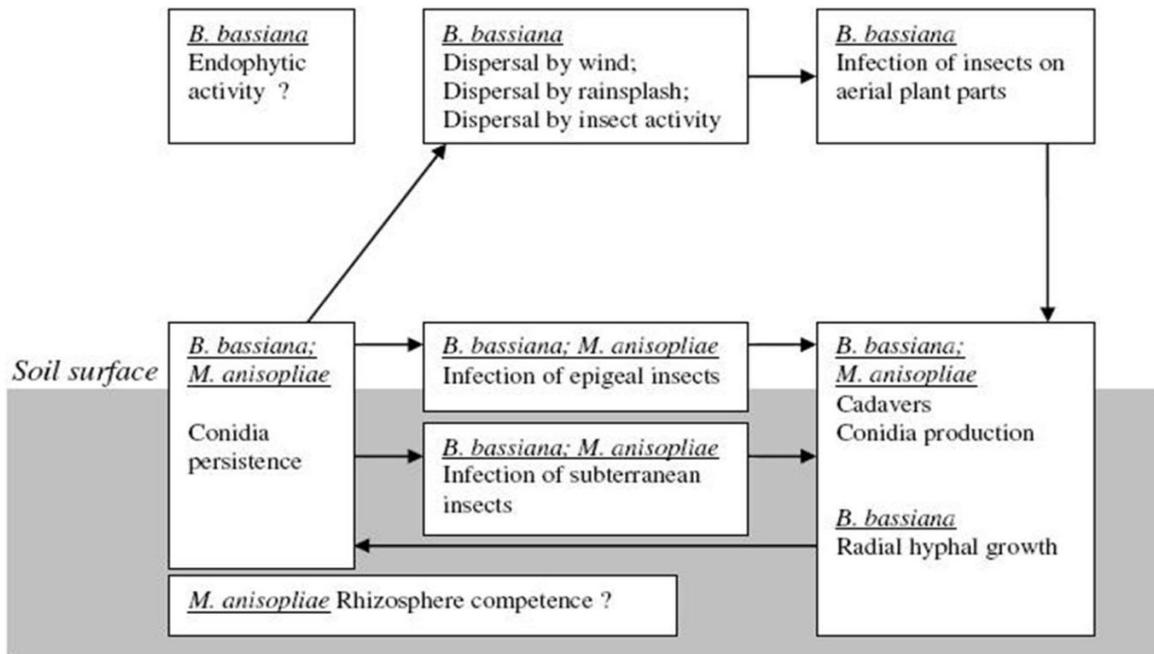


Figure 8: Les compartiments des écosystèmes terrestres tempérés où *B. bassiana* et *M. anisopliae* se produisent naturellement (Meyling et Eilenberg, 2007)

5. Avantages de l'utilisation de *Metarhizium anisopliae*

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

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

Le champignon *M. anisopliae* comporte d'autres avantages. En effet, son activité insecticide est plus rapide que d'autres agents entomopathogènes et sa durée de conservation est longue. De plus sa production exige des milieux de culture relativement peu dispendieux. Son application s'effectue à l'aide d'équipements standards, et ses effets sur les insectes bénéfiques et les organismes non ciblés sont nuls à négligeables (Zimmermann 2007). Le champignon *M. anisopliae* peut infecter l'hôte par ingestion ou par simple contact, contrairement aux autres agents entomopathogènes, qui doivent être ingérés pour infecter (Cloutier et Cloutier 1992). Ce mode d'action particulier rend tous les stades (œuf, larve, adulte) sensibles. De plus, les conidies peuvent persister dans l'environnement par la propagation des enzooties ou des épizooties.

6. Production de *Metarhizium anisopliae*

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

Selon les conditions de croissance, trois types de spores peuvent être produits par le champignon. Lorsqu'il croît en milieu solide, *M. anisopliae* produit des conidies aériennes. En milieu liquide, il produit surtout des blastospores, des conidies submergées (Jenkins *et al.*, 1998). Les blastospores sont généralement de grande taille que les conidies et tendent à avoir une durée de vie plus courte que celles-ci lors de l'entreposage (Vega *et al.*, 2003). Chez les champignons *M. anisopliae* et *Hirsutella thompsonii*, les blastospores ont une stabilité limitée et sont moins virulentes que les conidies (Hegedus *et al.*, 1990). De plus, les blastospores sont plus sensibles à la dessiccation que les conidies (Burgess, 1998). Pour ces raisons, les formulations contenant des conidies sont plus souvent utilisées sur le terrain.

Les champignons entomopathogènes peuvent être produits de différentes façons : par méthode simple en sacs plastiques en utilisant comme milieu du riz stérile, des grains concassés de maïs, de l'orge ou d'autres produits, en fermentation liquide ou en fermenteurs semi-solides.

La production en milieu solide présente l'avantage qui est facile à réaliser et que les conidies produites ont tendance à être plus tolérantes à la dessiccation et plus stables que les spores produites en culture liquide. Malheureusement, les méthodes de fermentation solide présentent de nombreuses contraintes techniques et économiques (problèmes de stérilisation de substrats, échanges de gaz, contrôle de température, maintien d'une culture pure et récupération du produit à partir du substrat). La fermentation liquide est une méthode plus économique. Elle assure un environnement nutritionnel homogène et les facteurs environnementaux (pH, température, aération) sont facilement contrôlés par rapport à la fermentation solide.

Plusieurs paramètres de croissance doivent être considérés afin d'obtenir de grandes quantités de spores et une forte virulence de celles-ci. Il a été démontré que la température d'incubation est un paramètre important lors de la production de champignons. La température optimale peut varier non seulement entre les espèces de champignons, mais aussi entre les isolats de la même espèce (Jenkins *et al.*, 1998 ; Lopez-Lastra *et al.*, 2002 ; Mondal et Bhattacharya, 2004). Pour *Nomuraea rileyi*, un autre entomopathogène, la température optimale pour la croissance optimale du mycélium se situe entre 22 et 26°C (Edelstein *et al.*, 2004).

D'autres part, une étude a démontré que la production de conidies de *M. anisopliae* était plus importante à 20°C qu'à 23°C (Nelson *et al.*, 1996). Le niveau d'humidité peut aussi influencer la croissance et la sporulation de *M. anisopliae*. Des degrés d'humidité différents ont permis la production de conidies. La photopériode normale (Nelson *et al.*, 1996) ou à un cycle de lumière/obscurité de 12 :12 (Kamp et Bidochka, 2002) pourrait aussi affecter la production de conidies.

7. Formulation à base de champignons entomopathogènes

Pour obtenir les conditions optimales de production, on doit considérer non seulement le rendement en conidies, mais aussi la stabilité des conidies. Les formulations granulées peuvent être obtenues soit par enrobage des spores préalablement récoltées (Leland et Behle, 2005), soit par croissance et sporulation du champignon à la surface d'un support nutritif granulé.

Ce premier procédé, déjà appliqué à de nombreux microorganismes auxiliaires, facilement industrialisable, est encore insuffisamment éprouvé au champ pour les champignons entomopathogènes et ses perspectives d'utilisation agronomique ne peuvent pas être précisément estimés.

Les produits formulés, contenant de matériels tels que de protecteurs UV, d'huiles, d'humectants et de nutriments pour stimuler la germination et la croissance des spores, ont un grand potentiel pour obtenir des meilleurs résultats (Bateman, 1994; Burges, 1998 ; Goettel *et al.*, 2000 ;Wraight *et al.*,2001). Par exemple, les huiles permettent une meilleure adhésion et un épandage adéquat des spores sur la cuticule hydrophobique de l'insecte (Ibrahim *et al.*, 1999). De plus, les conidies des champignons entomopathogènes formulées dans l'huile végétale pure et en présence d'adjuvants semblent être plus résistantes aux radiations UV que les conidies non-formulées (Alves *et al.*,1998 ; Moore *et al.*, 1993).

8. Les essais biologiques et l'évaluation de l'infection

Les tests biologiques ou les bio tests sont une forme d'expérimentation pour l'estimation de la puissance d'une substance ou comparant l'efficacité de deux ou de plusieurs substances par le biais de la réaction qui suit leur application à la matière vivante (Rangaswamy, 1995).

En entomologie, le sujet (hôte) peut être un insecte, le stimulus peut être un pesticide ou un agent microbien et la réponse peut être le changement dans les caractéristiques des insectes en termes de poids, de forme, de taille, d'appétit, de comportement ou de la mort. La virulence peut être mesurée dans un essai biologique en exposant un nombre connu d'hôtes à un nombre connu d'agents pathogènes et en observant le nombre de morts au cours du temps (Reichelderfer, 1993).

Chapitre II : Les Moustiques

1. Généralités sur les moustiques

1.1. Position systématique

Le moustique est le nom commun des insectes de la famille des *Culicidés* qui forme le sous ordre des nématocères dans l'ordre des diptères (Tableau 1). Leur corps est élancé et ils possèdent de longues antennes à plus de six articles. Leurs pattes sont fines et longues. Seules les femelles sont hématophages.

Tableau 1 : Position systématique du moustique (Berchi, 2000)

Classification	Dénomination	Signification
Règne	Animalia	Etre vivant hétérotrophe (se nourrissant de matière organique)
Sous règne	Metazoa	Organisme eucaryote pluricellulaire
Embranchement	Arthropoda	Corps segmenté (métamère) pourvu d'un squelette externe (cuticule)
Sous- embranchement	Hexapoda	Possèdent trois paires de pattes articulées
Classe	Insecta	Corps composé de trois parties(tête, thorax, abdomen) et d'une paire d'antennes
Sous-classe	Pterygota	Adulte possédant deux paires d'ailes
Infra-classe	Neoptera	Ailes pourvues d'un champ jugal et repliées en arrière au repos
Super-ordre	Holometabola	Larves et adultes différent radicalement. La larve est aptère et grandit sans changer de forme.
Ordre	Diptera	Une seule paire d'aile assure la fonction de vol, la deuxième assure la stabilité de l'insecte lors du vol (balanciers)
Sous-ordre	Nematocera	
Famille (Meigen,1818)	Culicidae	Non vernaculaire : Moustiques

La famille des *Culicidés* se divise en trois sous-familles : les *Culicinae*, les *Anophelinae* et les *Toxorhynchitinae* (Figure 9). Cette dernière est formée d'un seul genre n'est pas représentée en Europe occidentale (Duchauffour,1976;Matille,1993) ni en Afrique Méditerranéenne (Brunhes *et al.*, 1999). Environ 3500 espèces sont décrites de part le monde (Marquardt *et al.*, 2005), dont trois-quarts environ sont originaires des zones subtropicales et tropicales humides.

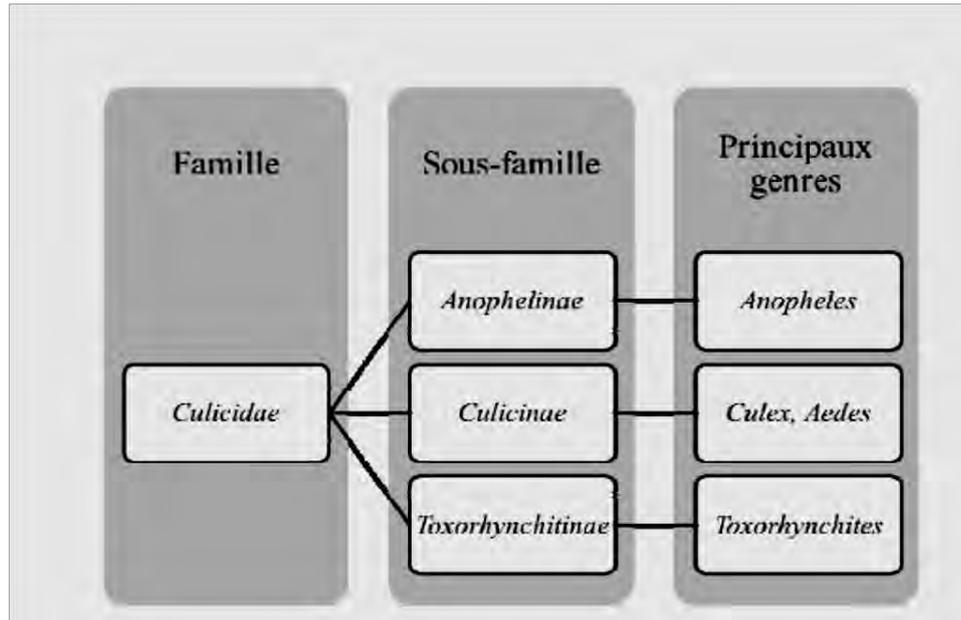


Figure 9 : Classification des *Culicidae* ou moustiques (Anopheles Group, 2012)

Une liste taxonomique rapportée par Brunhes *et al.*,(1999) mentionne 66 espèces présentes en Algérie. Elles appartiennent à deux sous-familles, (*Culicinae* et *Anophelinae*) et se répartissent en 6 genres : *Anopheles* (Meigen,1818), *Culex* (Linnaeus,1758), *Culiseta* (Felt,1904), *Aedes* (Meigen,1818), *Orthopodomyia* (Theobalt,1904) et *Uranotaenia* (Lynch Arribalzaga,1891)

1.2. Bio écologie des moustiques

1.2.1. Cycle de vie

Les moustiques ont une métamorphose complète, ils sont holométaboles. Ils sont présents sur tous les continents sauf en Antarctique, à proximité de pièces d'eau stagnantes, nécessaires au développement de stades immatures (Lehane, 1991; Clements, 1999).

Les moustiques se développent dans deux milieux radicalement différents en fonction de leur stade de vie : aérien au stade imaginal (adulte) et aquatique aux stades larvaires et nymphals (Figure 10) (Clements, 1992).

Les individus immatures passent par quatre stades de développement larvaires successifs, qui se nourrissent principalement de microorganismes, algues et débris. Ils ont une respiration aérienne qui se fait à l'aide d'un siphon (*Culicinae*) ou des stigmates respiratoires (*Anophelinae*). Après un stade nymphal de transformation complète de l'organisme (Insecte holométabole), l'imago émerge pour investir le milieu aérien.

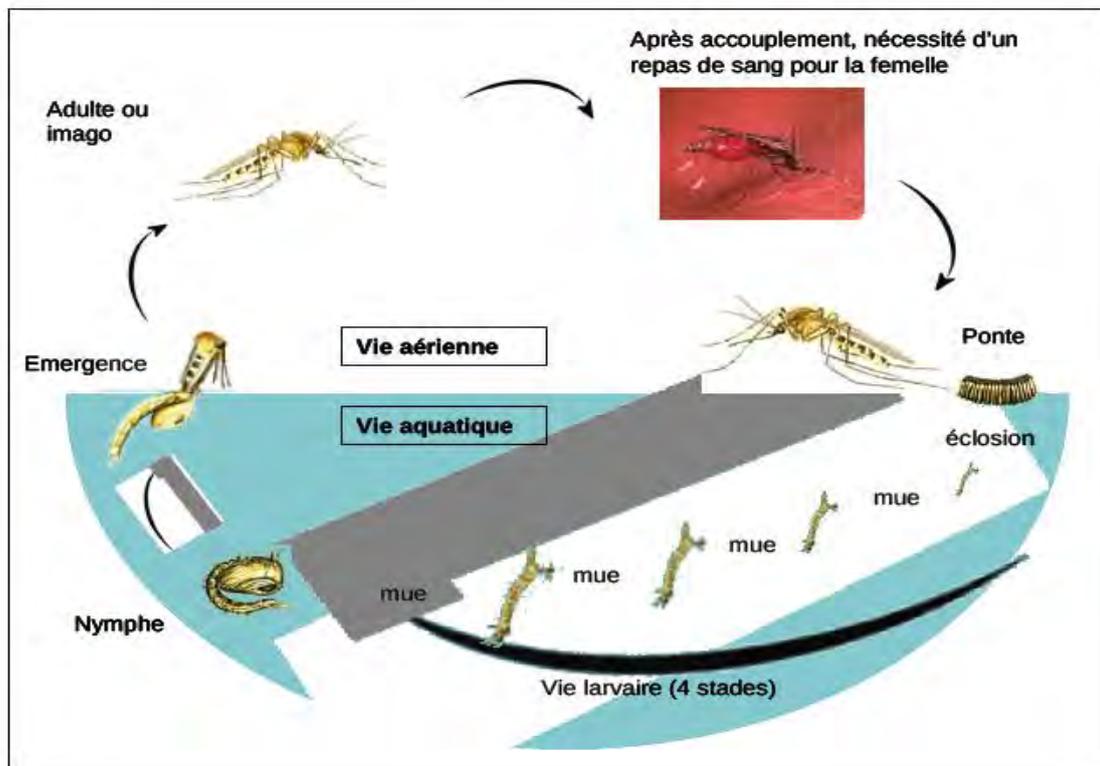


Figure 10: Cycle biologique des moustiques (Berchi, 2000)

De l'éclosion de l'œuf au stade adulte, le cycle dure environ 15 à 20 jours, lorsque les conditions de température et de nourriture sont favorables.

Les moustiques respirent à la surface de l'eau l'oxygène aérien, sauf pour les genres *Coquillettidia* (Dyar,1905) et *Mansonia* (Blanchard,1901) qui puisent l'oxygène circulant dans les racines de certaines plantes aquatiques.

Les *Culex* pondent leurs œufs groupés, collés les uns aux autres formant une "nacelle" flottante. Les *Anopheles* pondent leurs œufs un à un à la surface d'eau généralement claires, ombragées ou ensoleillées, herbacées ou non. Les œufs d'*Aedes* sont pondus isoler dans l'eau ou sur des supports secs, car ils sont résistants à la sécheresse et peuvent attendre la mise en eau plusieurs mois. Ils éclosent très rapidement dès qu'ils sont immergés (Rioux, 1958).

1.2.2. Comportement trophique

Les adultes se nourrissent de nectar de plantes, et après accouplement la femelle recherche un animal vertébré pour effectuer un repas de sang nécessaire au développement des œufs. Les femelles de certaines espèces peuvent toutefois pondre sans avoir pris de repas de sang, il s'agit alors d'une ponte autogène. Certains comportements imaginaires peuvent présenter un intérêt pratique (Rioux et Cousserans,2008).

Les différences de modes d'accouplement permettent de distinguer des espèces *eurygames* et *sténogames*. Les premières ont besoin de grands espaces pour effectuer leur vol nuptial (*Aedes detritus* Haliday, 1833). Par contre, les espèces dites *sténogames* s'accouplent au sol, sur la végétation érigée (*Aedes coluzii*) ou sur les murs des grottes et des habitations (*Culex pipiens* Linné,1758).

L'étendue des aires de dispersion dépend des capacités de déplacement, propres à chaque espèce (portée de vol de quelques mètres pour *Culex pipiens*, de plusieurs kilomètres pour *Aedes caspius* et *Aedes detritus*) et du vent. Mais, quelque soit l'espèce, les plus fortes densités s'observent généralement au voisinage des gîtes larvaires, ainsi dans les milieux ouverts ou la présence de vent est importante, les adultes trouvent un abri dans les arbustes les plus proches.

Certaines espèces, qui évoluent habituellement à l'extérieur (*exophiles*), peuvent pénétrer dans les habitations pour se nourrir (*endophiles*) et digérer le repas sanguin ou pour hiverner (*gites de diapause*). Les espèces de moustiques sont plus nombreuses dans les zones tropicales et équatoriales que dans les régions tempérées car ces insectes supportent mal les écarts thermiques.

Les femelles de moustiques n'ayant jamais pris de repas sanguin sont parfois capables de donner une première ponte fertile. Ce phénomène, observé pour la première fois par Théobald en 1901, est signalé par Roubaud (1929), qui lui attribue le nom d'autogenèse par opposition à l'anautogenèse qui est la nécessité de prendre un repas de sang pour produire une première ponte.

1.3. Intérêts dans l'écosystème

Les moustiques représentent un maillon essentiel dans le fonctionnement d'un écosystème aquatique. En effet, par sa présence en grand nombre, ils représentent une biomasse importante dont se nourrissent de nombreux organismes (batraciens, poissons...). Ils sont ainsi un maillon important de la chaîne trophique des zones humides. De plus, de part leur régime alimentaire, les larves participent au processus de destruction de la matière organique. Leur régime omnivore, avec l'ingestion de feuilles en décomposition par exemple, accélère la décomposition des matières organiques dans les écosystèmes aquatiques.

1.4. Nuisance et intérêt médical

Les moustiques ont été toujours considérés comme source de nuisance pour l'homme, en raison du fait qu'ils sont responsables des plus grandes endémies dans le monde, ils constituent le groupe de vecteurs le plus important en santé publique humaine et vétérinaire.

Dans la sous famille des *Culicinae* les genres vecteurs des agents pathogènes sont: *Culex*, *Aedes* et *Anopheles*. Sur le plan santé, la pique par les adultes femelles de nombreux *Culicidés* anthropophiles, nécessaire à la maturation des pontes, ne se résume pas seulement au désagrément passager lié à la prise de sang (Failloux et Rodhain 1999). Cette prise directe du fluide dans les capillaires sanguins va permettre à différentes formes de vies (virus, protozoaires, ver et nématodes) d'exploiter les moustiques comme voie de transfert vers les hôtes vertébrés.

Ainsi, les agents pathogènes comme par exemple les protozoaires (ex: *Plasmodium faciparum* responsable du paludisme) utilisent le moustique comme vecteur puis l'homme comme hôte pour la réalisation de leur cycle biologique infectant ainsi à l'homme de nombreuses maladies.

2. Le complexe *Culex*

2.1. Caractères morphologiques

2.1.1. Les œufs

Les oeufs sont fusiformes et mesurent environ 1mm de long. Généralement blanchâtres au moment de la ponte, ils s'assombrissent dans les heures qui suivent. Ils sont pondus dans l'eau, réunis par 200 à 400 en nacelle (Figure11) dont l'arrangement leur permet d'être insubmersibles (Rioux, 1958).



Figure 11 : Aspect des Œufs de *Culex sp*
(Berchi, 2000)

2.1.2. La larve

D'aspect vermiforme, le corps de la larve se divise en trois segments: la tête, le thorax trapu et l'abdomen (Figure 12). Sa taille varie de 12mm en moyenne en fonction des stades et elle est dépourvue d'appareil locomoteur. Son extrémité caudale est munie d'un siphon, long et étroit affleurant à la surface de l'eau.

Ce tube est muni de 5 clapets qui s'ouvrent sur deux orifices par où l'air pénètre à l'intérieur quand la larve monte à la surface de l'eau. Ces clapets se rabattent quand elle gagne les profondeurs. Ses pièces buccales sont de types broyeurs, adaptées à un régime saprophyte (alimentation de type particulaire)(Kettle,1995).

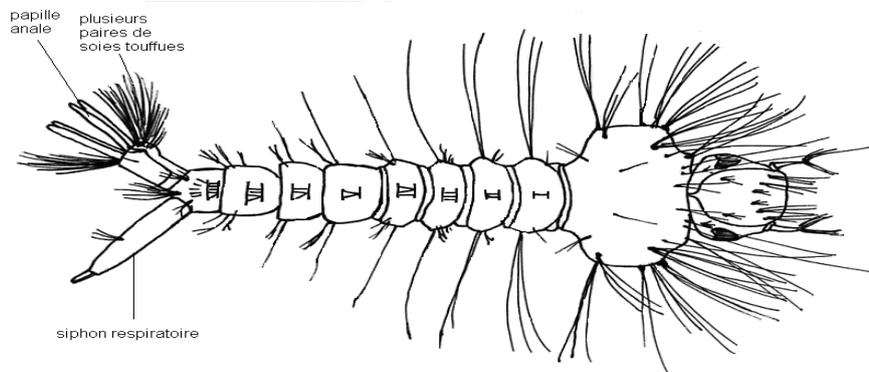


Figure 12 : Morphologie générale d'une larve de IV^{ème} de *Culicinae* (*Culex*) (Kettle,1995).

2.1.3. La nymphe

La tête et le thorax de la nymphe fusionnent pour donner un céphalothorax sur lequel on trouve deux trompes qui permettent à la nymphe de respirer. Sa forme globale rappelle celle d'un point d'interrogation. Les orifices anal et buccal étant bouchés, la nymphe ne se nourrit pas (Figure 13). Ses palettes natatoires, situées sur l'abdomen, lui permettent de se déplacer (Rioux, 1958 ; Cachereul, 1997).

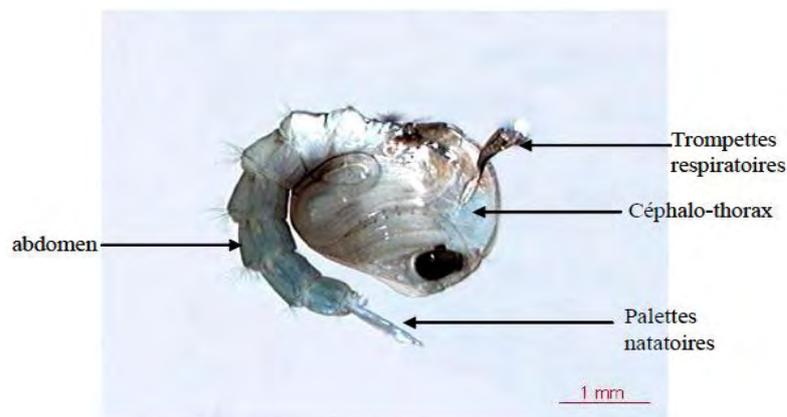
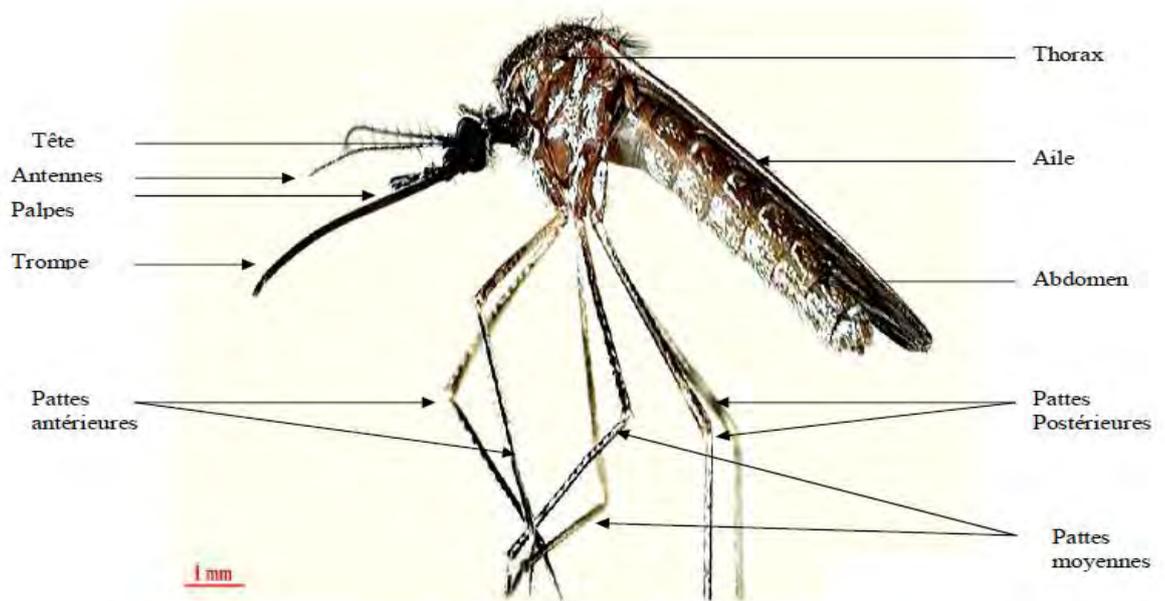


Figure 13 : Aspect général d'une nymphe de *Culicinae* (*Culex pipiens*) (Berchi,2000)

2.1.4. L'adulte

Le *Culex* adulte mesure 3 à 6 mm de long (Figure 14). Les différentes parties sont :

- **La tête** : est sombre, couverte d'écailles fourchues dressées et sombres entre lesquelles sont situées des écailles blanches et des poils bruns. Sur les joues se trouvent des écailles plus courtes formant une tache blanche (Kettle,1995 ;Andreo,2003).
- **Le thorax** : est Composé de trois segments soudés (le prothorax, le mésothorax et le métathorax), il porte les ailes et les pattes. Le thorax est brun recouvert d'écailles fauves foncées avec quelques écailles claires sur les cotés.
- **L'abdomen** : Grêle et allongé, il est composé de 9 segments terminés par 2 cerques, appendices courts protégeant l'anus et l'orifice génital. Il est recouvert d'écailles claires, brunes et blanches avec de longs poils sur la face dorsale. Une ligne longitudinale sombre ainsi que quelques taches sombres sur les cotés ornent la face ventrale. Chez les males, l'abdomen se termine en une armature génitale servant à maintenir la femelle durant l'accouplement. Chez les femelles, on trouve un oviscapte qui intervient lors de la ponte (Bussieras et Chermette, 1991).



Figures 14: Morphologie du moustique adulte vu de profil (Brunhes *et al*, 1999).

2.2. Bio écologie du *Culex*

2.2.1. L'œuf

Les lieux de ponte de la femelle sont variés : ce sont les petites collections d'eau proches des habitations comme les bassins, les citernes, les pots de fleurs, les vieux pneus, ou encore les boîtes de conserve. La femelle dépose les œufs, qui ont un diamètre inférieur à 1 mm (Andreo, 2003), perpendiculairement à la surface de l'eau en amas groupés (Figure 15). Une femelle peut pondre jusqu'à 300 œufs (Wall et Shearer, 1997), qui éclosent en 24 à 48 heures lorsque la température de l'eau est suffisante.

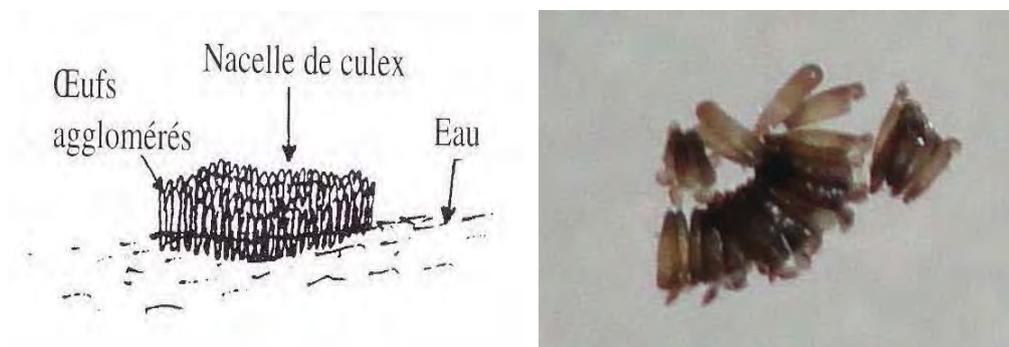


Figure 15: Œufs de *Culex* (Moulinier, 2003)

2.2.2. La larve

La larve sort de l'œuf ; elle est disposée obliquement par rapport à la surface de l'eau (Euzeby, 2008; Ripert, 1998) et se déplace par mouvements saccadés. Son régime saprophyte est constitué de plancton et de particules organiques ingérés grâce à ses pièces buccales de type broyeur. Elle respire par un siphon (Figure 16). La larve évolue ainsi selon quatre stades pendant 8 à 12 jours, avant d'atteindre le stade nymphal (Cachareul, 1997 ; Wall et Shearer, 1997).

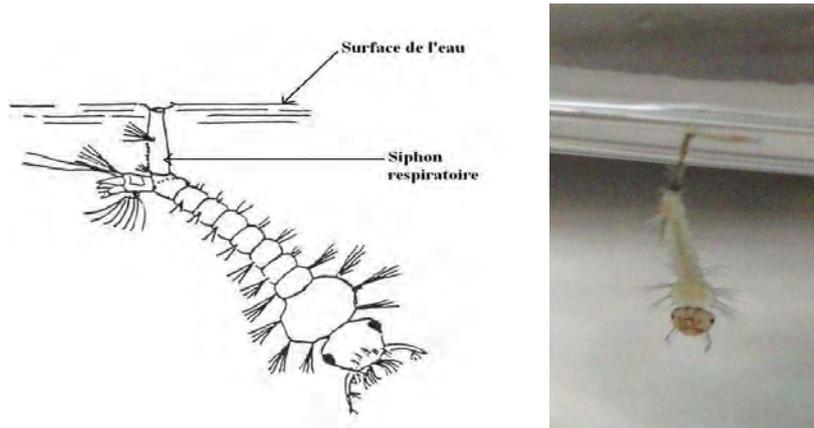


Figure 16 : Larves de *Culex* (Moulinier, 2003)

2.2.3. La nymphe

La nymphe a une forme de point d'interrogation (Euzeby,2008)et respire par des trompettes respiratoires situées sur le céphalothorax (Figure 17) . Elle n'ingère par contre aucune nourriture. Elle est extrêmement sensible et plonge dans l'eau au moindre mouvement perçu (Cachareul, 1997 ; Wall et Shearer, 1997). *Culex pipiens* reste sous cette forme pendant 2 à 4 jours. A la fin de cette période, la nymphe donne un adulte, male ou femelle. Cette étape se fait généralement le matin (Ripert,2007).

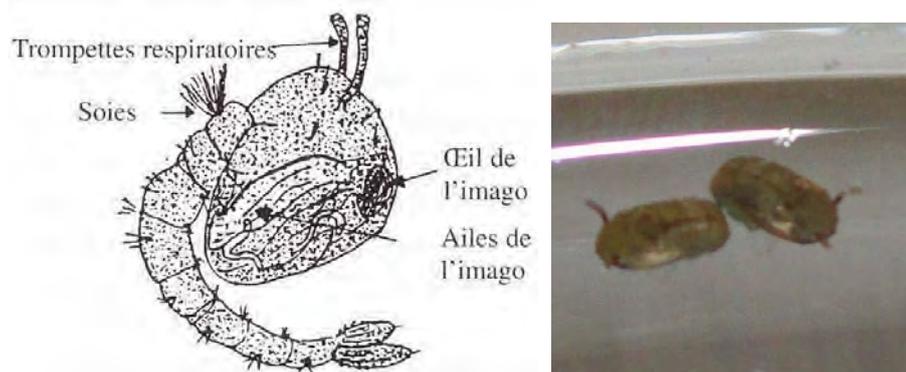


Figure 17: Nymphe de *Culex* (Moulinier, 2003)

2.2.4. L'adulte

Le male se nourrit exclusivement de suc et de nectar extrait de plantes, et meurt après la copulation. La femelle peut vivre 3 semaines à 3 mois selon la température et la qualité du gîte. Elle se nourrit du suc des plantes et est en plus hémaphage, ce qui est indispensable à la formation des œufs (Ripert, 1998)(Figure 18).

Les adultes s'éloignent peu des gîtes larvaires après l'éclosion. Ils ne dépassent pas 3 km de distance, sauf lors de vent violent qui pousse les *Culex* beaucoup plus loin. L'accouplement se produit dans les 48 heures suivant l'émergence des femelles et avant le premier repas sanguin. La femelle s'accouple en général une seule fois au cours du vol, dans un large espace : c'est une espèce dite eurygame (Moulinier, 2003). Le male est attiré par les fréquences sonores ainsi que par des phéromones émises par la femelle. Après l'accouplement, la femelle part à la recherche d'un hôte pour se nourrir de sang nécessaire à la maturation des ovules. La ponte a lieu environ 5 jours après le dernier repas (Moulinier, 2003). En automne, lorsque les journées commencent à raccourcir et que les températures baissent, Les femelles cherchent un gîte de repos et y passent plusieurs mois sans se nourrir : c'est la diapause. Elles sont capables de survivre grâce aux réserves lipidiques accumulées à partir des sucres végétaux. Elles sortiront et recommenceront leurs repas sanguins à partir du printemps (Robich et Denlinger, 2005).

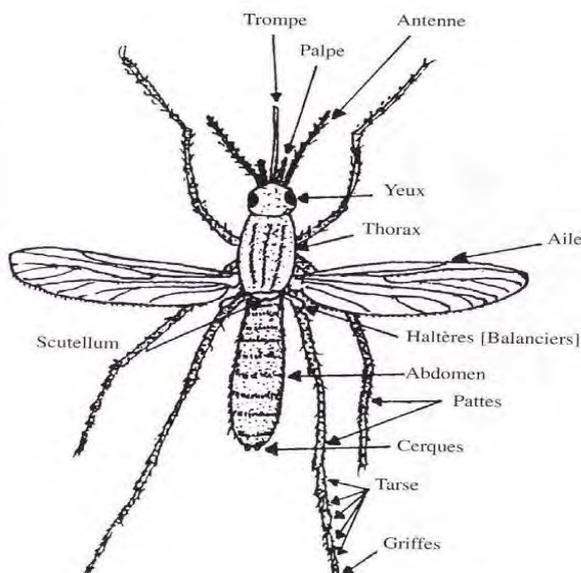


Figure 18 : *Culex* adulte ou imago (femelle en haut à droite, mâle en bas à droite) (Moulinier,2003).

2.3. Les principales nuisances causées par le genre *Culex*

2.3.1. Les Piqures

Chez l'homme comme chez l'animal, la piqure du moustique femelle provoque une lésion ronde de quelques mm à 2 cm de diamètre souvent prurigineuse. Des réactions allergiques à ces piqures peuvent apparaître, dues à l'injection d'antigènes salivaires mais pouvant aussi être dues au simple contact avec le moustique ou ses excréments (Candace *et al.*, 2001). L'expression de cette allergie chez le chien peut être aussi bien locale que généralisée, et se manifeste par des plaques érythémateuses très prurigineuses (Prelaud, 1991).

2.3.2. Transmission de maladies

L'espèce *Culex pipiens* est connue comme étant vecteur de plusieurs maladies notamment des arboviroses. Savage *et al.*, (1995) le considèrent comme l'un des principaux vecteurs du virus de l'encéphalite de Saint-Louis aux Etats-Unis. Il a été considéré aussi comme le principal responsable de l'épidémie du virus West Nile qui a frappé les Etats-Unis en 2002 (Palmisano *et al.*, 2005). En effet, le virus de la maladie du West Nile a été isolé à partir de 43 espèces de moustiques, principalement du genre *Culex*. En Afrique et au Moyen-Orient, le principal vecteur est *Culex univittatus* (Theobald, 1901), bien que *Culex poicilipes* ; *Culex neavei* (Theobald, 1901) ; *Culex decens* (Theobald, 1901) ; *Aedes albocephalus* ou *Mimomyia spp*, jouent un rôle important dans certaines régions. En Europe, les principaux vecteurs sont *Culex pipiens*, *Culex*, *Culex modestus* (Ficalbi, 1889) et *Coquillettidia richiardii* (Ficalbi, 1986). En Asie, *Culex quinquefasciatus* (Say, 1823), *Culex tritaeniorhynchus* (Giles, 1901) et *Culex vishnui* (Theobald, 1901) prédominent (Hubalek et Halouzka, 1999). Aux Etats-Unis (Andreadis *et al.*, 2001), en Roumanie (Savage *et al.*, 1999), en Bulgarie et en République tchèque (Hubalek et Halouzka, 1999), l'espèce *Culex pipiens* est le principal vecteur, d'où le virus a été également isolé.

La compétence vectorielle de *Culex pipiens* pour cette maladie a été prouvée expérimentalement dans plusieurs régions du monde. Par ailleurs, en plus de cette compétence vectorielle, les femelles infectées de cette espèce sont capables de transmettre le virus à leur progéniture (Farajollahi *et al.*, 2005 ; Murgue *et al.*, 2001), ce qui fait de ce moustique le premier suspect du maintien et de la transmission de l'enzootie du virus West Nile.

Au Maroc, *Culex pipiens* joue un grand rôle dans la forte nuisance que connaît la majorité des zones urbaines. Son rôle dans la transmission des épidémies du virus West Nile qui ont touché le Maroc en 1996 (Harrack *et al.*, 1997, Murgue *et al.*, 2001), et en 2003 (Schuffenecker *et al.*,2005), est fortement suspecté. Zientara *et al.*(2001), rapportent qu'en Algérie des cas isolés chez l'homme ont été observés en 1994.

En Algérie, le *Culex pipiens* présente le plus d'intérêt en raison de son abondance et sa nuisance réelle dans les zones urbaines (Berchi, 2000).

3- Aperçu général sur les moyens de lutte contre les moustiques

De part le monde, les premiers moyens de lutte furent l'élimination de certaines zones humides permanentes ou temporaires (étangs, marais, marécages, étangs d'eau printanière). C'est le développement de l'élimination de ces zones d'eau, et donc de l'habitat naturel du moustique, qui a permis de diminuer les populations de moustiques et d'éradiquer certaines maladies (Boyer, 2006). Cependant, pour préserver ces milieux naturels, les recherches se sont intensifiées pour développer de nouvelles stratégies de lutte contre les moustiques. C'est ainsi que les premières luttés insecticides ont commencé avec la lutte chimique.

En Algérie, grâce à la campagne d'éradication du paludisme lancée en Algérie en 1968, le nombre de cas a chuté de manière considérable, passant de 95 424 en 1960 à 30 en 1978. A cette date, le nord était déclaré indemne de paludisme à *Plasmodium falciparum* .

Dans les années 60, le sud de l'Algérie était faiblement impaludé. Aujourd'hui elle est la région la plus affectée par le paludisme. En effet, le nombre de cas importés et autochtones ne cesse d'augmenter d'année en année (Hammadi *et al.*,2009). Selon ce même auteur, l'Algérie qui a été un pionnier mondial dans la lutte antipaludique, se trouve aujourd'hui dans une situation épidémiologique certes favorable, mais l'environnement reste propice à une réintroduction du paludisme.

3.1. La lutte chimique

Les premiers insecticides chimiques utilisés dans la lutte anti vectorielle sont les organochlorés tout particulièrement, le Dichloro-Tichloroéthane synthétisé la première fois en 1873 par Othman Zeidler et connu sous le nom de DDT.

Cet insecticide décrit par Muller pour son efficacité insecticide ne fut reconnu qu'en 1939. Il s'agit d'un insecticide de la famille des organochlorés agissant au niveau des cellules nerveuses. Il s'accumule dans les membranes cellulaires et perturbe les équilibres cationiques K^+/Na^+ conduisant à des convulsions et des paralysies, puis la mort (Boyer, 2006). De part son efficacité, il a longtemps été employé partout dans le monde (Mouchet, 1995). Cependant, le DDT qui a provoqué une véritable révolution dans la lutte contre les insectes, a été interdit au bout d'un certain temps dans de nombreux pays à cause de son accumulation dans l'environnement et d'éventuels effets néfastes sur la santé humaine (Mouchet, 1994). Le DDT a donc laissé place à d'autres insecticides organochlorés comme l'aldrine, la dieldrine, l'héptachlore et le lindane.

Bien que les insecticides chimiques se soient révélés très efficaces sur les moustiques, ils présentent plusieurs inconvénients. En effet, en plus de leur coût élevé, ils peuvent être à l'origine de divers problèmes environnementaux. Pour Barbouche *et al.*, (2001), l'accumulation significative de matières actives dans les écosystèmes traités, aquatiques et terrestres peut engendrer un problème de pollution. Par ailleurs, les substances actives des produits utilisés présentent un large spectre d'action et n'épargnent pas les organismes non cibles. A tous ces inconvénients, s'ajoute aussi un problème de développement de la résistance aux insecticides chez les insectes traités (Georghiou *et al.*, 1975 ; Sinègre *et al.*, 1977). Selon Georghiou et Lagunes-Tejeda (1991), plus de 500 espèces d'insectes ont développé en 1989, une résistance à une ou plusieurs familles d'insecticides. Ainsi, la résistance des moustiques aux insecticides est connue dans de nombreux pays. Elle a été constatée en 1958 au Cameroun (Mouchet *et al.*, 1960) à la suite de traitement au malathion de *Culex quinquefasciatus*. Une baisse de sensibilité au malathion des souches de *Culex pipiens* urbains et une faible résistance au fenthion sont observées par Chauvet *et al.*, (1971) à Madagascar. Plus tard, Sinègre *et al.*, (1976) observent après trois années de traitement au chlorpyrifos sur le littoral méditerranéen, une baisse du niveau de sensibilité et même une résistance.

En Algérie, les travaux réalisés à Constantine par Berchi (2000) sur les populations larvaires urbaines et périurbaines de *Culex pipiens* ont montrés une résistance vis-à-vis du malathion, organophosphoré utilisé dans la lutte anti larvaire.

Ce phénomène de résistance rapporté par plusieurs auteurs comme ceux cités précédemment, a amené la communauté scientifique à chercher des solutions de rechange à la lutte chimique. La méthode alternative proposée est la lutte biologique.

3.2. La lutte biologique

La lutte biologique est l'utilisation d'organismes vivants pour prévenir ou réduire les dégâts causés par des ravageurs. Celle-ci s'illustre de différentes manières.

La lutte par entomophage, qu'il soit parasitoïde ou ravageur, s'effectue par l'introduction d'un animal ravageur de l'organisme cible. La lutte microbiologique est l'utilisation de microorganismes (champignons, bactéries) qui infectent la cible souvent par ingestion. Si l'organisme antagoniste doit être lâché ou inoculé (en grand nombre) à chaque fois que l'effectif du ravageur croît dangereusement, c'est la lutte biologique inondative. Enfin, aux frontières de la lutte biologique ; la lutte autocide (encore dénommée lutte par mâles stériles) a pour principe l'introduction en grand nombre, dans une population naturelle, d'individus mâles de la même espèce rendus stériles mais au comportement sexuel intact.

Deux grands types de luttes biologiques ont été utilisés à l'encontre des moustiques.

La première méthode biologique est l'utilisation d'un poisson prédateur, la gambusie (*Gambusia holbrooki*), qui a souvent été utilisée mais avec plus ou moins de succès (Pates et Curtis 2005). Ce poisson est un prédateur généraliste à utiliser avec grande précaution pour éviter les dommages sur les autres organismes aquatiques. D'autres formes de contrôles biologiques ont été tentées avec d'autres espèces de poissons, de champignons, de bactéries, de nématodes, des parasites protozoaires, des insectes prédateurs, mais peu d'entre elles ont été concluantes et donc adoptées.

La deuxième méthode est l'utilisation d'organismes microbiens tels que le *Bacillus sphaericus* (*Bs*) et le *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (*Bti*). Ces bacilles sont d'ailleurs considérés comme des agents de contrôle biologique efficace (Becker 1998). Ils agissent sur les larves des moustiques, des simuliides et des diptères en général et sont aujourd'hui utilisés dans un large panel de gîtes larvaires, du fait de leur efficacité et leur spécificité qui respectent largement la faune compagne.

D'ailleurs, le *Bt* est le micro-organisme le plus utilisé comme bio-insecticide et représente plus de 90% du marché des bio insecticides, mais seulement 2% à peine du marché global des insecticides (Fargues et Bourguet, 2005). Bien que le développement d'une résistance chez les moustiques n'ait pas encore été décelé avec ce composé, il est important de poursuivre les études en vue d'élaborer de nouveaux insecticides biologiques afin d'être prêt à répondre à toutes éventualités.

Les champignons entomopathogènes sont des plus prometteurs. Ils jouent un rôle considérable dans la régulation des populations d'insectes (Roberts, 1973; Ferron, 1975). L'un des plus intéressants appartient à la classe des *Ascomycètes* : il s'agit d'un pathogène d'insectes connu sous le nom de *Metarhizium anisopliae* (Veen, 1968; Samuels *et al.* , 1989).

Chapitre 3 : Les toxines (destruxines) élaborées par *Metarhizium anisopliae*

1. Les toxines fongiques

Les mycotoxines sont des composés naturels toxiques, élaborés par de nombreuses espèces de moisissures. Ce sont des métabolites secondaires produits par les champignons et n'ayant pas de rôle évident dans l'économie de la cellule vivante qui les synthétise. Le terme « mycotoxine » est apparu pour la première fois pour décrire les toxines impliquées dans une maladie, inconnue à l'époque, qui a tué près de 100 000 volailles en Angleterre au début des années 1960 (Blout, 1961). Rapidement, ce terme a été adopté pour désigner l'ensemble des toxines sécrétées par les champignons.

Seule une vingtaine de mycotoxines a été actuellement identifiée à des teneurs significatives dans notre environnement (Hsieh, 1992).

Ces mycotoxines présentent des origines chimiques très diverses correspondant à la différence de leurs voies de biosynthèse: il s'agit de composés dérivés des acides aminés (alcaloïdes de l'ergot, acide aspergillique, acide cyclopiazonique, slaframine, gliotoxine, roquefortine, sporodesmine), d'autres des polycétoacides (aflatoxines, ochratoxines, patuline, citrinine, acide pénicillique, stérigmatocystine, zéaralénone) et d'autres sont des dérivés terpéniques (diacétoxyscirpénol, fusarénone, désoxynivalénol, roridines, toxine T-2, verrucarine) (Turner, 1971, 1983; Steyn, 1980).

2. Les Destruxines

2.1. Définition des destruxines

Chez certains champignons entomopathogènes incluant *Metarhizium anisopliae*, il y a production de mycotoxines pendant la pénétration des hyphes dans l'insecte, Ces métabolites secondaires jouent un rôle important lors de l'invasion de l'insecte par le pathogène, puisqu'ils accélèrent la mort de l'hôte et permettent au champignon de proliférer plus rapidement (Vey *et al.*, 1986; Ignoffo, 1988; Ravallec *et al.*, 1989).

Des protéases, des cytochalasines ainsi que la prodestruxine sont tous des métabolites élaborés par *Metarhizium anisopliae*. Cependant, les plus intéressants restent les hexacyclodepsipeptides du groupe des destruxines isolés de ce champignon.

2.2 Nature chimique des destruxines

Actuellement, 39 depsipeptides différents ont été identifiés (Liu et Tzeng, 2011). Les destruxines sont caractérisées par un cycle commun de 5 acides aminés (β alanine, alanine, valine, isoleucine, proline) cyclisés par un α -hydroxyacide (Figure 19).

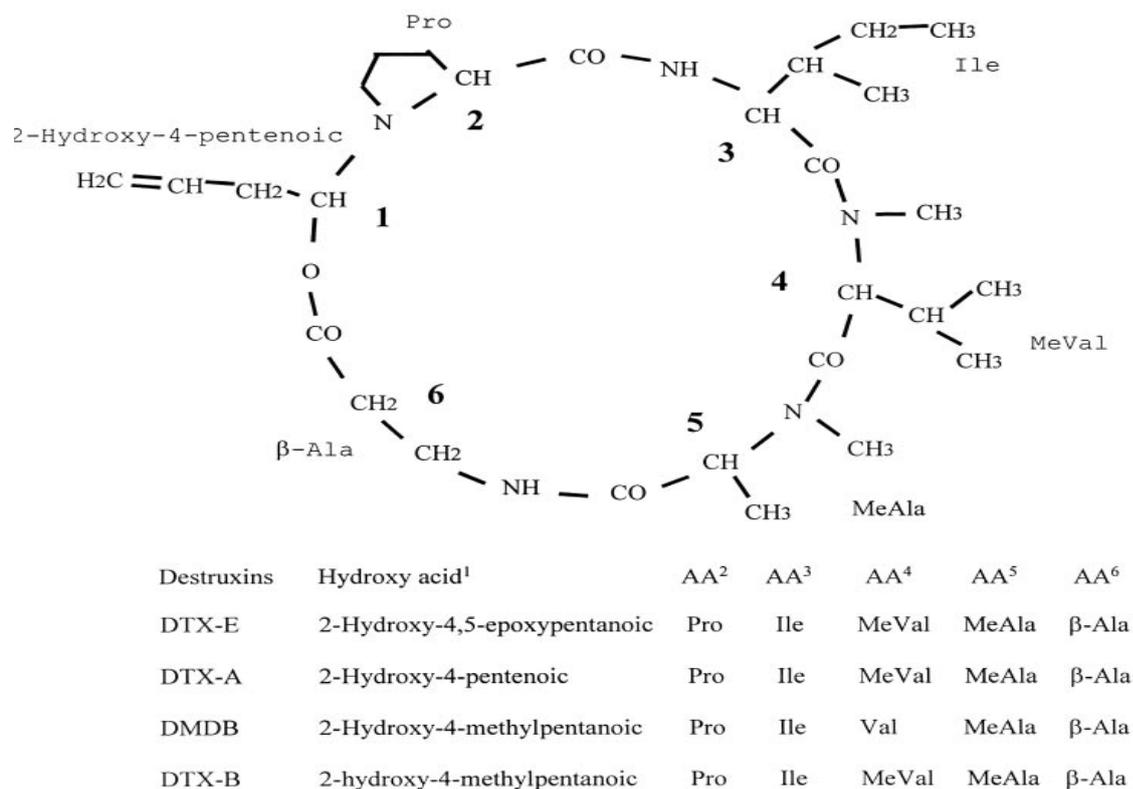


Figure 19 : Structure chimique des destruxines (Pais *et al.*, 1981)

Elles ont toutes un faible poids moléculaire. Trois d'entre elles sont produites en plus grande quantité que les autres. Il s'agit de la destruxine A, de la destruxine B et de la destruxine E.

La différenciation de ces trois structures se situe au niveau de l'acide α hydroxylé, qui présente : soit une double liaison entre les carbones γ , δ (DA), soit un groupement méthyle en γ (DB), soit un cycle époxyde en γ , δ (DE) (Pais *et al.*, 1981). Ce groupe présente une structure générale (Figure 20) qui peut en fonction des groupements R donner en plus de destruxines différents analogues de structures (Tableau 2).

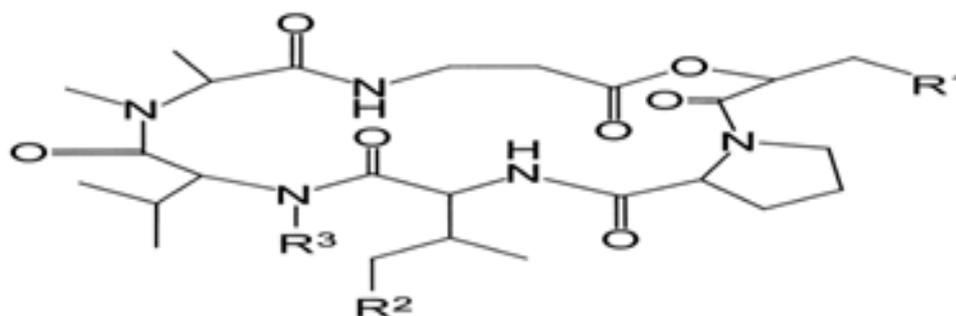


Figure 20 : Formule générale des destruxines (voir tableau 2 pour les structures des groupements R) (Pais *et al.*, 1981)

Tableau 2 : Différentes formes de destruxines

Destruxines	R ¹	R ²	R ³
Destruxine A	CH=CH ₂	CH ₃	CH ₃
Dihydrodestruxine A	CH ₂ CH ₃	CH ₃	CH ₃
Destruxine B	CH(CH ₃) ₂	CH ₃	CH ₃
N-Demethyldstruxine B	CH(CH ₃) ₂	CH ₃	H
Destruxine B2	CH(CH ₃) ₂	CH ₃	CH ₃
Destruxine D	CH(CH ₃)COOH	H	CH ₃
Destruxine E	CHOCH ₂	CH ₃	CH ₃
Destruxine E diol	CHOHCH ₂ OH	CH ₃	CH ₃
Destruxine E chlorohydrin	CHOCH ₂ Cl	CH ₃	CH ₃

2.3 Toxicité des destruxines

Il est généralement accepté que ces toxines jouent un rôle important dans le déroulement de la pathogenèse du champignon, pouvant même causer la mort de l'hôte (Roberts, 1981; Vey *et al.*, 1987; Vey et Quiot, 1989). De plus, les destruxines possèdent une bonne toxicité sur un large spectre d'insectes cibles (Fargues et Robert, 1986; Roberts, 1981) et semblent pouvoir être une alternative valable aux insecticides chimiques (Roberts, 1981). Ces toxines, qui par ailleurs ont une action qui présente des traits communs à celle de la toxine du *B.t.* (Vey *et al.*, 1987).

Fargues et Roberts (1986) mentionnent les résultats de différentes études portant sur la toxicité des destruxines (A, B et E) vis-à-vis des invertébrés. Les destruxines étaient *mises* en contact avec les insectes par incorporation dans le substrat d'élevage, par ingestion forcée ou par exposition du feuillage traité, plus de 10 espèces d'insectes (Diptères, Lépidoptères, Coléoptères) ont présenté A des degrés différents de toxicité en présence de ces substances. D'autres études effectuées sur des diptères ont démontré que l'activité cytotoxique de la destruxine E était plus importante comparativement aux deux autres mycotoxines (Robert et Fargues, 1986; Robert *et al.*, 1986; Vey *et al.*, 1987; Ravallec *et al.*, 1989; Lepage *et al.*, 1991).

Il a été démontré par d'autres auteurs que les destruxines, administrées par ingestion forcée ou ingestion libre, provoquent chez l'insecte un effet cytotoxique précoce principalement au niveau du mésentéron (Vey *et al.*, 1987; Vey et Quiot, 1989). Parallèlement, il a été observé lorsque les destruxines sont administrées par injection intracoelomique chez le lépidoptère *Galleria mellonella* une paralysie tétanique immédiate réversible (Roberts, 1981). Cette paralysie serait attribuable à l'effet potentiel des destruxines sur des canaux Ca^{2+} endogènes provoquant la dépolarisation des muscles (Samuels *et al.*, 1988). De plus, selon ce même mode d'administration une détoxification rapide des destruxines par l'organisme de l'insecte a été observée, celle-ci serait responsable entre autre de la réversibilité de la paralysie tétanique (Lange *et al.*, 1991 ;Jegorov *et al.*, 1992). Il est donc possible que la mortalité rapide observée chez l'insecte soit causée principalement par l'attaque initiale des toxines au niveau de l'intestin en créant une perturbation de la balance ionique, un peu à la manière des toxines protéiques du *B.t.* (McGaughey et Whalon, 1992). Lorsque cette attaque initiale est importante, elle serait alors principalement responsable de la mort de l'insecte (Tableau 3).

Tableau 3 : Activités insecticides des différentes destruxines (Liu et Tzeng, 2011)

Destruxines (Dx)	Espèces (référence)	Références
Dx A	<i>Bombyx mori</i> <i>Cetonia aurata</i> <i>Epilachna sparsa</i> <i>Galleria mellonella</i> <i>Heliothis virescens</i> <i>Musca domestica</i> <i>Oryctes rhinocerus</i> <i>Phaedon cochleariae</i> <i>Plutella xylostella</i>	Kodaira, 1962, Suzuki <i>et al.</i> , 1971, Quiot <i>et al.</i> , 1985 Fargues <i>et al.</i> , 1985 Kodaira, 1962 Kaijiang et Roberts, 1986, Calmes <i>et al.</i> , 1993, Dumas <i>et al.</i> , 1994, Loutelier <i>et al.</i> , 1996 Gupta <i>et al.</i> , 1989a, Ast <i>et al.</i> , 2001 Robert and Fargues, 1986 Fargues <i>et al.</i> , 1985 Amiri <i>et al.</i> , 1999 Amiri <i>et al.</i> , 1999
Dx A2	<i>G. mellonella</i> <i>H. virescens</i>	Loutelier <i>et al.</i> , 1996 Gupta <i>et al.</i> , 1989a
Dx A3 (4)	<i>Coptotermes formosanus</i>	Wahlman and Davidson, 1993
Dx A4 (5)	<i>Drosophila melanogaster</i> <i>Rhagoletis pomonella</i>	Krasnoff <i>et al.</i> , 1996 Krasnoff <i>et al.</i> , 1996
Dx A5 (6)	<i>D. melanogaster</i> <i>R. pomonella</i>	Krasnoff <i>et al.</i> , 1996 Krasnoff <i>et al.</i> , 1996
DesmethylDx A (8)	<i>C. formosanus</i>	Wahlman et Davidson, 1993
Dx B2 (12)	<i>G. mellonella</i> <i>H. virescens</i>	Loutelier <i>et al.</i> , 1996 Gupta <i>et al.</i> , 1989a
DesmethylDx B	<i>G. mellonella</i> <i>H. virescens</i>	Loutelier <i>et al.</i> , 1996 Gupta <i>et al.</i> , 1989a
Dx C	<i>G. mellonella</i>	Loutelier <i>et al.</i> , 1996
Dx C₂	<i>G. mellonella</i>	Loutelier <i>et al.</i> , 1996
DesmethylDx C	<i>C. formosanus</i>	Wahlman et Davidson, 1993
Dx D (23)	<i>G. mellonella</i>	Loutelier <i>et al.</i> , 1996

Suite du tableau 3

Dx E (26)	<i>B. mori</i> <i>Brevicoryne brassicae</i> <i>C. aurata</i> <i>Culex pipiens</i> <i>Delia antiqua</i> <i>D. melanogaster</i> <i>Empoasca vitis</i> <i>G. mellonella</i>	Quiot <i>et al.</i> , 1985 Robert et Riba, 1989 Fargues <i>et al.</i> , 1985 Vey <i>et al.</i> , 1987 Poprawski <i>et al.</i> , 1985 Vey <i>et al.</i> , 1987 Poprawski <i>et al.</i> , 1994 Fargues <i>et al.</i> , 1986, Calmes <i>et al.</i> , 1993, Dumas <i>et al.</i> , 1994, Loutelier <i>et al.</i> , 1996
Dx E chlorohydrin	<i>G. mellonella</i> <i>H. virescens</i>	Loutelier <i>et al.</i> , 1996 Gupta <i>et al.</i> , 1989a
Dx E diol	<i>G. mellonella</i>	Loutelier <i>et al.</i> , 1996
Dx F (33)	<i>Coptotermes formosanus</i>	Wahlman et Davidson, 1993

En plus de l'effet insecticide et l'activité phytotoxique, les destruxines montrent une grande variété d'activités biologiques. Des effets importants ont été observés sur des cellules de leucémie L1210 et les lymphocytes de la rate traitées avec les destruxines (A, A₂, B, B1 et E). (Morel *et al.*, 1983). La destruxine E semble être essentiellement plus efficace que les destruxines A et B dans l'activité antiproliférative sur les cellules néoplasiques mammifères dans des analyses in vitro avec les néoplasmes P388 murins (Morel *et al.*, 1983; Odier *et al.*, 1987, 1992). La destruxine B et homodestruixine B ont montré également des effets suppressifs sur l'antigène viral de l'hépatite B. Elles ont été considérées en tant que candidats potentiels pour le développement de nouveaux agents d'anti hépatites (Sun *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 1995 ;1997). Tandis que la destruxine A4 chlorohydrin a agi en tant qu'inducteur d'érythropoïétin (Cai *et al.*, 1998). Les destruxines A et B ont montré un effet inotropique positif avec chronotropie négative sur le tissu cardiaque de rat (Tsunoo *et al.*, 1997; Tsunoo et Kamijo, 1999).

2.4. Production des destruxines

La grande majorité des destruxines ont été isolées à partir des cultures du champignon entomopathogène *Metarhizium anisopliae*, cependant quelques destruxines ont été produites par des champignons pathogènes des plantes. Les destruxines A et B ont été d'abord identifiées comme métabolites secondaires du champignon *O.destructor* (Kodaira, 1961), elles ont été également isolées à partir de culture du champignon *Trichotecium roseum*, (Tsunoo *et al.*, 1997) avec la destruxine A et homodestruixine B. La destruxine B est la principale toxine produite par le champignon pathogène *Alternaria brassicae* (Ayer et Pena-Rodriguez, 1987 ; Bains et Tewari, 1987). L'homodestruixine B a été isolée la première fois dans les cultures d'*Alternaria brassicae* avec la destruxine B, desmethyldestruixine B (Ayer et Pena-Rodriguez, 1987) et la destruxine B₂ (Buchwaldt et Jensen, 1991).

La destruxine E diol a été isolée à partir de *M.anisopliae* (Cherton *et al.*, 1991). La protodestruixine a été isolée à partir d'une souche mutante de *M.anisopliae* tandis que plusieurs chlorohydrines ont été isolées à partir de la souche sauvage. Les pseudodestruixines A et B sont les nouvelles destruxines les plus récemment isolées, elles sont produites par le champignon *Nigrosabulum globosum* (Che *et al.*, 2001). L'isolement des analogues de destruxines, brusapheloades (A et B) et roseotoxines B à partir de *Trichotecium roseum* ont été également étudiées (Engstrom *et al.*, 1975; Springer *et al.*, 1984)(Figure 21). Cependant ces composés n'ont pas été nommés destruxines car ils ont été isolés et extraits la première fois à partir des champignons différents de *M.anisopliae*.

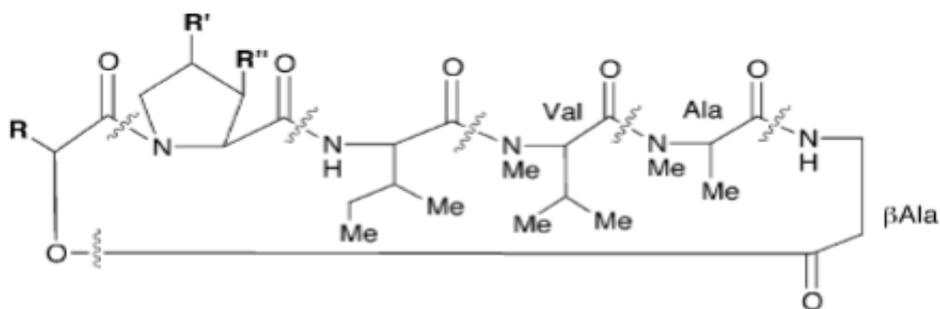


Figure 21 : structure chimique des analogues des destruxines, roseotoxines B(R= -CH₂CH=CH₂, R'=-H, R''=-Me), brusapheloades B (R= CHMeCH₂Me , R'=-Me, R''= -H), roseocardin (R= CH₂CHMe₂, R'=-H, R''= -Me)

2.4. Méthodes d'identification et de détection des destruxines

2.4.1. Chromatographie sur Couche Mince(CCM)

L'utilisation de la CCM, permet une détection et une quantification des destruxines. Plusieurs protocoles ont ainsi été développés, notamment pour la recherche des destruxines à partir d'une culture de *Metarhizium anisopliae*. D'après Donald et Roberts (1969), les paramètres de CCM idéaux pour la détection des destruxines sont les suivants: Type de couche mince: gel de silice (silica gel); solvant de séparation: Chloroform/Methanol (19:1, v/v); Système de détection: une lampe UV (365 nm) et une révélation par la vapeur d'iode.

2.4.2. Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC/MS)

Ces toxines ont été isolées dans les extraits organiques obtenus à partir des cultures fongiques (EtOAc, CCl₄, CH₂Cl₂); la chromatographie de gel de silice et la chromatographie liquide à phase renversée ont été utilisées (Pais et al, 1981; Ayer et Pena-Rodriguez, 1987; Bains et Tewari, 1987 ; Samuels *et al*, 1988; Gupta *et al.*, 1989a,b; Buchwaldt et Jensen, 1991; Che *et al.*, 2001).

La quantification de divers destruxins en extraits des cultures fongiques de *M. anisopliae* a été effectuée par HPLC en utilisant des courbes d'étalonnage des destruxins purs (Loutelier *et al*, 1996; Chen *et al.*,1999). La spectrométrie de masse en bombardement par atomes rapides (FAB-MS) a été une méthode très utile pour l'analyse des destruxines dans les extraits fongiques bruts (Lange *et al.*,1991 ,1992; Loutelier *et al.*,1996).Des méthodes plus récentes incluent la spectrométrie à temps de vol (TOF) avec l'ionisation chimique à pression atmosphérique (LC-APCI-MS) (Jegorov *et al.*,1998) et l'ionisation electrospray (ESI-MS) ont été appliquées pour l'identification et la caractérisation des destruxines (Potterat *et al.*, 2000 ; Liu et Tzeng, 2011).

Partie pratique

Chapitre I : Isolement et Identification du champignon entomopathogène *Metarhizium anisopliae*

L'isolement sélectif des champignons entomopathogènes , à partir du sol , pose un réel problème. En effet trop de substrats favorisent les champignons parasites et les bactéries à croissance rapide et empêchent de ce fait un isolement facile des champignons entomopathogènes qui ont un temps de génération relativement long (Doberski *et al.*, 1980 ; Milner *et al.*, 1992).

Plusieurs méthodes ont été utilisées pour l'isolement sélectif des entomopathogènes. Elles reposent essentiellement sur le développement de milieux appropriés et l'addition aux milieux d'isolement des substances inhibitrices (antibiotiques et fongicides) stoppant la croissance des germes envahisseurs (Beilharz *et al.*, 1982, Chase *et al.*, 1986, Liu *et al.*, 1993, Fernandes *et al.*, 2010).

L'identification des champignons entomopathogènes repose principalement sur l'étude de plusieurs caractères morphologiques correspondant à la présence, l'abondance et la disposition des hyphes du mycélium aérien, la présence de spores et leur forme. Ces méthodes d'identification ont été abandonnées par plusieurs chercheurs pour les remplacer par les techniques moléculaires. Ces approches moléculaires sont souvent utilisées pour leur rapidité et efficacité (ST Leger *et al.*, 1992, Bridge *et al.*, 1993, Dong *et al.*, 2007). Parmi les méthodologies employées, la réaction en chaîne de la polymérase (PCR) est largement pratiquée. Le gène ADNr 18S et les régions ITS sont l'outil principalement utilisé pour l'identification moléculaire des champignons.

Dans cette étude, nous nous proposons dans une première étape, d'isoler sélectivement et de purifier des souches fongiques entomopathogènes du genre *Metarhizium* à partir de plusieurs échantillons provenant des sols agricoles céréaliers. La seconde étape consiste à l'identification moléculaire par amplification d'un fragment du gène 18S, en utilisant des amorces universelles. Cette technique a permis dans plusieurs travaux de recherche antérieurs d'identifier un nombre important de champignons filamenteux (Driver *et al.*, 2000).

1. Matériel et méthodes

1.1. Prélèvement des échantillons

Les échantillons du sol utilisés pour ce travail proviennent de trois sols agricoles céréaliers de la région de Constantine (Blé : Ain-El-Bey, El Khroub et Maïs : Hamma Bouziane) ont été prélevés par la technique de Pochon et Tradieux (1962). Après avoir écarté les cinq premiers centimètres de sol, une quantité suffisante de terre est prélevée du sol, jusqu'à 10 centimètres de profondeur, puis déposée à l'aide d'une spatule sur une feuille d'aluminium stérile. Après un premier tri, écartant les pierres et les débris végétaux, l'échantillon est récupéré dans un flacon stérile. Les échantillons ont été ensuite transportés au Laboratoire de Mycologie, Biotechnologie et de l'Activité Microbienne et traités immédiatement.

1. 2. Milieux d'isolement

Trois milieux synthétiques (composition en annexe 1) ont été utilisés pour l'isolement du champignon entomopathogène *Metarhizium anisopliae*:

- **SDAY** (Sabouraud dextrose agar yeast)
- **ODA** (Oatmeal dodine agar)
- **PDAY**(Potato dextrose agar yeast)

La croissance bactérienne a été inhibée par l'addition de Streptomycine aux milieux de culture à une concentration de 50 µg/l (Botton *et al.*, 1999).

1.3. Méthode d'isolement

Pour préparer les suspensions du sol, 1g de chaque échantillon a été dilué dans 9 ml d'eau distillée stérile (Clark *et al.*, 1985 ; Ulacio *et al.*,1997), puis une série de dilutions décimales a été effectuée sur les trois types d'échantillons.

Après la préparation des dilutions, une agitation vigoureuse à l'aide du Vortex a été réalisée afin de permettre une bonne homogénéisation des solutions. A chaque échantillon, il a été attribué un code désignant son origine et son degré de dilution.

Par ailleurs, les milieux ont étéensemencés par étalement dans des boites de Pétri à raison de 1ml par dilution (Ikasari et Mitchell, 1994). Les boites ont été incubées à 28°C à l'obscurité et observées quotidiennement pendant trois semaines.

1. 4. Purification et conservation des souches isolées

Les colonies fongiques obtenues ont subi une purification, en réalisant les repiquages successifs nécessaires jusqu'à obtention d'une souche pure, confirmée par l'observation microscopique. Les souches, ainsi obtenues, ont été conservées selon trois techniques :

- Conservation sur gélose inclinée sur milieu PDA à 4 °C pour une durée de deux mois environ.
- Au congélateur à -20 °C après culture liquide et en présence du glycérol (20 %, v/v) utilisé comme cryo-protécteur pour une durée plus longue.
- Les tubes contenant des cultures en gélose inclinée sur milieu PDA sont remplis de l'huile de paraffine, cette technique permet une bonne conservation, aussi longue que celle de la congélation.

1.5. Méthodes d'identification

L'identification des champignons fait essentiellement appel aux caractères cultureaux (Identification macroscopique) et à la morphologie (identification microscopique).

1.5.1. Identification macroscopique

Les caractères morphologiques et cultureaux ont été déterminés après ensemencement des souches pures sur les milieux de cultures spécifiques cités ci-dessus. Les milieux sont coulés sur des boites de Pétri, ils ont été ensuiteensemencés par quelques spores ou une petite bouture mycélienne prélevée auparavant à l'aide d'une anse de platine stérile et déposée au centre de la boite.

L'évaluation de l'ampleur de la croissance et du développement a été observée après 7, 14 et 21 jours d'incubation à 28°C. Ce suivi réalisable à l'oeil nu mais aussi grâce à un binoculaire permettant ainsi de rassembler des indices révélateurs sur l'identité de nos souches (couleur du mycélium aérien et sa variation au cours du temps, couleur du revers de

la boîte, production de pigment diffusible, présence ou absence de gouttelettes sur le mycélium etc...)

1.5.2. Identification microscopique

L'observation *in situ* de la morphologie des chaînes de spores et celle du mycélium s'est faite en employant deux techniques différentes.

1.5.2.1. Réalisation d'un montage du matériel à examiner

Les préparations microscopiques se font à l'état frais en milieu liquide entre lame et lamelle. La manipulation consistait à mettre un petit fragment mycélien sur la lame propre placée entre deux becs Bunsen en présence d'une goutte du liquide de montage (lactophénol). Celui-ci a été légèrement dilacéré avec deux aiguilles afin d'éviter la réalisation d'une préparation trop dense et inobservable (Botton, 1990), puis a été recouvert délicatement d'une lamelle en évitant de créer des bulles d'air ou des débordements.

1.5.2.2. Réalisation de la culture sur lamelle

Cette technique est appliquée essentiellement aux champignons dont la structure est particulièrement fragile, qui subissent alors un examen microscopique spécial qui consiste à préparer une culture observable directement au microscope.

Une lamelle stérile a été insérée délicatement dans un milieu gélosé de manière à former un angle de 45°. Une goutte de l'inoculum (suspension de spores) a été déposée contre la lamelle en contact avec le milieu nutritif. Après 14 jours d'incubation à 28°C, la lamelle a été retirée délicatement de la gélose, déposée sur une lame et examinée au microscope.

1.5.3. Caractérisation moléculaire des isolats de *Metarhizium*

1.5.3.1. Extraction de l'ADN génomique

Les isolats de *Metarhizium* ont été sélectionnés initialement sur milieu sélectif ODA (Oatmeal dodine agar), puis maintenus à 4°C. Pour obtenir du matériel frais, ils ont été réensemencés sur milieu nutritif SDA (Sabouraud dextrose agar) et placés en chambre de croissance pendant 7 jours à 27°C.

L'extraction de l'ADN a été réalisée au sein du Laboratoire de Biologie Moléculaire, Hôpital La Croix Rousse- Lyon, France) en utilisant le Kit Quiagen (Réf : 51304).

Un volume de 200µl a été prélevé de la culture puis sonifié pendant 40min, ensuite 20µl de protéase K ont été ajoutés aux 200µl d'échantillon pour dénaturer toutes les enzymes. La lyse de la paroi cellulosique des spores fongiques a été réalisée dans du tampon AL. La suspension a été vortexée jusqu'à dissolution complète du culot et incubée à 70°C pendant 10min. Après l'incubation 200µl d'éthanol absolu ont été rajoutés afin de précipiter l'ADN.

La suspension a été pipetée (y compris le précipité qui a pu se former) et transformée dans une colonne placée dans un tube de 2ml (fourni dans le kit), puis centrifugée 1min à 6000g. La colonne a été remise dans un nouveau tube de 2ml, ensuite elle a été lavée avec 500µl de Tampon AW1 puis centrifugée 1min à 6000g. La colonne a été remise une deuxième fois dans un nouveau tube de 2ml et a été lavée avec 500µl de AW2 et centrifugée 3min à vitesse maximale, par la suite la colonne a été placée dans un tube Eppendorf 1.5ml et éluée avec 50µl d'eau distillée préchauffée à 60°C. Une incubation de 14min a été faite avant une centrifugation d'une minute à vitesse maximale. 50µl de la solution ont été récupérés et 5µl ont été utilisés pour l'amplification de l'ADN.

L'ADN extrait a été conservé à -40°C dans une boîte numérotée et identifiée dans le congélateur.

1.5.3.2. Amplification de l'ADN fongique (PCR)

L'objectif était d'identifier et de différencier les isolats de *Metarhizium* à l'aide d'un outil moléculaire.

La PCR consiste à amplifier sélectivement une séquence particulière d'ADN par action d'une ADN polymérase thermostable. L'amplification s'effectue sur un fragment d'ADN à partir de deux amorces oligonucleotidiques s'appariant spécifiquement aux extrémités des deux brins complémentaires qui délimitent la partie d'ADN à amplifier. Le marqueur moléculaire choisi dans cette étude phylogénétique est le genre ribosomal 18s, très représenté dans les banques de données. Ce marqueur nous permettra d'affilier nos séquences avec celles d'organismes connus. Deux amorces universelles ont été utilisées (**ITS1 et ITS4**). L'amplification est réalisée par un volume de 200µl. Les réactions de PCR ont eu lieu dans le

thermocycleur (LightCycler 2.0 Roche). Les micro tubes contiennent 2µl de l'ADN (200ng/µl) et 20µl d'un mélange réactionnel.

La composition du milieu réactionnel et les cycles employés figurent sur les tableaux 4 et 5.

ITS1: TCCGTAGGTGAACCTGCGG (Tm= 58°C)

ITS4: TCCTCCGCTTATTGATATGC (Tm=65°C)

Le mélange réactionnel (Tableau 4) était composé de : 2µL ITS1, 2µL ITS4, 2µL ADN, 2µL Fast Start Master Mix, 1.6µL MgCl₂, 10.4µL H₂O. Les conditions d'amplification par PCR ont été : une dénaturation initiale à 95°C pendant 10 minutes suivie de 45 cycles de dénaturation à 95°C (10 secondes), Hybridation à 58°C (10 secondes) et élongation à 72°C (40 secondes). Une élongation supplémentaire à 72°C (5 minutes) a été réalisée (Tableau 5).

Tableau 4 : Composition du milieu réactionnel (PCR)

Composés	Volumes (µl)
ITS1	2
ITS4,	2
ADN	2
Fast Start Master Mix	2
MgCl ₂	1.6
H ₂ O	10.4

Tableau 5: Les cycles d'amplification employés (PCR)

	Étapes	Températures (C°)	Temps
	Pré dénaturation	95	10 min
45 Cycles	Dénaturation	95	10 s
	Hybridation	58	10 s
	Elongation	72	40 s
	Elongation supplémentaire	72	5 min

1.5.3.3. Purification des produits PCR

La purification des PCR pré-séquençage a été réalisée par la méthode dite EXOSAP (Biofidal). Des plaques PCR et adhésif de fermeture ont été utilisées. Dans un tube de 1,5ml, un mix EXOSAP a été préparé par 100 réactions (Tableau 6). Ensuite une répartition de 2µl de ce mélange dans chaque puits avec un volume d'ADN nécessaire à la réaction de séquence, Les plaques PCR ont été mises dans un thermocycleur (Programme EXOSAP) (Tableau 7). En fin de cycle, une récupération des produits dans un bloc froid conservant les réactions à +4°C.

Tableau 6 : Composition du Mix EXOSAP

Réactifs	Volume (µl)	Volume (µl) pour 100 réactions
ADN	x	
Exonuclease 1 (20U/µl-20000U)	0.05	5 µL
Shrimp Alkaline Phosphatase (1U/µl-5000U)	0.70	70 µL
H2O qsp 2µL	1.25	125 µL

Tableau 7: PCR Programme EXOSAP

Température	Temps	Répétition
37°C	20:00	1
92°C	20:00	
11°C	indéfiniment	

1.5.3.4. Séquençage de l'ADN

Le séquençage a été effectué selon la technique de Sanger avec le Kit Big Dye Terminator V3.1 (de la société Lifetechnologies) automatisée au laboratoire Biofidal (Avenue Gabriel Péri 69120 Vaulx en Velin, Lyon France) (Tableau 8). Une réalisation d'abord d'un mélange (Premix + dilution Buffer + Taq) pour l'ensemble des réactions, qui ont été repartis dans les puits de la plaque PCR ou se trouve déjà l'ADN qui a été purifié par EXOSAP. La plaque a été ensuite scellée et placée dans le thermocycleur (Tableau 9).

Tableau 8: Composition Kit Big Dye

Réactifs	Volumes pour une réaction (µl)
ADN	X
Amorce (à 10 µM)	0,5 à 1 µl
BigDye V3.1 Ready Mix	1
BigDye Dilution Buffer 5 X	2
Taq (Termi Pol 5U/µl)	0,1
H2O	QSP 11 µl

Tableau 9: Programme PCR (Kit Big Dye)

Température	Temps	Nombre de cycles
95°C	3 :00 min	1
95°C 51°C 60°C	0 :15 min 0 :15 min 3 :00 min	35
11°C	For ever	1

1.5.3.5. Purification des séquences

La purification des réactions de séquences a été réalisée avec le Kit CleanSeq (de la société Agencourt), une purification sur kit Billes magnétiques SPRI. (Le protocole est détaillé dans l'annexe 2).

1.5.3.6. Analyse des séquences

Les résultats du séquençage des souches fongiques ont été obtenus sous forme d'électrophorogrammes bruts sous logiciel ChromasR (Annexe 3). Les alignements du couple des séquences sens / antisens ont été effectués par le logiciel Clustal X pour définir la séquence consensus. (Larkin *et al.*, 2007).

1.5.3.7. Comparaison des séquences avec la banque informatique

Les séquences d'ARNr 18s obtenues ont été soumises à une recherche d'homologie de séquences en utilisant le programme BLAST (Blast local Alignement Search Tool) sur le site NCBI (National Center For Biotechnology Information) pour rechercher les séquences les plus proches déposées dans Genbank ([http:// www.ncbi.nlm.nih.gov/blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast): (Altschul *et al.*, 1997).

1.5.3.8. Analyse phylogénétique

L'analyse phylogénétique consistait à évaluer les divergences entre plusieurs séquences : plus le nombre des substitutions entre deux séquences est élevé, plus la probabilité que ces deux séquences aient un ancêtre commun est faible. L'arbre phylogénétique est une représentation des résultats obtenus.

1.5.3.9. Méthodes de reconstruction d'arbres phylogénétiques

Après avoir aligné les séquences, les arbres phylogénétiques ont été construits avec le programme Mega version 5 (Kumar *et al.*, 2008). Ce programme permet d'utiliser des méthodes mathématiques modélisant différentes hypothèses quant à l'évolution des gènes, et génère des arbres phylogénétiques représentant les relations entre organisme. La méthode utilisée pour la construction d'arbres est : la méthode du « Neighbor Joining » (Saitou et Nei, 1987) : elle est la plus utilisée en microbiologie, c'est une méthode de distance, elle est basée sur le nombre moyen de substitutions nucléotidiques entre des séquences prises deux à deux. Elle permet de trouver les paires de séquences voisines qui minimisent la somme des longueurs des branches à chaque étape de regroupement. C'est une méthode relativement rapide, qui génère un arbre selon l'évolution minimale et donne de bons résultats pour des séquences proches. Cependant elle n'est pas utilisable pour des séquences très éloignées, et elle traite toutes les substitutions de manière équivalente ce qui induit une perte d'informations comme dans toutes les méthodes de distance (Ex : UPGMA), la méthode du Neighbor Joining sous estime le nombre d'événements mutationnels car les substitutions sont simplement dénombrées et ne sont pas pondérées. Or des phénomènes de mutations multiples peuvent se produire.

Différentes corrections ont été proposées pour tenter de corriger ce biais en faisant des hypothèses sur la façon dont les bases se sont substituées à un locus donné.

La correction de Kimura (1980) repose sur l'hypothèse que les transitions se produisent à des taux élevés que les transversions : le poids des transversions est double par rapport à celui des transitions.

Par ailleurs, la robustesse des arbres a été testée par la méthode du bootstrap (Felsenstein, 1985). Cette méthode d'analyse par échantillonnage permet d'évaluer la robustesse de chaque embranchement en donnant une mesure statistique de la confiance qui peut lui être attribuée. L'échantillonnage consiste à redistribuer les sites de façon aléatoire et à créer les topologies d'arbres correspondantes. L'opération est réalisée 100 à 1000 fois. La valeur de bootstrap d'un embranchement correspond à sa fréquence d'obtention sur les différentes topologies obtenues.

2. Résultats

2.1. Isolement des champignons entomopathogènes

L'isolement des champignons entomopathogènes a été effectué à partir de 3 échantillons de sols agricoles céréaliers (Blé et Mais). Quatre souches de champignons entomopathogènes ont été isolées. Au bout de 21 jours d'incubation à 28°C, les champignons apparaissent et se développent lentement. Ils ont été repérés d'après leurs aspects macroscopiques caractéristiques et purifiés afin d'obtenir des cultures pures.

L'isolement à partir des quatre échantillons de sols agricoles sur les trois milieux de culture (ODA, SDAY et PDAY) a conduit aux résultats rassemblés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 10 : Les échantillons de sol et leurs sites de prélèvement

Type de sols	Site	Nombre d'isolats		
		ODA	SDAY	PDAY
Blé	Ain el Bey	0	1	0
Blé	El Khroub	1	0	0
Mais	Hamma Bouziane	2	0	0

Parmi les trois milieux sélectifs utilisés, le milieu ODA additionné d'antibiotiques et de fongicides s'est montré efficace en permettant une bonne récupération des champignons entomopathogènes à partir des milieux naturels en comparaison avec les deux autres milieux utilisés (Tableau 10).

2.2. Identification des isolats

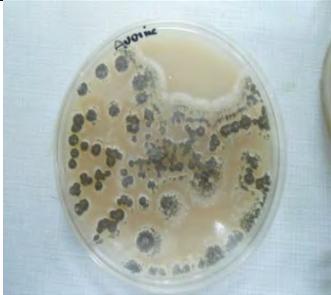
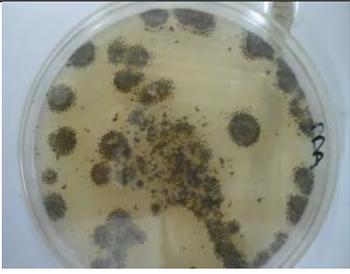
2.2.1. Caractères morphologiques et cultureux

En se basant sur les clés de détermination des genres fongiques à savoir les caractères cultureux et morphologie microscopique (la taille, la forme et l'arrangement des conidies sur le conidiophore) établies par Bischoff *et al.*,(2009), il s'est avéré que les quatre isolats fongiques appartiendraient au genre *Metarhizium*.

2.2.2.1. Aspect macroscopique

Après ensemencement sur les différents milieux de culture gélosés, les colonies des souches M1, M2, M3 et M5 apparaissent au bout de 7 jours d'incubation à 28°C et à l'obscurité. Les caractères cultureux des isolats ; *Metarhizium sp*₁, *Metarhizium sp*₂, *Metarhizium sp*₃, et *Metarhizium sp*₅ sur les 3 milieux de culture gélosés utilisés qui favorisent leur sporulation et leur différenciation sont rassemblés dans le tableau 11.

Tableau 11 : Aspects macroscopiques des quatre souches isolées

	ODA	SDAY	PDAY
<i>Metarhizium sp</i> ₁ (M1)			
<i>Metarhizium sp</i> ₂ (M2)			
<i>Metarhizium sp</i> ₃ (M3)			
<i>Metarhizium sp</i> ₅ (M5)			

Toutes les souches (M1, M2, M3 et M5) se développent sur tous les milieux utilisés avec différents degrés de croissance allant d'une croissance faible à une croissance abondante.

- Sur les milieux ODA et PDAY, la totalité des souches a donné des colonies poudreuses de couleur blanche devenant verdâtre foncée après la maturation, contournées à leur périphérie.
- Sur le milieu SDAY, les colonies ont présenté, au début, un mycélium blanc plat d'aspect cotonneux sur lequel les spores ont formées de petits ilots. Plus tard, elles sont devenues jaunâtres verdâtres après la maturation des spores avec un aspect poudreux.

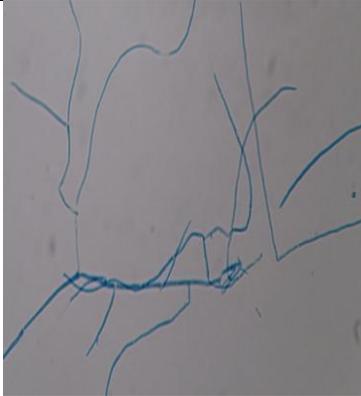
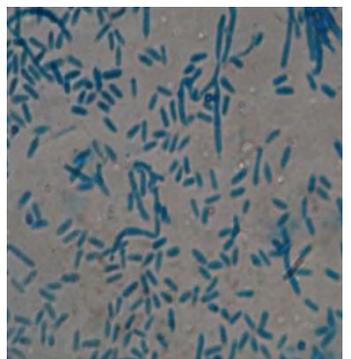
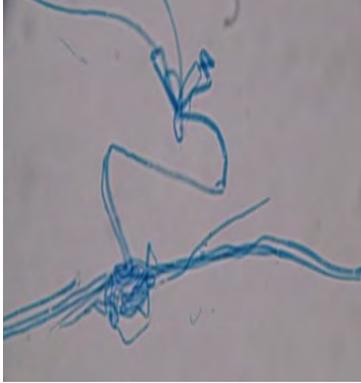
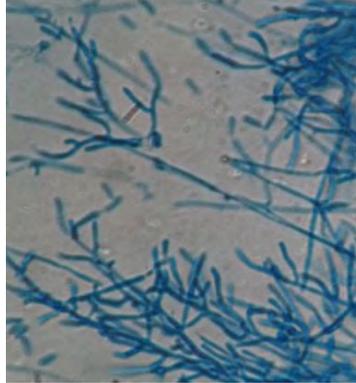
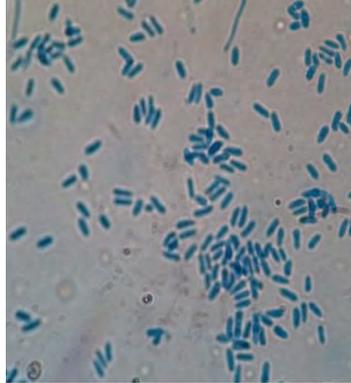
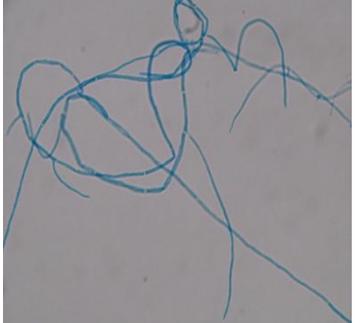
Au 21^{ème} jour d'incubation, pratiquement toutes les souches apparaissent pigmentées. C'est la maturation des cultures, des gouttelettes d'eau de couleur jaune sont déposées à la surface des colonies, elles apparaissent après la maturation du mycélium aérien. Elles sont différentes de celles dues à l'humidité (condensation lors de l'incubation) du fait qu'elles sont pigmentées et ne sont présentes que sur le mycélium aérien.

2.2.1.2. Aspect microscopique (Technique des lamelles)

Après 14 jours d'incubation, les lamelles sont retirées de la gélose et déposées sur une lame, puis observées au microscope optique. Il apparaît que toutes les souches ont développé un mycélium de substrat, ce mycélium se présentait sous forme de longs filaments ramifiés cloisonnés.

De point de vue microscopique, les quatre isolats ont été caractérisés par un mycélium hyalin, cloisonné et ramifié. Les conidiophores qui se sont formés sur le mycélium sont ramifiés irrégulièrement vers le bas. Les phialides ont une forme cylindrique ou légèrement gonflés sur le côté où les spores ont été formées. Les conidies, formées en chaînes basipètes ont une forme cylindrique et sont arrondies aux deux extrémités, parfois un des côtés est légèrement rétréci (Tableau 12).

Tableau 12: Aspects microscopiques des quatre souches isolées

Isolats	Mycélium	Phialides	Conidies
<i>Metarhizium</i> <i>sp</i> ₁ (M1)			
<i>Metarhizium</i> <i>sp</i> ₂ (M2)			
<i>Metarhizium</i> <i>sp</i> ₃ (M3)			
<i>Metarhizium</i> <i>sp</i> ₅ (M5)			

2.3. Amplification et séquençages de l'ARNr 18S avec des amorces universelles

Le marqueur moléculaire choisi dans cette étude est le gène ribosomal 18s. Très représenté dans les banques de données. Ce marqueur nous permettra d'affilier nos séquences à un groupe d'organismes connu.

Les ADN codants pour les ARN ribosomiaux 18S des quatre isolats ont d'abord été amplifiés par la technique de la PCR. Les produits de la PCR ont été séquencés et les séquences obtenues (Annexe 3) ont été comparées avec celles d'autres organismes de la base de données Genbank. L'analyse des séquences d'ARNr 18S et les séquences de la région ITS des souches fongiques de la banque a permis d'affilier les quatre souches à l'espèce *Metarhizium anisopliae* (Tableau 13).

- ✓ **L'isolat M1** : La séquence d'ARNr 18S de la souche M1 présente 100% d'identité avec celle de *Metarhizium anisopliae* (AJ608970.1) et 100% avec *Metarhizium anisopliae* CZ593 (FJ755244).
- ✓ **L'isolat M2** : L'isolat M2 présente des homologies de 100% avec l'espèce *Metarhizium anisopliae* (HM017066.1) et 99% d'identité avec l'espèce *Metarhizium anisopliae var. majus* (AF339530.1).
- ✓ **L'isolat M3** ; un pourcentage d'identité de 100% a été obtenu entre les séquences de l'ARNr 18s de la souche M3 et celle de *Metarhizium anisopliae* (HM017066.1) et un pourcentage de 99% avec l'espèce *Metarhizium anisopliae var. majus* (AF339530.1).
- ✓ **L'isolat M5** : La séquence d'ARNr 18s de la souche M5 présente 100% d'homologie à celle de *Metarhizium anisopliae* strain HZ1(GQ888737.1) et *Metarhizium anisopliae var. anisopliae strain Mb7* (EF113341.1) .

Tableau 13 : Affiliation phylogénétique des quatre isolats (paires d’amorces universelles)

Souches	Groupe	Identité	Espèces proches	Numéro d’accession
M1	<i>Metarhizium</i>	100%	<i>Metarhizium anisopliae</i>	AJ608970.1
		100%	<i>Metarhizium anisopliae</i> CZ593	FJ755244.1
M2	<i>Metarhizium</i>	100%	<i>Metarhizium anisopliae</i>	HM017066.1
		99%	<i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>majus</i>	AF339530.1
M3	<i>Metarhizium</i>	100%	<i>Metarhizium anisopliae</i>	HM017066.1
		99%	<i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>majus</i>	AF339530.1
M5	<i>Metarhizium</i>	100%	<i>Metarhizium anisopliae</i> strain HZ1	GQ888737.1
			<i>Metarhizium anisopliae</i> var <i>anisopliae</i> strain Mb7	EF113341.1

2.4. Analyse Phylogénétique

A partir des séquences obtenues après amplification avec la paire d’amorces universelle, une étude phylogénétique a été réalisée. Des alignements des séquences sont réalisés par ClustalW. L’arbre est construit à partir de Neighbor-joining en utilisant le test de bootstrap (nombres sur les branches) de 1000 réplifications en utilisant les distances de Kumura qui prend en compte les transitions et les transversions du programme MEGA5 (Tamura *et al.*,2007) (Figure 22). Le séquençage du gène de l’ARNr et l’alignement avec des séquences extraites de Genbank confirme l’appartenance des isolats M1, M2, M3 et M5 à l’espèce ***Metarhizium anisopliae***.

Les séquences obtenues des quatre souches (M1,M2,M3 et M5) ont été enregistrées au niveau de Genbank sous les numéros d’accession : LK995308, LK995309, LK995310 et LK995311 respectivement.

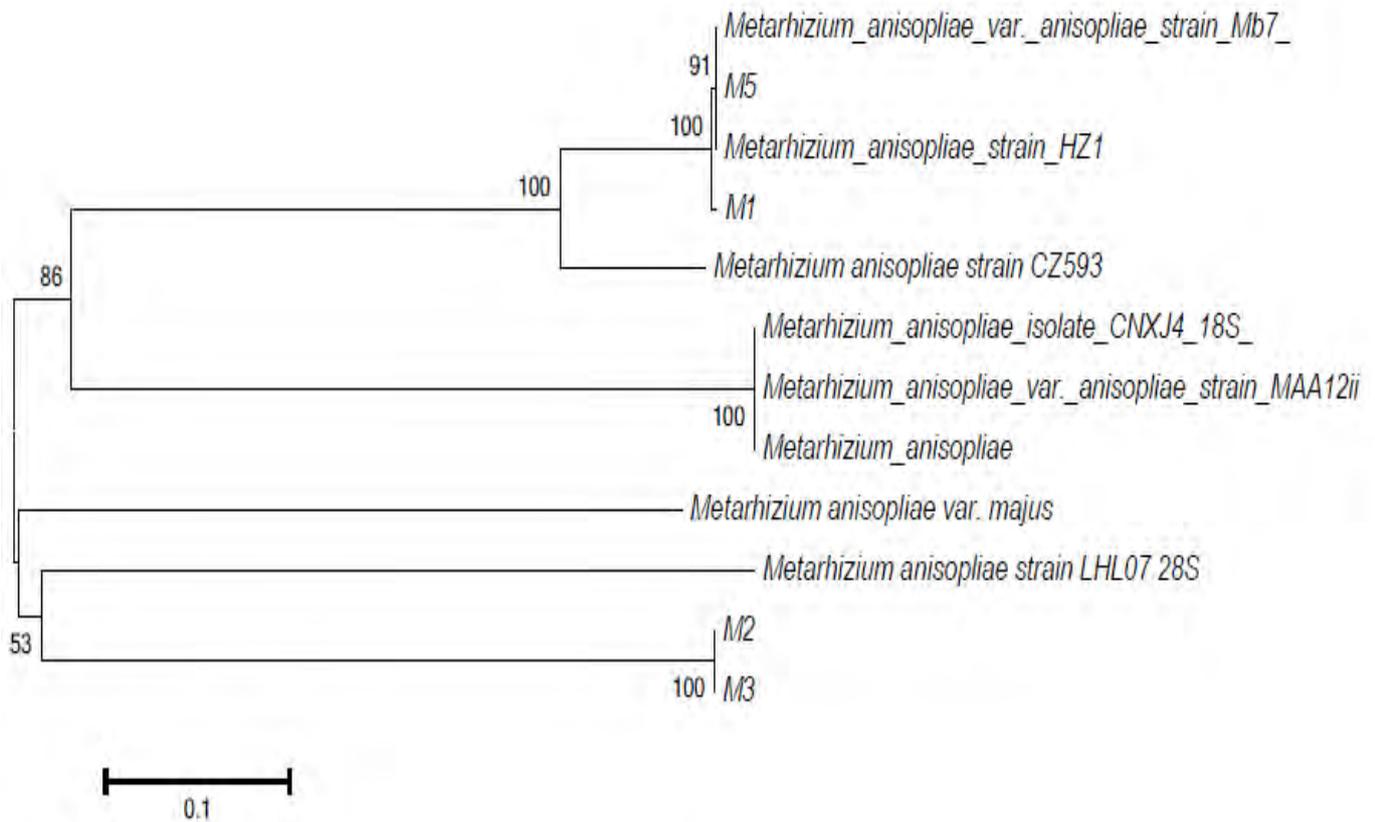


Figure 22: Arbre selon la méthode des distances (Neighbor-Joining) construit d'après l'analyse des séquences d'ARNr 18s en utilisant le logiciel Mega(Molecular Evolutionary Genetics Analysis) montrant la position phylogénétique des isolats M1, M2,M3 et M5 parmi les espèces représentatives du genre *Metarhizium*. Les valeurs mentionnées à l'origine des nœuds représentent le pourcentage après 1000 bootstrap. 0.1 représente le nombre de substitution par position de nucléotide.

3. Discussion

Les champignons entomopathogènes sont naturellement présents dans l'environnement (sol, air, eau) et infectent généralement leur hôte soit par ingestion, par la cuticule ou par les orifices. Le genre *Metarhizium* représente un large nombre de champignons entomopathogènes communément isolés à partir d'insectes (Poprawski et Yule, 1991 ; Pedro et Condidio, 1997) et à partir du sol (Roddam et Rath, 1997 ; Tarasco *et al.*, 1997). En effet l'exploration des échantillons récoltés dans le présent travail a abouti à l'isolement de quatre isolats de *Metarhizium* repartis sur les différents sites.

Le sol agricole céréalier a déjà fait l'objet d'un isolement du champignon entomopathogène *Metarhizium anisopliae* par Mietkiewski *et al.*, (1992) à partir duquel il a isolé dix isolats de champignons entomopathogènes dont deux isolats de *Metarhizium anisopliae*. Meyling *et* Einlenberg (2007) ont aussi exploré le sol céréalier de pour l'isolement de *Metarhizium anisopliae* afin de déterminer leur spectre insecticide.

Selon Nielson *et al.*, 2004 *Metarhizium anisopliae* est une espèce agricole du fait de sa forte présence dans les agro écosystèmes par rapport aux autres espèces. De plus, le modèle analytique (Log-Lineaire) explicatif de la prévalence de champignon entomopathogènes utilisé par Quesada –Morgan *et al.*, (2007), a indiqué une stricte corrélation positive entre *Metarhizium anisopliae* et les sols cultivés.

L'isolement de *Metarhizium anisopliae* à partir de différents sols agricoles est cohérent avec les études de Meyling *et* Einlenberg (2007) qui indiquent que les sols céréaliers favorisent l'installation du genre *Metarhizium* plus que les autres champignons entomopathogènes. **Cependant à notre connaissance, aucun travail n'a été publié sur l'isolement de *Metarhizium anisopliae* à partir du sol en Algérie.**

L'isolement sélectif des champignons entomopathogènes particulièrement *Metarhizium anisopliae* à partir du sol pose problème. En effet trop de substrats favorisent les champignons et les bactéries à croissance rapide et empêchent de ce fait un isolement facile des champignons entomopathogènes qui ont un temps de génération relativement long (Keller *et* Zimmerman, 1989), leur sélection doit passer par l'élimination des microorganismes qui par leurs facilités d'envahissement gênent la croissance des entomopathogènes.

Le rapport entomopathogène/microorganisme d'un échantillon augmente soit par l'utilisation de certaines sources de carbone et d'azote (Avoine, Glucose, Peptone de soja) rendant les milieux moins favorables à la croissance des champignons autres que les entomopathogènes ou encore par l'emploi de substances antibiotiques et antifongiques (Dodine, Bénomyl, Rose bengale, steptomycine, crystal violet et actidione) qui permette d'inhiber le développement des flores bactériennes, fongiques et antagonistes (Chase *et al.*, 1986 ; Milner *et al.*, 1992 ; Liu *et al.*, 1993 ; Fernandes *et al.*, 2010).

Les trois milieux de culture utilisés au cours de cette étude ont été décrits par plusieurs auteurs pour l'isolement des champignons entomopathogènes à partir du sol (Veen *et al.*, 1966 ; Beilharz *et al.*, 1982). Le milieu ODA a été utilisé pour l'isolement de *Metarhizium anisopliae* à partir du sol, son constituant principal est l'avoine complété de glucose, il permet aussi la croissance de *Beauveria bassiana* en présence d'autres champignons du sol, mais sa sélectivité s'avérant insuffisante. De ce fait divers composés antifongiques y ont été adjoints pour inhiber les champignons à croissance rapide. En outre, le fongicide dodine (N.dodecylguanidine monoacétate) déjà préconisé par Beilharz (1982) à été incorporé dans le milieu de culture à 50µg/l afin de favoriser le développement de *Metarhizium anisopliae* , C'est dans ce sens nous avons ajouté ce fongicide dans les trois milieux utilisés et nous avons obtenu quatre souches fongiques à partir des quatre différents sols agricoles prélevés . Nos résultats sont en accord avec les travaux rapportés par Chase *et al.*, (1986), qui indiquent que l'utilisation du fongicide dodine dans le milieu de culture favorise le développement de *Metarhizium anisopliae* et *Beauveria bassiana* lorsqu'il est employé à des faibles concentrations (10µg à 50µg) en réduisant 90% des contaminants de l'environnement..

Les différentes espèces du genre *Metarhizium* peuvent être différenciées par une approche taxonomique en utilisant une combinaison des données phénotypiques et génotypiques. L'étude des caractéristiques morphologiques macroscopiques et microscopiques des champignons entomopathogènes est largement utiliser pour caractériser le genre *Metarhizium* (Tulloch, 1976). La totalité des isolats obtenus développent des colonies après 21 jours d'incubation, le taux de croissance et la couleur verte dominante des colonies ont été marqués après la période d'incubation. Selon Goettel et Inglis (1997) ce sont des caractéristiques des champignons entomopathogènes du genre *Metarhizium* à croissance lente.

Pour l'identification des quatre champignons isolés nous avons utilisé les critères proposés par Weiser et Briggs (1971), Tulloch (1976), Samson *et al.*, (1988). Les quatre isolats cultivés sur les trois milieux (ODA, PDAY et SDAY) ont formé de grandes colonies circulaires de texture variable et des nuances variées de jaune vert à vert olive ou domine la masse de spores, devenant plus tard vert plus foncé selon le milieu de culture utilisé. Ces observations sont en parfaite concordance avec celles constatées par (Luz *et al.*, 1994 ; Hallsworth et Magan, 1996 ; Goettel et Inglis, 1997). Les quatre champignons isolés assignés dans un premier temps au genre *Metarhizium*, ils se caractérisent par des hyphes lisses, cloisonnées avec des conidiophores cylindriques et des conidies uninuclées cylindriques ou sont légèrement gonflées sur le côté. Selon (Tulloch, 1976 ; Goettel et Inglis, 1997) ces observations caractérisent exclusivement le genre *Metarhizium*.

En ce qui concerne les dimensions des conidies, Bridge *et al.*, (1993) indiquent qu'un caractère taxonomique fait la distinction entre les espèces du genre *Metarhizium*. Ce qui a été observé dans notre étude pour les souches M2 et M3 qui possèdent des conidies cylindriques et légèrement plus longues et plus larges que celles des deux autres souches M1 et M5, ces mêmes observations ont été constatées par Tulloch (1976) où il a trouvé qu'il existe deux formes de *Metarhizium anisopliae* dont la différence se base sur la taille des conidies, la forme *Metarhizium anisopliae var. anisopliae* à spores courtes, dont les conidies mesurent de 5 à 8 µm de longueur et la forme *Metarhizium anisopliae var. majus* à spores longues, dont les conidies mesurent de 10 à 14 µm de longueur.

Lorsque les caractéristiques morphologiques sont insuffisantes pour identifier un champignon, on utilise les techniques physiologiques et biochimiques. Cependant, pour des champignons filamenteux ces méthodes sont laborieuses, longues et quelques fois incomplètes. En outre, de nombreuses espèces de champignons ont été décrites à partir d'un seul spécimen ou, dans les meilleurs cas, d'un groupe d'individus très restreint. Ceci engendre une vulnérabilité certaine au niveau de la taxonomie morphologique en raison de la grande variabilité phénotypique dans le monde fongique (Andersen et Thrane, 1996; Frisvad *et al.*, 1998 ; Guarro *et al.*, 1999).

Les méthodes moléculaires sont universellement applicables et permettent d'explorer le polymorphisme à différents niveaux (comparaison entre des souches, des espèces, des genres, etc...). Ces dernières sont basées sur l'étude d'un gène (locus), d'un fragment d'ADN défini (espaceur, intron, etc.), et de plusieurs gènes (multiloci) ou encore de l'ADN total dépendant du but poursuivi. Les méthodes développées dans la littérature sont surtout basées sur la détection par PCR (Polymerase Chain Reaction). Toute séquence d'ADN qui est spécifique à une espèce particulière ou à un groupe d'espèces peut être utilisée pour la détection par PCR (Henson et French, 1993). Les séquences qui codent pour les ARNr (nucléaire et mitochondrial) sont largement utilisées. L'une des premières applications de la PCR dans la mycologie a été réalisée par White et al., (1990) par l'amplification et le séquençage de l'ADN ribosomal fongique pour établir une relation taxonomique et phylogénétique. Les séquences de l'ADN ribosomal contiennent des régions conservées et variables, leur évolution permet d'étudier l'évolution du génome d'un organisme.

Au total, 4 souches de *Metarhizium* ont été testées dans cette étude. Ces souches ont été repiquées sur milieu SDA à 28°C pendant 7 jours, ce qui a permis le développement d'un mycélium blanc à partir duquel l'extraction de l'ADN génomique de chaque souche a été faite (Liu et al. 2000). Le gène 18S utilisé pour l'identification moléculaire des champignons est un gène chromosomique présent chez toutes les espèces fongiques (gène universel). En outre, en taxonomie moléculaire des champignons, les gènes les plus sollicités sont ceux qui codent pour l'ARN ribosomique (Frisvad et al., 1998). Pour la comparaison des taxons de rangs supérieurs (familles, ordres, classes) l'ADN ribosomal 18S, très conservé, s'avère plus adapté

Les études ont été ensuite menées dans le but de trouver des variations génétiques entre les espèces susceptibles de les différencier. Ce travail a été basé sur l'analyse des séquences de l'ADNr, y compris les séquences des espaceurs internes transcrits (ITS) en utilisant les deux amorces (ITS1 : 5' TCC GTA GGT GAA CCT GCG G 3' et ITS4 : 5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3') (Driver et al., 2000 ; Entz et al., 2005). Plusieurs auteurs ont accepté de considérer l'ITS comme étant le premier choix pour établir le code bar ADN du règne des champignons. Ceci dit, l'ITS ne permet pas toujours de distinguer entre des espèces phylogéniques très proches (Bruns, 2001), alors que certains gènes protéiques riches en introns le permettent (Geiser, 2004).

D'après Chen *et al.*, (2001) ; Zhao *et al.*, (2001), la discrimination des espèces proches se base plutôt sur les séquences de la région espaceur Interne Transcrit ('Internal Transcribed Spacer', ITS) de l'ADN ribosomal ceci en raison de la facilité de l'étude de ces unités, qui sont des régions non codantes et variables selon l'espèce, après amplification par PCR.

Par ailleurs, Pantou *et al.*, (2003) ont mis au point une paire d'amorces IGS ('Inter Genic Sequence', IGSa et IGSb) qui pourraient être utilisées pour identifier et différencier le champignon *Metarhizium* des autres champignons entomopathogènes.. En plus, les ITS et les IGS sont largement utilisés pour la fabrication des amorces spécifiques permettant de différencier les espèces appartenant au genre *Metarhizium* (Curran *et al.* , 1994 ; Fernandes *et al.*, 2010). D'autres séquences de l'ADNr comme 18S, 28S et l'ADNr mitochondrial sont aussi utilisés pour la fabrication des amorces spécifiques (Driver *et al.*, 2000).

L'analyse phylogénétique a montré que les deux souches M1 et M5 ont été placées dans la même branche avec leurs souches apparentées. Pour la souche M1, elle présente une ambiguïté entre *Metarhizium anisopliae* 5.8S_rRNA (AJ608970.1) et *Metarhizium anisopliae* CZ593(FJ755244) avec un même pourcentage d'homologie de 100%. La souche M5 présente une ambiguïté entre *Metarhizium anisopliae* var *anisopliae* strain mb7 (EF113341.1) et *Metarhizium anisopliae* HZI (GQ888737.1) avec un pourcentage de similarité de 100% pour les deux espèces. L'analyse moléculaire qui donne des pourcentages de similarité de 100% entre M1, M5 et leurs espèces apparentées a été confirmé par l'emplacement de ces dernières sur la même ligne phylogénétique. Les deux autres souches M2 et M3 occupent une ligne phylogénétique commune et elles ont été placées dans la même branche avec leurs souches apparentées (*Metarhizium anisopliae* (HM0170661.1) avec un pourcentage de 100 % et *Metarhizium anisopliae* var *majus* (AF339530.1) avec un pourcentage de 99%). Les souches identifiées par les caractères morphologiques appartenant à une même espèce se retrouvent dans les mêmes groupes. Les dendrogrammes montrent une bonne cohérence de classification entre les caractères morphologiques et moléculaires.

L'application des différents types d'identification (morphologique et moléculaire) a clarifié la taxonomie des quatre souches à l'espèce *Metarhizium anisopliae*. Les quatre souches isolées (M1, M2, M3 et M5) portent les numéros d'accès suivants : LK995308, LK995309, LK995310, LK995311.

Chapitre II : Etude de l'activité larvicide de *Metarhizium anisopliae* sur les larves de *Culex pipiens*

Certaines espèces de moustiques sont des vecteurs de parasites responsables de maladies comme le paludisme, la Fièvre jaune et les Filarioses. Pour lutter contre les moustiques plusieurs possibilités existent telles que la lutte contre les adultes et la lutte contre les larves. Pour la lutte anti larvaire les méthodes les plus utilisées sont de nature mécanique (remblayage ou destruction des gîtes) et chimique (utilisation de produits chimiques de synthèse). Depuis quelques années, l'augmentation des cas de résistance aux insecticides chimiques et les effets néfastes sur les espèces non cibles ont conduit à la recherche de nouvelles solutions de lutte contre les insectes vecteurs de maladies comme les moustiques. Dans la recherche de méthode alternative à la lutte chimique, l'utilisation des biopesticides est de plus en plus développée contre les moustiques.

La méthode de lutte contre les vecteurs au moyen d'agents microbiens utilisant des organismes trouvés en milieu naturel est généralement beaucoup plus sélective et moins polluante que celle utilisant les pesticides.

Les entomopathogènes sont des micro-organismes (bactéries, champignons, protozoaires, etc.) causant des maladies mortelles chez les insectes. Les souches de champignons sont les plus prometteuses dans cette nouvelle perspective.

Pour cela nous avons opté pour un essai de lutte biologique, Nous avons procédé à des biotests microbiologiques en utilisant un champignon entomopathogène *Metarhizium anisopliae* isolé à partir de différents sols agricoles contre les larves de *Culex pipiens*.

1. Matériel et méthodes

1.1 Matériel biologique

1.1.1. Echantillonnage

Les larves et les nymphes ont été récoltées dans un gîte représenté par un bassin (Figure 23) situé à Chaab Erssas (Université Constantine1).



Figure 23 : Gîte larvaire utilisé dans l'étude

L'échantillonnage a été effectué selon une fréquence de deux à trois séances de capture par semaine au cours desquelles, les spécimens larvaires et nymphal ont été collectés. Une louche d'une capacité de 60ml a été plongée doucement sous l'eau avec une inclinaison de 45° environ par rapport à la verticale. L'eau contenant probablement des larves et des nymphes a été prélevée plusieurs fois en diversifiant les points de prélèvement, le contenu de la louche a été versé à chaque fois dans un récipient. Les spécimens collectés ont été transportés au laboratoire (LaMyBAM) où règnent des conditions normales de température (25°C). Les larves du stade 1 et 2 ont été séparées des celles des stades 3 et 4 et des nymphes à l'aide d'une pipette compte goutte.

Les spécimens de chacun de ces stades ont été ensuite placés dans un bac contenant 500 ml d'eau de source. Celui des larve contient une mixture de poudre de biscuit 75% et de levure sèche 25% laquelle permet un apport de protéines, de glucides et de vitamines B (Mohanty *et al.*, 2008).

L'eau des larves a été changée tous les 2-3 jours afin d'éviter l'apparition de moisissure à la surface de l'eau, ce qui empêcherait les larves de respirer.

Quant au bac des nymphes, il a été déposé dans une cage cubique (30x25x30cm) avec une armature en bois voilée en tulle et comportant sur le coté un manchon de tulle pour permettre un accès facile (Figure 24).

1.1.2. Méthode d'élevage

A l'issue du stade nymphale qui dure au moins 48 heures, émergent les moustiques adultes. Les males et les femelles ont été laissés dans la même cage afin d'assurer l'accouplement. Leur nourriture et particulièrement celle des males, est constituée de raisins secs attachés sur le coté supérieur de la cage sous forme de grappe. Une boîte de Pétri en verre contenant du sang hépariné est recouverte avec un film alimentaire et disposée au dessus de la cage pour assurer le repas sanguin des femelles fécondées (Figure 24). Il suffit alors de retourner la boîte de Pétri que l'on place sur le haut de la cage en tulle de manière à rendre accessible le sang pour les femelles. Cette technique que nous avons adaptée pour l'élevage est inspirée des travaux d'Ensernik(2006). Cet élevage a pour but de donner un nombre appréciable de larves des stades 3 et 4 sensibles qui constituent la souche témoin lors des bioessais.



Figure 24 : Méthode d'élevage des moustiques

1.1.3. Conditions de l'élevage

Pour que les tests de sensibilité soient fiables et donnent une idée exacte du degré réel de résistance dans la population, le local où ont été réalisés ces tests sont indemnes de toute contamination par des insecticides. Il n'y règne aucune condition extrême d'éclairage, de ventilation, de température ou d'humidité.

Il est à noter que nous avons suivi le protocole d'élevage de OMS (1963) qui stipule que la température moyenne de l'eau doit être d'environ 25°C et ne doit jamais être à 20°C ni supérieure à 30°C.

1.2. Etude de l'effet des différentes souches de *Metarhizium anisopliae* sur les larves du *Culex pipiens*

1.2.1. Méthode d'ensemencement du champignon entomopathogène

Les souches (M1, M2, M3 et M5) de *Metarhizium anisopliae* ont été multipliées dans des boîtes de Pétri contenant le milieu PDA. Sous la hotte, nous avons prélevé à l'aide d'une pipette Pasteur des fragments du milieu contenant le champignon et cela à partir d'une ancienne souche de *Metarhizium* que nous avons ensemencé dans le milieu de culture. L'ensemencement a été fait de manière à ce que le développement du champignon occupe toute la surface de la boîte. Les boîtes ont été fermées avec du Parafilm pour éviter les contaminations, puis placées à l'étuve à 28°C à l'obscurité pendant 14 jours d'incubation.

1.2.2. Méthode de préparation de la solution entomopathogène

À l'aide d'une spatule stérile de petits fragments du champignon en fructification dans la boîte de Pétri ont été prélevés par grattage de la surface de la boîte pour être introduits dans un tube à essai contenant 9ml d'eau distillée. La solution ainsi obtenue (solution mère) a été mise en agitation pendant 10 minutes pour une libération maximale des spores. La concentration de la solution entomopathogène a été évaluée à l'aide d'une cellule hématimétrique « Cellule de Thoma ». Cinq différentes concentrations de la solution entomopathogène ont été utilisées pour le traitement des larves ; 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , et 10^9 spores/ml.

1.2.3. Réalisation des biotests

Pour les bio-essais nous avons sélectionné des larves de *Culex pipiens* au 4^{ème} stade larvaire (L4) : c'est un stade indicateur du bon fonctionnement des bio-toxines.

1.2.3.1. Protocole expérimental

Un dispositif simple en blocs à 5 niveaux et à 3 répétitions pour les témoins et les 5 doses choisies a été élaboré afin de traiter les larves. Le dispositif consiste à :

- Préparer 5 godets en plastique remplis à $\frac{3}{4}$ de l'eau du gîte
- Déposer dans chaque godet 25 larves au 4^{ème} stade
- Recouvrir chaque godet d'un morceau de tulle
- Renfermer avec un élastique en caoutchouc
- Mettre le dispositif au laboratoire à une température ambiante d'environ 25°C et traiter.

Les tests ont été réalisés avec les différentes concentrations de la solution entomopathogène dans des godets contenant chacun 50 ml de solution (49 ml eau distillée et 1 ml de la solution entomopathogène) et 25 larves de moustiques du 4^{ème} stade de la même espèce (Figure 25). Le même nombre de larves a été placé dans un godet témoin contenant 50 ml de l'eau distillée. Pour chacune des 5 concentrations de la solution entomopathogène ainsi que pour le témoin, trois répétitions ont été effectuées.

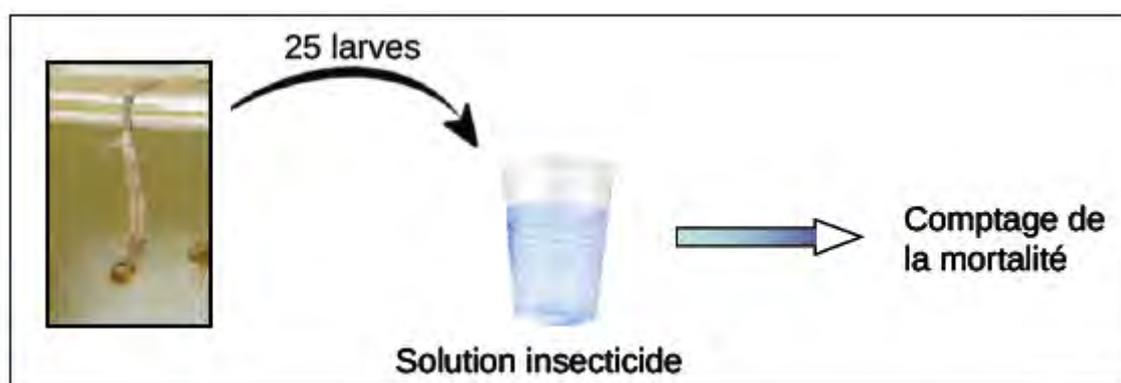


Figure 25 : Protocole expérimental mettant en évidence de l'effet de *Metarhizium anisopliae* sur la mortalité des larves L4 de *Culex pipiens*

Ces comptages permettent d'obtenir la sensibilité larvaire, exprimée par le taux de mortalité (%) en fonction du temps d'exposition et de la dose du toxique. Selon les recommandations de l'OMS (1963), Le pourcentage de mortalité a été calculé en utilisant la formule (1) :

$$(1) \text{ Pourcentage de mortalité} = \frac{\text{Nombre des larves mortes}}{\text{Nombre des larves introduites}} \times 100$$

Cependant si le taux de mortalité des témoins est compris entre 5 et 20%, une correction est effectuée selon la formule (2) Abbott (1925) qui permet d'éliminer la mortalité naturelle et de connaître la toxicité réelle du larvicide. Si la mortalité est supérieure à 20%, le test est annulé et doit être renouvelé

$$(2) \text{ Pourcentage de mortalité} = \frac{\text{Mortalité des larves traitées\%} - \text{mortalité des témoins}}{100 - \text{mortalité des témoins}} \times 100$$

1.3. Analyse statistique

Une analyse de la variance a été réalisée afin de mieux interpréter les résultats ainsi que divers tests statistiques et mathématiques.

1.3.1 Analyse de la variance

Selon Dagnelie (1975), l'analyse de la variance consiste à étudier la comparaison des moyennes à partir de la variabilité des échantillons.

Pour prouver l'efficacité du facteur étudié nous avons fait appel à l'analyse de la variance à deux critères de classification dans le but de tester la sélectivité statistique des différences entre les facteurs étudiés, en utilisant le logiciel SPSS.

1.3.2. Le test Newman Keuls au seuil de 5%

Ce test vient compléter l'analyse de la variance en indiquant les niveaux de significativité pour les couples correspondants de moyennes. Par la suite les moyennes seront classées en groupes homogènes et en groupes hétérogènes.

Suivant le niveau de la signification on peut déterminer l'influence des facteurs étudiés. La probabilité inférieure à 0,01 donne un effet hautement significatif, à 0,05 un effet significatif et pour une probabilité supérieure à 0,05 on considère que l'effet n'est pas significatif.

1.3.3. L'analyse Probit

Pour estimer la DL₅₀ (dose nécessaire et suffisante pour tuer la moitié d'une population) et de le TL₅₀ (temps léthal au bout du quel on obtient 50% de mortalité) nous avons utilisé pour chaque dose la transformation en Probit des pourcentages de mortalités corrigées (Cavalier,1976). Notons que les valeurs sont tabulées. A partir des équations de droites de régression « Probit-logarithme » nous pouvons calculer la DL₅₀ et le TL₅₀ en remplaçant Y par le probit 5. Ces transformations permettent d'établir les droites de régression de type :

$$Y = ax + b$$

Y : probit des mortalités corrigées

x : logarithmes de la dose ou des temps

a : la pente

2. Résultats

Cette partie a été consacrée à l'étude de l'effet larvicide du champignon entomopathogène *Metarhizium anisopliae* contre les larves du 4^{ème} stade de *Culex pipiens*. Ce dernier est connu comme étant une espèce ayant développé une résistance aux insecticides notamment le Malathion et autres organophosphorés (Berchi, 2000), d'où l'intérêt de s'orienter vers les méthodes de lutte biologique.

2.1. La souche *Metarhizium anisopliae* LK995308 (M1)

2.1.1 Taux de mortalité

Pendant 10 jours de traitement, nous avons noté quotidiennement le nombre de larves mortes. Les résultats ont été constatés à partir du 1^{ier} jour de traitement. En effet, après avoir isolé les larves mortes, nous avons pu remarquer qu'elles ont développé une couche brune

verdâtre à la surface et à l'intérieur du corps accumulée en grande quantité au niveau abdominale. Ce qui correspond très probablement aux hyphes du champignon parasite.

Par ailleurs, le taux de mortalité a été noté quotidiennement pour chacune des doses appliquées et par l'ensemble des répétitions. La moyenne des mortalités cumulées a été réalisée et illustrée dans le tableau 14.

Tableau 14 : Pourcentage moyen de mortalité des larves de *Culex pipiens* traitées par *Metarhizium anisopliae* (M1)

Doses(spores/ml) / Temps(jours)	D0 : Témoin	D1 (10^5)	D2 (10^6)	D3 (10^7)	D4 (10^8)	D5 (10^9)
1	0	4	8	32	40	52
2	0	8	12	44	52	68
3	0	20	32	64	72	84
4	0	40	48	76	88	96
5	0	40	52	80	96	100
6	0	48	64	88	100	100
7	0	52	72	92	100	100
8	0	72	84	92	100	100
9	0	84	92	100	100	100
10	0	100	100	100	100	100

Le tableau 14 montre que l'effet de M1 a commencé dès le 1^{ier} jour et met en évidence une évolution « verticale et horizontale ». En effet, le pourcentage moyen de mortalité est proportionnel aux doses administrées et, est en fonction du temps. Il varie de 4% pour une dose de 10^5 spores/ml ; le premier jour pour atteindre 52% pour une dose de 10^9 spores/ml. Cet effet larvicide est plus prononcé au fur et à mesure qu'on avance dans le temps pour atteindre un taux de mortalité de 100%, les 5^{ème} et 6^{ème} jour ; pour les concentrations les plus élevées (10^9 et 10^8 spores/ml ; et les 9^{ème} et 10^{ème} jour pour les doses les plus faibles.

Les résultats obtenus ont été exprimés en courbes (Figure26) pour mieux suivre les niveaux de mortalité.

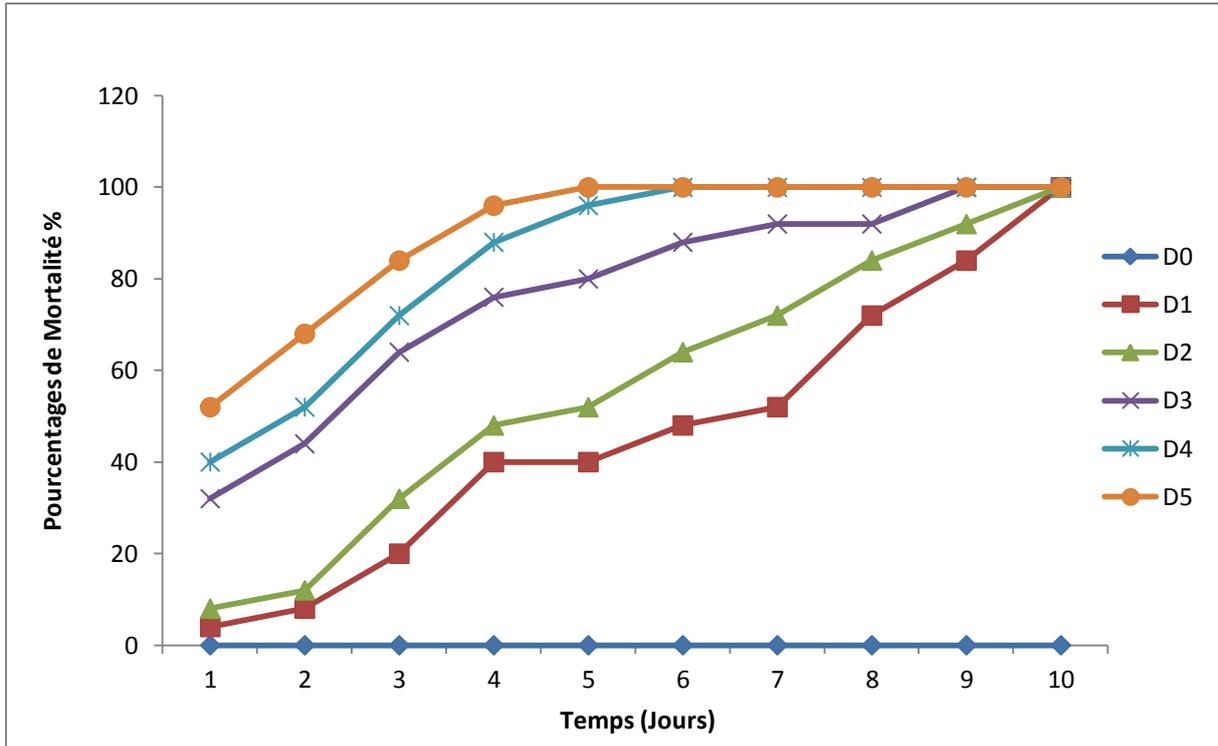


Figure 26: Pourcentages de mortalité des larves de *Culex pipiens* après 10 jours de traitement par la souche (M1).

Cette courbe illustre l'allure de la progression des pourcentages de mortalité des larves de *Culex pipiens* traitées par *Metarhizium anisopliae* (M1). Nous remarquons une ascension du pourcentage de mortalité des larves traitées par la dose D1, l'effet est tout de suite aperçu à partir du 1^{ier} jour de traitement avec 4% de mortalité, 8% de mortalité après le 2^{ème} jour, 52% à partir du 7^{ème} jour pour atteindre 100% le 10^{ème} jour de traitement.

Par ailleurs, nous avons observé 8%, 32% et 40% de mortalité chez les larves traitées par les doses D2, D3 et D4 respectivement après le 1^{ier} jour de traitement, 52%, 80% et 96% au bout du 5^{ème} jour et 100% de mortalité pour les trois doses D2, D3 et D4 après 10 jours.

La courbe la plus amplement représentée est celle de la mortalité des larves traitées avec la dose D5 qui marque un début d'effet du 1^{ier} jour avec 52% de mortalité et 100% à partir du 5^{ème} jour.

2.1.2. Analyse de la variance

Pour que nos résultats soient plus explicites, nous nous sommes appuyés sur l'analyse de la variance à deux critères de classifications :

- ❖ Facteur 1 : Doses avec 6 niveaux (D1 : 10^5 , D2 : 10^6 , D3 : 10^7 , D4 : 10^8 et D5 : 10^9 spores/ml)
- ❖ Facteur 2 : Temps avec 10 niveaux indiquant 10 jours d'observations

D'après les résultats d'analyse de la variance (Tableau 15), L'analyse à deux facteurs nous révèle que la différence pour tous les facteurs est très hautement significative $P= 0,000$. Ce qui implique que les doses de *Metarhizium anisopliae* (Facteur1), le temps (Facteur2) ainsi que l'interaction entre ces deux facteurs, ont une influence sur le taux de mortalité des larves de *Culex pipiens*

Tableau 15: Analyse de la variance

Source de la Variation	SCE	DDL	CM	F.Obs	P
Var. Total	258910	179			
Var. Fact.1. Doses	167474	5	33494,8	3656,19	,000
Var.Fact.2 Temps	66776	9	7419,6	809,90	,000
Var.Fact1*2 Interaction	23560	45	523,6	57,15	,000
V. Résiduelle	1099	120	9,2		

❖ **Test student Newman keuls**

Ce test permet de constituer des groupes homogènes de traitement, ainsi les moyennes appartenant au même groupe sont considérées comme non différentes.

Les classement des moyennes pour les larves traitées par M1 à travers le test de Newman keuls au seuil de 5% sont portés sur les tableaux (16 et 17)

Le test de Newman Keuls a classé les taux de mortalités en fonction des doses et du temps. Pour le facteur1 (Dose), ce test révèle 6 groupes bien distincts (Tableau 17), le groupe (A) renferme les mortalités moyennes les plus élevées (90) correspondant à la dose D5 (10^9 spores/ml). Et le groupe F qui correspond au dernier groupe et est réservé aux mortalités

nulles enregistrées chez les témoins. Les mortalités correspondant aux doses D4, D3, D2 et D1 sont classées respectivement dans les groupes (B), (C), (D) et (E).

Tableau 16 : Classement des moyennes pour le facteur1 (Dose)

DOSES	MOYENNES	Groupes
D5	90	A
D4	84.80	B
D3	76.93	C
D2	56.83	D
D1	46.80	E
D0	00.00	F

Ce même test range les mortalités moyennes pour le facteur 2 (Temps) en groupes distincts (Tableau18) Le groupe (A) renferme les mortalités moyennes les plus élevées (83.33) relatives au 10^{ème} jour (j10) et les groupes (H),(I) et (J) qui représentent les mortalités les plus faibles (46.22),(30.66) et (22.66) qui correspondent au 3^{ème}, au 2^{ème} et au 1^{er} jour (j3, j2 et j1). Les groupes (B), (C),(D),(E),(F) et (G) représentant les moyennes intermédiaires relatives aux jours (j9,j8,j7, j6, j5, et j4).

Tableau 17 : Classement des moyennes pour le facteur2 (Temps)

Temps (Jours)	Moyennes	Groupes homogènes
J10	83.33	A
J9	79.33	B
J8	74.66	C
J7	69.38	D
J6	66.66	E
J5	61.33	F
J4	58.00	G
J3	46.22	H
J2	30.66	I
J1	22.66	J

2.1.3. Calcul de la DL₅₀

Afin de déterminer la DL₅₀ (Dose létale suffisante pour tuer 50% des individus) nous avons transformé les pourcentages de mortalité enregistrés après le 1^{er} jour de traitement en Probits et les doses de *Metarhizium anisopliae* (M1) en logarithme népérien (Tableau 18).

Nous avons, ensuite tracé la droite de régression avec son coefficient de détermination (Figure 27). Cette droite a permis d'estimer la DL₅₀ relative à la mortalité de 50% des larves de *Culex pipiens*.

Tableau 18: Logarithmes décimaux des doses et Probits des taux de mortalité au 1^{er} jour

Doses (spores/ml)	D1 (10 ⁵)	D2 (10 ⁶)	D3 (10 ⁷)	D4 (10 ⁸)	D5 (10 ⁹)
Logarithme décimal des doses	5	6	7	8	9
Pourcentages de mortalité	04	08	32	40	52
Probits des pourcentages de mortalité	3,25	3,59	4,53	4,75	5,05

A partir de la droite de regression qui suit nous avons déterminé la DL₅₀ chez les larves de *Culex pipiens* : $Y = 0,477x + 0,897$ avec $R^2 = 0,9429$

Pour une mortalité de 50% , Y est égale à 5 (Probit)

$$x = \frac{5 - 0,897}{0,477} \quad x = 8,60$$

$$\text{antilog } x = 398107170,55$$

Cette concentration a été arrondie à $3,9 \cdot 10^8$ spores/ml

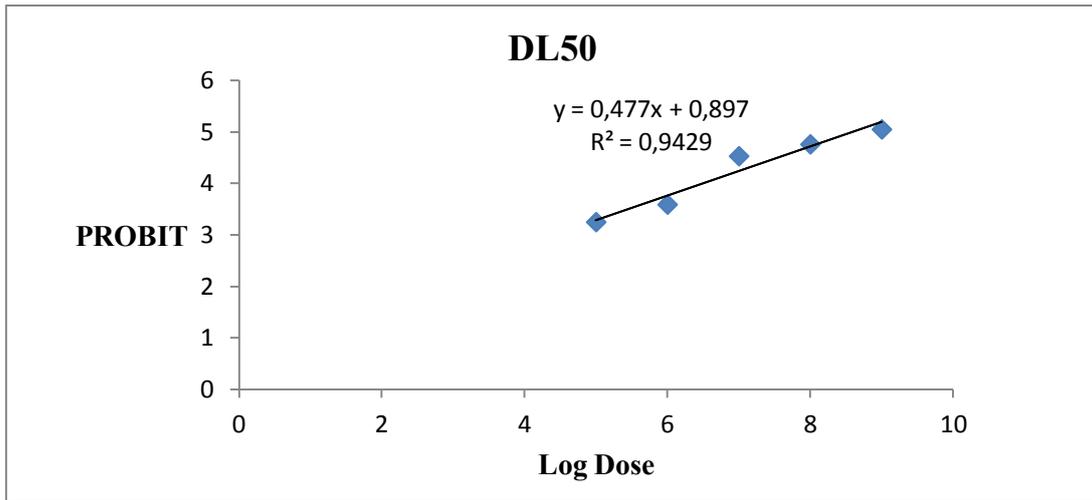


Figure 27: Efficacité de *Metarhizium anisopliae* (M1) vis-à-vis des larves de *Culex pipiens*

2.1.4. Calcul des TL₅₀

Le calcul des TL₅₀ (temps léthal au bout duquel on obtient 50% de mortalité) de *Metarhizium anisopliae* (M1) testé sur les L4 de *Culex pipiens* nous renseigne sur la variation du temps provoqué par la variation de la dose.

Les résultats concernant les valeurs du TL₅₀ des 4 doses sont représentés dans la figure 28. Pour cela nous avons effectué la transformation des pourcentages de mortalité en Probits et celles des temps en logarithme népérien (Tableau 19 en annexe 4).

A partir des équations de droites de régression nous avons déduit les valeurs du TL₅₀ relatifs à chaque dose. Ces valeurs sont mentionnées dans le tableau 20.

Tableau 20: Equations des droites de régressions et valeurs des TL₅₀ pour chaque dose de traitement utilisée.

Doses	Equations des droites de régressions	R ²	TL ₅₀ (jours)
D1 : 10 ⁵ spores/ml	Y = 3,6244x + 2,6384	0,7141	4,48
D2 : 10 ⁶ spores/ml	Y = 3,6345x + 2,9528	0,7783	4,13
D3 : 10 ⁷ spores/ml	Y = 3,329x + 3,9632	0,7827	3,04
D4 : 10 ⁸ spores/ml	Y = 4,1332x + 4,1646	0,8937	1,59
D5 : 10 ⁹ spores/ml	Y = 3,7383x + 4,6707	0,8589	1,22

Le tableau 20 montre que pour chaque dose le coefficient de détermination est plus ou moins élevé. Pour la D1 le TL₅₀ est de 4,48 jours, pour la D2, la D3, la D4 et la D5 les TL₅₀ sont de 4,13, 3,04, 1,59 et 1,22 jours respectivement.

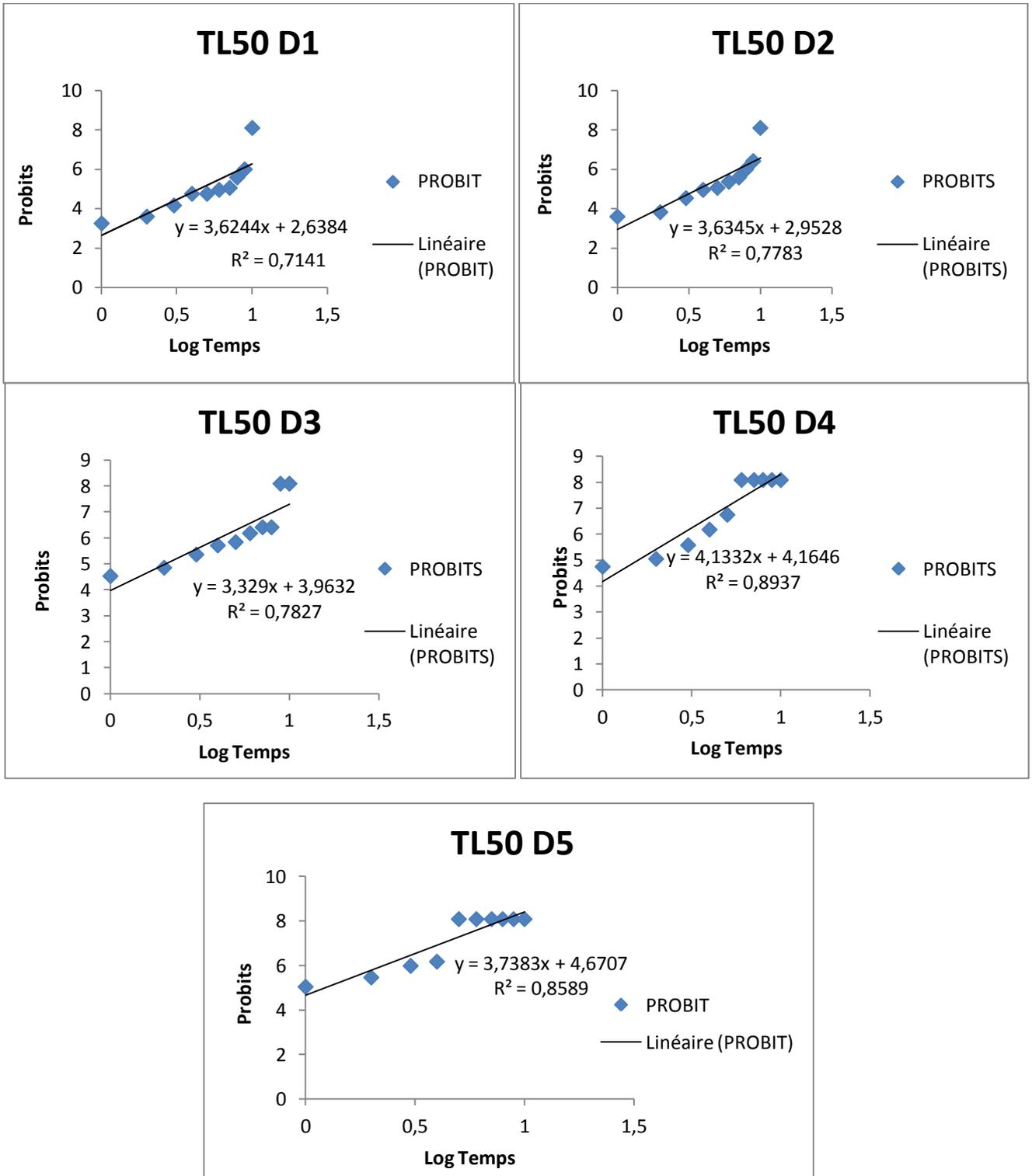


Figure 28 : Efficacité de *Metarhizium anisopliae* (M1) dans le temps vis-à-vis des larves de *Culex pipiens* traitées par les différentes doses D1, D2, D3, D4 et D5

2.2. La souche *Metarhizium anisopliae* LK995309 (M2)

2.2.1. Taux de mortalité

La mortalité des larves évolue avec les doses et la durée de traitement (Figure 29). Au bout de 10 jours aux différentes doses testées, une mortalité de 100% a été obtenue (Tableau 21).

Tableau 21 : Pourcentage moyen de mortalité des larves de *Culex pipiens* traitées par *Metarhizium anisopliae* (M2)

Doses (Spores/ml) Temps(Jours)	Témoin	D1 : 10⁵	D2 :10⁶	D3 :10⁷	D4 :10⁸	D5 :10⁹
1	0	5,33	5,33	8	9,33	20
2	0	12	16	16	22,66	36
3	0	21,33	22,66	30,66	45,33	61,33
4	0	32	34,66	42,66	66,66	89,33
5	0	60	65,33	66,66	82,66	97,33
6	0	73,33	80	81,33	93,33	100
7	0	81,33	81,33	93,33	96	100
8	0	92	92	96	100	100
9	0	96	96	100	100	100
10	0	97,33	100	100	100	100

Le tableau 21 et la figure 29 montrent que la mortalité des larves traitées par la souche M2 a commencé à partir du 1^{er} jour de traitement par les 5 doses(D1, D2,D3,D4 et D5) avec des taux respectifs de 5,33, 5,33, 8, 9,33 et 20% pour atteindre les 100% le 6^{ème} jour pour la dose D5, le 8^{ème} jour pour D4, 9^{ème} jour pour la D3 et le 10^{ème} jour pour la D2 et la D1.

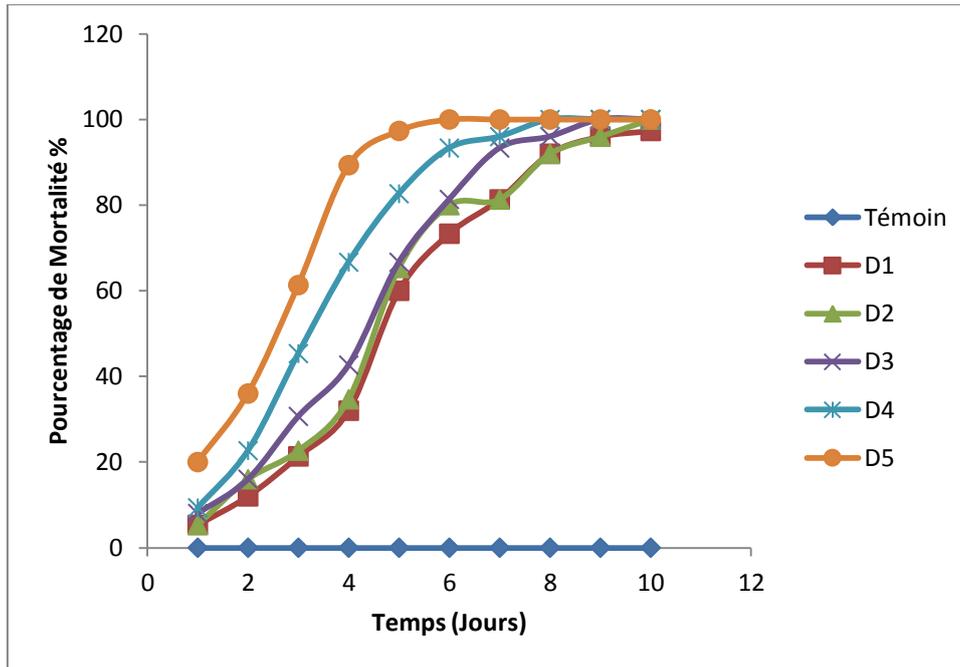


Figure 29 : Pourcentages de mortalité des larves de *Culex pipiens* après 10 jours de traitement par la souche M2.

2.2.2. Analyse de la variance

Pour interpréter nos résultats, nous nous sommes appuyés sur l'analyse de la variance à deux critères de classification :

- ❖ Facteur 1 : Doses avec 6 niveaux (D1 : 10^5 , D2 : 10^6 , D3 : 10^7 , D4 : 10^8 et D5 : 10^9 spores/ml)
- ❖ Facteur 2 : Temps avec 10 niveaux indiquant 10 jours d'observations

L'analyse de la variance à deux critères de classification révèle (Tableau 22) une différence très hautement significative pour les deux facteurs.

Tableau 22: Analyse de la variance

Source de la Variation	SCE	DDL	CM	F.Obs	P
Var. Total	286970,6	179			
Var. Fact.1. Doses	121196,2	5	24239,2	953,47	,000
Var.Fact.2 Temps	130189,2	9	14465,5	569,01	,000
Var.Fact1*2 Interaction	32534,5	45	723,0	28,44	,000
V. Résiduelle	3050,7	120	25,4		

❖ **Test de Newman keuls**

Le test de Newman Keuls a donné une classification des moyennes de mortalité (Tableau 23), A travers ce test, nous remarquons 5 groupes homogènes pour le facteur (Dose). Le premier groupe (A) comporte la D5, le deuxième groupe (B) comporte la D4, le troisième, et le quatrième groupe (C) et (D) comportent les doses D3, D2 et D1 respectivement. Le dernier groupe (E) intéresse la dose nulle (témoin D0).

Tableau 23 : Classement des moyennes pour le facteur1 (Dose)

DOSES	MOYENNES	Groupes Homogènes
D5	80,40	A
D4	71,60	B
D3	63,46	C
D2	59,33	D
D1	57,06	D
D0	00,00	E

Pour le facteur temps, le test révèle 8 groupes homogènes bien distincts (Tableau 24), le groupe (A) intéresse le maximum de mortalité enregistré à partir du 8ème jour.

Tableau 24 : Classement des moyennes pour le facteur 2 (Temps)

Temps (Jours)	MOYENNES	Groupes Homogènes
10	82,88	A
9	82,00	A
8	79,77	A
7	75,55	B
6	71,33	C
5	62,00	D
4	44,22	E
3	30,22	F
2	17,11	G
1	08,00	H

2.2.3. Calcul de la DL₅₀

Une fois la transformation des pourcentages de mortalité en Probits. Correspondant à 3 jours après le traitement et les doses en Log décimaux effectués (Tableau 25). Nous avons déterminé la DL₅₀ à partir de l'équation issue de la droite de régression (Figure 30)

Tableau 25: Logarithmes décimaux des doses et Probits des taux de mortalités au 3^{ème} jour

Doses (spores/ml)	D1 (10 ⁵)	D2 (10 ⁶)	D3 (10 ⁷)	D4 (10 ⁸)	D5 (10 ⁹)
Logarithme décimal des doses	5	6	7	8	9
Pourcentages de mortalité	21,33	22,66	30,66	45,33	61,33
Probits des pourcentages de mortalité	4,19	4,23	4,48	4,87	5,28

A partir de la droite de régression qui suit nous avons déterminé la DL50 chez les larves de *Culex pipiens* : $Y = 0,282x + 2,636$ avec $R^2 = 0,931$

Pour une mortalité de 50% , Y est égale à 5 (Probit)

$$x = \frac{5 - 2,636}{0,282} \quad x = 8,38$$

$$\text{antilog } x = 2,41534960$$

Cette concentration a été arrondie à $2,4 \cdot 10^8$ spores/ml

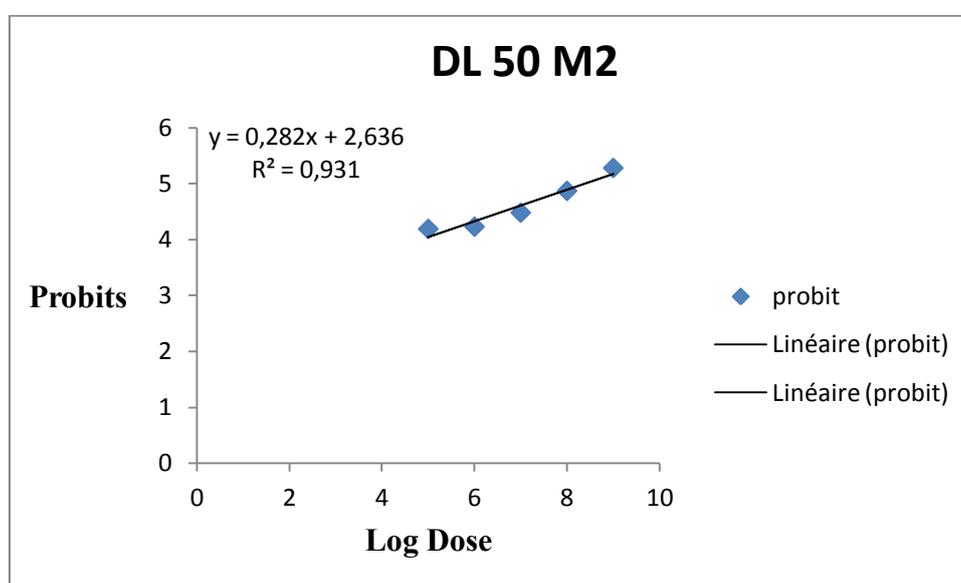


Figure 30 : Efficacité de *Metarhizium anisopliae* (M2) vis-à-vis des larves de *Culex pipiens*

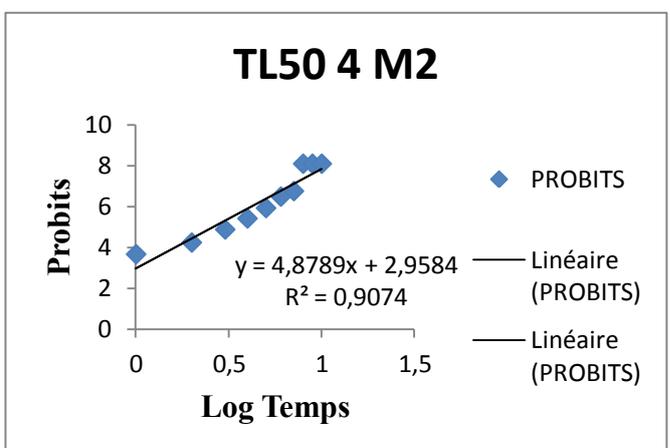
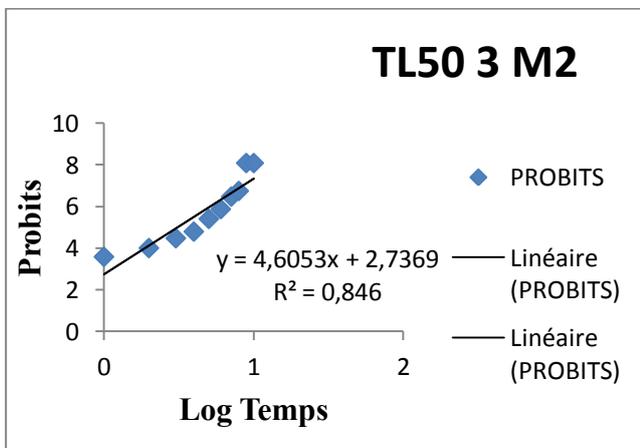
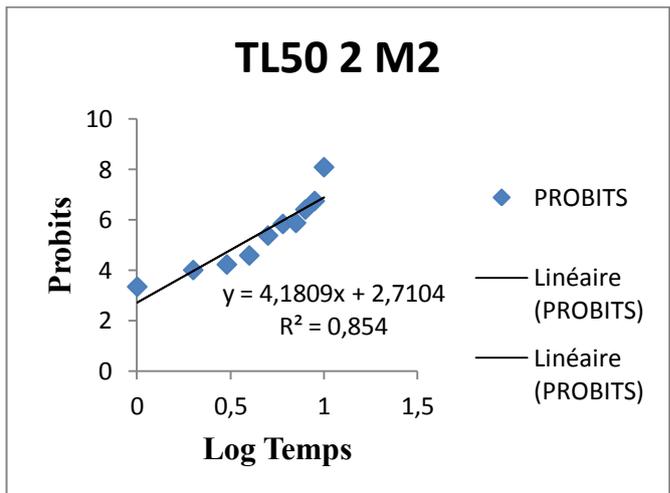
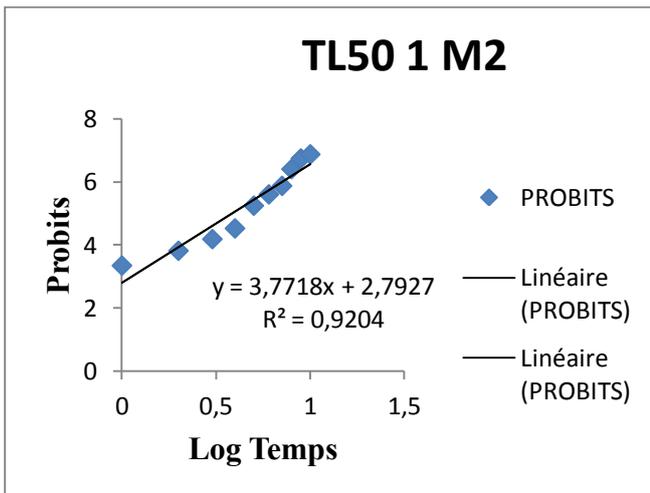
2.2.4. Calcul des TL_{50}

Pour calculer les TL_{50} , nous avons transformé les pourcentages des mortalités en probit et le temps en log décimal (Tableau 26 en annexe 5) .

A partir des équations des droites de régressions (Figure 31) nous avons calculé les valeurs des TL_{50} portées sur le tableau 27 pour chaque dose.

Tableau 27: Equations des droites de régressions et valeurs des TL50 pour chaque dose de traitement utilisée.

Doses	Equations des droites de régressions	R ²	TL50 (jours)
D1 : 10 ⁵ spores/ml	$Y = 3,7718x + 2,7927$	0,920	3,85
D2 : 10 ⁶ spores/ml	$Y = 4,1809x + 2,7104$	0,854	3,53
D3 : 10 ⁷ spores/ml	$Y = 4,6053x + 2,7369$	0,846	3,10
D4 : 10 ⁸ spores/ml	$Y = 4,8789x + 2,9584$	0,907	2,62
D5 : 10 ⁹ spores/ml	$Y = 4,7798x + 3,6284$	0,921	1,94



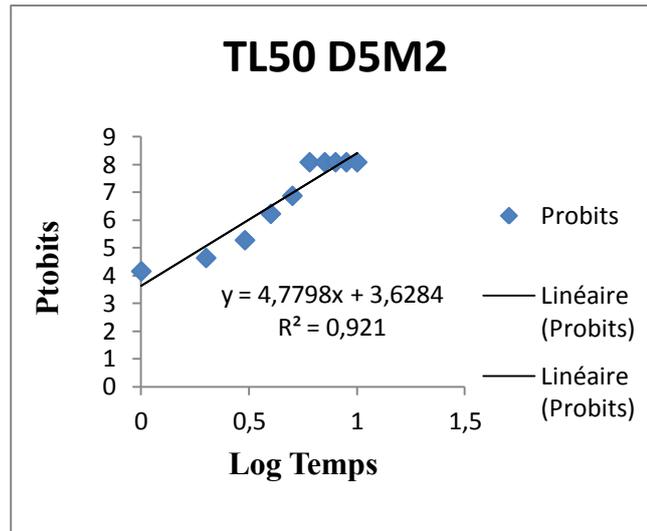


Figure 31 : Efficacité de *Metarhizium anisopliae* (M2) dans le temps vis-à-vis des larves de *Culex pipiens* traitées par les différentes doses (D1, D2, D3, D4 et D5).

2.3. La souche *Metarhizium anisopliae* LK9953010 (M3)

2.3.1. Taux de mortalité

Le pourcentage de mortalité journalière des larves traitées par *Metarhizium anisopliae* (M3) sont portées sur le tableau 28 et illustrés par la figure 31. Il en ressort que les résultats obtenus montrent un début de mortalité le 2^{ème} jour pour la dose D1 avec 4% de mortalité et le 1^{ier} jour pour les autres doses D2, D3, D4 et D5 avec 1,33 ; 4 ; 10,66 et 12% respectivement. Ce taux de mortalité atteint 77,33% à la dose D1, 92% à la dose D2, 96% à la dose D3 et 100% aux doses D4 et D5 au 8^{ème} jour

Tableau 28 : Pourcentage moyen de mortalité des larves de *Culex pipiens* traitées par *Metarhizium anisopliae* (M3).

Doses (Spores/ml) Temps (Jours)	D0 :Témoin	D1 (10^5)	D2 (10^6)	D3 (10^7)	D4 (10^8)	D5 (10^9)
1	0	0	1,33	4	10,66	12
2	0	4	5,33	9,33	20	20
3	0	12	24	28	36	44
4	0	20	36	54,66	60	65,33
5	0	40	53,33	65,33	70,66	77,33
6	0	54,66	70,66	81,33	82,66	85,33
7	0	69,33	88	90,66	94,66	97,33
8	0	77,33	92	96	100	100
9	0	86	97,33	100	100	100
10	0	97,33	100	100	100	100

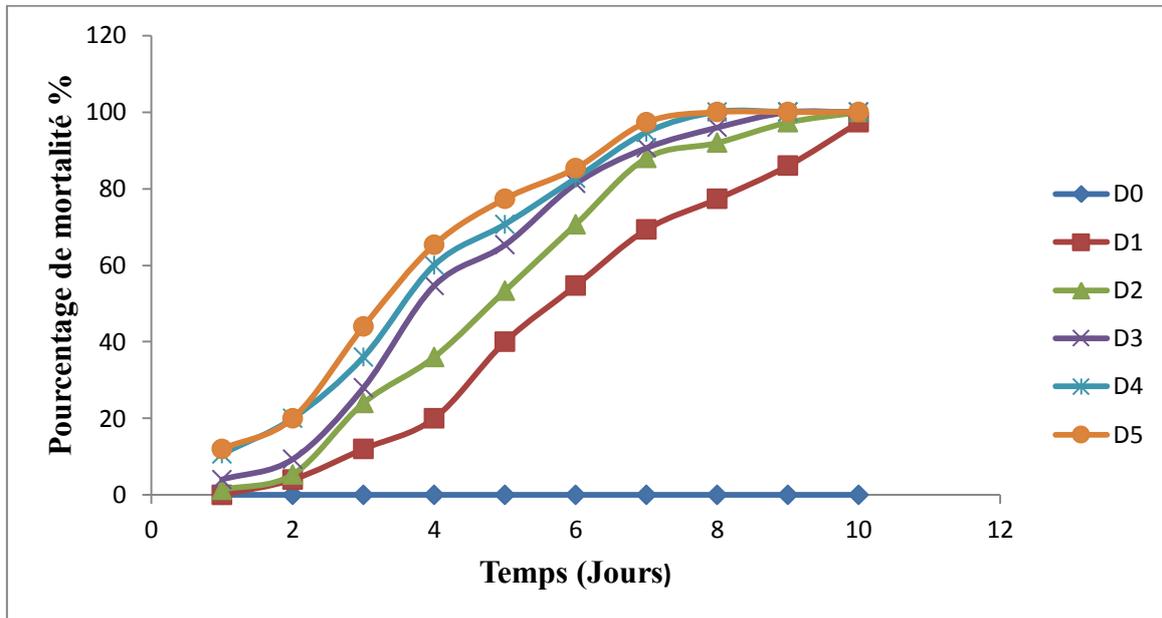


Figure 32: Pourcentage de mortalité des larves de *Culex pipiens* après 10 jours de traitement par *Metarhizium anisopliae* (M3)

2.3.2. Analyse de la variance

L'analyse statistique par l'utilisation de l'analyse de la variance à 2 critères de classification (Tableau 29) révèle une différence hautement significative entre les différentes mortalités enregistrées pour les larves traitées et les témoins, à différents niveaux de temps et à différentes doses avec un niveau de probabilité (P=0,000)

Tableau 29: Analyse de la variance

Source de la Variation	SCE	DDL	CM	F.Obs	P
Var. Total	280335,2	179			
Var. Fact.1. Doses	103071,7	5	20614,3	1348,32	,000
Var.Fact.2 Temps	143185,9	9	15909,5	1040,59	,000
Var.Fact1*2 Interaction	32242,9	45	716,5	46,86	,000
V. Résiduelle	1834,7	120	15,3		

❖ Test de Newman keuls

A travers le test de Newman Keuls au seuil de 5%, le classement des moyennes de mortalités des larves qui ont été soumises à différentes doses de *Metarhizium anisopliae* (M3) sont portées sur le tableau 30. Le test révèle 6 groupes significativement différents.

Tableau 30: Classement des moyennes pour le facteur1 (Dose)

DOSES	MOYENNES	Groupes Homogènes
D5	70,13	A
D4	67,46	B
D3	62,93	C
D2	56,80	D
D1	46,26	E
D0	0	F

Pour le facteur (Temps) le test révèle 9 groupes homogènes (Tableau 31) , le groupe (A) comporte les moyennes les plus élevées (82,88 et 80,00) correspondant aux 10^{ème} et 9^{ème} jour respectivement. Les groupes (B),(C),(D) et (E)comportent les moyennes intermédiaires correspondant aux 8^{ème}, 7^{ème}, 6^{ème} et 5^{ème} jour. Les groupes (F),(G),(H) et (J) intéressent les moyennes faibles correspondant aux 4^{ème}, 3^{ème} ,2^{ème} et 1^{er} jour de traitement respectivement.

Tableau 31 : Classement des moyennes pour le facteur2 (Temps)

Temps(Jours)	MOYENNES	Groupes Homogènes
10	82,88	A
9	80,88	A
8	77,55	B
7	73,33	C
6	62,44	D
5	51,12	E
4	39,33	F
3	24,00	G
2	09,77	H
1	04,66	I

2.3.3. Calcul de la DL₅₀

Nous avons calculé la DL50 au 4^{ème} jour après traitement des larves (Tableau 32), donc nous avons utilisé la fonction suivante : $Y = ax + b$ (d'où Y : probits et x : log doses). et pour un pourcentage de mortalité de 50% : $Y = 5$ (dont probit de 50 = 5), (Figure 33).

Tableau 32: Logarithmes décimaux des doses et Probits des taux de mortalités au 3^{ème} jour

Doses (spores/ml)	D1 : 10 ⁵	D2 : 10 ⁶	D3 : 10 ⁷	D4 : 10 ⁸	D5 : 10 ⁹
Logarithme décimal des doses	5	6	7	8	9
Pourcentages de mortalité	20	36	54,66	60	65,33
Probits des pourcentages de mortalité	4,16	4,64	5,10	5,25	5,38

La figure 33 définissant la droite de régression des probits des taux de mortalité en fonction des logarithmes décimaux des doses, montre une corrélation positive ($P < 1$) pour les différentes doses étudiées. Ceci se traduit qu'il existe une proportionnalité entre les doses et les taux de mortalités. D'après la formule obtenue à partir de la droite de régression. La dose létale pouvant tuer 50% de la population des larves (DL50) est donnée par l'équation obtenue aux niveaux de la droite de régression : $Y = 0,305x + 2,771$

$$x = \frac{5 - 2,771}{0,305} = 7,3082$$

Cette concentration a été arrondie à $2,3 \cdot 10^7$ spores/ml

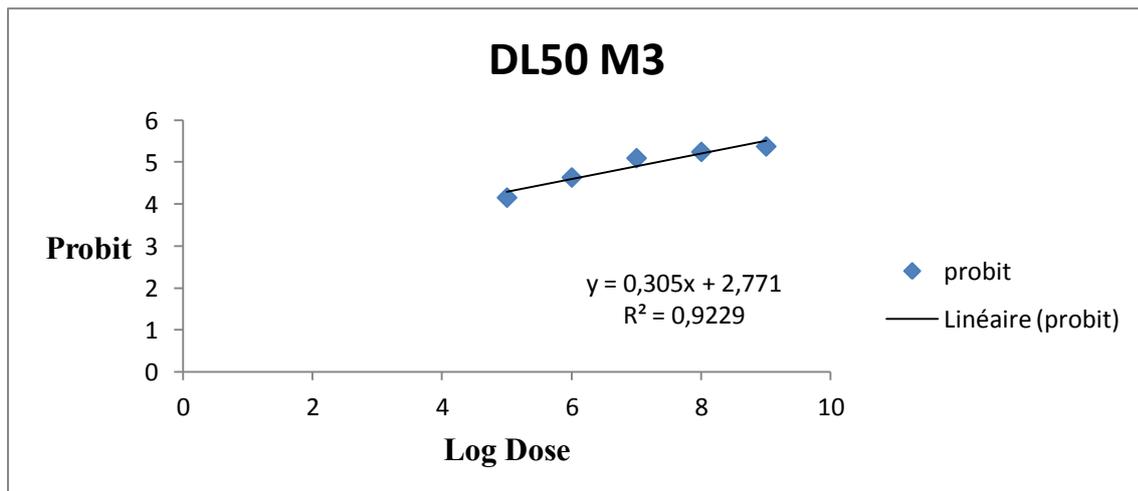


Figure 33 : Efficacité de *Metarhizium anisopliae* (M3) vis-à-vis des larves de *Culex pipiens*

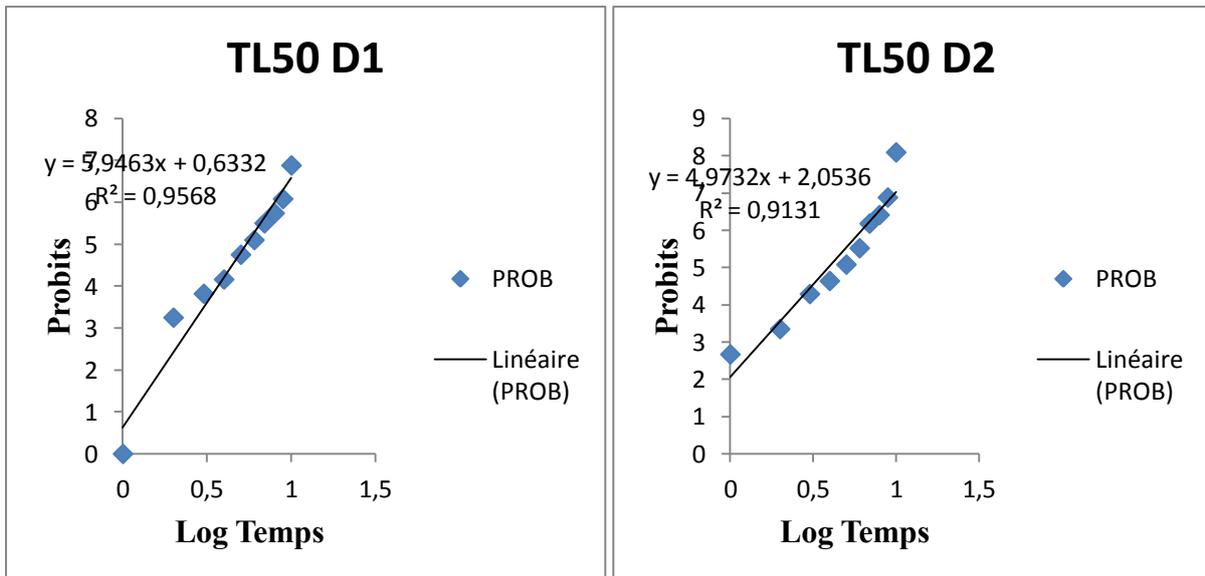
3.4. Calcul des TL50

Pour calculer les TL₅₀, nous avons transformé les pourcentages des mortalités en probit et le temps en log décimal (Tableau 33 en annexe 7) .

A partir des équations des droites de régressions (Figure 34) nous avons calculé les valeurs des TL₅₀ portées sur le tableau 34 pour chaque dose.

Tableau 34 : Equations des droites de régressions et valeurs des TL₅₀ pour chaque dose de traitement utilisée.

Doses	Equations des droites de régressions	R ²	TL50 (jours)
D1 : 10 ⁵ spores/ml	Y = 5,9463x + 0,6332	0,9598	5,37
D2 : 10 ⁶ spores/ml	Y = 4,9732x + 2,0536	0,9131	3,91
D3 : 10 ⁷ spores/ml	Y = 4,9503x + 2,4475	0,8831	3,25
D4 : 10 ⁸ spores/ml	Y = 4,7951x + 2,8632	0,8457	2,79
D5 : 10 ⁹ spores/ml	Y = 4,7672x + 2,9915	0,8708	2,64



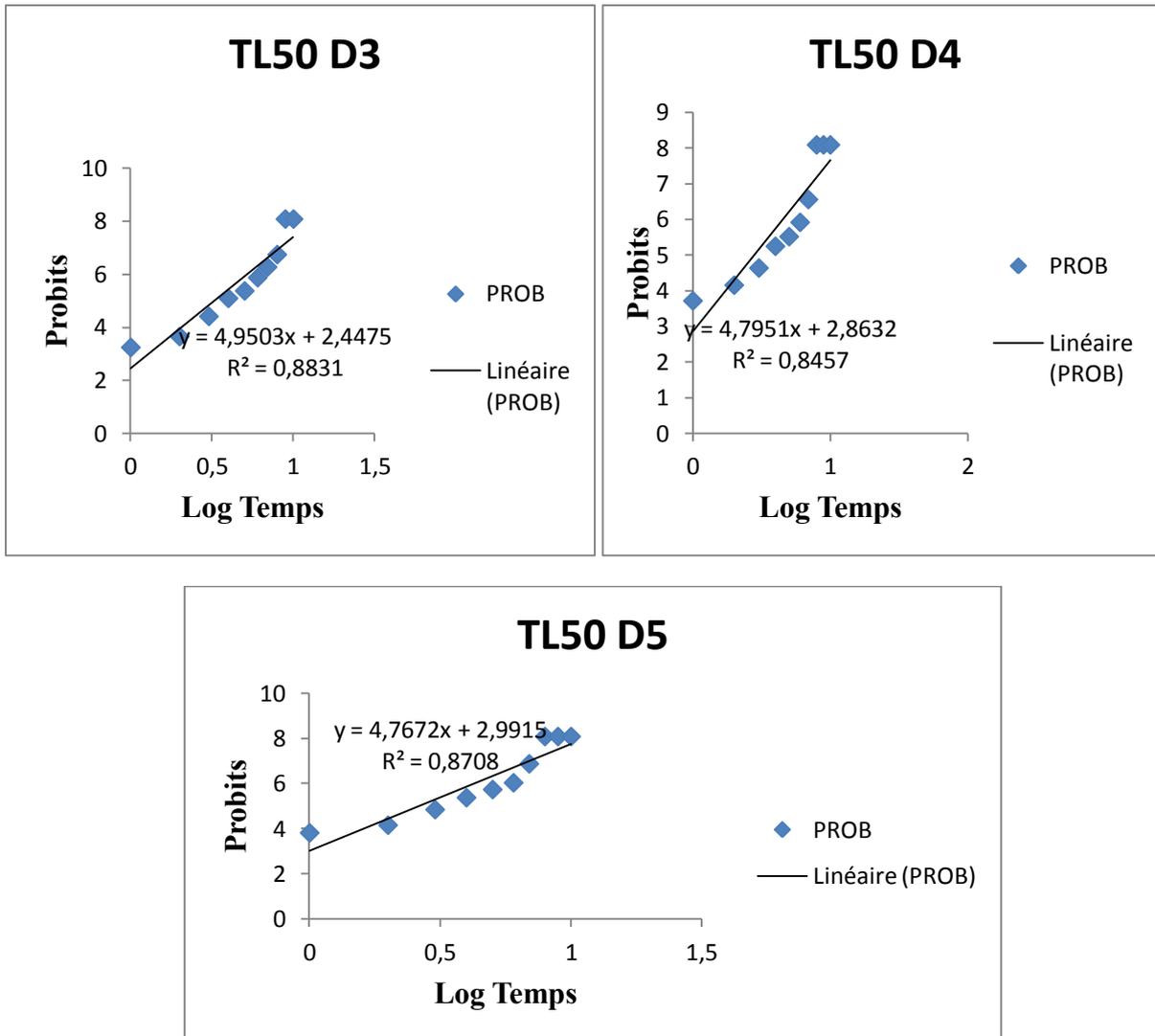


Figure 34: Efficacité de *Metarhizium anisopliae* (M3) dans le temps vis-à-vis des larves de *Culex pipiens* traitées avec les différentes doses (D1, D2, D3, D4 et D5)

2.4. La souche *Metarhizium anisopliae* : LK995311 (M5)

Il est à noter que les observations sur 7 jours sont faites dans le but de vérifier l'efficacité des traitements appliqués sur le stade larvaire L4 de *Culex pipiens* avec le champignon *Metarhizium anisopliae* (M5)

2.4.1. Taux de mortalité

Les essais biologiques de *Metarhizium anisopliae* (M5) sur les larves de *Culex pipiens* ont montré que le début de mortalité des larves traitées avec les 5 doses, a été enregistrée dès le 1^{er} jour. Ou nous avons remarqué une mortalité massive des larves traitées.

Les résultats relatifs aux pourcentages de mortalités moyennes des larves traitées par M5 sont mentionnés dans le tableau 35 et représentés par la figure 35.

Tableau 35 : Pourcentage moyen de mortalité des larves de *Culex pipiens* traitées par *Metarhizium anisopliae* (M5)

Doses(spores/ml) / Temps(jours)	D0 :Témoin	D1 (10 ⁵)	D2 (10 ⁶)	D3 (10 ⁷)	D4 (10 ⁸)	D5 (10 ⁹)
1	0	60	80	88	92	96
2	0	80	92	96	100	100
3	0	88	96	100	100	100
4	0	92	96	100	100	100
5	0	496	96	100	100	100
6	0	96	98,66	100	100	100
7	0	100	100	100	100	100

Les résultats portés sur le tableau 35 montrent que la mortalité chez les témoins est nulle. Les pourcentages de mortalité corrigés sont égaux aux pourcentages de mortalités observés et une mortalité supérieure à 50% a été observée à partir du 1^{er} jour.

Les courbes des mortalités cumulées représentées sur la figure 35 présentent la même allure et évoluent dans le même sens, se caractérisent par un décalage dans le temps en réponses aux doses aux quelles les larves ont été soumises.

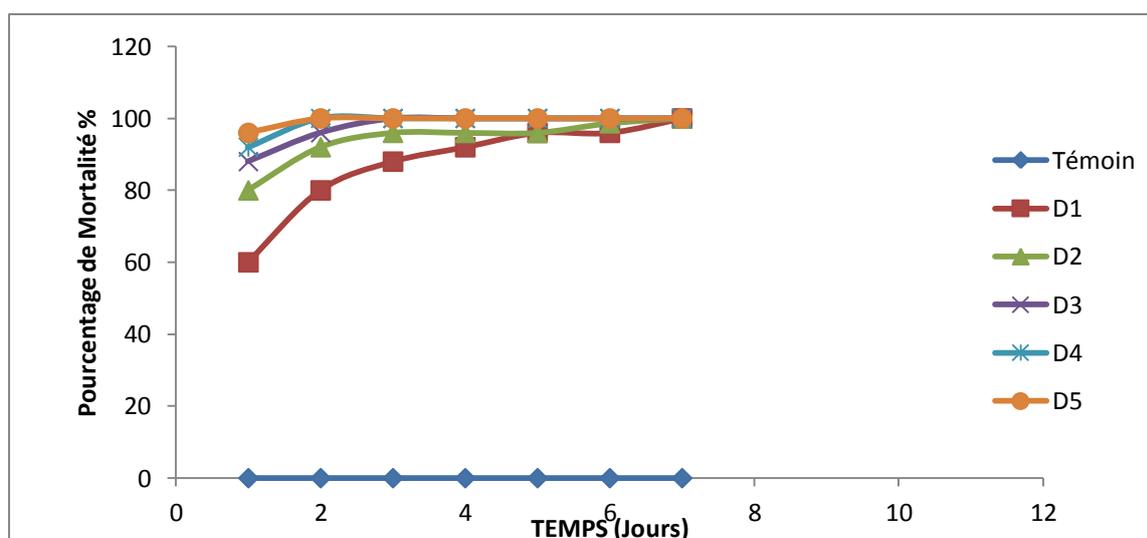


Figure 35: Pourcentage de mortalité des larves de *Culex pipiens* après 7 jours de traitement par *Metarhizium anisopliae* (M5)

2.4.2. Analyse de la variance

Pour que nos résultats soient plus explicites. On s'est appuyé sur l'analyse de la variance à deux critères de classifications :

- ❖ Facteur 1 : Doses avec 6 niveaux (D1 : 10^5 , D2 : 10^6 , D3 : 10^7 , D4 : 10^8 et D5 : 10^9 spores/ml
- ❖ Facteur 2 : Temps avec 7 niveaux indiquant 7 jours d'observations

Nous avons appliqué l'analyse de la variance à 2 Critères de classification (Doses et Temps) aux larves testées de manière à étudier l'influence de ces deux facteurs (doses ainsi que les durées de traitement sur les taux de mortalité des larves de *Culex pipiens* ainsi que leurs interactions. En comparant la somme des carrés des taux de mortalité en fonction des différents facteurs nous remarquons qu'il existe une différence très hautement significative dans la mortalité des larves traitées avec différentes doses ainsi que pour le facteur durée de traitement. (P=0,000) (Tableau 36).

Tableau 36 : Analyse de la variance

Source de la Variation	SCE	DDL	CM	F.Obs	P
Var. Total	167040,6	125			
Var. Fact.1. Doses	161928,254	5	32385,651	10201,480	,000
Var.Fact.2 Temps	2561,524	6	426,921	134,480	,000
Var.Fact1*2 Interaction	2284,190	30	76,140	23,984	,000
V. Résiduelle	266,667	84			

❖ Test Newman keuls

D'après les tableaux 37 et 38, des classements et regroupement des groupes significativement différents. Nous avons obtenus 5 groupes homogènes pour les deux facteurs (Dose et Temps).

Pour le facteur (Dose) le groupe (A) intéresse le maximum de mortalité (98,86) et (99,43) correspondant aux doses (D4) et (D5) respectivement, le groupe (E) intéresse la dose nulle (témoin D0) quant aux groupes (B),(C) et (D) intéressent les doses (D3),(D2) et (D1) respectivement.(tableau 38).

Tableau 37 : Classement des moyennes pour le facteur1 (Dose)

DOSES	MOYENNES	Groupes Homogènes
D5	99,43	A
D4	98,86	A
D3	97,71	B
D2	94,45	C
D1	87,43	D
D0	0	E

Pour le deuxième facteur (Temps), le groupe (A) commence à partir du 5ème jour ou la mortalité a atteint son maximum. Les groupes (B), (C)et (D) qui respectivement correspondent aux jours (J4, J3 et J2) ou la mortalité décrois progressivement jusqu' a atteindre un minimum intéressant le groupe (E).

Tableau 38 : Classement des moyennes pour le facteur2 (Temps)

Temps (Jours)	Moyennes	Groupes Homogènes
7	83,33	A
6	82,66	AB
5	82,22	AB
4	81,33	B
3	80,60	C
2	78,00	D
1	69,33	E

2.4.3. Calcul de la DL₅₀

La DL₅₀ a été déterminée à partir de l'équation issue de la droite de régression (Figure 36) qui a été élaborée à partir de transformation des pourcentages de mortalité en probits. correspondant au 1^{ier} jour après le traitement, et des doses en log décimaux (Tableau 39).

Tableau 39 : Logarithmes décimaux des doses et Probits des taux de mortalité au 1^{ier} jour

Doses (spores/ml)	D1 (10 ⁵)	D2 (10 ⁶)	D3 (10 ⁷)	D4 (10 ⁸)	D5 (10 ⁹)
Logarithme décimal des doses	5	6	7	8	9
Pourcentages de mortalité	60	80	88	92	96
Probits des pourcentages de mortalité	5,25	5,84	6,18	6,34	6,75

$Y = 0,357x + 3,587 \quad R^2 = 0,9698$

$x = 3,957$

Cette concentration a été arrondie à 8,9.10³ spores/ml

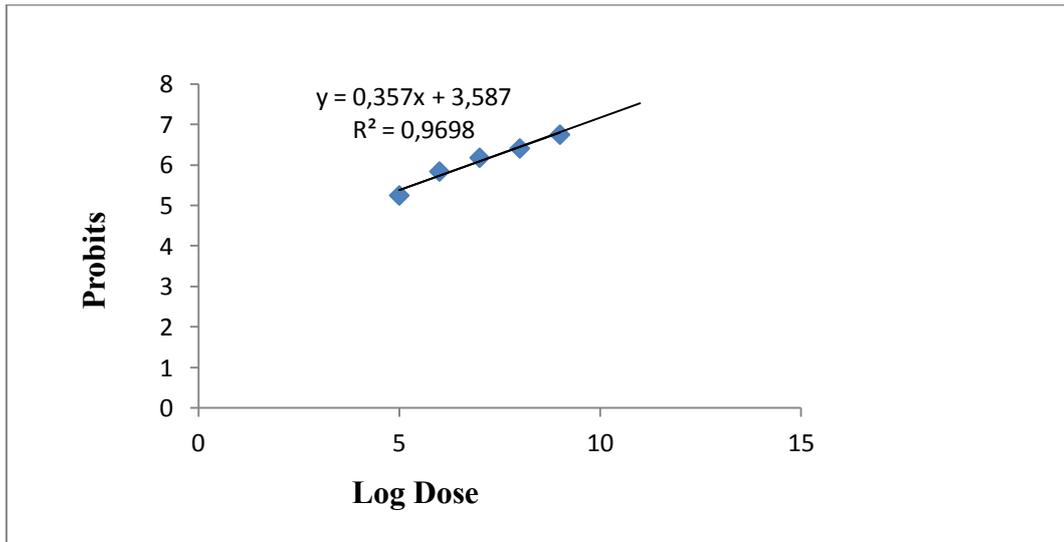


Figure 36 : Efficacité de *Metarhizium anisopliae* (M5) vis-à-vis des larves de *Culex pipiens*

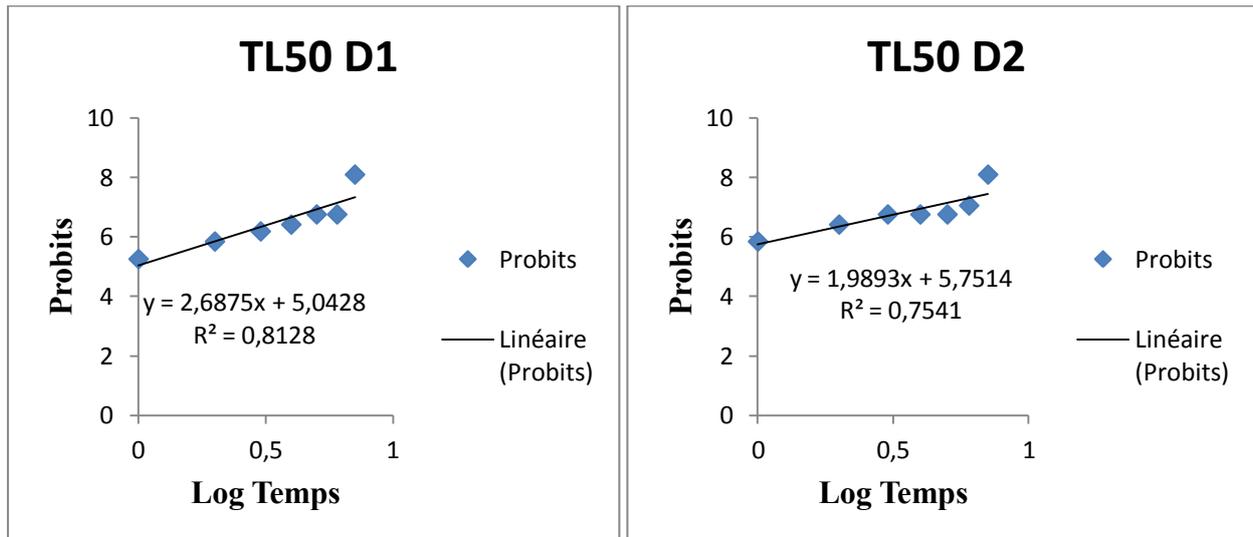
2.4.4. Calcul des TL50

Le calcul des TL50 rapporté aux doses nous renseigne sur l'importance de l'effet du champignon dans le temps. Les probits des pourcentages de mortalité ainsi que le logarithme décimal des temps pour chaque dose sont portés sur le tableau 40 en (Annexe 7).

A partir des équations des droites de régressions (Figure 37) nous avons calculé les valeurs des TL₅₀ portées sur le tableau 41 pour chaque dose.

Tableau 41: Equations des droites de régressions et valeurs des TL50 pour chaque dose de traitement utilisée

Doses	Equations des droites de régressions	R ²	TL50 (jours)
D1 : 10 ⁵ spores/ml	Y = 2,6875x + 5,0428	0,8128	0,96
D2 : 10 ⁶ spores/ml	Y = 1,9893x + 5,7514	0,7541	0,42
D3 : 10 ⁷ spores/ml	Y = 2,4682x + 6,3176	0,8283	0,29
D4 : 10 ⁸ spores/ml	Y = 1,6643x + 6,9679	0,6126	0,06
D5 : 10 ⁹ spores/ml	Y = 1,3275x + 7,195	0,8589	0,02



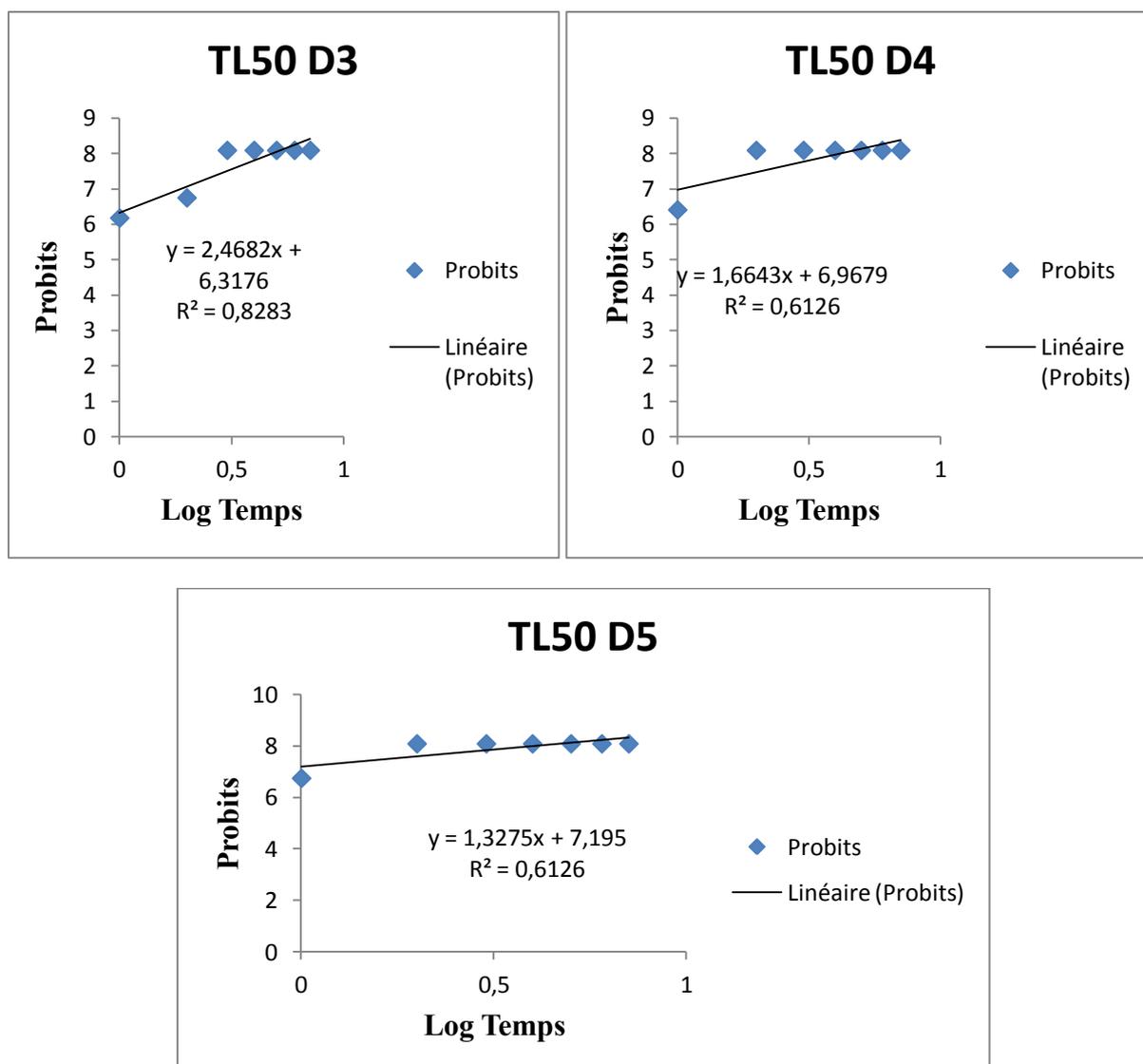


Figure 37 : Efficacité de *Metarhizium anisopliae* (M5) dans le temps vis-à-vis des larves de *Culex pipiens* traitées par les différentes doses (D1, D2, D3, D4 et D5)

3. Discussion

Le phénomène de résistance aux insecticides qu'a développé *Culex pipiens* a suscité la recherche d'une autre solution pour combattre ces insectes nuisibles et vecteurs de maladies. Selon Failoux et Rodhain (1999) ce phénomène est apparu en 1990 en régions tempérées. *Culex pipiens* connue comme étant une espèce vectrice de filarioses et d'encéphalites a développé plusieurs types de résistance vis-à-vis des organo-phosphorés. Cette résistance est un phénomène dû à une forte production d'une protéine appelée estérase B protéine (à plus de 10% des protéines totales) et plus de 10 gènes sont impliqués dans sa production et donc dans la résistance aux organo-phosphorés (Chevillon, 1994).

Corosmans *et al.*,(1992) ont proposé un programme de lutte intégrée contre *Anopheles gambiae* dans une région rizicole au Burundi qui comprend dans son programme: un assainissement, l'emploi de moustiquaires imprégnés de deltaméthrine ainsi que des traitements intradomiculaires. Ces auteurs avaient montré que cette méthode avait réduit la prévalence palustre mais n'avait en aucun cas réduit la densité ni la charge des populations parasitaires cibles. Par ailleurs les travaux de Berchi (2000) sur le Malathion testé au laboratoire sur six populations de *Culex pipiens* des gîtes épigés et hypogés ont révélé que ces dernières étaient résistantes à ce produit. C'est dans ce sens que nous avons opté pour une lutte microbiologique.

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 (McCray *et al.*,1973) .

Dans cette étude nous avons testé quatre souches fongiques entomopathogènes de *Metarhizium anisopliae* (M1, M2, M3 et M5) isolées pour la première fois à partir d'un sol agricole Algérien contre les larves du 4^{ème} stade de *Culex pipiens* avec différentes concentrations. Nos résultats ont montré un effet significatif quant à la mortalité des larves. En effet nous avons remarqué que le taux de mortalité des larves témoins utilisées pour les quatre tests était nul. Ces mêmes résultats ont été constatés par Alves *et al.*, (2002) ou ils n'ont enregistré aucune mortalité des larves témoins durant la période des bio essais.

En effet, nous avons aussi constaté que ces champignons agissent dès le premier jour du traitement. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par Alves *et al.*,(2002) qui ont enregistré un début de mortalité des larves de *Culex quinquefasciatus* traitées par *Metarhizium anisopliae* à partir du 1^{ier} jour de traitement. Cependant le pourcentage de mortalité des larves était de 50% après 24h traitées à la dose 10^9 spores/ml avec les souches *Metarhizium anisopliae* (M1) et *Metarhizium anisopliae* (M5). Ce même taux de mortalité a été enregistré avec les larves traitées avec *Metarhizium anisopliae* (M2) et *Metarhizium anisopliae* (M3) après 3 jours et 4 jours respectivement. Nos résultats vont dans le même sens que ceux obtenus par Alves *et al.*, (2002) ou ils ont enregistré un taux de mortalité 50% des larves de *Culex quinquefasciatus* traitées par *Metarhizium anisopliae* 1037 par le mode de contact après 24h.

Ensuite, nous avons comparé l'efficacité de nos quatre souches sur les larves L4 du *Culex pipiens*, d'après les résultats de mortalité nous avons remarqué que la mortalité des larves traitées avec la souche (M5) est plus rapide et intense par rapport à la mortalité des larves traitées avec les souches (M1, M2 et M3). La mortalité complète des larves a été atteinte au 2^{ème} jour pour M5, au 4^{ème} jour pour M1, au 5^{ème} jour pour M2 et au 8^{ème} jour pour M3. Nos résultats corroborent ceux obtenus par Alves *et al.*,(2002) qui ont étudié la comparaison de l'effet des deux champignons *Metarhizium anisopliae* 1037 et *Metarhizium anisopliae* E9 sur les larves de *Culex quinquefasciatus*. Ils ont trouvé que la souche *M. anisopliae* 1037 est plus virulente que *M. anisopliae* E9, avec un taux de mortalité de 93,33% après 5 jours de traitement par rapport à un taux de mortalité de 55,55% de *M. anisopliae* E9 après 5 jours. .

D'après Roberts (1967) ce champignon entomopathogène *M.anisopliae* attaque les larves de moustiques préférentiellement par le siphon respiratoire. C'est pourquoi ce germe tue davantage de moustiques lorsqu'il est appliqué à la surface de l'eau. Mais, en fait si les larves sont mises dans des suspensions conidiennes de fortes concentrations (10^7 spores/ml) le champignon peut tuer celles-ci avant toute colonisation fongique intrahémocoelienne. Les faits rapportés par cet auteur sont en totale concordance avec nos résultats (Benserradj et Mihoubi, 2014).

L'étude de la virulence du champignon entomopathogène *Metarhizium anisopliae* vis-à-vis de différentes espèces de moustiques a fait l'objet de plusieurs travaux :

Des essais au laboratoire réalisés par Daoust et Roberts (1982) pour l'étude de l'effet de cette même souche sur la mortalité des larves de *Culex pipiens* ont révélé un taux de mortalité de 50% après 3 jours de traitement en utilisant une dose de 1mg de conidies. Contrairement à Ramoska (1982) qui a observé ce taux de mortalité au bout d'un mois.

Par ailleurs, Mohamed *et al.*, (1983) ont testé la sensibilité –résistance de *Culex pipiens* et *Culex quinquefasciatus* au *Metarhizium anisopliae* (Ma 43 et E9) et ont affirmé que tous les stades du moustique sont très sensibles aux deux souches avec un taux de mortalité allant de 86 à 100% aux plus fortes doses, ce qui va dans le sens de nos résultats.

Lepage *et al.*, (1992) ont utilisé plusieurs souches de champignons entomopathogènes (*Metarhizium anisopliae*, *Cordyceps militaris* et *Tolypocladium cylindrosporium*) afin de lutter contre quelques diptères piqueurs, Ils ont conclu que de toutes les souches testées, *Metarhizium anisopliae* semble le plus intéressant pour la lutte microbiologique contre les larves de diptères piqueurs. Dans ce sens Saint-Louis *et al.*, (2001) ont confirmé que *Metarhizium anisopliae* est un champignon promoteur pour une lutte biologique de par son efficacité sur tous les stades de développement d'un insecte et pourrait être un excellent candidat comme mesure alternative aux pesticides de synthèse dans le cadre d'une lutte biologique ou une lutte intégrée.

Les travaux de Ravallec *et al.*, (2003) ont démontré que *Metarhizium anisopliae* avait un effet distinct sur les larves d'*Aedes albopictus*. Ceux-ci ont développé la muscardine verte maladie due à *Metarhizium anisopliae* qui s'est propagé dans tout le corps des larves. En effet, ces mêmes auteurs ont révélé en 2006 que les larves d'*Aedes albopictus* soumises à de fortes doses de *Metarhizium anisopliae* ont montré une mort progressive (100% de mortalité au bout de 20 jours de traitement). Selon eux, si la dose de l'inoculum est assez élevée, les mycotoxines sont libérées dans l'hémocoel de l'insecte et c'est dans le mésantéron que les spores subissent une protéolyse alcaline (une larve de 4^{ème} stade ingère 3.10^5 spores). Effectivement, au fur et à mesure, les larves finissent par perdre leur capacité digestive.

L'étude de l'effet de nos 4 souches sur la mortalité des larves de *Culex pipiens*, nous montre que le traitement a mis en évidence une efficacité très hautement significative comparativement aux témoins ($P < 0.01$) et les larves ont été sensibles envers ces quatre souches malgré leur effet différent.

L'analyse de la variance à deux critères de classification (Temps et doses) a révélé une différence très hautement significative entre les pourcentages de mortalité des larves de *Culex pipiens* pour les différentes doses et à différents temps avec $P = 0.000$ pour l'effet des deux variables.

Pour les champignons M1 et M3 le test de Newman keuls a révélé l'existence de six groupes homogènes (A, B, C, D, E et F) et de ce fait classé les concentrations (Doses) selon leur efficacité. La dose 10^9 spores/ml est la plus efficace contre les larves suivie des doses 10^8 , 10^7 , 10^6 et 10^5 spores/ml et le groupe (F) étant celui des larves témoins qui n'ont subi aucune dose de traitement. Pour les champignons M2 et M5 le test de Newman keuls a révélé l'existence de cinq groupes homogènes (A, B, C, D et E) et de ce fait classé les concentrations (doses) selon leur efficacité. La dose 10^9 spores/ml est la plus efficace contre les larves suivie des doses 10^8 , 10^7 spores/ml. Les concentrations 10^6 et 10^5 spores/ml ont été classées dans un même groupe (D) pour la souche M3 et semblent avoir un effet similaire sur la mortalité. Pour la souche M5 les concentrations 10^8 et 10^9 spores/ml ont été classées dans un même groupe (A) et semblent avoir un effet similaire sur la mortalité, ce qui nous a permis de déduire que les doses employées ont été efficaces sur les larves et que la concentration 10^9 spores/ml qui a eu le plus d'effet car elle a permis de tuer 100% de larves et ce dès le 2^{ème} jour de traitement avec M5, le 4^{ème} jour de traitement avec M1, le 5^{ème} jour de traitement avec M2 et le 8^{ème} jour de traitement avec M3. Les doses 10^8 et 10^7 spores/ml sont aussi fortes car elles ont suffi à tuer jusqu'à 100% des larves au bout de 3 jours pour M5, les doses 10^6 et 10^5 spores/ml ont eu un moindre effet.

Nous pouvons également conclure que l'analyse de la variance explique que les doses employées ont été fortes, en effet elles ont permis d'avoir de grands taux de mortalité dans un intervalle de temps compris entre un et cinq jours.

Après correction des pourcentages des mortalités obtenues après traitement des larves par la solution entomopathogènes des quatre espèces de *Metarhizium anisopliae*, nous les avons convertis en probit selon la table des probits et nous avons également convertit le facteur temps et le facteur dose en logarithmes afin de calculer la DL₅₀ et les TL₅₀. Nos résultats ont abouti à une DL₅₀=3,9.10⁸ spores/ml pour la souche M1 et 8,9.10³ spores/ml après 24h pour M5, une DL₅₀ = 2,4.10⁸ spores/ml après le 3^{ème} jour pour M2 et 2,3.10⁷spores/ml après 4 jours pour M3. Les DL₅₀ de ce champignon, enregistrées par les différents auteurs sont de 1,09.10⁵ spores/ml sur les larves de *Aedes albopictus* (Hazrat *et al.*, 2012) après 3 jours d'application. et 8ppm pour les larves de *Aedes triseritatus* (Lepage *et al.*,1992). Quant aux larves de *Culex quinquefasciatus*, les DL₅₀ obtenues étaient respectivement 1,97.10⁴ spores/ml pour la souche *M. anisopliae* 1037 et 3,01.10⁵ spores/ml pour *et M. anisopliae* E9 (Alves *et al.*, 2002).

Concernant les TL₅₀, notre étude montre qu'ils sont inversement proportionnels aux doses appliquées. En effet, nous avons relevé des TL₅₀ de 1,22 jour pour la souche M1, ce qui correspond au temps le plus court à la dose la plus faible (10⁹ spores/ml) et 4,48 jours représentant ainsi le temps le plus long à la dose la plus faible (10⁵ spores/ml). Quant aux souches M2,M3 et M5, les TL₅₀ relevés sont respectivement 1,94, 2,64 et 0,02 jours représentant les temps les plus courts à la dose la plus élevée et des TL₅₀ de 3,85, 5,37 et 0,96 jours correspondant aux temps les plus longs à la dose la plus faible.

Nos résultats corroborent ceux obtenus par Alves *et al.*,(2002).Ces auteurs ont constaté que les LT₅₀ différaient selon les doses appliquées et les méthodes d'application : un TL₅₀ égale 1 jour quand ils avaient appliqué des conidies de *Metarhizium anisopliae* à la surface de l'eau et TL₅₀ égale 3,6 jours après traitement avec la même souche sous forme de spores sèches.

Les résultats de l'effet larvicide de *Metarhizium anisopliae* que nous avons obtenus sont en corrélation avec ceux observés par plusieurs auteurs (Alves *et al.*, 2002; Scholte *et al.*, 2005; Amora *et al.*, 2010) et permettent de conclure que les espèces de *Metarhizium anisopliae* testées ont une action pathogène sur les larves de *Culex pipiens*.

Chapitre III : Production et Identification des toxines (Destruxines) élaborées par *Metarhizium anisopliae*

Chez certains champignons entomopathogènes incluant *Metarhizium anisopliae* il y a production de mycotoxines pendant la pénétration des hyphes dans l'insecte , Les toxines sont souvent supposées être des armes chimiques, soit pour la défense des micro-organismes, soit pour l'attaque de l'hôte. Ces métabolites secondaires jouent un rôle important lors de l'invasion de l'insecte par le pathogène, puisqu'ils accélèrent la mort de l'hôte et permettent au champignon de proliférer plus rapidement (Vey *et al.*,1986; Ignoffo,1988; Ravallec *et al.*,1989). Des protéases, des cytochalasines ainsi que la prodestruxine sont tous des métabolites élaborés par *Metarhizium anisopliae*. Cependant, les plus intéressants restent les hexacyclodepsipeptides du groupe des destruxines isolés de ce champignon.

Par ailleurs, il est à signaler que les manipulations d'extraction, de purification et de caractérisation chimique des biomolécules sont très délicates, fastidieuses et coûteuses. En effet, la détermination complète de la structure chimique d'une molécule biologiquement active nécessite d'une part, la combinaison de plusieurs techniques d'extractions et de purifications et la disposition d'une quantité assez importante de la molécule à l'état pur, une telle quantité ne peut être obtenue que dans des conditions semi-préparatives ou même préparatives, et d'autre part, l'utilisation de plusieurs techniques physico-chimiques et spectroscopiques.

Dans cet objectif, nous avons analysé et caractérisé les différentes destruxines produites par les espèces *Metarhizium anisopliae* en se basant sur la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse.

1. Matériel et méthodes

1.1. Production des destruxins

1.1.1. Pré-culture

Les souches de *Metarhizium anisopliae* (M1, M2, M3 et M5) 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 distillée puis diluées pour obtenir une suspension d'environ 10^7 spore/ml. 1ml de la suspension a été ensemencé dans 49ml du milieu liquide Czapek dox broth (CDB) + 0,5% peptone et incubé 5 jours à 28°C et 150rpm afin de favoriser la sporulation (Hu *et al.*, 2006).

1.1.2. Fermentation

Le milieu maltose a été choisi comme un milieu spécifique pour une production optimale des destruxins (Liu *et al.*, 2000). La fermentation a été réalisée dans des Erlenmeyer de 250ml contenant 90 ml du milieu de fermentation. Chaque Erlenmeyer contenant le milieu a été inoculé par 10ml des prés cultures puis incubé à 28°C pendant 14jours sous agitation à 150 rpm. Les expérimentations ont été réalisées en triple.

1.1.3. Extraction

Après une durée d'incubation de 14 jours à 28°C, le contenu de chaque Erlenmeyer est filtré sur papier Whattman n°1, ensuite le milieu liquide a été centrifugé pendant 20 min à 8000 x g (permet de bien séparer le mycélium et le surnageant).

Les Mycotoxines (destruxines) présentes dans le surnageant de culture ont été extraites par partition de phase en mettant en contact les 100 ml de surnageant avec 100 ml de dichloromethane.

L'éluent contenant les métabolites secondaires a été recueilli puis évaporé à une température 40°C en utilisant l'appareil rotatif évaporation sous vide. Enfin, nous avons recueilli de nouveau le résidu à l'aide du méthanol.

1.2. Identification des destruxins

Cette partie du travail a été réalisée au sein de l'Institut de Chimie et Biochimie Moléculaires et Supramoléculaires (ICBMS), Université Claude Bernard Lyon 1-France).

1.2.1 Analyse par HPLC

Le système chromatographique utilisé au laboratoire se compose d'un système de pompage avec un formeur de gradient, une colonne et d'un injecteur (Pump. Agilent G 1312A binary, C₁₈ column). Les différents éléments sont reliés à un micro-ordinateur permet de piloter automatiquement les différents composants du système chromatographique. Il présente aussi toutes les fonctions d'un intégrateur classique de chromatographie.

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) et le solvant B (Acétonitrile). Au temps $t = 0$, la part du solvant B représente 4% de la phase mobile pour augmenter de façon linéaire pendant 12 minutes afin d'atteindre 30%, puis 95% de la phase mobile en 30 minutes, La composition de la phase mobile reste constante durant 10 minutes.

Enfin, les conditions initiales du système chromatographique ont été rétablies en dix minutes supplémentaires afin de rincer et de rééquilibrer la colonne (Tableau 42). Une colonne C18 Zorbax C18 a été utilisée comme phase stationnaire. 40 μ l d'extrait resuspendu et filtré ont été injectés automatiquement dans le système de chromatographie, pour chaque échantillon considéré avec un débit de 0,3ml/min.

Tableau 42: Programme gradient utilisé pour l'analyse et la séparation du métabolite

Temps (min)/Solvant	A	B
0 min	96%	4%
12 min	70%	30%
30 min	5%	95%
40 min	96%	4%

1.2.2 Analyse par HPLC couplée à la spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est une technique analytique mature qui s'est fortement implantée dans le domaine biomédical. Elle consiste à mesurer le rapport masse/charge (m/z) d'espèces élémentaires ou moléculaires (Figure 38).



Figure 38 : Système Hplc couplé à la spectrométrie de masse (*Institut de Chimie et Biochimie Moléculaires et Supramoléculaires(ICBMS), Université Claude Bernard Lyon 1-France*)

Fondamentalement, un spectromètre de masse est composé des éléments suivants : un système d'introduction de la substance à analyser, une source pour ioniser les analytes, un ou plusieurs analyseurs pour séparer les différents ions générés dans la source, un détecteur pour dénombrer les ions, et enfin un système de traitement des données permettent la visualisation et l'enregistrement des spectres de masse et permettant de contrôler les paramètres d'acquisition (Figure 39).

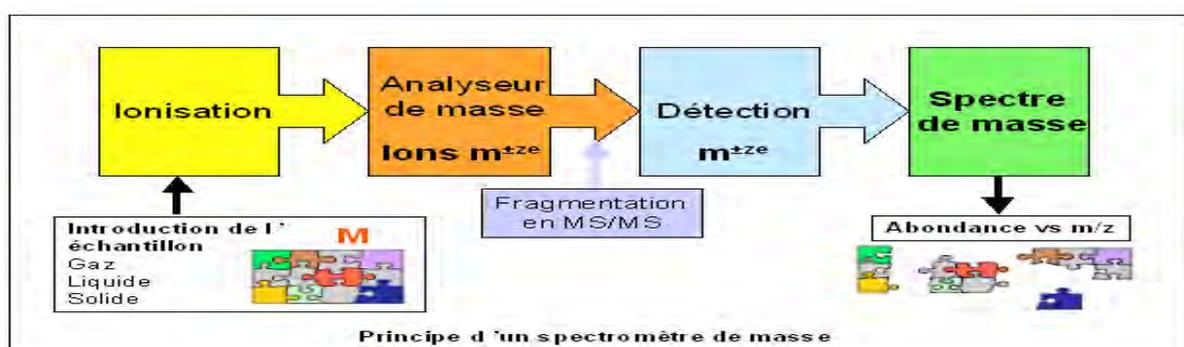


Figure 39 : Principe d'un spectromètre de masse
(Kebarle , 2000)

1.2.2.1 Analyses LC-ESI-MS et LC-APCI-MS

Afin d'analyser nos divers extraits ou mélanges réactionnels, nous avons utilisé la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse avec une source d'ionisation à la pression atmosphérique (API) de type electrospray (ESI) (Figure 38 (A)) et ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI) (Figure 38(B)).

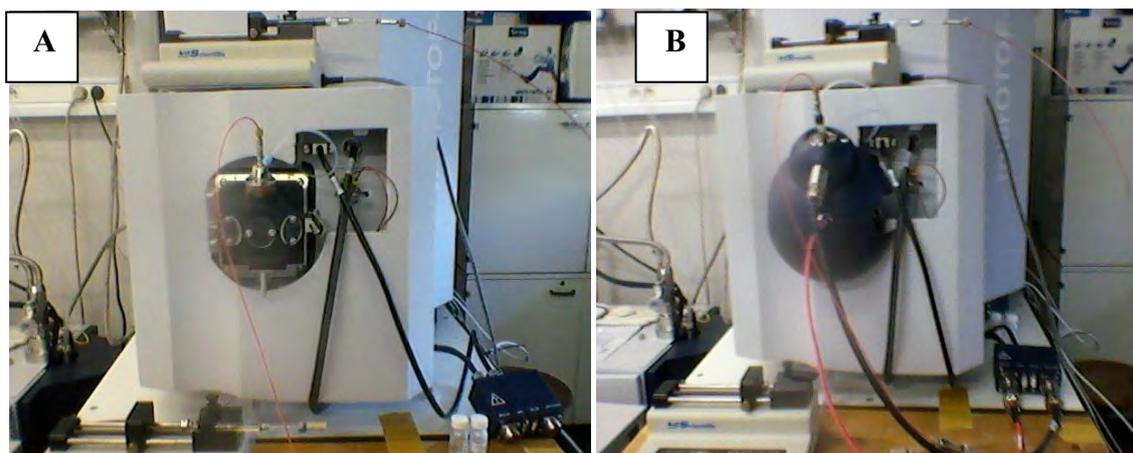


Figure 38 : (A) source d'ionisation electrospray (ESI-MS), (B) source d'ionisation à pression atmosphérique (APCI-MS) . (*Institut de Chimie et Biochimie Moléculaires et Supramoléculaires(ICBMS), Université Claude Bernard Lyon 1-France*)

▪ Les sources électrospray (ESI : *Electrospray Ionisation*)

Cette technique, développée par J.B. Fenn au milieu des années 1980, est utilisée en spectrométrie de masse pour produire des ions à partir de composés en solution. L'électrospray est produit par application à pression atmosphérique d'un fort champ électrique sur un liquide traversant un tube capillaire avec un faible débit. Le champ électrique est obtenu par application d'une différence de potentiel de 2 à 6 kV entre ce capillaire et la contre-électrode. Il provoque l'accumulation de charges à la surface du liquide, situé à l'extrémité du capillaire, qui va se rompre pour former des gouttelettes fortement chargées.

L'évaporation du solvant contenu dans ces gouttelettes va provoquer la réduction de leur taille jusqu'au moment où les forces coulombiennes vont approcher le niveau des forces de cohésions des gouttelettes et provoquer leur explosion.

Une cascade de fissions conduit à des gouttelettes de plus en plus petites, jusqu'au moment où le champ électrique à leur surface devient suffisant pour provoquer la désorption d'agrégats chargés. Les agrégats chargés ainsi produits sont accélérés pour être désolvatés au cône alors que les molécules non chargées sont éliminées (Figure 40).

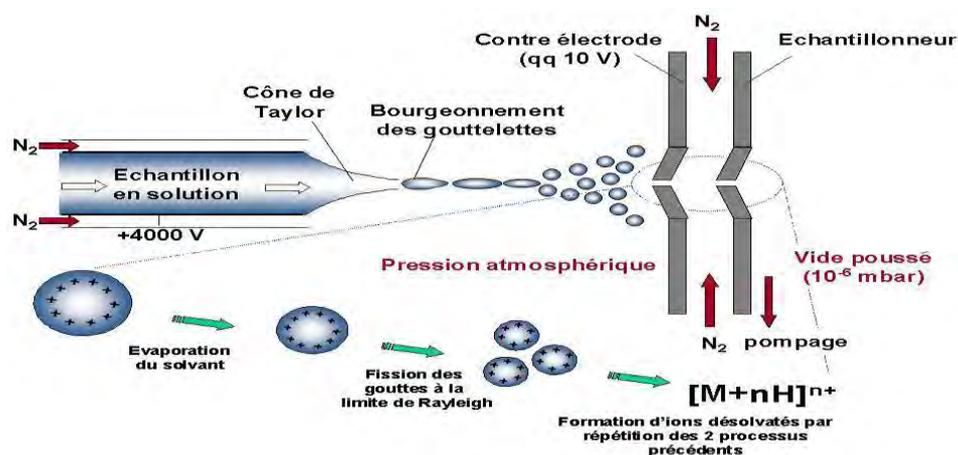


Figure 40 : Schéma d'une source électrospray

(Kebarle , 2000)

Cette technique d'ionisation douce, permettant une faible fragmentation de l'ion moléculaire et donnant ainsi accès à la masse moléculaire des analytes, est l'une des techniques les plus utilisées pour les études métabolomiques en couplage LC-MS.

▪ L'APCI (Ionisation chimique à pression atmosphérique)

Cette technique, employée en couplage LC-MS, fait appel à des réactions ions-molécule en phase gazeuse à pression atmosphérique. C'est donc une méthode analogue à l'ionisation chimique où les ions primaires sont produits par des décharges Corona sur un aérosol de solvant contenant les analytes. La source APCI est principalement appliquée à l'analyse des composés polaires et ioniques avec une masse moléculaire inférieure à environ 1500 Da, même si elle est capable d'analyser des composés relativement non polaires. Elle utilise un nébuliseur pneumatique à air ou à azote pour produire un fin aérosol au sein d'une chambre chauffée (350 à 500 °C), le vaporisateur. Au sein de la source, les molécules de solvant et d'analytes, sous forme gazeuse, sont ionisées à l'aide d'une décharge corona.

Les molécules de solvant, en large excès, sont ionisées préférentiellement et jouent le rôle d'ions réactifs. En ionisation en mode positif, le transfert de proton à partir des ions du solvant conduit à la formation de molécules protonées de l'analyte. En ionisation en mode négatif, les ions de l'espèce moléculaire sont obtenus par transfert d'électron ou par abstraction de proton. La formation d'ions aduits peut se produire dans les deux modes.

- **L'analyseur**

Le principe de fonctionnement de l'analyseur à temps de vol (Figure 41), désigné TOF pour *Time of flight* est le suivant : les ions sont accélérés vers le tube de vol par une différence de potentiel appliquée entre une électrode et la grille d'extraction. Les particules accélérées ayant toutes la même énergie cinétique passent ensuite dans le tube de vol, libre de champ, où elles sont séparées en fonction de leur vitesse acquise.

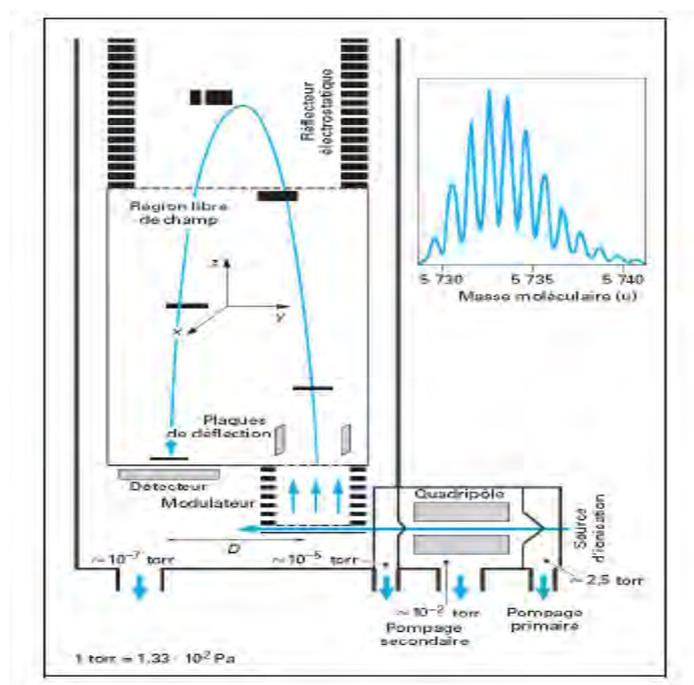


Figure 41: Principe de fonctionnement d'un analyseur à temps de vol (TOF)
(Bouchoux et Sablier, 2005)

1.2.2.2. Conditions opératoires des paramètres d'ionisation (LC-ESI-MS et LC-APCI-MS)

Les analyses présentées dans ce chapitre ont été réalisées en couplant un appareil HPLC 1100 (Agilent, Waldron, Allemagne) avec un triple quadripôle Quattro Ultima Micromass équipé d'une source électrospray (ESI) et une source à pression atmosphérique (APCI). Les données enregistrées d'un rapport m/z de 50 à 1000 ont ensuite été analysées. Les valeurs des paramètres pour obtenir un rapport signal/bruit optimal, en mode positif, sont les suivantes :

- une tension de capillaire de ± 3.5 kV
- une température de désolvation de 200°C
- une température de source de 350°C
- un débit de gaz de cône de 4 L/min

1.2.3. La spectrométrie de masse en tandem ou MS/MS

La spectrométrie de masse en tandem (ou MS/MS) consiste à combiner deux analyseurs. Ce système va permettre d'augmenter la précision des analyses.

La Figure 43 illustre le fonctionnement d'un spectromètre de masse en mode MS/MS. Les ions sont analysés dans un premier analyseur, puis passent dans une chambre de collision où ils sont fragmentés. Les fragments sont ensuite envoyés dans un second analyseur de masse. Les deux analyseurs ne sont pas nécessairement du même type. L'utilisation d'analyseurs de types différents permet de bénéficier d'avantages plus variés, ou de limiter les inconvénients d'un analyseur donné.

Par exemple, le « Quadrupole Time-of-flight » (aussi appelé QTOF) utilisé dans notre étude est un appareil utilisant un analyseur de type quadripôle dans un premier temps, avant de fragmenter les ions et de les faire passer dans un analyseur de type Temps-de-Vol.

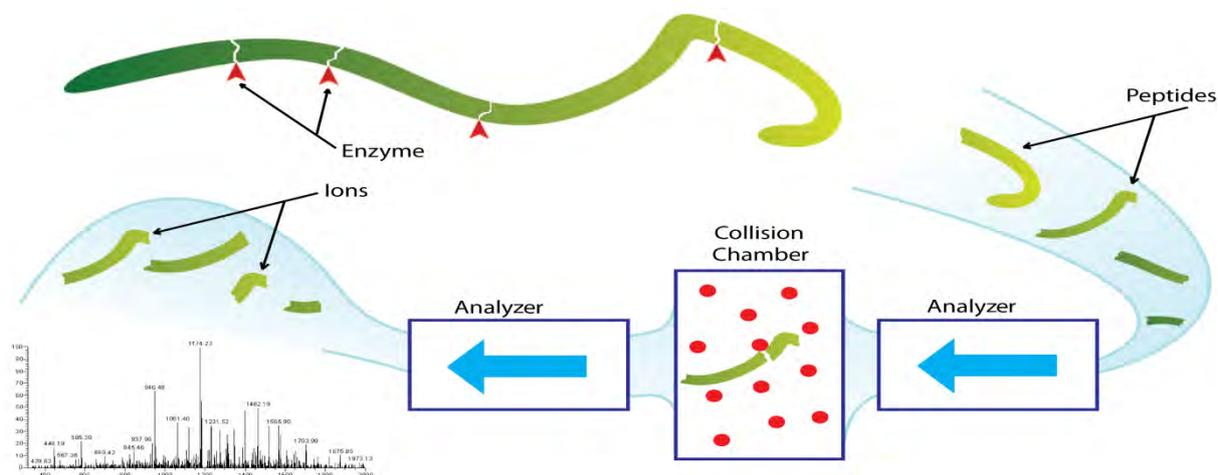


Figure 43 : Principe général d'un spectromètre de masse MS/MS.
(Freddy, 2011)

La fragmentation en MS/MS va couper le peptide à différents endroits, et ainsi créer une série d'ions. Cette fragmentation a principalement lieu sur le squelette peptidique. Selon la notation introduite en 1984 par Roepstorff et Fohlman, les ions formés quand la charge reste sur le fragment de gauche (nommé N-terminal) sont appelés a, b et c ; quand la charge reste sur le fragment de droite (nommé C-terminal), les ions formés sont appelés x, y et z.

La Figure 44 présente la position de la fragmentation pour ces différents ions. La détection de chacun de ces ions va se traduire par un pic dans le spectre MS/MS.

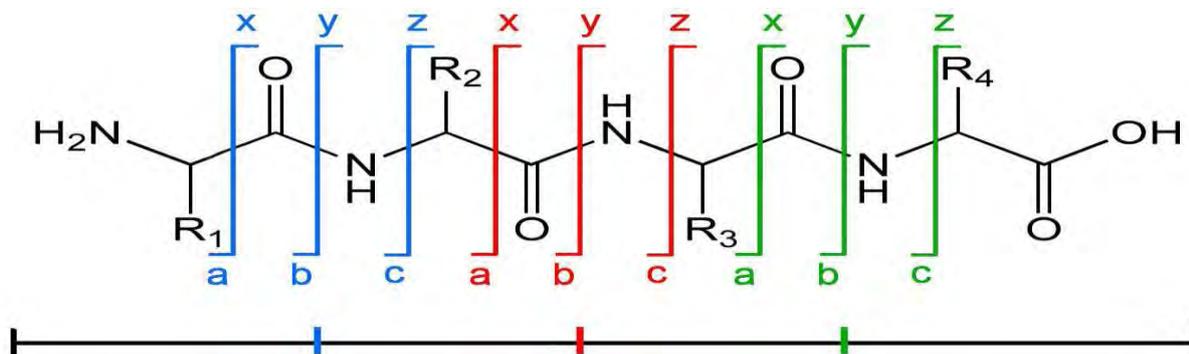


Figure 44 : Les différents sites de fragmentation à l'intérieur d'un peptide de quatre acides aminés (Roepstorff et Fohlman, 1984)

2. Résultats

2.1. Fermentation

Après inoculation, les Erlenmeyer ont été incubés à 28°C et agités à 150rpm pendant 14 jours. Cette agitation assez intense pourrait entraîner un développement hétérogène du mycélium selon les espèces fongiques. Au cours de notre étude, nous avons remarqué des développements morphologiques différents du mycélium des 4 champignons entomopathogènes *Metarhizium anisopliae*. 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, le mycélium se développe de façon hétérogène dans le milieu de culture en formant des billes ou des filaments. La figure 45 illustre le développement hétérogène des quatre souches de *Metarhizium anisopliae* après 14 jours de fermentation.

Pendant les 14 jours d'incubation, les Erlens ont été contrôlés hebdomadairement pour confirmer l'absence de contamination par d'autres espèces fongiques.

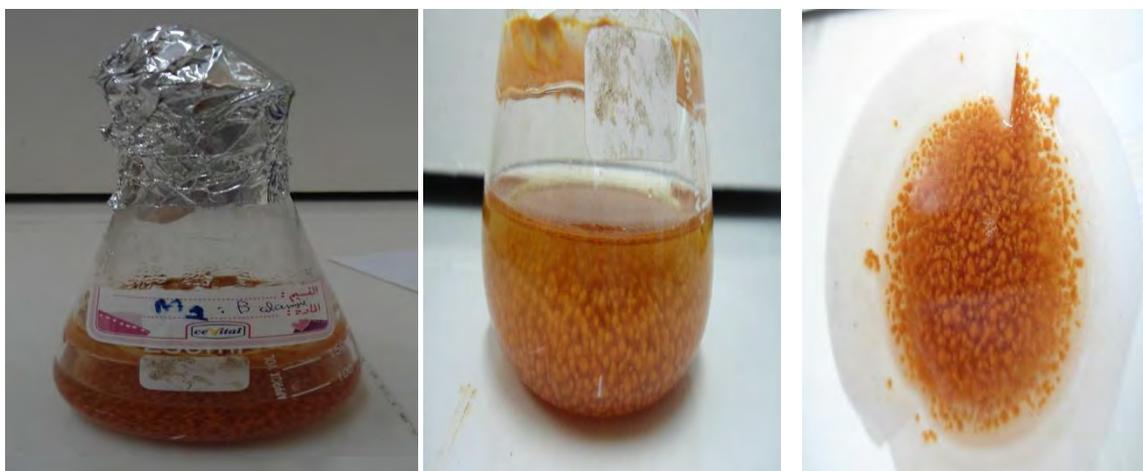


Figure 45 : Développement morphologique de *Metarhizium anisopliae* sur milieu de fermentation en formant des billes

2.2. Extraction

Les souches de *Metarhizium anisopliae* ont été sélectionnées pour ses activités insecticides importantes contre les larves de moustiques. Pour la purification et la caractérisation chimiques des biomolécules (toxines) de ces sources, nous avons préparé quatre cultures de 100 ml. Après 14 jours d'incubation à 28°C sous une agitation à 150 rpm. Les surnageants des quatre cultures ont été séparés de la biomasse par centrifugation. Une double extraction par le dichlorométhane a été réalisée sur chacun des quatre surnageants obtenus (Figure 46).

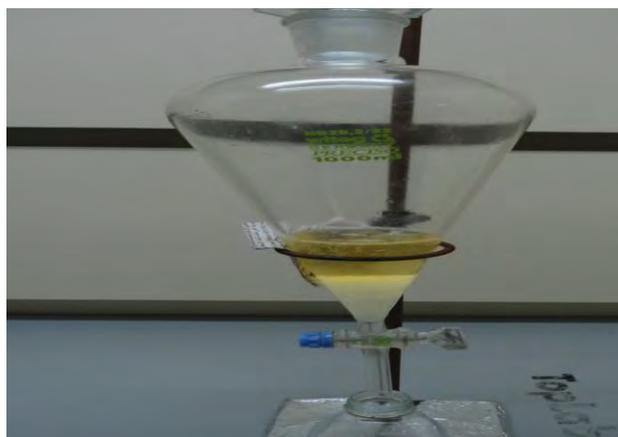


Figure 46 : Extraction des métabolites secondaires de *Metarhizium anisopliae* par le dichlorométhane

La phase organique contenu le composé actif est évaporé a sec par rotavapor. Les 4 extraits secs obtenus sont de couleur jaune-marron (Figure 47).



Figure 47 : Extrait brut de la souche *Metarhizium anisopliae*

2.3. Identification et caractérisation des destruxines

2.3.1. Analyse par HPLC

Dans le but d'obtenir une séparation satisfaisante et plus rapide des destruxines. Le système Hplc à été effectué en gradient d'éluion linéaire. De ce fait la phase mobile HPLC à été testée avec l'acétonitrile comme solvant (Figure 48).

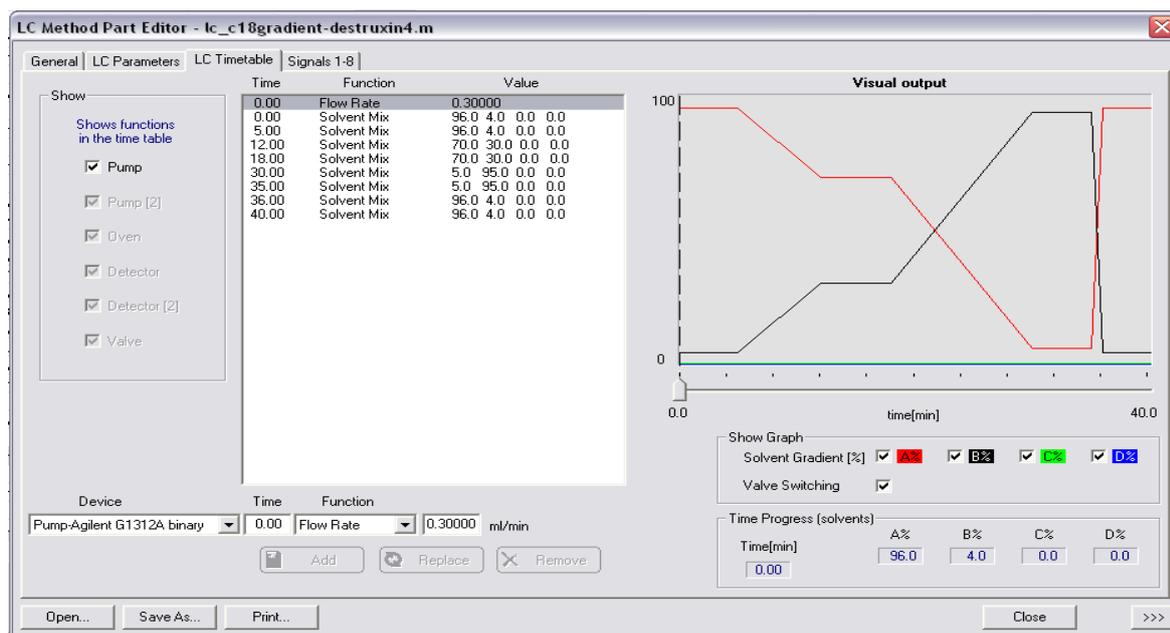


Figure 48 : Les conditions analytiques du système HPLC (agilent)

La figure 49 montre les différents profils chromatographiques obtenus par analyse en HPLC des cultures des 4 souches de *M.anisopliae*. Il peut être observé que les métabolites secondaires de *Metarhizium anisopliae* recherchés dans les surnageant de culture couvrent une large gamme de polarité et que 40 minutes sont nécessaires pour séparer l'ensemble de ces molécules.

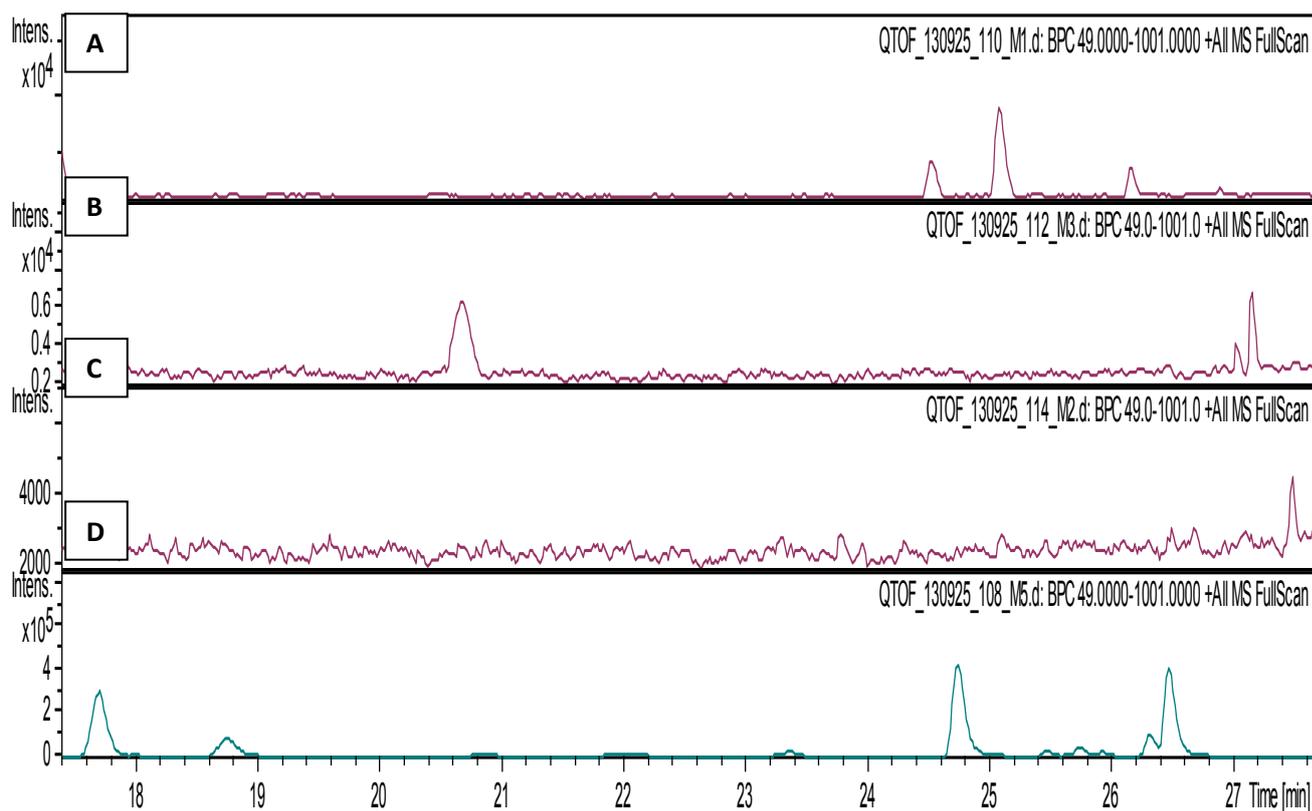


Figure 49 : Chromatogramme HPLC des 4 souches de *Metarhizium anisopliae*, A) la souche M1, B) la souche M3, C) la souche M2, D) la souche M5

Les chromatogrammes 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 M5 douze pics dont quatre ont été détectés dans les surnageants issue de la souche M1. Cependant aucun pic n'a été détecté pour les extraits des souches M2 et M3. En outre, les 4 pics ont été détectés aux mêmes temps de rétention pour l'extrait de la souche M1 et M5 et 9 pics n'ont été présents que dans l'extrait de la souche M5.

Les différents métabolites obtenus ont des temps de rétention très voisins du fait de la similitude de leurs propriétés physicochimiques, les métabolites ont été séparés entre les temps de rétention 17min-28min (Figure 50 a et b).

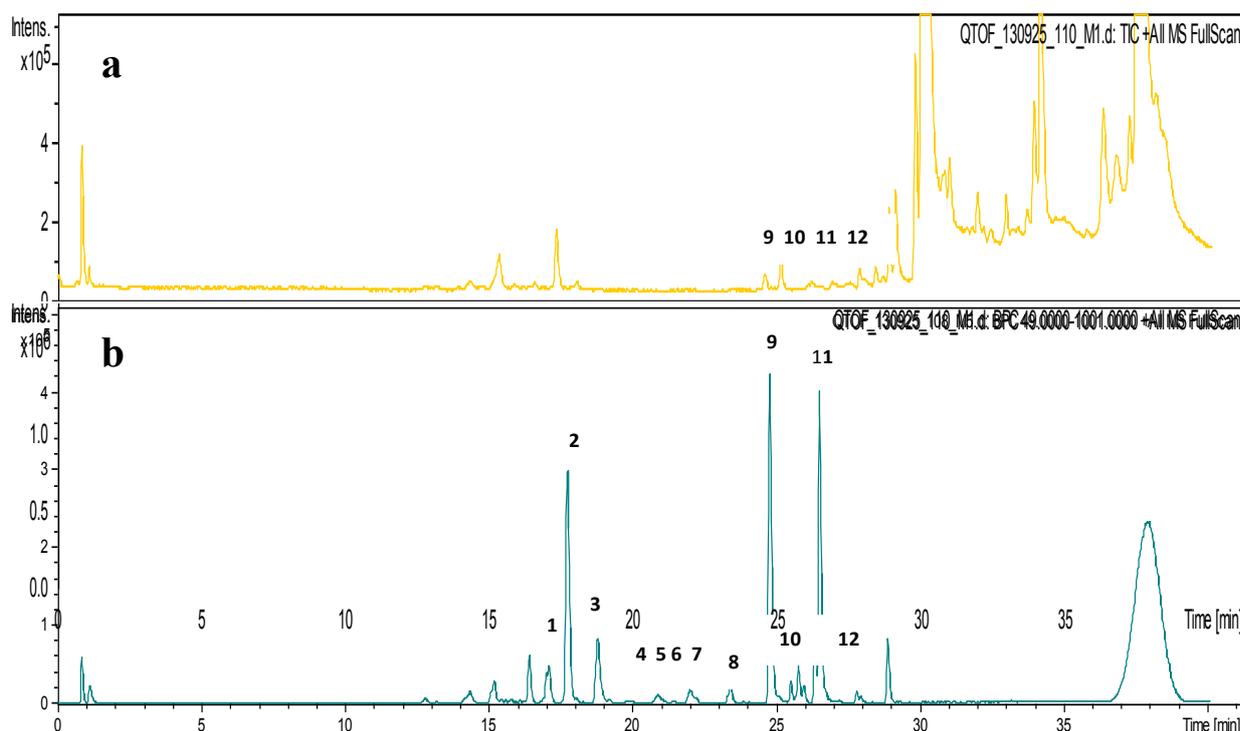


Figure 50: Séparation des molécules par HPLC, (a) la souche M1, (b) la souche M5

2.3.2. Analyse par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC/MS) et (LC/MS/MS)

Dans le but d'identifier les molécules présentes dans les extraits des 4 souches de *M.anisopliae*, nous avons combiné l'HPLC à un système de détection MS (spectrométrie de masse). car non seulement c'est un mode de détection souvent rencontré pour l'analyse des métabolites secondaires mais surtout il fournit des informations structurales sur les analyses étudiées.

En spectrométrie de masse, la molécule est analysée sous une forme ionisée et pour la quantifier, le détecteur enregistre l'intensité du signal associé à cette espèce (de rapport m/z) en fonction du temps. On obtient alors un chromatogramme dont l'abscisse est le temps et l'ordonnée est l'intensité de l'ion considéré. Différents modes peuvent être utilisés, comme le mode MS/MS, ou le mode MS simple.

Les résultats d'analyses LC/MS ont montré que la souche *Metarhizium anisopliae* LK995308(M1) produit 4 types de destruxines (A, B2, B et B1), tandis que la souche *Metarhizium anisopliae* LK995311 (M5) produit 12 types de destruxines à savoir Ed, F, Ed1, C, E chlorohydrin, E, D, Desmethyl A, A, B2, B et B1). En revanche, la production des destruxines est absente dans le cas des deux souches *Metarhizium anisopliae* LK995309 (M2) et *Metarhizium anisopliae* LK995310 (M3).

2.3.2.1. Analyse par LC /MS

❖ Détermination de structure du composé 1(C1)

▪ Identification par LC-ESI-MS

Le spectre de masse obtenu en ESI en mode positif (Figure 51A) présente un ion quasi moléculaire de rapport m/z 612,4 $[M-H]^+$ et un ion pseudo moléculaire $[M-Na]^+$ 634,4 à 17,1min .

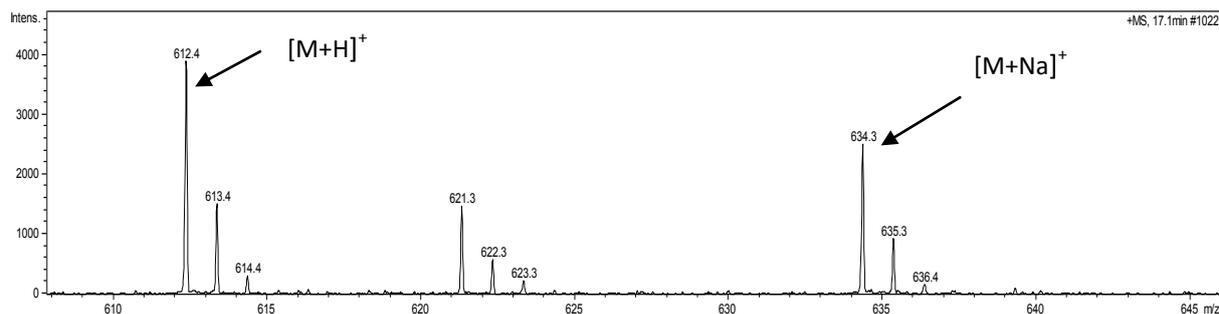


Figure 51 (A): Spectres de masse obtenus par ESI-MS en mode positif pour le composé 1 de la souche M5

▪ Identification par LC-APCI-MS

L'ionisation à pression atmosphérique (APCI) en mode positif a généré principalement un ion moléculaire à $[M-H]^+$ à m/z 612,3585 (Figure 51B), ce qui correspond à une composition élémentaire $C_{20}H_{50}N_5O_9$. La valeur théorique de la formule brute correspond à $C_{20}H_{50}N_5O_9$ vaut 612,3603 (erreur inférieure à 1,8ppm).

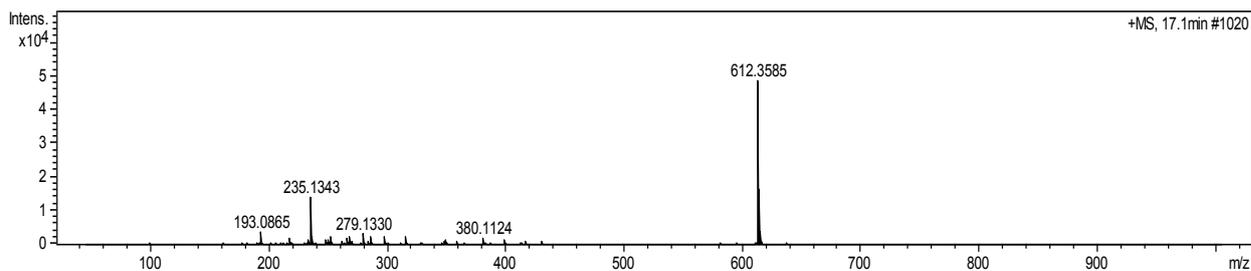


Figure 51(B) : Spectres de masse obtenus par APCI-MS en mode positif pour le composé 1 de la souche M5

❖ Détermination de structure du composé 2(C2)

▪ Identification par LC-ESI-MS

Sur le spectre de masse en ESI en mode positif, nous observons un ion quasi moléculaire à m/z 596,4 et un adduit de sodium $[M+Na]^+$ 618,4 à 18,2min (Figure 52A)

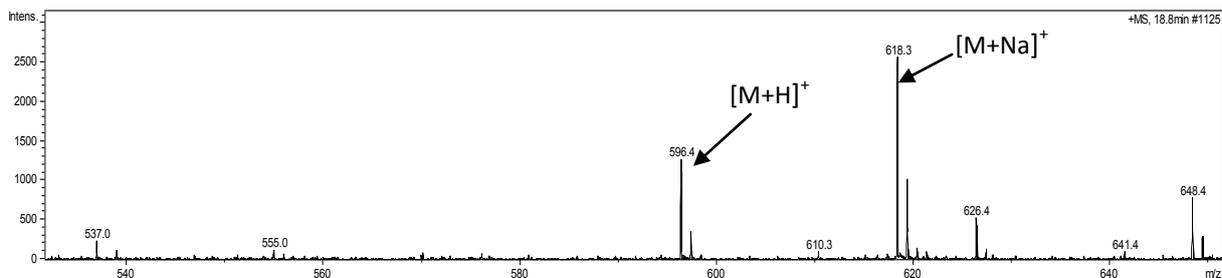


Figure 52(A) : Spectres de masse obtenus par ESI-MS en mode positif pour le composé 2 de la souche M5

▪ Identification par LC-APCI-MS

L'ionisation APCI en mode positif a produit un ion $[M-H]^+$ à m/z 596,3644 (Figure 52B), ce qui est compatible avec une composition élémentaire $C_{29}H_{50}N_5O_8$. La valeur théorique de la formule brute correspond à la destruxine F vaut 596,3654 (erreur inférieure à 1,7 ppm)

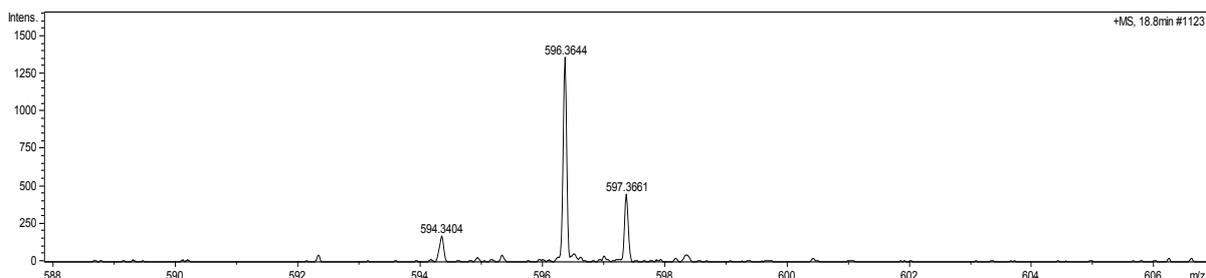


Figure 52(B): Spectres de masse obtenus par APCI-MS en mode positif pour le composé 2 de la souche M5

❖ Détermination de structure du composé 3(C3)

▪ Identification par LC-ESI-MS

L'analyse du spectre de masse en ESI du composé 3 (Figure 53A) permet d'observer un ion quasi moléculaire $[M-H]^+$ 626,4m/z avec un adduit de sodium $[M-Na]^+$ 648,4 m/z .

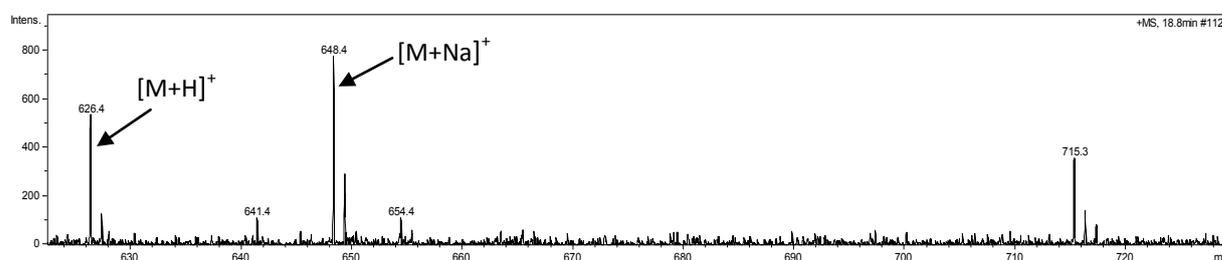


Figure 53 (A): Spectres de masse obtenus par ESI-MS en mode positif pour le composé 3 de la souche M5

▪ Identification par LC-APCI-MS

L'ionisation APCI a généré un ion $[M-H]^+$ à m/z 626,3739. Ce qui est compatible avec une composition $C_{30}H_{51}N_5O_8$. Cette composition correspond exactement à la formule brute de la destruxine Ed1 (Figure 53B).

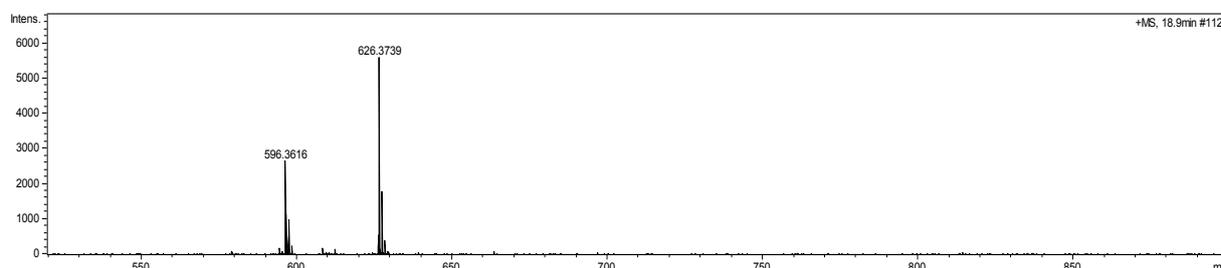


Figure 53 (B) : Spectres de masse obtenus par APCI-MS en mode positif pour le composé 3 de la souche M5

❖ Détermination de structure du composé 4(C4)

▪ Identification par LC-ESI-MS

La mesure du spectre de masse en ESI⁺ (Figure 54A) montre un ion a m/z 610,4 qui correspond à l'ion moléculaire $[M-H]^+$ et l'adduit de sodium $[M-Na]^+$ 632,4 m/z (figure)

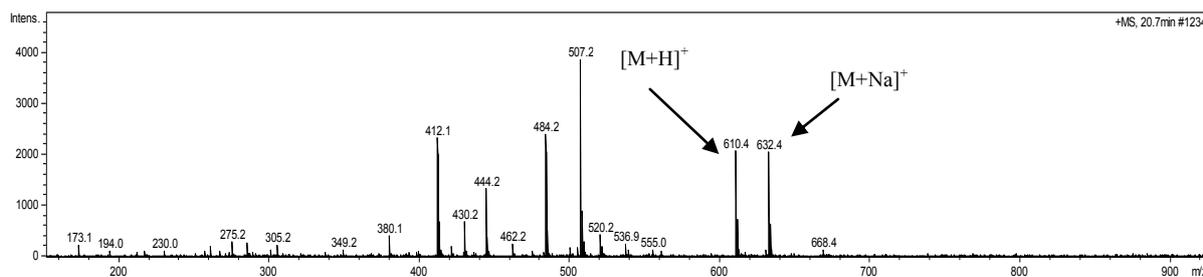


Figure 54 (A): Spectres de masse obtenus par ESI-MS en mode positif pour le composé 4 de la souche M5

▪ **Identification par LC-APCI-MS**

Un spectre obtenu en mode APCI a permis d'un ion pseudo moléculaire à 610,3805 avec la formule brute $C_{30}H_{52}N_5O_8$ correspond à la destruxine C (masse calculée 610,3810 avec une erreur de 1,1ppm) (Figure 54B)

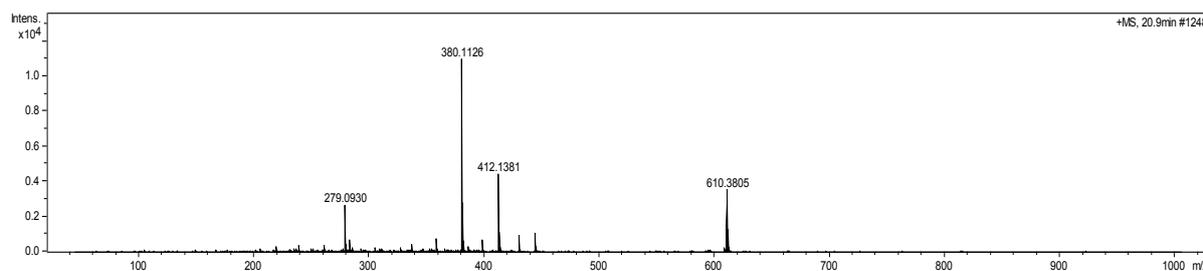


Figure 54 (B) : Spectres de masse obtenus par APCI-MS en mode positif pour le composé 4 de la souche M5

❖ **Détermination de structure du composé 5(C5)**

▪ **Identification par LC-ESI-MS**

Le spectre de masse en ESI⁺ (Figure 55A) confirme la masse atomique $[M-H]^+$ 630,3 car il présente les ions $[M-Na]^+$ 652,3.

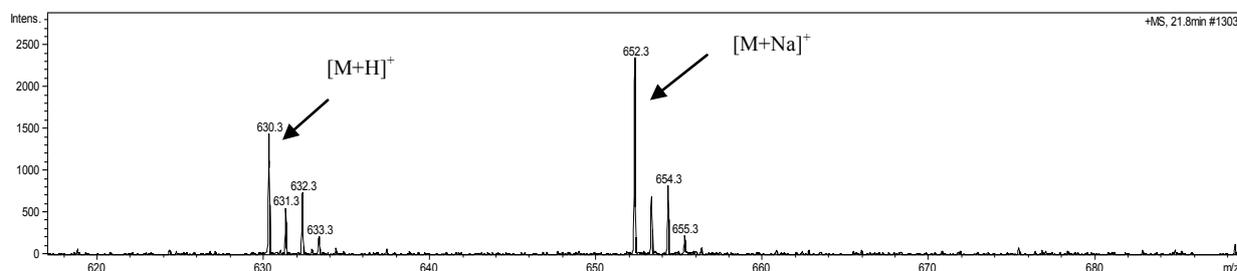


Figure 55(A) : Spectres de masse obtenus par ESI-MS en mode positif pour le composé 5 de la souche M5

▪ **Identification par LC-APCI-MS**

La masse du composé 5(C5) à été confirmée par un spectre obtenu en APCI⁺ à permis d'observer un ion pseudo moléculaire à m/z 630,3232 [M-H]⁺ avec la formule brute C₂₉H₄₈N₅O₈CL (masse calculée (630,3270), le composé correspond à la destruxine E chlorohydrin (Figure 55B).

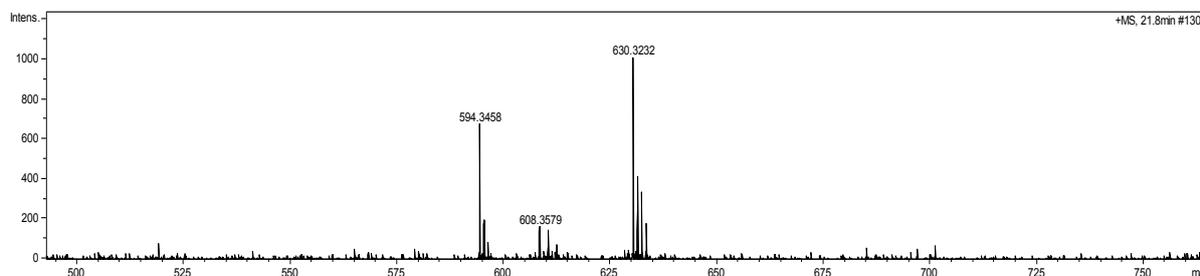


Figure 55 (B) : Spectres de masse obtenus par APCI-MS en mode positif pour le composé 5 de la souche M5

❖ **Détermination de structure du composé 6(C6)**

▪ **Identification par LC-ESI-MS**

Sur le spectre de masse en ESI en mode positif, nous observons un ion quasi moléculaire à m/z 594,4 et un adduit de sodium [M+Na]⁺ 616,4 à 22min (Figure 56A)

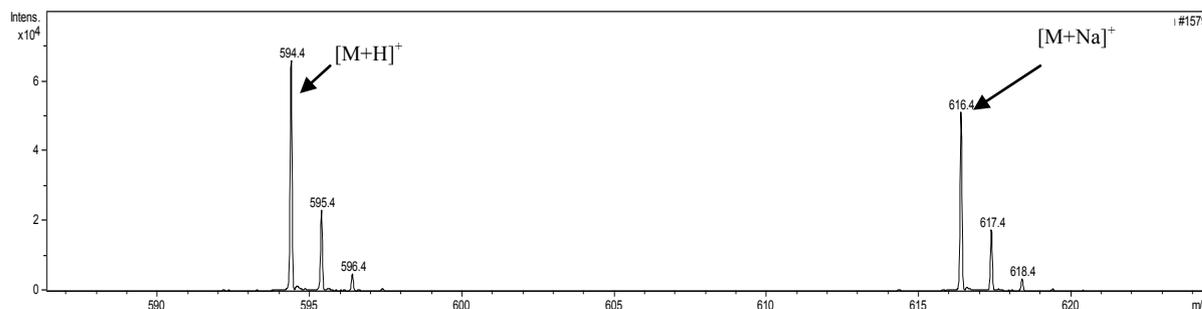


Figure 56(A) : Spectres de masse obtenus par ESI-MS en mode positif pour le composé 6 de la souche M5

▪ Identification par LC-APCI-MS

L'ionisation à pression atmosphérique (APCI) en mode positif a généré principalement un ion moléculaire à $[M-H]^+$ à m/z 594,3489 (Figure 56B), ce qui correspond à une composition élémentaire $C_{29}H_{48}N_5O_8$. La valeur théorique de la formule brute correspond à 594,3497 (erreur inférieure à 1,4ppm).

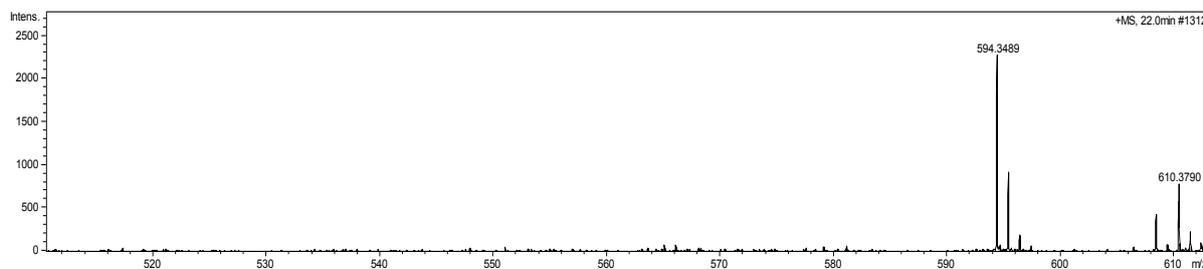


Figure 56(B) : Spectres de masse obtenus par APCI-MS en mode positif pour le composé 6 de la souche M5

❖ Détermination de structure du composé 7(C7)

▪ Identification par LC-ESI-MS

La mesure du spectre de masse en ESI^+ (Figure 55A) montre un ion à m/z 624,4 qui correspond à l'ion moléculaire $[M-H]^+$ et l'adduit de sodium $[M-Na]^+$ 646,3 m/z (Figure 57 A)

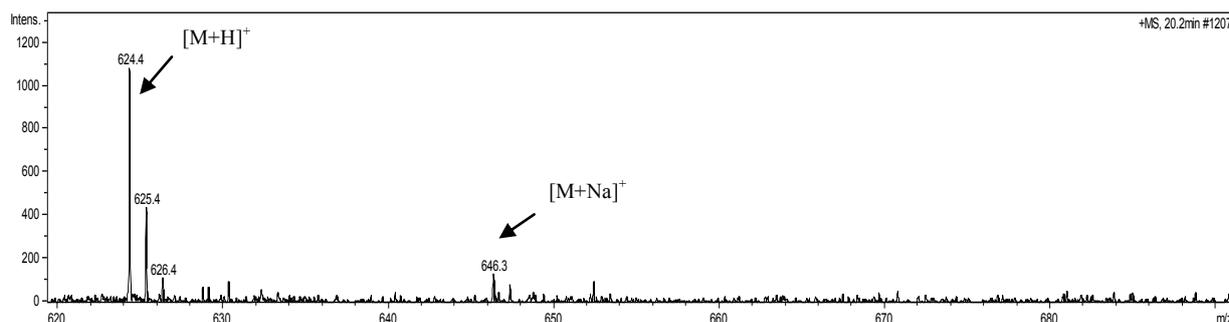


Figure 57(A) : Spectres de masse obtenus par ESI-MS en mode positif pour le composé 7 de la souche M5

▪ **Identification par LC-APCI-MS**

La masse du composé 7(C7) à été confirmée par un spectre obtenu en APCI⁺ à permis d'observer un ion pseudo moléculaire à m/z 624,3590 [M-H]⁺ avec la formule brute C₃₀H₅₀N₅O₉ (masse calculée (624,3603), le composé correspond à la destruxine D (Figure 57B).

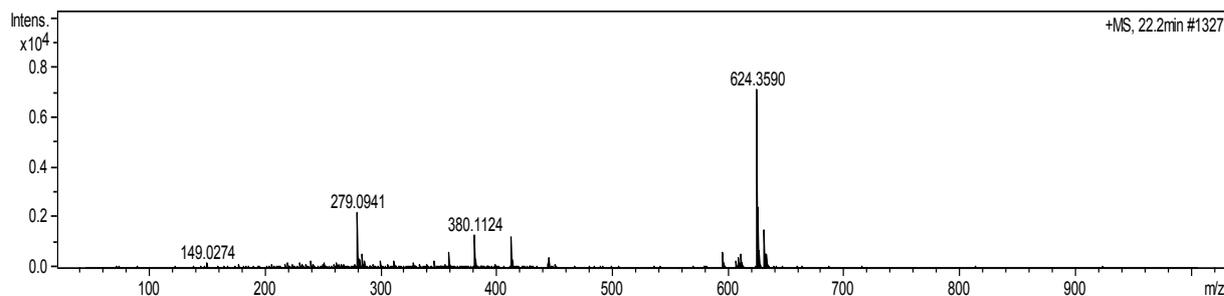


Figure 57(B) : Spectres de masse obtenus par APCI-MS en mode positif pour le composé 7 de la souche M5

❖ **Détermination de structure du composé 8(C8)**

▪ **Identification par LC-ESI-MS**

Le spectre de masse en ESI⁺ (Figure 58A) confirme la masse atomique [M-H]⁺ 564,3 car il présente les ions [M-Na]⁺ 586,3 .

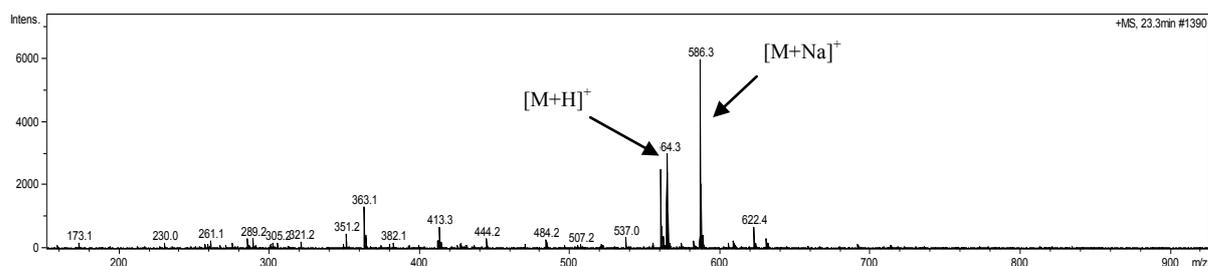


Figure 58(A) : Spectres de masse obtenus par ESI-MS en mode positif pour le composé 8 de la souche M5

▪ **Identification par LC-APCI-MS**

Un spectre obtenu en mode APCI a permis d'un ion pseudo moléculaire à 564,3375 avec la formule brute $C_{28}H_{46}N_5O_7$ correspond à la destruxine A2 (masse calculée 564,3392 avec une erreur de 3 ppm) (Figure 58B) .

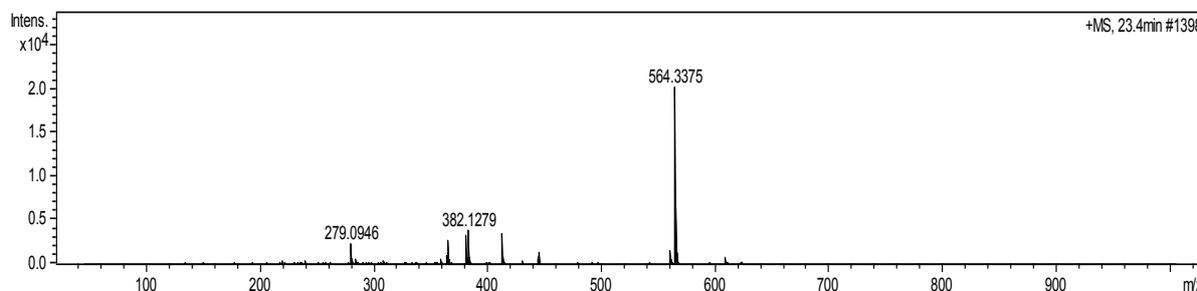


Figure 58(B): Spectres de masse obtenus par APCI-MS en mode positif pour le composé 8 de la souche M5

❖ **Détermination de structure du composé 9(C9)**

▪ **Identification par LC-ESI-MS**

L'analyse du spectre de masse en ESI du composé 9 (Figure 59A) permet d'observer un ion quasi moléculaire $[M-H]^+$ 578,4m/z avec un adduit de sodium $[M-Na]^+$ 600,4 m/z .

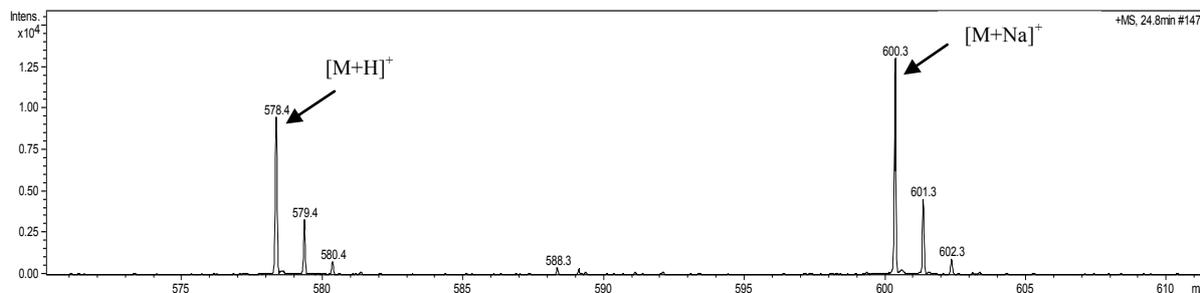


Figure 59(A) : Spectres de masse obtenus par ESI-MS en mode positif pour le composé 9 des deux souches M1et M5

▪ **Identification par LC-APCI-MS**

L'ionisation APCI a généré un ion $[M-H]^+$ à m/z 578,3533. Ce qui est compatible avec une composition $C_{29}H_{48}N_5O_7$. Cette composition correspond exactement à la formule brute de la destruxine A (figure 59B).

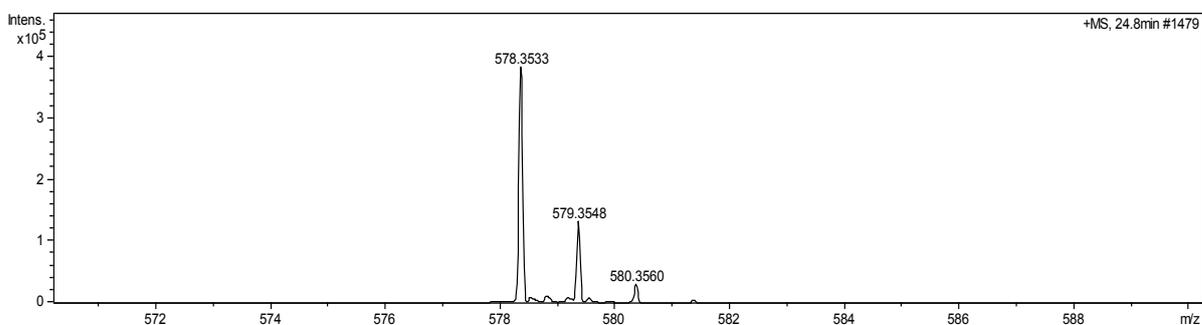


Figure 59(B) : Spectres de masse obtenus par APCI-MS en mode positif pour le composé 9 des deux souches M1 et M5

❖ **Détermination de structure du composé 10(C10)**

▪ **Identification par LC-ESI-MS**

La mesure du spectre de masse en ESI⁺ (figure) montre un ion à m/z 580,4 qui correspond à l'ion moléculaire $[M-H]^+$ et l'adduit de sodium $[M-Na]^+$ 602,4 m/z (Figure 60 A)

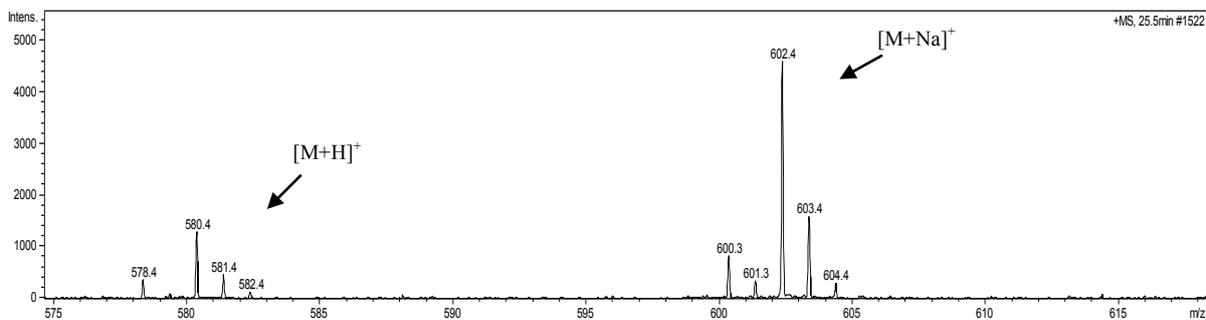


Figure 60(A): Spectres de masse obtenus par ESI-MS en mode positif pour le composé 10 des deux souches M1 et M5

▪ **Identification par LC-APCI-MS**

Un spectre obtenu en mode APCI a permis d'un ion pseudo moléculaire à 580,3678 avec la formule brute $C_{28}H_{46}N_5O_7$ correspond à la destruxine B2 (masse calculée 564,3705 avec une erreur de 4,6 ppm) (Figure 60B)

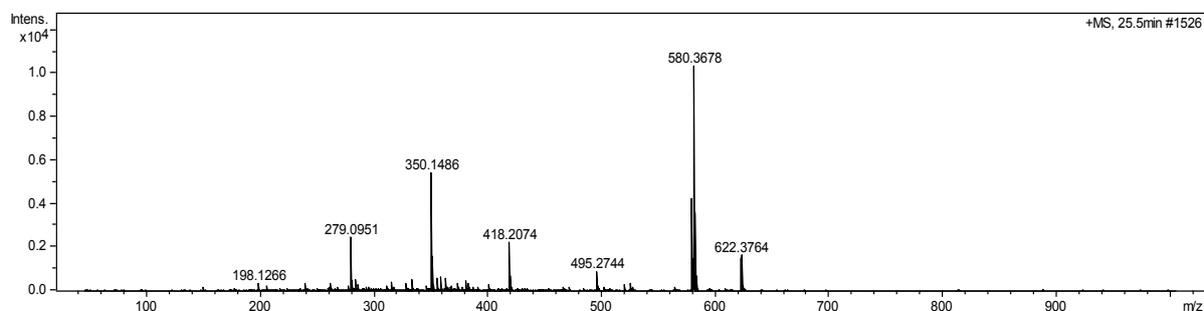


Figure 60(B) : Spectres de masse obtenus par ESI-MS en mode positif pour le composé 10 des deux souches M1 et M5

❖ **Détermination de structure du composé 11(C11)**

▪ **Identification par LC-ESI-MS**

Le spectre de masse en ESI^+ (Figure 61A) confirme la masse atomique $[M-H]^+$ 594,4 car il présente les ions $[M-Na]^+$ 616,4

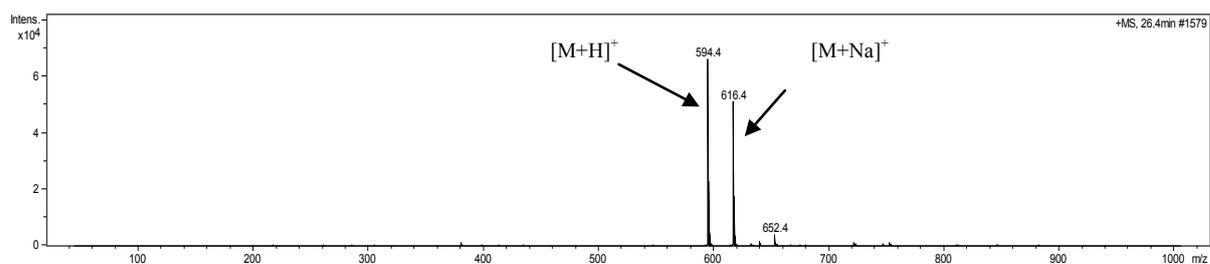


Figure 61(A) : Spectres de masse obtenus par ESI-MS en mode positif pour le composé 11 des deux souches M1 et M5

▪ **Identification par LC-APCI-MS**

L'ionisation APCI a généré un ion $[M-H]^+$ à m/z 594,3845. Ce qui est compatible avec une composition $C_{30}H_{52}N_5O_7$. Cette composition correspond exactement à la formule brute de la destruxine B (Figure 61B).

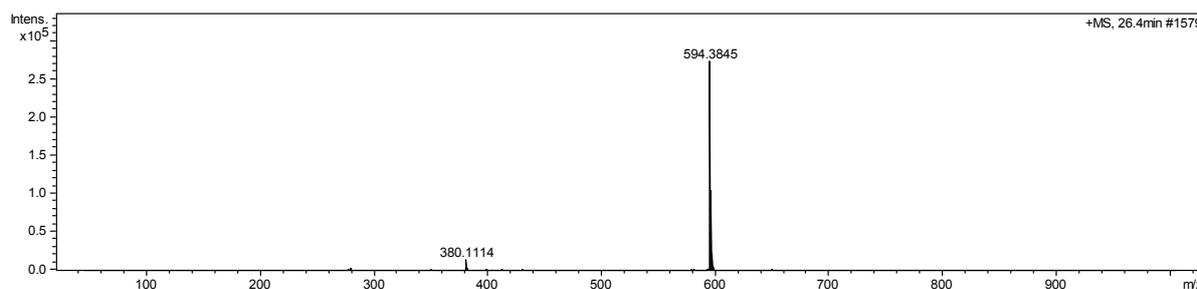


Figure 61(B) : Spectres de masse obtenus par APCI-MS en mode positif pour le composé 11 des deux souches M1 et M5

❖ **Détermination de structure du composé 12(C12)**

▪ **Identification par LC-ESI-MS**

Sur le spectre de masse en ESI en mode positif, nous observons un ion quasi moléculaire à m/z 608,4 et un adduit de sodium $[M-Na]^+$ 630,4 à 27,8 min (Figure 62A)

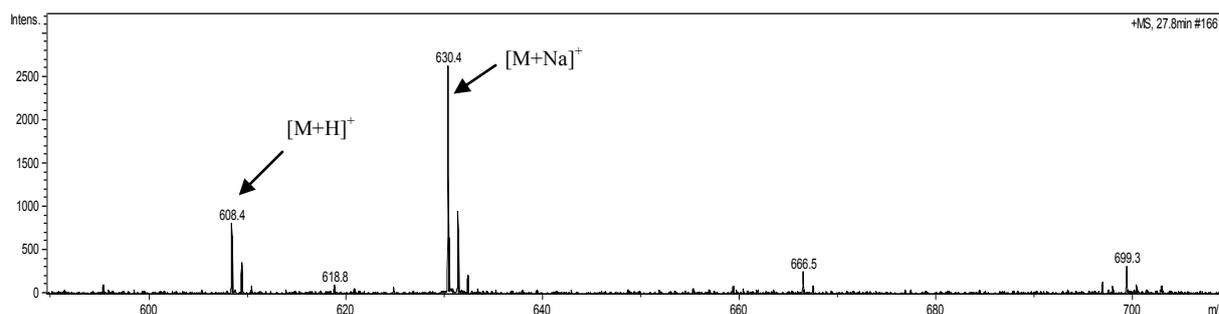


Figure 62(A): Spectres de masse obtenus par ESI-MS en mode positif pour le composé 12 de la souche M5

▪ Identification par LC-APCI-MS

L'ionisation APCI en mode positif a produit un ion $[M-H]^+$ à m/z 608,3996 (Figure 62B), ce qui est compatible avec une composition élémentaire $C_{31}H_{54}N_5O_8$. La valeur théorique de la formule brute correspond à la destruxine B1 vaut 608,4018 (erreur inférieure à 3,6 ppm)

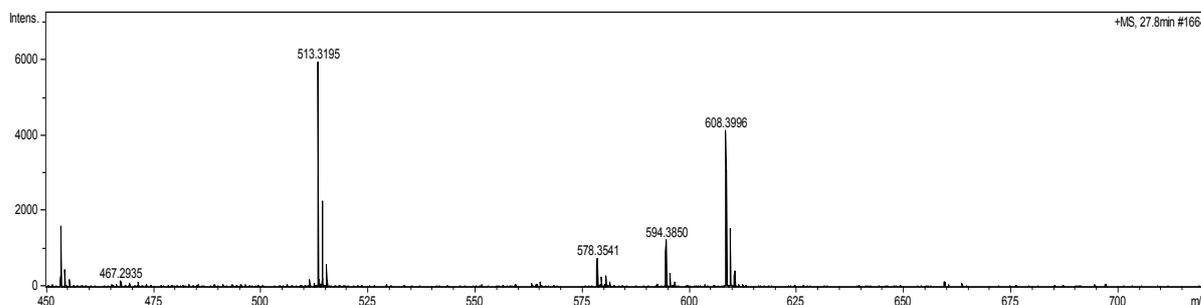


Figure 62(B): Spectres de masse obtenus par APCI-MS en mode positif pour le composé 12 de la souche M5

2.3.2.2 Analyse par spectrométrie de masse en mode tandem (LC-MS /MS)

Pour chaque molécule, l'ion majoritaire a été déterminé par infusion directe dans la source ESI en mode positif. Toutes les molécules donnent un signal en mode positif et conduisent un ion moléculaire protoné $[M-H]^+$. La fragmentation de cet ion moléculaire donne des ions fils dont l'abondance dépend de l'énergie de collision appliquée. Ces ions de fragmentations des 12 molécules de destruxines détectées sont répertoriés dans le tableau 43 dont les détails sont présentés dans l'annexe (7).

Dans cette étude l'ion moléculaire protoné $[M-H]^+$ a été sélectionné pour les spectres de fragmentations, type CID (Collision-induced dissociation) à une énergie de collision voisine de 40Ev.

Tableau 43: Fragmentations des ions observées par APCI-QTOF-MS des destruxines

DTX	MH+	⁴⁻⁵ b₅	⁴⁻⁵ a₅	⁴⁻⁵ b₄	⁴⁻⁵ a₄	⁵⁻⁶ b₃	⁴⁻⁵ b₃	⁵⁻⁶ a₃
Ed	612	499	471	386	358	301	289	273
F	596	513	485	400	370			
Ed1	626	513	485	400	372			
C	610	497	469	384	356		287	
E Cl	631	517	489	404	376		307	
E	594	481	453		340	283		
D	624	511	483	398	370		301	
A2	564	451	423	352	324	267	255	239
A	578	465	437	352	324	267	255	
B2	580	467		368	340	283	271	255
B	594	481	453	368	340	283	271	255
B1	608	495			354		271	

Les ions a et b pour lesquels la charge positive est portée par l'extrémité N-terminale ; les ions b issus de la fragmentation de la liaison peptidique (CO-NH) et les ions a issus de la coupure en amont de la liaison peptidique (CH-CO). Chacun de ces ions peut subir des pertes neutres, parmi lesquelles on trouvera souvent une perte en eau (H₂O) ou une perte en ammoniac (NH₃), formant ainsi un nouvel ion. Un ion b subissant une perte d'H₂O forme un ion b^o, tandis que si il subit une perte de NH₃ il forme un ion b^{*}.

3. Discussion

Les champignons sont des producteurs prolifiques de métabolites secondaires. Les toxines, métabolites secondaires sont des dérivés de précurseurs issus du métabolisme primaire, tels que l'Acétyl CoA, les acides aminés, les phénols ou les composés terpéniques. Les toxines fongiques sont souvent supposées être des armes chimiques, soit pour la défense des champignons, soit pour l'attaque de l'hôte. Chez certains champignons entomopathogènes incluant *Metarhizium anisopliae*, il y a production de Destruxines pendant la pénétration des hyphes dans l'insecte. Ces métabolites secondaires jouent un rôle important lors de l'invasion de l'insecte par le pathogène, puisqu'ils accélèrent la mort de l'hôte et permettent au champignon de proliférer rapidement (Vey *et al.*, 1986 ; Ignoffo, 1988 ; Ravallec *et al.*, 1989).

Quelques métabolites fongiques sont retenus dans le mycélium fongique, alors que les autres tels que les destruxines sont excrétés dans le milieu de culture (Ignoffo 1988). Ces peptides ont été isolés à partir de filtrats de culture de *Beauveria*, *Nomurea* et *Metarhizium*.

Plusieurs milieux ont été décrits dans la littérature pour la production des destruxines (Chen *et al.*, 1999 ; Liu *et al.*, 2000), cependant le milieu maltose a été considéré comme sélectif pour la production des destruxines en particulier les destruxines A et B (Hsiao et Ko, 2001 ; Feng *et al.*, 2004). La croissance de *Metarhizium anisopliae* dans le milieu liquide s'accompagne par l'excrétion de métabolites secondaires. Cette excrétion débute lorsque la culture fongique entre en phase stationnaire.

La biosynthèse des destruxines est modulée par plusieurs facteurs, tels que les stades de développement des champignons, la source de carbone, la source d'azote et d'autres acides aminés (Loutelier *et al.*, 1996 ; Potterat *et al.*, 2000 ; Liu *et al.*, 2000).

Liu *et al.*, (2000) ont étudié l'effet de certaines sources de carbone et d'azote sur la production des DTXS, ils ont constaté que le maltose et la peptone ont un effet stimulateur sur la biosynthèse des DTXS chez l'espèce *Metarhizium anisopliae* en favorisant la production essentiellement des DTXS A et B. Ces résultats sont en concordance avec les résultats que nous avons obtenus (Benserradj *et al.*, 2014).

Les destruxines sont des depsipeptides cycliques se composant de cinq acides aminés basiques et d'un acide α hydroxy (contient un groupe R). L'addition d'un acide aminé est un facteur essentiel dans beaucoup d'études de biosynthèse (Chan J.C, 1972, Van derMeer, 1994). En effet plusieurs travaux ont prouvé que l'addition de l'acide aminé β alanine dans le milieu de fermentation favorise la production des DTXS A et DTXS B. Ces constatations sont en concordance avec plusieurs travaux indiquant que les acides aminés particulièrement β alanine et α alanine donnent une bonne production des destruxines DA et DB (Liu et Tzeng, 1999 ; Liu *et al.*, 2000 ; Hu *et al.*, 2006 , Benserradj *et al.*, 2014) .

Les souches de *Metarhizium anisopliae* secrètent dans le milieu de culture des substances actives particulièrement les destruxines qui sont généralement extraites par l'éthyle acétate ou du dichlorométhane. L'efficacité de ces solvant a été déjà rapportée (Chen *et al.*, 1999). Toutefois des solvants plus polaires par exemple l'acétonitrile et tetrachlorure de carbone (Samuels *et al.*, 1988 ; Richard et Samuels, 1998 ; Cheng-Ming *et al.*, 2005) sont requis pour l'extraction.

Dans le but d'identifier et de caractériser ce type de composés (DTXS), plusieurs techniques ont été utilisées comme la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie simple (LC/MS) et la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en mode tandem (LC /MS/MS) Pais *et al.*, 1981. Ayer et Pena-Rodriguez, 1987 ; Bains et Tewani, 1987 ; Samuels *et al.*, 1988, Gupta *et al.*, 1989a).

Au cours de notre étude, l'analyse des extraits a été réalisée dans un premier temps par HPLC afin de confirmer la présence des différentes destruxines. Les résultats issus de cette analyse montrent 12 pics détectés à partir de la souche M5 dont 4 pics ont été détectés également à partir de l'extrait de la souche M1, tandis qu'aucun pic n'a été détecté à partir des extraits des deux souches (M2 et M3). Nos résultats sont en accord avec ceux de Kaijiank et Roberts (1986) qui avaient également constaté l'absence de différentes destruxines dans les cultures de *M.anisopliae var majus*, selon les mêmes auteurs la plupart des isolats de *M.anisopliae var acridium* ne produisent pas les destruxines ou bien ils synthétisent que la DTX A et DTX B. En parallèle ces résultats confirment les résultats d'identification moléculaires des deux souches (M2 et M3) qui ont présenté une identité de 99% avec la souche *Metarhizium anisopliae var.majus* qui a été décrite dans la littérature comme non productrice des destruxines (Kaijiank et Roberts, 1986).

L'analyse chromatographique des différents composés détectés en se basant sur leur temps de rétention ne nous a pas permis de définir leur composition avec la méthode Hplc utilisée. Nous avons utilisé la technique LC/MS plus précise pour l'identification des destruxines. Les différents composés dont les spectres de masse étaient exploitables ont été caractérisés et identifiés par leur temps de rétention et leur spectre de masse.

L'analyse des 12 pics détectés donne des signaux à 612,4 ; 596,4 ; 626,4 ; 610,4 ; 630,4, 594,4 ; 624,4 ; 564,33 ; 578,4 ; 580,4 ; 594,4 et 608,4 pour les composés C1 ; C2 ; C3 ; C4 ; C5 ; C6 ; C7 ; C8 ; C9 ; C10 ; C11 et C12 respectivement pour l'ion $[M-H]^+$. selon la littérature ces ions $[M-H]^+$ détectés correspondent aux destruxines Ed, F, Ed1, C, E chlorohydrin, E, D, Desmethyl A(A2), A, B2, B et B1 respectivement (Pais *et al*, 1981 ; Potterat *et al*, 2000 ; Hsiao et Ko, 2001 ; Cheng Peng *et al.*, 2005). Nos résultats vont dans le même sens que ceux obtenus par Jegorov *et al.*, (1998) qui ont déduit que les différents types de destruxines furent éluées dans cet ordre C<E<A<B.

Les résultats de l'ionisation à pression atmosphérique (APCI) nous confirment les résultats obtenus par l'ionisation Electrospray (ESI). Parmi les destruxines détectées cinq destruxines ont été identifiées à partir de leur masse moléculaire (A, Ed, D, Ed1, EdCl), par ailleurs, nos résultats sont en corrélation avec ceux obtenus par Samuels *et al.*, (1988) pour l'identification des destruxines par APCI ou les destruxines ont été groupées en 2 paires isobariques (A2, desA ; C et D2), un groupe de trois (B,E, bursaphélocide A ; F, C2, desmethyl C) et un groupe de cinq (608 :B1, E2, homodestruxin B, bursaphelocide B, roseotoxin A).

L'efficacité de ces méthodes d'ionisation (ESI-APCI) fait qu'on n'observe pas ou peu de fragmentations, mais essentiellement les ions quasi moléculaires protonés. Pour observer les fragments il faut donc les provoquer dans une chambre de collision, c'est ce qui a conduit au développement des techniques MS/MS ou un ion sélectionné est alors soumis à collision avec des molécules neutres d'un gaz N2 provoquant sa fragmentation puis les fragments sont encore analysés. Des informations supplémentaires ont été obtenues après fragmentation MS/MS ou MS² en mode d'ionisation positif. L'ion moléculaire protoné $[M-H]^+$ a été sélectionné pour les spectres de fragmentations à une énergie de collision voisine de 40Ev. L'utilisation de l'ionisation ESI-QTOF-MS en tandem nous a permis de déterminer la masse moléculaire et compte tenu de la composition en acides aminés ainsi que la formule brute de ces cyclopeptides .

Les ions formés par fragmentation d'un cyclopeptide sont nommés selon la nomenclature introduite par Roepstorff et Fohlman, (1984) et modifiée par Biemann en 1988 (Biemann, 1990). Aussi sont définis les ions b_n et y_n issus de la rupture de la liaison amide selon que la charge est conservée sur le fragment N terminal (b_n) ou C terminal (y_n), de même la rupture de la liaison entre $C\alpha$ et CO conduit à la formation de la série d'ion a_n .

Les 12 molécules présentant des ions fragments de type b_n et a_n caractéristiques des différents types de destruxines (Samuels *et al.*, 1988, Jegorov *et al.*, 1998). De ces données nous pouvons déduire que les différentes destruxines ont les formules brutes suivantes ($C_{29}H_{49}N_5O_9$; $C_{29}H_{49}N_5O_8$; $C_{30}H_{50}N_5O_8$; $C_{30}H_{51}N_5O_8$; $C_{29}H_{48}N_5O_7$; $C_{29}H_{47}N_5O_8$; $C_{30}H_{49}N_5O_9$; $C_{28}H_{45}O_7N_5$; $C_{29}H_{47}N_5O_7$; $C_{29}H_{49}N_5O_7$; $C_{30}H_{51}N_5O_7$; $C_{31}H_{53}N_5O_7$). Ces mêmes résultats ont été constatés et prouvés par Jegorov *et al.*, (1998). Ces formules sont en accord avec la composition en acides aminés et correspondent à la présence de cinq acides aminés confirmant la nature cyclique de ces études.

D'après les résultats obtenus, nous pouvons conclure que les résultats de la production des destruxines par les souches isolées concordent avec ceux des bioessais contre les larves de *Culex pipiens* étudiés dans le 2ème chapitre. En effet, la souche M5 testée a été prouvée comme la plus virulente par rapport aux autres souches testées (M1, M2 et M3). Ceci peut se traduire par la production de 12 différents types de destruxines par la souche.

Conclusion générale et perspectives

Dans ce présent travail de thèse, qui entre dans le cadre de l'axe d'évaluation de l'activité larvicide du champignon entomopathogène contre les larves de moustiques, nous nous sommes intéressés aux aspects microbiologiques, taxonomiques, toxicologiques et spectroscopiques du champignon entomopathogène *Metarhizium anisopliae*, Trois parties ont été développées

* Les travaux de la première partie ont été orientés vers l'isolement de *Metarhizium anisopliae* à partir de différents sols agricoles. L'isolement a été réalisé par l'utilisation de milieux de culture sélectifs. D'après cette étude, il a été démontré que l'isolement sélectif de ce champignon à partir de différents sols agricoles Algériens est favorisé par l'emploi de substances antibactériennes et antifongiques. L'emploi du fongicide dodine à 50 µg/mL agit contre les champignons contaminants et ne favorise que le développement des champignons entomopathogènes. La streptomycine additionnée dans le milieu d'isolement à raison de 50 µg/mL est indiquée également. Quatre souches fongiques ont été isolées à partir du sol pour la première fois en Algérie. Les quatre souches ont fait l'objet d'identification selon les méthodes morphologiques et moléculaires, Pour ce faire, nous avons développé plusieurs études qui sont :

- Une étude morphologique utilisant trois milieux de culture solides (ODA, PDAY et SDAY). De point de vue microscopique, les 4 isolats sont caractérisés par un mycélium hyalin, cloisonné et ramifié, des conidiophores formés sur le mycélium sont ramifiés irrégulièrement vers le bas, les phialides ont une forme cylindrique ou sont légèrement gonflés sur le côté ou les spores sont formées. Les conidies formées en chaînes basipètes ont une forme cylindrique et sont arrondies aux deux extrémités, parfois un des côtés est légèrement rétréci. Les résultats obtenus ont montré que les quatre souches seraient apparentées au genre *Metarhizium*

- Des études phylogéniques se basant sur les analyses des séquences nucléotidiques des gènes ARNr18S et les régions ITS en utilisant des amorces universelles (ITS1 et ITS4). Après comparaison des séquences d'ADN avec la banque de données « Genbank », les quatre souches ont été assimilées à l'espèce *Metarhizium anisopliae* avec des pourcentages d'homologies de 99 à 100 %. Les quatre souches ont été enregistrées au niveau de Genbank sous les numéros d'accès LK995308, LK995309, LK995310 et LK995311.

*Dans la Deuxième partie des travaux de recherche de cette thèse, notre intérêt s'est porté vers les bio tests avec les quatre souches de *Metarhizium anisopliae* contre les larves de *Culex pipiens*,

L'étude de l'effet des souches (M1, M2, M3 et M5) a montré que le taux de mortalité des larves traitées augmente en fonction du temps et de la dose utilisée. La mortalité a commencé après le 1^{ier} jour de traitement avec les trois espèces de *Metarhizium anisopliae* (M1, M2 et M5) pour les cinq doses D1 (10^5 spores/ml), D2 (10^6 spores/ml), D3 (10^7 spores/ml), D4 (10^8 spores/ml) et D5 (10^9 spores/ml). Comparativement aux témoins (D0) aucune mortalité n'a été observée durant les biotests. En effet les pourcentages respectifs obtenus à partir du 1^{ier} jour sont de 52%, 20%, 12% et 96% pour les larves traitées par M1, M2, M3 et M5 respectivement. En augmentant la dose la mortalité devient plus rapide, elle atteint 100% le 5^{ème} jour après traitement par M1, le 6^{ème} jour et le 8^{ème} jour après traitement avec M2 et M3. Par contre, les larves traitées par M5, leur mortalité était très rapide et intense, car nous avons enregistré 100% de mortalité le 2^{ème} jour de traitement.

L'analyse de la variance à deux critères de classification (Doses et Temps) a confirmé nos résultats, nous avons constaté qu'il ya un effet très hautement significatif des deux facteurs sur la mortalité des larves traitées avec les quatre espèces de *Metarhizium anisopliae*. Nous avons également pu calculer la DL_{50} et les TL_{50} . La DL_{50} a été estimée à $3,9 \cdot 10^8$ spores/ml, $2,4 \cdot 10^8$ spores/ml, $2,3 \cdot 10^7$ spores/ml et $8,9 \cdot 10^3$ spores/ml pour tuer 50% de larves traitées avec les champignons *Metarhizium anisopliae* M1, M2, M3 et M5 respectivement.

Les résultats de la TL_{50} des larves traitées avec les quatre espèces de *Metarhizium anisopliae* montrent que la sensibilité des larves est en fonction de la concentration de l'inoculum.

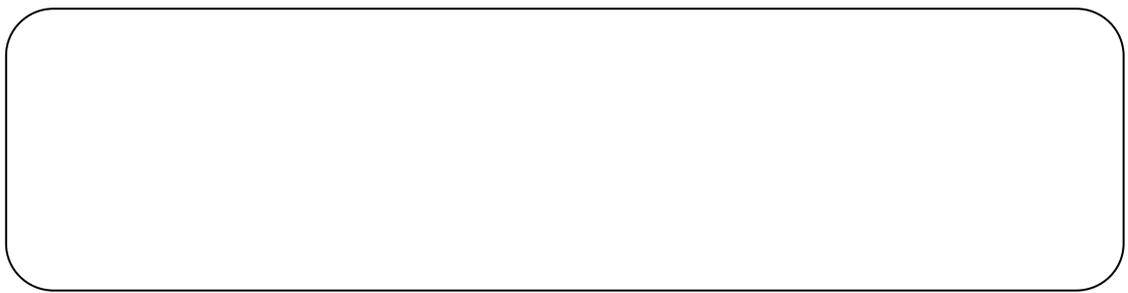
*Concernant les travaux de recherche relatifs à la troisième partie de la thèse, les études réalisées ainsi que les résultats obtenus peuvent être résumés comme suit :

- Production des toxines (Destruxines) à partir des quatre souches de *Metarhizium anisopliae* par fermentation submergée en utilisant le milieu Maltose de fermentation le plus préconisé dans la littérature pour la biosynthèse des destruxines.

- Après une double extraction du surnageant par le dichlorométhane , les extraits secs actifs obtenu ont été soumis en Chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC). Douze molécules ont été obtenues à partir de l'espèce *Metarhizium anisopliae* (M5) et quatre molécules (9, 10, 11 et 12) ont été obtenues à partir de l'espèce *Metarhizium anisopliae* (M1) ; tandis que aucune molécule n'a été détectée à partir des espèces *Metarhizium anisopliae* (M2 et M3).
- Les structures chimiques correspondantes ont été caractérisées par le biais des techniques spectroscopiques (la spectrométrie de masse simple « SM » et la spectrométrie de masse en tandem « SM/SM »). Il s'agit des destruxines ((1)Ed, (2)F, (3)Ed1,(4) C, (5)EC1,(6) E, (7)D, (8)A2, (9)A,(10)B2, (11)B et (12) B1 .

En résumé, les résultats de cette modeste recherche nous ont permis de confirmer et de préciser l'importance du potentiel toxémique de *Metarhizium anisopliae* à l'égard des larves de moustiques. Les études en cours sur les toxines de cet agent , notamment en ce qui concerne l'approfondissement de leurs mécanismes d'action au niveau cellulaire et biochimique, devraient aider à la compréhension du mécanisme d'agression particulier que manifeste *M. anisopliae* chez les larves de moustiques et sur un plan appliqué, fournir des données utilisables pour la mise au point de formulations appropriées de propagules de ce champignon pathogène, permettant à la fois le maintien de son potentiel d'infection et l'expression optimale de son effet toxémiques, ou de ses métabolites à propriétés insecticides.

Enfin pour conclure, ce travail a fait l'objet de deux publications dans des revues de renommées dotées d'un IF ainsi que de plusieurs communications dans des congrès nationaux et internationaux.



- 1- Abbott W.S. (1925). A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.* **18**: 265-266.
- 2- Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W et Lipman D.J. (1997). "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**: 3389-3402.
- 3- Alves R.T., Batman R.P., Prior C et Leather S.R. (1998). Effects of simulated solar radiation on conidial germination of *Metarhizium anisopliae* in different formulations. *Crop Prot.* **17**: 675-679.
- 4- Alves S.B., Alves L.F.A., Lopes R.B., Pereira R.M et Vieira S.A. (2002). Potential of some *Metarhizium anisopliae* isolates for control of *Culex quinquefasciatus* (Dipt. Culicidae). *J. Appl. Entomol.* **126**: 504–509.
- 5- Amora S.S.A., Bevilaquaa C.M.L., Feij F.M.C., Pereira R.H.M.A., Alves N.D., Freire F.A.M., Kamimura M.T.K., De Oliveira D.M., Lima E.A.L.A et Rocha. M.F.G. (2010). The effects of the fungus *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* on different stages of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *Acta Tropica.* **113** :214–220.
- 6- Andersen B et Thrane U. (1996). Secondary metabolites produced by *Alternaria infectoria* and their use as chemotaxonomic markers. *Mycotoxin Res.* **12** : 54–60.
- 7- Anderson J.F et Crabreadis V. (2001). Mosquito surveillance for West Nile virus in Connecticut, 2000: isolation from *Culex pipiens*, *Culex restuans*, *Culex salinarius* and *Culiseta melanura*. *Emerg Infect Dis.* **7**: 670-674
- 8- Andreadis T.G., Anderson J.F et Vossbrinck C.R. (2001). Mosquito surveillance for West Nile virus in Connecticut, 2000: Isolation from *Culex pipiens*, *Cx. restuans*, *Cx. salinarius*, and *Culiseta melanura*. *Emerg. Infect. Dis.* **7**: 670-674.
- 9- Andersen S.O. (1979). Biochemistry of insect cuticle. *Annual Review Entomol.* **24** :2961.
- 10- Andreo V. (2003). L'effet anti-égorgement sur un chien d'un shampoing a 0,07% de Deltamethrine sur un moustique du Complexe *Culex pipiens* ; These de Medecine Veterinaire, Toulouse. 70 p.

- 12- Anonyme a. (2000). Lignes directrices applicables à l'évaluation et l'élimination de la contamination fongique en milieu intérieur. NewYork City Departement of Health (NYC) service d'hygiène de la ville NewYork.
- 13- Anonyme b. (2004). Clearing the air : Asthma and indoor air exposure. Comite on the assessment of Asthma and indoor air. Division of health and disease. Institute of Medecine (IOM). National Academy Press – Washington.
- 14- Ayer W.A. et Pena-Rodriguez M. (1987). Metabolites Produced by *Alternaria brassicae*. the Black Spot Pathogen of Canola, Part I, the Phytotoxic Components. *J. Natural Prod.* **50**: 400-408.
- 15- Bains P.S. et Tewari J.P. (1987.) Purification, chemical characterization and host-specificity of the toxin produced by *Alternaria brassicae*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **30** :259–271.
- 16- Barbouche N., Hajjem B., Lognay G et Ammar M . (2001). Contribution à leude de l'activité biologique d'extraits de feuilles de *Cestrum parqui* L'Hérit. (*Solanaceae*) sur le criquet pèlerin *Schistocerca gregaria* (Forsk.). *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **5** (2): 85–90.
- 17- Bateman R.P., Price R.E., Muller E.J et Brown H.D. (1994). Controlling brown locust hopper bands in South Africa with a mycoinsecticide spray. In: Proc Brighton Crop Protection Conf, Pests and Diseases. *Brit .Crop. Protect.Council*, Farnham. **2** :609–616.
- 18- Becker N. (1998). The use of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (BTI) against mosquitoes, with special emphasis of the ecological impact. *Israel. J. Entomol.* 63-69.
- 19- Beilharz V.C., Parbery D.G et Swart H.J. (1982). Dodine: A selective agent for certain fungi. *T. Br. Mycol. Soc.* **79** (3): 507-511.
- 20- Belloncik S., Aubin A., Maire A., Boisvert J., Gagnon R ., Thng C., Trudel C. et Arts O.B H. (1983). Arbovirus studies in the Trois-Rivières, province of Québec.
- 21- Belloncik S., Poulin L., Maire A., Aubin A., Fauvel M et Jousset F.X. (1982) . Activity of California enphalitis group viruses in Entrelacs (province of Ouebec, Canada) . *Can J. Miorobiol.* **28** : 572-579 .

- 22- Benserradj O et Mihoubi I. (2014). Larvicidal activity of entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* against mosquito larvae in Algeria. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci.* **3** (1): 54-62.
- 23- Benserradj O., Albrieux F et Mihoubi I. (2014). Production and identification of Destruxins in crude extract of the fungus *Metarhizium anisopliae* by liquid chromatography-electrospray time-of-flight mass spectrometry. *Int. J.Pharm.Sci.Rev.Res.* **27** (1) :172-177.
- 24- Berchi S. (2000) . Bioécologie de *Culex pipiens* L. (Diptera : Culicidae) dans la région de Constantine et perspectives de lutttes. Thèse doc. Es – science, Université de Constantine, Algérie : 133p.
- 25- Bidochka M.J et Small C. (2005). Phylogeography of *Metarhizium*, an insect pathogenic fungus. In: F.E. Vega & M. Blackwell (Eds.) *Insect-Fungal Associations*. 28-49. Oxford University Press Inc., New York.
- 26- Bischoff J.F., Rehner S.A et Humber R.A. (2006). *Metarhizium frigidum* sp. nov.: a cryptic species of *M. anisopliae* and a member of the *M. flavoviride* complex. *Mycologia* . **98** :737-745.
- 27- Bischoff J.F., Rehner S.A et Humber R.A. (2009). A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage , *Mycologia*, **101** : 512-530.
- 28- Blout W. (1961) .Turkey “X” disease. *Turkeys* **9** (52): 55-58, 61, 77.
- 29- Botton B., Bretton A., Fever M., Gautier S., Guy Ph., Larpent J.P., Reymond P., Sanglier J-J., Vayssier Y et Veau P. (1990). *Moisissures utiles et nuisibles, importance industrielle*, (edn) Masson, Paris.
- 30- Boucias D.G., Pendland J.C et Latge J.P. (1988). Nonspecific factors involved in attachment of entomopathogenic Deuteromycetes to host insect cuticle. *Appl. Environ..Microbiol.* **54** :1795-1805.
- 31- Boucias D.G et Pendland J.C.(1991). Attachment of mycopathogens to cuticle. In: *The Fungal Spore and Disease Initiation in Plants and Animals*. (Cole GT, Hoch HC (Editors). Plenum Press, New York.

- 32- Boucias DG, Pendland JC. 1998. Principles of insect pathology. Boston, MA: Kluwer Academic Publishers.568 p.
- 33- Bouchoux G et Sablier M. (2005). *Spectrométrie de masse - Principes et appareillages*. In Techniques de l'ingénieur. Paris: Editions T.I.
- 34- Boyer S. (2006). Résistance Métabolique des larves de Moustiques aux insecticides : Conséquences Environnementales. Thèse pour l'obtention du titre de docteur de l'université Joseph Fourier-Grenoble I.78p
- 35- Bradfish G. A. et Harmer S. L. (1990). Omega-Conotoxin GVIA and nifedipine inhibit the depolarizing action of the fungal metabolite, destruxin B on muscle from the tobacco budworm (*Heliothis virescens*). *Toxicon*. **28** (11): 1249-1254.
- 36- Braga G., Flint S., Miller C., Anderson A. et Roberts D. (2001). Variability in response to UV-B among species and strains of *Metarhizium* isolated from sites at latitudes from 61°N to 54°S. *J Invertebr Pathol* .**78** :98-108
- 37- Bridge P.D.,William M.A.J., Prior C et Paterson R.R.M.(1993). Morphological, biochemical and molecular characteristics of *Metarhizium anisopliae* and *Metarhizium flavoviride*. *J Gen Microb*.**139** :1163-1169
- 38- Brown A.W.A ., Haworth J et Zahar A.R. (1976). Malaria eradication and control from a global stand point. *J. Med. Ent*. **13** :1-25.
- 39- Brunhes J., Rhaim A., Geoffroy B., Angel G et Hervy J.P. (1999).Les moustiques de l'Afrique méditerranéen. Logiciel d'identification et d'enseignement. IRD édition
- 40- Bruns T. D. (2001). ITS Reality. *Inoculum*. **52**: 2-3.
- 41- Buchwaldt L et Jensen J.S. (1991). HPLC purification of destruxins produced by *Alternaria brassicae* in culture and leaves of *Brassica napus*. *Phytochem* **30**:2311–2316.
- 42- Burges D.H.(1998). Formulation of mycoinsecticides. In: Formulation of microbial biopesticides: beneficial microorganisms, nematodes and seed treatments. Ed. by Burges HD, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 31-185.
- 43- Bussieras J et Chermette R. (1991). *Parasitologie Veterinaire, Entomologie, Service de Parasitologie*, ENVA,.58-61.
- 44- Butt TM. (1990). Fungal infection processes.A Mini-Review 5th Int.Colloquium of Invertebrate Pathology.Adelaide. *Soc,Inverbr.Pathol*. 121-124.

- 45- Butt T.M et Becket A. (1994) . Pathogenicity of entomogenous fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* against crucifer pests and the honey bee. *Biocontr.Sci.Techn.* **4** :207-214.
- 46- Butt T.M., Ibrahim L., Ball B.V et Clark S.J. (1994). Pathogenicity of the entomogenous fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* against crucifer pests and the honey bee. *Biocontr.; Sci. Technol.* **4** :207-214
- 47-Cachereul A. (1997). Les moustiques : cycle de développement, aspects anatomophysiologiques et régulation du cycle ovarien, Thèse de Médecine Vétérinaire, Nantes. 117p.
- 48- Cai P., Smith D., Katz B., Pearce C., Venables D et Houck D. (1998). Destruxin-A4 chlorohydrin, a novel destruxin from fungus OSF68576: isolation, structure determination, and biological activity as an inducer of erythropoietin. *J.Nat.Prod.* **61** :290–293.
- 49- Campos R.A., Arruda W., Boldo J.T., da Silva M.V., de Barros N.M., de Azevedo J.L., Schrank A et Vainstein M.H.(2005) .Boophilus microplus infection by *Beauveria amorpha* and *Beauveria bassiana* :SEM analysis and regulation of subtilisin-like protease and chitinases .*Cur .Genet.***50**:257-261.
- 50- Candance A., Sousa Richard E.W et Halliwell. (2001). The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XI): the relationship between arthropod hypersensitivity and atopic dermatitis in the dog, *Veterinary Immunology and Immunopathology*.
- 51- Cavalier M. (1976). *Cours de phytopharmacie*. Ed. Institut National Agronomique, T.1, El- Harrach, 514 p.
- 52- Chan J. C. (1972). The influence of synthetic amino acid and casein hydrolysate on the endogenous production and urinary excretion of acid in total intravenous alimentation. *Pediatr. Res.* **6**: 789-796.
- 53- Charnley A.K. (1989) .Mechanisms of fungal pathogenesis in insects. In :Biotechnology of fungi for improving plant growth. Whipps JM, Lumsden RD (eds), Cambridge Univ .Press ,UK .p.85-123
- 54- Charnley A.K et St Leger. (1991).The role of cuticle degrading enzymes in fungal pathogenesis of insects.In :The fungal spore and disease initiation in plants an animals. Plenum Publishing Co.,New York, p 267-286.

- 55- Chase A.R., Osborne L.S et Ferguson V.M. (1986). Selective isolation of the entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* from an artificial potting medium. *Fla. Entomol.* **69** (2): 285-292.
- 56- Chauvet G., Ravaonjanahary C. et Brunhes J. (1971). Sensibilité et résistance à divers insecticides organophosphorés chez *Culex pipiens fatigans* Wied. En milieu urbain à Madagascar. *C.R. Soc. Biol.* **165** (2) : 444-484.
- 57- Chauvet G.(1978). Lutte biologique contre les vecteurs d'affections humaines et tropicales. Moyens actuels et perspectives. *Méd.Trop.* **6** : 651- 657.
- 58- Che Y., Swenson D.C., Gloer J.B., Koster B., Malloch D. (2001). Pseudodestruxins A and B: new cyclic depsipeptides from the Coprophilous fungus *Nigrosabulum globosum*. *J Nat Prod.***64**:555–558.
- 59- Chen H. C., Yeh S. F., Ong, G.-T., Wu S.-H., Sun C.M., et Chou C.K. (1995). The novel desmethyldestruxin B2, from *Metarhizium anisopliae*, that suppresses hepatitis B virus surface antigen production in human hepatoma cells. *J. Natural Products* .**58** :527–531.
- 60- Chen H.C., Chou C.K., Sun C.M. et Yeh S.F. (1997). Suppressive effects of destruxin B on hepatitis B virus surface antigen gene expression in human hepatoma cells. *Antiviral Res.* **34** (3): 137–144.
- 61- Chen J.W., Liu B.L et Tzeng Y.M. (1999).Purification and quantification of destruxins A and B from *Metarhizium anisopliae*. *J Chromatogr A* . **830**:115–125.
- 62- Chen Y.C., Eisner J.D., Kattar M.M., Rassouljian-Barrett S. L., Lafa K , Bui U , Limaye A.P et Cookson B.T. (2001). Polymorphic internal transcribed spacer region 1 DNA sequences identify medically important yeasts. *J. Clin. Microbiol.* **39** : 4042-4051.
- 63- Cheng-Ming L., Shyuan-Shuenn H et Yew-Min T. (2005). Purification and Quantitative Analysis of Destruxins from *Meterhizium anisopliae* by HPLC . *J. Liquid. Chromatogr.Relat. Technol.* **27**(6):1013-1025
- 64- Cheng Peng K., Huang H.S., Tzeng Y.M et Liu S.Y. (2005). Circular dichroism analysis of destruxins from *Metarhizium anisopliae* . *J. Biochem. Biophys. Methods* .**62** :41–50.

- 65- Cherton J.C., Lange C., Mulheim C., Pais M., Cassier P et Vey A. (1991). Direct in vitro and in vivo monitoring of destruxins metabolism in insects using internal surface reversed-phase high performance liquid chromatography; I. Behaviour of E destruxin in locusts. *J. Chromatogr. B* . **566** :511–524.
- 66- Chevillon C. (1994). Evolution de mécanismes adaptatifs : flux géniques, sélection et contre sélection. Thèse de doctorat, Université de Montpellier, 140 p .
- 67- Clark T.B., Kellen W.R. , Fukuda R et Lindegren, J. E. (1968). Field and laboratory studies on the pathogenicity of the fungus *Beauveria bassiana* to three genera of mosquito. *J. Invertebr. Pathol.* **11**: 1-8.
- 68- Clark H.E, Geldriche E.F.B, Kabler P.W et Huff C.B.(1985). Identification of Industrial microorganismes. *Appl. Microbiol. Process Biochem.* **30** :723-727.
- 69- Clarkson J.M et Charnley A.K. (1996) .New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects, *Trends Microbiol.* **4** :197-204.
- 70- Clements A.N. (1992). *Biology Of Mosquitoes : Development, Nutrition And Reproduction* Chapman & Hall, London
- 71- Cloutier C et Cloutier C. (1992). Les solutions biologiques de lutte pour la répression des insectes et acariens ravageurs des cultures. Dans: *La lutte biologique*, Tech & Doc Lavoisier (Vincent, c., Coderre, D.) 671p.
- 72- Coosmans M., Barutwanayo M et Delacolette C.H. (1992). Lutte anti-paludique intégrée dans une région rizicole au Burundi. *Mém. Soc. belge. Ent.* **35** :97-101.
- 73- Curran J., Driver F., Ballard J.W.O et Milner R.J. (1994). Phylogeny of *Metarhizium*: sequence analysis of the internally transcribed and 5.8s region of the ribosomal DNA repeat. *Mycol. Res.* **98** (5): 547-552.
- 74- Dagnelie B. (1975). *Théorie et méthodes de statistiques : applications agronomiques*. Ed. Presse agronomique de Gembloux, Vol. II, Gembloux, 459 p
- 75- Daoust R.A., Ward M.G et Roberts D.W. (1982). Effect of formulation on the virulence of *Metarhizium anisopliae* conidia against mosquito larvae, *J. Invertebr. Pathol.* **40** :228–236.
- 76- Doberski J.W. et Tribe H.T. (1980). Isolation of entomogenous fungi from elm bark and soil with reference to ecology of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *Trans. Brit Mycol Soci.* **74** :95–100.

- 77- Donald W et Roberts .(1969). Toxins from the Entomogenous Fungus *Metarhizium anisopliae*: Isolation of Destruxins from Submerged Cultures. *J.Invertebr.Pathol.* **14** :82-88
- 78- Dong C., Zhang J., Chen W., Huang H et Hu Y. (2007). Characterization of a newly discovered China variety of *Metarhizium anisopliae* (*M. anisopliae* var. *dcjhyium*) for virulence to termites, isoenzyme and phylogenetic analysis. *Microbiol.Res.* **162** :53–61.
- 79- Driver F., Milner R.J et Trueman J.W.H. (2000). A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. *Mycol Res* .**104** :134– 150
- 80- Duchauffour P. (1976). Atlas écologique des sols do monde. Ed. Masson, Paris, 178p
- 81- Edelstein J.D., Lecuona R.E et Trumper E.V. (2004). Selection of culture media and *In Vitro* assessment of temperature-dependent development of *Nomuraea rileyi*. *Biol.Contr.***33**: 773-742.
- 82- Ekesi S., Maniania N.K. et Ampong-nyarko K. (1999). Effect of temperature on germination, radial growth and virulence of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* on *Megalurothrips sjostedti*. *Bioconrt Scie and Technol* **9** :177-185
- 83- Engstrom G.W., DeLance J.V., Richard J.L et Baetz, A.L. (1975). Purification and characterization of roseotoxin B, a toxic cyclodepsipeptide from *Trichothecium roseum*. *J. Agric. Food Chem.* **23** :244–253.
- 84- Enserink M. (2006). Infectious diseases. Massive outbreak draws fresh attention to little-known virus.*Science* **311**: 108.
- 85- Entz S.C., Johnson D.L et Kawchuk L.M. (2005). Development of a PCR-based diagnostic assay for the specific detection of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. *Mycol Res* .**109** :1302–1312
- 86- Euzbey J. (2008). Grand dictionnaire illustre de parasitologie médicale et vétérinaire. Paris : Editions Tec&Doc. 818 p.
- 87- Failloux A.B. et Rodhain F. (1999). Apport des études de génétique des populations de moustiques (Diptera: culicidae) en entomologie médicale. Exemples choisis en Polynésie française. *Anna. Soci ; Entomol .France* .**35** (1): 1-16.

- 88- Farajollah A., Crans Wj., Bryant P., Burkhalter K.I et Godsey Ms. (2005). Detection of West Nile viral RNA from an overwintering pool of *Culex pipiens* (Diptera : Culicidae) in New jersey. *J Med Entomol.* **42** : 490-494.
- 89- Fargues J et Robert P.H. (1986). Potentialités insecticides des destruxines ,mycotoxines produites par l'hyphomycète entomopathogène, *Metarhizium anisopliae* (Metsch), Congrès sur la protection de la santé humaine et des cultures en milieu tropical , Marseille, 357-362
- 90- Fargues J et Luz C. (2000). Effects of fluctuating moisture and temperature regimes on sporulation of *Beauveria bassiana* on cadavers of *Rhodnius prolixus*. *Biocontrol. Sci.Technol.* **8**: 323-334.
- 91- Fargues J et Bourguet D. (2005). La lutte microbiologique contre les insectes ravageurs des cultures: contraintes, bilan et perspectives. *Enjeux phytosanitaires pour l'agriculture et l'environnement*. E. T. DOC. Paris-Londres-New-York, Lavoisier: 1013.
- 92- Faria M et Wraight S.P.(2001). Biological control of *Bemisia tabaci* with fungi. *Crop Protect.* **20** :767-778.
- 93- Felsenstein J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution.* **39** :783-791
- 94- Feng K.C., Rou T.M., Liu B.L., Tzeng Y.M et Chang Y.N.(2004). Effect of fungal pellet size on the high yield production of destruxin B by *Metarhizium anisopliae*. *Enzy. Microb. Technol.* **34**(1): 22-25
- 95- Fenn J.B., Mann M., Meng C.K., Wong S.F et Whitehouse C.M.(1989). Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science.* **246**: 64-71.
- 96- Fernandes E.K.K., Keyser C.A., Rangel D.E.N., Foster R.N et Roberts D.W. (2010). CTC medium: A novel dodine-free selective medium for isolating entomopathogenic fungi, especially *Metarhizium acridum*, from soil. *Biol. Control.* **54** (6): 197-200.
- 97- Ferron P. (1975) . Les champignons entomopathogènes : évolution des recherches au cours des dix dernières années. *Bull . SROP/WPRS.* 54 p
- 98- Ferron P. (1977). Influence of relative humidity on the development of fungal infection caused by *Beauveria bassiana* (Fungi Imperfecti Moniliales) in imagos of *Acanthoscelides obtectus* (Col.: Bruchidae). *Entomophaga .* **22** :393-396.

- 99- Ferron P.(1978). Biological control of insect pests by entomopathogenic fungi. *Ann Rev Entomol.* **23** :409-442.
- 100- Ferron P., Fargues J et Riba G. (1991). Fungi as microbial insecticides against pests. In: Arora D.K., Ajello L., Mukerji K.G (eds) *Handbook of Applied Mycology. Volume 2: Humans, Animals, and Insects.***18**: 665–706. Marcel Dekker, Inc, New York.
- 101- Ferron P., Fargues J et Riba G. (1993). Les champignons agents de lutte microbiologique contre les ravageurs D5, 65-92. (*Handbook of applied mycology, vol. 2, Humans, Animals and Insects*, 1991).
- 102- Freddy C. (2011). Des spectres MS/MS à l'identification des protéines - Interprétation des données issues de l'analyse d'un mélange de protéines d'un organisme non séquencé Thèse de Doctorat de l'Université de Nantes.
- 103-Frisvad J.C., Bridge P.D et Arora D.K. (1998). Chemical Fungal Taxonomy. Marcel Dekker Inc. New York, 398p .
- 104- Fugita T. (2002) . Evolution of lectin-complement pathway and its role in innate immunity. *Nature Rev. Immunol.* **2** :346-353
- 105- Georghiou G.P., Ariaratnam V., Pasternak M.E et Lin C.S. (1975). Organophosphorus multiresistance in *Culex quinquefasciatus* in California. *J. Econ. Entomol.* **68** : 461–467.
- 106- Georghiou G.P et Lagunes-Tejada A. (1991). The occurrence of resistance to pesticides in arthropods. An index of cases reported through 1989. FAO, Rome.
- 107- Geiser D.M. (2004). Practical molecular taxonomy of fungi. In "*Advances in Fungal Biotechnology for Industry, Medicine and Agriculture*". Lange L, Tkacz J, eds. New York. Kluwer Academic Publishers.1-12
- 108- Gillespie J.P., Bailey A.M., Cobb B et Vilcinskis A .(2000). Fungi as elicitors of insect immune responses. *Arch Insect Biochem Physiol.* **44** :49–68
- 109- Goettel M.S., St Leger R.J., Rizzo N.W., Staples R.C et Roberts D.W. (1989). Ultrastructural localization of a cuticle-degrading protease produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* during penetration of host (*Manduca sexta*) cuticle. *J. General. Microbiol.* **135** :2233-2239.

- 110- Goettel M.S. (1992). Des champignons comme agents de lutte biologique. In La lutte biologique contre les acridiens, sous la direction de C.J. Lomer et C. Prior p.122-131. Ibadan, Nigeria: CAB International/IITA.
- 111- Goettel M.S et Inglis G.D. (1997). Fungi: hyphomycetes. In: Lacey LA (ed.) *Manu Tech. Insect. Pathol.* **5** (3):213–248. Academic Press, San Diego.
- 112- Goettel M.S., Inglis G.D et Wraight S.O.(2000). Fungi. In: Field manual of techniques in invertebrate pathology. Lacey LA, Kaya HK (eds), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 255-282
- 113- Groden E et Lockwood J L. (1991). Effects of soil fungistasis on *Beauveria bassiana* and its relationship to disease incidence in the Colorado potato beetle. *Leptinotarsa decemlineata*, in Michigan and Rhode Island soils. *J. Invertebr. Pathol.* **57** :7-76.
- 114- Grula E.A., Woods S.P et Russel H .(1984). Studies utilizing *Beauveria bassiana* as an entomopathogen. In: Infection processes of fungi. Conference Report. Robert DW, Aist JR (eds). Rockefeller Foundation, New York. 147-152
- 115- Guarro J., Gené J et Stchigel A.M. (1999). Developments in fungal taxonomy. *Clinic and Microbiol Rev.* **12** (3): 454–500.
- 116- Guiraud J.P. (1998). *Microbiologie alimentaire*. Dunod, Paris. p : 310-321
- 117- Gupta S., Roberts D.W et Renwick J.A.A. (1989a). Insecticidal cyclodepsipeptides from *Metarhizium anisopliae*. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1** :2347-2357.
- 118- Gupta S., Roberts D.W et Renwick, J.A.A.(1989b). Preparative isolation of destruxins from *Metarhizium anisopliae* by high performance liquid chromatography. *J. Liq. Chromatogr.* **12** :383-395.
- 119- Hajek A.E et St Leger.(1994). Interaction between fungal pathogens and insect host. *Ann.Rev.Entomol.* **39** :293-322.
- 120- Hallsworth J.F et Magan N. (1996). Culture age, temperature and pH affect the polyol and trehalose contents of fungal propagules. *Appl Environ. Microbiol.* **62** :2435-2442.
- 121- Hallsworth J.F et Magan K.E. (1999). Hallsworth and N. Magan, Water and temperature relations of growth of three entomogenous fungi *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces farinosus*, *J. Invertebr. Pathol.* 261-266.

- 122- Hammadi D., Boubidi S.C., Chaib S.E., Saber A., Khechache Y., Gasmi M. et Harrat Z. (2009). Le paludisme au Sahara algérien. *Bull Soc Pathol Exot.* **102** (3): 185-192
- 123- Hamon J., Mouchet J., Coz J., Challier A., Subra R. et Adam J.P. (1972) . Résistance aux insecticides et contrôle des vecteurs de maladies en Afrique Occidentale et Centrale. *Doc.Tech. OCCGE.* **5** : 217.
- 124- Harrack M.E., Guenno B. et Guenno P. (1997). Isolement du virus West Nile au Maroc. *Virol.* **1**:248-249.
- 125- Hastuti B.S., Glare T.R. et Chapman, R. B. (1999). Effect of temperature and humidity on the susceptibility of *Parosis cltarybdis* to *Beauveria bassiana*. Proc. 52nd N.Z. Plant Protection Conf.103-107.
- 126- Hawksworth D.L., Kirk P.M., Sutton B.C. et Pegler D.N. (1994). Ainsworth and Bysby's dictionary of the fungi , 8 th ed . *International Mycological Institute*, Egham.
- 127- Hazrat B., Soaib A.H et Imtinan A.K. (2012).Isolation and efficacy of entomopathogenic fungus (*Metarhizium anisopliae*) for the control of *Aedes albopictus* Skuse larvae: suspected dengue vector in Pakistan. *Asian Pacific.J.Trop. Biomed.* 298-300.
- 128- Hegedus D.D., Bidochka M.J et Khachatourians G.G. (1990). *Beauveria bassiana* Submerged Conidia Production in a Defined Medium Containing Chitin, Two Hexosamines or Glucose', *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **33** :641647.
- 129- Henson J et French R. (1993). The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis. *Annu. Rev. Phytopathol.* **31** :81-109.
- 130- Hoffmann J.A et Reichhart J.M.(2002). Drosophila innate immunity: An evolutionary perspective. *Nature Immunol.* **3**:121-126.
- 131- Hsiao Y.M et Ko J.L. (2001). Determination of destruxins, cyclic peptide toxins, produced by different strains of *Metarhizium anisopliae* and their mutants induced by ethyl methane sulfonate and ultraviolet using HPLC method. *Toxicon* **39**:837–841
- 132- Hsieh D.P. H. (1992). An overview of mycotoxin risks. Presentation at the symposium on naturally occurring substances in traditional and biotechnology-derived foods: Their potential toxic and anti-toxic effects. March, 1992, Irvine, California.
- 133- Hubàlek Z et Halouzka J. (1999). West Nile Fever - a Reemerging Mosquito-Borne Viral Disease in Europe.*Emerging Infectious Diseases.* **5** (5): 643-650.

- 134- Hu Q.B., Ren S.X., Wu J.H., Chang J.M et Musa P.D.(2006). Investigation of destruxin A and B from 80 *Metarhizium* strains in China, and the optimization of cultural conditions for the strain MaQ10. *Toxicon* .**48** : 491– 498.
- 135- Ibrahim L., Butt T.M., Beckett A et Clark S.J. (1999). The germination of oil-formulated conidia of the insect pathogen *Metarhizium anisopliae*. *Mycol. Res.* **103**:901-907.
- 136- Ignoffo C.M . (1988).CRC handbook of natural pesticides. Volume V. Microbial insecticides. Part A. Entomogenous protozoa and fungi . Editeur Ignoffo, C.M. CRC Press, Inc . , Florida. 272 p.
- 137- Ihara F., Yaginuma K., Kobayashi N., Mishiro K et Sato T. (2001). Screening of entomopathogenic fungi against the brown-winged green bug, *Plautia stali* Scott (Hemiptera: Pentatomidae). *Appl.Entomol.Zool.* **36** (4): 495-500.
- 138- Ikarari L et Mitchell D. A.(1994). Protease production by *Rhizopus oligosporus* in solid state fermentation. *Appl. Microbio. Biotechnol.* **10** :320 – 324.
- 139- Inglis G.D., Goettel M.S, Butt T.M et Strasser H. (2001). Use of hyphomycetous fungi for managing insect pests. In: Butt TM, Jackson CW, Magan N (eds) Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential. CABI Publishing, Wallingford, UK, 23–55.
- 140- Jegorov A., Matha V et Hradec H. (1992). Detoxification of destruxins in *Galleria Mellonella* L larvae. *Comp. Biochem. Physiol.* **103C** :227-229.
- 141- Jegorov A., Havlicek V et Sedmera P. (1998). Rapid screening of destruxins by liquid chromatography/ mass spectrometry. *J Mass Spectrom* .**33** :274–80.
- 142- Jenkins N.E., Heviefó G., Langewald J., Cherry A.J et Lomer C.J. (1998). Development of mass production technology for aerial conidia for use as mycopesticides. *Biocontrol News Information.* **19** :21–31
- 143- Kaijiang L et Roberts D.W. (1986). The production of destruxins by the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae* var *major*. *J. Invertebr. Pathol.* **47** :120–122.
- 144- Kamp A.M et Bidockka M.J. (2002) .Conidium production by insect pathogenic fungi on commercially available agars. *Lett. App. Microbiol.* **35** :74-77.
- 145- Kebarle P. (2000). A brief overview of the present status of the mechanisms involved in electrospray mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **35**: 804-817.

- 146- Keller S et Zimmermann G.J.(1989). Mycopathogens of soil insects. [n Wilding, N., N. Collins, N. M.Hammond, P. M. Webber, and I. F. Webber (eds.), *Insect-Fungus Interactions*. Academic Press, London, p. 240-269.
- 147- Kettle D.S. (1995). *Medical and Veterinary Entomology*, 2° edition, Wallingford: CAB international. 725 p.
- 148- Khachatourians G.G.(1991). Physiology and genetic of entomopathogenic fungi. In : *Handbook of applied mycology*. Mukeji DK, Drouhet E (eds). Marcel Dekker Inc., New York, USA. 613-663.
- 149- Kimura M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Molecul. Evol.* **16**:111-120
- 150- Kirk P.M., Cannon P.F., David J.C., Egham U.K. et Stophes J.A. (2001). *Ainsworth and Bysby's Dictionnary of fungi* , 9 th edn .CABI. Bioscience.UK. Center and central Bureau Voie. Utrecht. The Net.
- 151- Kodaria Y.(1961). Biochemical studies on the Muscardine fungi in the silkworm *Bombyx mori*. *J. Fac. Text. Sci. Tech. Shinsu Univ.* **29**: 1-68.
- 152- Kumar S., Nei M., Dudley J et Tamura K. (2008). MEGA: a biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Brief Bioinform* **9** :299-306.
- 153- Lacey L. A et Undeen, A.H.(1986). Microbial control of flies and mosquitoes. *Ann. Rev. Entomol.* **25** :265-296.
- 154- Lange C., Mulheim C., Cherton J.C., Cassier P., Vey A. et Pais M.(1991). Desorption of ions from locust tissues. I. Behaviour of E-Destruxin using positive-ion fast-atom bombardment mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **5**: 169-174.
- 155- Larkin M.A., Blackshields G., Brown N.P., Cenna R., McGettigan P.A., McWilliam H *et al.* (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinform.* **23**: 2947-2948.
- 156- Lecuona R., Clement J.L., Riba G., Joulie C et Juarez P. (1997). Spore germination and hyphal growth of *Beauveria sp* .on insect lipids. *J. Econ. Entomol* .**90**:119-123
- 157- Lehane M. J. (1991). *Biology of blood-sucking insects*. Chapman & Hall, London, UK.

- 158- Leland J.E et Behle R.W. (2005). Coating *Beauveria bassiana* with lignin for protection from solar radiation and effects on pathogenicity to *Lygus lineolaris*. *Bicontr.Sci. Technol.***15**: 309-320.
- 159- Lepage S., Oi-Pentier G., Pecoueur D., Vey A. et Quiot J.M . (1991).(Sous presse). Utilisation des toxines de champignons entomopathogènes dans la lutte contre les diptères piqueurs. Actes de la Troisième Conférence Internationale des Entomologistes d' Expression Française . Gembloux Belgique . Mémoires de la Société Internationale des Royale Belge d'Entomologie .7p.
- 160- Lepage S., Charpentier G., Pecqueur D., Vey A et Quiot J.M. (1992). Utilisation des toxines de champignons entomopathogènes dan la lutte contre les Diptères piqueurs. *Mém. Soc. Belge. Ent.* **35** :139-143.
- 161- Leveau J.Y. et Bouix M. (1993). Les moisissures. In florent J Microbiologie industrielle. *Les microorganismes d'intérêt industrielle.* (edn) Tec et Doc- Lavoisier.
- 162- Liu Z.Y., Milner R.J., McRae C.F et Lutton G.G. (1993). The use of dordine in selective media for the isolation of *Metarhizium* spp. from soil. *J. Invertebr. Pathol.* **62** :248–251.
- 163- Liu B.L et Tzeng Y.M. (1999). Water content and water activity for the production of cyclodepsipeptides in solid-state fermentation by *Metarhizium anisopliae*. *Biotechnol .Lett.* **21**: 657–661.
- 164- Liu B.L., Chen J.W et Tzeng Y.M .(2000). Production of cyclodepsipeptides destruxin A and B from *Metarhizium anisopliae*. *Biotechnol Prog* .**16** :993–999.
- 165- Liu B.L et Tzeng Y.M . (2011). Development and applications of destruxins: A review. *Biotechnol Adv.*1-13
- 166- Lopez Lastra C.C., Hajek A.E et Humber R.A. (2002). Comparing methods for preservation of cultures of entomopathogenic fungi. *Can. J.Bot.* **80** :1126-1130.
- 167- Loutelier C., Cherton J.C., Lange C, Traris M et Vey A. (1996). Studies on the dynamics of the production of destruxins by *Metarhizium anisopliae*: direct high-performance liquid chromatographic and fast atom bombardment mass spectrometric analysis correlated with biological activity tests. *J Chromatogr A* .**738** :181–189
- 168- Luz C., Fargues J., Romaña C.A., Moreno J., Goujet R., Rougier M et Grunewald J. (1994). Potential of entomopathogenic hyphomycetes for the control of the triatomine vectors of Chagas' disease. *Proc6 Int Coll Invertebr Path Microbiol Control.* **1** :272- 276.

- 169- Magelhas B.P., Lord J.C., Wraight S.P., Daoust R.A et Roberts D.W. (1981). Pathogenicity of *Beauveria bassiana* and *Zoophthora radicans* to the coccinellid predators *Coleomegilla maculate* and *Eriopis connexa*. *J.Invertebr.Pathol.* **52**:471-473
- 170- Maire A et Aubin A. (1980). Les moustiques du Québec (Diptera : Culicidae) . Essai de synthèse écologique. Mémoires de la Société Entomologique du Québec.**6** :107.
- 171- Mansouri M., Bendali-Saoudi F., Benhamed D et Soltani N. (2013). Effect of *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* against *Culex pipiens* (insecta:Culicidae). Effect of *Bti* on two non-target species *Eylais hamata* (Acari:Hydrachnidia) and *Physa marmorata* (Gastropoda: physidae) and Dosage of their GST biomarker. *Ann. Biol. Res.* **4** (11):85-92
- 172- Marquardt W.C., Black W.C., Higgs S., Freier J.E., Hagedorn H.H., Kondratieff B., Hemingway J et Moore C.G. (2005). Biology of Disease Vectors. Second Edition, Elsevier Academic Press.
- 173- Mathew R. (1995). *Biologie Campbell*, (edn) ISBN Canada.
- 174- Matille L. (1993). Les diptères d'Europe occidentale. Introduction, technique d'étude et morphologie. Nématocères, Brachycères, Orthoraphes et Aschizes. Ed. Boubée, T1, Paris : 439p.
- 175- McCoy A., Quintela E.D et Faria M. (1990). Environmental Persistence of Entomopathogenic Fungi. In, New direction in biological control. R.R. Baker and P.E. Dunn (eds), A.R. Liss, New York, 139-159.
- 176- McCray Jr E.M., Womelderoff D.J., Husbands R.C et Eliason D.A. (1973). Laboratory observation and field tests with *Legenidium* against California Mosquitoes. *Proc Cali Mosq Control Assoc* **41** :123–128.
- 177- McGaughey W.H et Whalon M.E. (1992). Managing insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. *Science* 1451–1455.
- 178- Metschnikoff E. (1879). Krankheiten der Larve des Getreidekäfers. Odessa, 32p.
- 179- Meyling N.V et Eilenberg J. (2007). Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: Potential for conservation *boil. contr.* **43** :145-155.

- 180- Mietkiewski R., Tkaczuk C et Zasada L. (1992). Occurrence of entomopathogenic fungi in arable soil and meadow soil. *Acta Mycologica*. **27** (2): 197-200.
- 181- Milner R.J., Lutton G.G et Zouyi L. (1992). Methods for isolating *Metarhizium anisopliae* from soil. XXV Annual Meeting Society for Invertebrate Pathology, August 16-21, 1992, Heidelberg, Germany, 176 p.
- 182- Miranpuri G.S et Khachatourians G.G. (1991). Infection sites of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in the larvae of the mosquito *Aedes aegypti*. *Entomol.* **16** :215-234.
- 183- Mitsuaki S. (2004). Effect of temperature on growth of *Beauveria bassiana* F-263, a strain highly virulent to the Japanese pine sawyer, *Monochamus alternatus*, especially tolerance to high temperatures. *Appl Entomol Zool.* **39** : 469-475.
- 184- Mohamed A.K., Hernandez D et Nelson R.S. (1983). Susceptibility of various instars of *Culex quinquefasciatus* to two strains *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. *Journ. Flor. Anti- Mosquito. Asso.* **54** (1) : 5-8.
- 185- Mohanty S.S., Raghavendra K., Mittal P.K et Dash A.P. (2008). Efficacy of culture filtrates of *Metarhizium anisopliae* against larvae of *Anopheles stephensi* and *Culex quinquefasciatus* *J.Ind.Microbiol.Biotechnol.* **35** :1199–1202.
- 186- Mondal P et Bhattacharya A.K. (2004). Assessment of different media for mass multiplication of entomopathogenic fungus. *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin *Proc.Nat.Acad.Sci.India.* **74**:161-169.
- 187- Moore D., Bridge P.D., Higgins P.M., Bareman R.P et Prior C.(1993). Ultra-violet radiation damage *Metarhizium flavoviride* conidia sunscreens. *Ann.Appl. Biol.* **122** :605-616.
- 188- Morel E., Pais M., Turpin M et Guyour M. (1983). Cytotoxicity of cyclodepsipeptides on murine lymphocytes and on L 1210 leukemia cells. *Biomed Pharmacother.* **37** :184–185.
- 189- Mouchet J. (1994). Le DDT en santé publique. Cahier santé. **4** : 257-262
- 190- Mouchet J.(1995). Le DDT en santé publique. Cahier santé 1994. **4** : 257-262
- 191- Mouchet J., Elliot R., Gariou R et Voelckel J.(1960) . La résistance aux insecticides chez *Culex pipiens fatigans* Wied . Et les problèmes d'hygiènes urbaines au Caméroun.. *Méd. Trop.* **20** :447-456.

- 192- Moulinier C. (2003). *Parasitologie et mycologie médicales*, éléments de morphologie et de biologie. Cachan : EM inter. 796 p.
- 193- Murgue B., Murri S., Triki H., Deubel V. et Zeller Hg. (2001). West Nile in the Mediterranean basin : *Ann N Y Acad Sci.* **951** :117-126
- 194- Napolitano R et Juárez M.P. (1997) .Entomopathogenous fungi degrade epicuticular hydrocarbons of *Triatoma infestans* .*Arch.Biochem.Biophys.* **344** :208-214.
- 195- Nelson T.L., Low A et Glare T.R. (1996). Large scale production of New Zealand strains of *Beauveria* and *Metarhizium*, Proc. 49th New Zealand .*Plant Production Conf.*257-261.
- 196- Nicklin J., Greame-Cook K., Paget T et Killington R. (1999). *Essentiel en microbiologie*, (edn) BERTI. Paris.
- 197- Nielsen C., Eilenberg J., Harding S et Vestergaard S. (2004). Biological Control of Weevils (*Strophosoma melanogrammum* and *S. capitatum*) in Greenery Plantations in Denmark Pesticide Research Danish Environmental Protection Agency, Copenhagen
- 198- Odier F., Vey A et Bureau J.P. (1992). In vitro effects of fungal cyclodepsipeptides on leukemic cells: study of destruxins A, B and E. *Biol. Cell* .74: 267–271.
- 199- Odier F., Vago P., Quiot J.M., Devauchelle G et Bureau J.P. (1987). Etude cryométrique des effets de la destruxine E sur des cellules leucémiques de souris. *C. R. Acad.Sci. Ser. 3* : (305) 575-578.
- 200- O.M.S. (1963). Méthodes à suivre pour déterminer la sensibilité ou la résistance des larves de moustiques aux insecticides. In Résistance aux insecticides et lutte contre les vecteurs. Treizième rapport du comité OMS d'experts des insecticides, Genève : OMS, *Sér .Rapp.techn.*256, p 55-60.
- 201 - O.M.S. (1970). Résistance aux insecticides et lutte anti vectorielle. *Sér.Rapp.Techn.*443
- 202- Pais M., Das B.C et Ferron P. (1981). Depsipeptides from *Metarhizium anisopliae* . *Phytochem.***20** :715-723.
- 203- Pantou M.P., Mavridou A et Typas M.A. (2003). IGS sequence variation, group-I introns and the complete nuclear ribosomal DNA of the entomopathogenic fungus *Metarhizium*: excellent tools for isolate detection and phylogenetic analysis. *Fungal Genet Biol.* **38** :159–174.

- 204- Palmisano C.T., Taylor V., Caillouetk., Byrd B et Wesso D.M., (2005). Impact of West Nile virus outbreak upon St. Tammany Parish Mosquito Abatement District. *J.AM Mosq Control Assoc.* **21** :33-38.
- 205- Pates H et Curtis C. (2005). Mosquito behavior and vector control. *Ann. Rev. Entomol.* **50**: 53-70.
- 206- Pedro H.C et Candido S.A. (1997). Entomopathogenic fungi associated with natural populations of the Moroccan Locust *Dociostaurus maroccanus* (Thunberg) (Orthoptera: Gomphocerinae) and other Acridoidea in Spain. *Biocontrol Sci. Technol.* **7** (3): 357-364.
- 207- Pochon J. et Tradieux P. (1962). *Techniques d'analyse en microbiologie du sol.* Tourelle, St Mandré. 110-111.
- 208- Poprawiski T.J et Yule W.N. (1991). Incidence of fungi in natural populations of *Phyllophaga* spp. and susceptibility of *Phyllophaga anxia* (LeConte) (Col., Scarabidae) to *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina). *J. Appl. Entomol.* **112** (3): 359-365.
- 209- Potterat O., Wagner K., Haag H. (2000). Liquid chromatography-electrospray time-of-flight mass spectrometry for on-line accurate mass determination and identification of cyclodepsipeptide in a crude extract of fungus *Metarhizium anisopliae*. *J Chromatogr A* . **872** :85-90.
- 210- Prelaud P. (1991). Urticaire provoquée par une hypersensibilité aux piqûres de moustiques chez un boxeur, *L'Action Veterinaire.* **1189** :11-13.
- 211- Quesada-Moraga E., Navas-Cortes J., Maranhao E., Ortiz-Urquiza A et Santiago-Alvarez C. (2007). Factors affecting the occurrence and distribution of entomopathogenic fungi in natural and cultivated soils. *Mycol .Res.* **111**: 947-966.
- 212- Ramoska W.A., Watts S et Watts H.A. (1981). Effects of sand formulated *Metarhizium anisopliae* spores on larvae of three mosquito species. *Mosquito News* .**41** :725-728
- 213- Ramoska W.A. (1982). An examination of the longterm epizootic potential of various artificially introduced mosquito larval pathogens. *Mosquito News.* **42** :603-607.
- 214- Rangaswamy R. (1995). A textbook of agricultural statistics. New Age International (P.) Limited, New Delhi. 496 p .

- 215- Ravallec M., Riba G et Vey A. (1989). Sensibilité d ' *Aedes albopictus* (Diptera : Culicidae) à l' hyphomycète entomopathogène *Metarhizium anisopliae*. *Entomophaga*. **34** :209-217.
- 216- Ravallec M., Robert P. et Coz J. (2003). Sensibilité d'un prédateur culiciphage *Toxorynchites ambionensis* à l'hyphomycète entomopathogène *Metarhizium anisopliae* (Sorokin). *Cah. ORSTROM .Sér. Ent. Médic. Parasitol.* **24** (4): 275-278.
- 217- Ravallec M, Riba G et Vey A. (2006). Sensibilité d'*Aedes albopictus* (Dipt., Culicidae) à l'hyphomycète entomopathogène *Metarhizium anisopliae*. *Biocontr.* **34** (2):209-217.
- 218- Reichelder C.F. (1993). Biological assays with insect pathogens. In: N. B. Mandava (ed.). *CRC handbook of natural pesticides: methods. V.I Theory practice and detection*. New Delhi. CBS Publishers and Distributors. 489-515.
- 219- Richard I et Samuels. (1998). A sensitive bioassay for destruxins, cyclodepsipeptides from the culture filtrates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. *An. Soc. Entomol. Bras.* **27** (2).
- 220- Rioux et Causserans . (2008). La démoustication du littoral méditerranéen : base écologique, stratégie opérationnelle, devenir. *Bulletin De l'académie des Sciences et Lettres De Montpellier.* **39** :343-356.
- 221- Rioux J.A. (1958). Les Culicidae du "Midi" méditerranéen. Etude systématique et écologique, Ed. Paul lechevalier, Paris: 301p.
- 222- Ripert C. (1998). *Epidémiologie des maladies parasitaires, tome 2, Helminthoses*. Cachan : EM inter. 580p.
- 223- Ripert C. (2007). *Epidémiologie des maladies parasitaires, tome 4, affections provoquées ou transmises par les arthropodes*. Cachan : EM inter. 581 p.
- 224- Robert P.H et Fargues J. (1986). Toxicité par ingestion des destruxines A, B et E pour les larves de *Musca domestica* L. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, Paris Série III* **303** : 641- 643.
- 225- Roberts D. W. (1967). Some effects of *Metarhizium anisopliae* and its toxins on mosquito larvae. In "Insect Pathology and Microbial Control" (P. A. van der Laan, Ed.), p 243-246. North-Holland, Amsterdam.

- 226- Roberts D.W. (1973). Means for insect regulation: *Fungi . Ann . N.Y., Acad . Sci .* **217**: 76-83
- 227- Roberts D.W. (1981). Toxins of entomopathogenic fungi . Dans "Microbial control of pests and plant diseases» 1970-1980. Editeur Burges, H.D. , Academic Press, New-York . 441-464
- 228- Robich R.M et Denlinger D.L. (2005). Diapause in the mosquito *Culex pipiens* evokes a metabolic switch from blood feeding to sugar gluttony. *Proceedings of the National Academy of Sciences.***102**: 15912-15917.
- 229 Roddam L.F et Rath A.C .(1997). Isolation and characterization of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* from Subantartic Macquarie Island. *J. Invertebr. Pathol.* **69** (3): 285-288.
- 230- Roepstorff P et Fohlman J. (1984). Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomedical Mass Spectrometry.* **11**(11).
- 231- Roubaud E. (1929). Cycle autogène d'attente et générations hivernales suractives inapparentes chez le moustique commun *Culex pipiens* L.C.R. *Acad.Sci.,Paris.* **88** :735-738
- 232- Saint -Louis M., Firlej A., Gagne I., Grjelchan M., Kouassi M., Pelletier F., Provost C. et VanoosThuys F. (2001). Eléments de recherche pour une meilleure utilisation des prédateurs et des champignons entomopathogènes en lutte biologique. *Antennae.* **8** (2): 1-6.
- 233- Saitou N et Nei M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* **4** :406-425.
- 234- Samson R.A, Evans H.C et Latge J.P. (1988). Atlas of Entomopathogenic Fungi. Springer-Verlag, Netherlands,187 p .
- 235- Samuels R.I, Charnley A.K, Reynolds S.E.(1988). The role of destruxins in the pathogenicity of three strains of *Metarhizium anisopliae* for the tobacco hornworm *Manduca sexta*. *Mycopathologia.* **104** :51–58.
- 236- Samuels K.D.Z., Heale J.B. et Llewellyn M.(1989). Characteristics relating to the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* toward *Nilaparvata lugens*. *J. Invertebr. Pathol.* **53**: 25-31.

- 237- Savage H et Miller B. (1995). House mosquitoes of the U.S.A, *Culex pipiens* Complex. *Wing Beast*. **6** (2): 8-9.
- 238- Savage H.m., Ceianu C., Nicolescu G., Karabatsos N et Lanciotti R. Vladimirescu A., Laiv L., Ungureanu A., Romanca C et Tsai T.F. (1999). Entomologic and avian investigations of an epidemic of West Nile fever in Romania in 1996, with serologic and molecular characterization of a virus isolate from mosquitoes. *Am J Trop Med Hyg.* **61** : 600-611.
- 239- Scholte E.J., Knols B.G et Takken W. (2004) . Auto dissemination of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* amongst adults of the malaria vector *Anopheles gambiae sensu strico*. *Mala. J.* **3** :45.
- 240- Schuffenecker I., Peyrefitte C.N., El Harrak M., Murri S., Leblond A et Zeller H.G. (2005). West Nile Virus in Morocco, 2003. *Emerging Infectious Diseases* .**11**: 306-309
- 241- 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.
- 242- Seye F., Ndiaye M., Faye O et Afoutou J.M. (2012).Evaluation of Entomopathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae* Formulated with Suneem (Neem Oil) against *Anopheles gambiae* s.l. and *Culex quinquefasciatus* Adults. *Malaria Chemotherapy, Control & Elimination*. **1**:1-6.
- 243- Siebeneicher S.R., Vinson S.B et Kenerley C.M. (1992). Infection of the red imported fire ant by *Beauveria bassiana* through various routes of exposure *.J. Invertebr.Pathol.***59** : 280-285.
- 244- Silvy C et Riba G. (1989). Biopesticides contre maladies, insectes, mauvaise herbe. Dossier de l'environnement N° 9, 157-200.
- 245- Sinigre G., Jilien J.L et Gaven B. (1977). Acquisition progressive de la résistance au chlorpyrifos chez les larves de *Culex pipiens* (L.) dans le Midi de la France. *Parasitologia*. **19** (1/2): 79–94.
- 246- Snegre G., Jllien J.L et Rcopse O. (1976). Résistances de certaines populations de *Culex pipiens* (L.) au chlorpyrifos (Dursban) en Languedoc-Roussillon (France). Cahier O.R.S.T.O.M., *Ser. Entomol. méd. et Parasitol.* **14** : 49-59.

- 247- Soltani N., Rehim N., Beldi H et Bendali F. (1999). Activité du Triflumuron sur *Culex pipiens* (Diptera : Culicidae) et impact sur deux espèces larvivores non visées. *Ann. Soc. Entomol. Fr. (N.S.)*, **35** (suppl.) :502-508.
- 248- Sorokin N. (1883). The parasites of plants, man and animals. *Rastitelnye oarazty ceoveska Iazitotnyh.* **2**: 268-290 (in Russian).
- 249- Soza-Gómez D.R et Alves S. B. (2000). Temperature and relative humidity requirements for conidiogenesis of *Beauveria bassiana* (Deuteromycetes: Monillicae). *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil* (english version) **29** :515-521
- 250- Springer J. P., Cole R. J., Dorner J. W., Cox R. H., Richard J. L., Barnes C. L. et Van der Helm D.(1984). Structure and Conformation of Roseotoxin B, *J. Am. Chem. Soc.*, **16** :2388.
- 251- St Leger RJ. (1986a). Cuticule- degrading enzymes of entomothogenic fungi : Synthesis in culture on cuticle. *J. Inverbr.Pathol.* **48** :85-95
- 252- St Leger RJ.(1986b). Cuticule- degrading enzymes of entomothogenic fungi : cuticule degradation in vitro by enzymes from entomothogens.. *J. Inverbr.Pathol.* **47** :167-177.
- 253- St Leger R.J., Lacetti L.B., Staples R.C et Roberts D.W. (1990). Protein kinases in the enthomopathogenic fungus *Metharhizium anisopliae*. *J. Gen. Microbiol.* **136** :1401-1411.
- 254- St Leger R.J., Allee L.L., May B., Staples R.C et Roberts D.W. (1992).World-wide distribution of genetic variation among isolates of *Beauveria spp.* *Mycol.Res.* **96**: 1007-1015.
- 255- St Leger R.J.(1993). Biology and mechanisms of insect-cuticle invation by deuteromycete fungal pathogens,In :Parasites and pathogens of insects .Beckage NE, Thompson SN,(eds),Federici BA (eds.).Academic Press Inc.,New York,USA .**2** : 211-225.
- 256- Starnes R.L., Liu C.L et Marone P.G. (1993). History, use and future of microbial insecticides. *Amer. Entomol.* **39** :83-91.
- 257- Steyn P.S.(1980).*The biosynthesis of mycotoxins* , Acad. Press, N.Y. and London
- 258- Sun C.M., Chen H.C et Yeh S.F. (1994). Suppressive effects of metabolites from *Alternaria brassicaea* on the hepatitis B surface antigen. *Planta Med.* **60** :87–88.
- 259- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M. et Kumar S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* **28** :2731–2739.

- 260- Tanada Y et Kaya H.K. (1993). Insect pathology. Academic Press Inc., San Diego, USA, 666 p.
- 261- Todorova S.J., Côté L.C., Martel P et Coderre D. (1994). Heterogeneity of two *Beauveria bassiana* strains revealed by biochemical tests, protein profiles and bioassays on *Leptinotarsa decemlineata* (Col: Coccinellidae) larvae. *Entomophaga*. **39** :159-169.
- 262- Tortora J., Funk B.F et Case Ch.I. (2003). *Introduction à la microbiologie*, (edn). ISBN.Canada.
- 263- Tarasco E., Bievre C.D et Papierok B. (1997). Occurrence of entomopathogenic fungi in soils in Southern Italy. *Entomol.* **31** :157-166.
- 264- Tsunoo A et Kamijo M.(1999). Non-cyclic AMP dependent, positive inotropic cyclodepsipeptides with negative chronotropy. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **290** :1006–1012.
- 265- Tsunoo A., Kamijo M., Taketomo N., Sato Y et Ajsaka, K. (1997). Roseocardin, a novel cardiogenic cyclodepsipeptide from *Trichothecium roseum* TT103. *J. Antibiot.* **50** : 1007–1013.
- 266- Tulloch M. (1976). The genus *Metarhizium*. *Transactions of the British Mycological Society.* **66** :497-411.
- 267- Turner W.B. (1971). «Fungal metabolites», Acad. Press, N.Y. and London.
- 268- Turner W.B et Albridge D.C. (1983). Fungal metabolites II, Acad. Press, N.Y. and London. Unitted .Kingdom.
- 269- Ulacio D., Perez C et Pineda Y.J. (1997). Mycoflora in tobacco plant roots (*Nicotiana tabacum*) in portuguesa state, Venezuela. *Bioagro.* **9** (1): 3-11.
- 270- Van der Meer J. R., Rollema H.S., Siezen R.J., Beerthuyzen M.M., Kuipers O.P et de Vos W.M. (1994). Influence of amino acid substitutions in the nisin leader peptide on biosynthesis and secretion of nisin by *Lactococcus lactis*. *J. Biol. Chem.* **269** :3555-3562
- 271- Veen K.H.et Ferron P. (1966). A selective medium for the isolation of *Beauveria tenella* and of *Metarhizium anisopliae*. *J. Invertebr.Pathol.* **8** :268–269.
- 272- Veen K.H. (1968). Recherches sur la maladie due à *Metarhizium anisopliae* chez le criquet pèlerin . *Meded . Land bouwhoghe school, Wageningen* . **68** :1-77.

- 273- Vega F.E., Jackson M.A., Mercadier G et Poprawski T.J. (2003). The impact of nutrition on spore yields for various fungal entomopathogens in liquid culture, *World J. Microbiol. Biotechnol.* **19** :363-368.
- 274- Vey A., Ouiot J.M. et Pais M. (1986). Toxémie d'origine fongique chez les invertébrés et ses conséquences cytotoxiques : étude sur l'infection de *Metarhizium anisopliae* (Hyphomycète, Moniliales) chez les Lépidoptères et les Coléoptères . Pathologie comparée. *C. R. Soc. Biol.* **180** :105-112 .
- 275- Vey A., Ouiot J.M et Vago C. (1987). Mode d'action insecticide d'une mycotoxine, la destruxine E, sur les diptères vecteurs et disséminateurs de germes. Pathologie animale .C.R . *Acad . Sc. Paris*, 304, Série III : 229-234 .
- 276- Vey A., Ouiot J.M. (1989). Effet cytotoxique .in vitro et chez l'insecte hôte des destruxines, toxines cyclodepsipeptidiques produites par le champignon entomopathogène *Metarhizium anisopliae*. *Can. J. Microbiol.* **35** :1000-1008 .
- 277- Wall R., Shearer D. (1997). *Veterinary entomology*. London : Chapman & Hall. 439 p.
- 278- Weiser J., Bridggs J.D. (1971). Identification of pathogens, In H.D. BURGER y N.W. HUSSEY (eds). Microbial control of insects and mites. *Academic Press*. New York . 13-66.
- 279- White T. J., Bruns Lee S et Taylor J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In "PCR protocols: A guide to methods and applications". Innis N, Gelfland J, White T, eds. New York. Academic Press.315-322..
- 280- Wood D.M. (1985). Diptères piqueurs du Canada qui s'attaquent à l' homme et au bétail. Agriculture Canada . Publication 1781/f . 38.
- 281- Wraight R.J et Roberts D.W. (1987). Insect control effort with fungi. *Devel. Industr. Microbiol.* **28** :77-87.
- 282- Wraight S.P., Jackson M.A et de Kock S.L. (2001). Production, stabilization and formulation of fungal biocontrol agents. In: Butt TM, Jackson CW, Magan N (eds) *Fungi As Biocontrol Agents, Progress, Problems and Potential*.253–288. CABI Publishing, New York.
- 283- Zientara S., Dufour B., Moutou F et Guitteny B. (2001). Le point sur l'épizootie française de West Nile en 2000. Bulletin d'Epidémiologie n°1.

284- Zhao J., Kong F., Li R., Wang X., Wan Z et Wang D. (2001). Identification of *Aspergillus fumigatus* and related species by nested PCR targeting ribosomal DNA internal transcribed spacer regions. *J. Clin. Microbiol.* **39** :2261-2266.

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

Annexes

Annexe 1**Les Milieux de culture**❖ **ODA (Oatmeal Dodine Agar)**

Avoine.....	20g
Dodine.....	50µg
Agar.....	20g
Eau distillée.....	1000ml

pH = 5.6❖ **SDAY (Sabouraud dextrose agar yeast)**

Peptone.....	10g
Saccharose.....	20g
Agar.....	15g
Extrait de levure.....	2g
Dodine.....	50µg
Eau distillée.....	1000ml

pH = 5.6❖ **PDAY (Potato dextrose agar yeast)**

Pomme de terre.....	200g
Saccharose.....	15g
Agar.....	20g
Extrait de levure.....	2g
Dodine.....	50µg

Eau distillée.....1000ml

pH = 5.6

❖ **Milieu liquide Czapek dox + Peptone**

NaNO₃.....3g
K₂HPO₄.....1g
MgSO₄... 7H₂O.....0,5g
KCl.....0,5g
FeSO₄... 7H₂O.....0,01g
Saccharose.....30g
Peptone5g
Eau distillée.....1000ml

❖ **Milieu liquide de Fermentation (Maltose)**

Maltose.....2,55g
Peptone.....0,75g
β alanine.....0,02g
Glucose.....0,5g
Eau distillée.....100ml

Annexe 2

Protocole de la purification des réactions de séquences avec le Kit CleanSeq

- 1- Retirer la/les Plaques de réaction de séquence. Placer sur un portoir plastique pour plaques 96 puits. Ajouter 10 μ l d'eau dans tous les puits avec une Pipette 10 μ l 8 canaux
- 2- Ajouter 10 μ l de réactif « Big Dye® Sequencing Clean up kit » dans tous les puits avec une Pipette 10 μ l 8 canaux
- 3- Ajouter 63 μ l d'Ethanol 80° dans tous les puits avec une Pipette 100 μ l 8 canaux
- 4- Bien mélanger par Aspiration-Refoulement avec la pipette 100 μ l 8 canaux en réglant le volume de prise sur 100 μ l
- 5- Laisser incuber 3 – 5 min pour fixation des ADNs sur les billes magnétiques
- 6- Placer sur la Plaque 96 puits Magnétique dite « SuperMagnet » environ 1 – 2 min
- 7- Aspirer la totalité du liquide avec la pipette 100 μ l 8 canaux réglée sur le volume de prise de 100 μ l
- 8- Réaliser un lavage des billes en ajoutant 100 μ l d'Ethanol 80° dans tous les puits avec une MultiPipette 1000 μ l 8 canaux ou pipette automatique 1000 μ l
- 9- Aspirer la totalité du liquide avec la pipette 100 μ l 8 canaux réglée sur le volume de prise de 100 μ l
- 10- Réaliser un second lavage des billes en ajoutant 100 μ l d'Ethanol 80° dans tous les puits avec une MultiPipette 1000 μ l 8 canaux ou pipette automatique 1000 μ l
- 11- sécher 5 min pour évaporer l'éthanol 80°
- 12- .Ajouter 50 μ l d'eau dans tous les puits avec une Pipette 100 μ l 8 canaux
- 13- Retirer la plaque de séquences du « SuperMagnet et Laisser incuber 3 – 5 min pour élution des ADNs des billes magnétiques
- 14- Replacer la Plaque 96 puits de séquences sur le « SuperMagnet » environ 2 min pour bien séparer les billes magnétiques du liquide éluat contenant les séquences pures

- 15- Prélever 25 à 30µl d'éluat clair avec une Pipette 100µl 8 canaux et transvaser dans une plaque PCR 96 puits semi-jupée spécialement adaptée au Séquenceur ABI 3730XL
- 16- Couvrir la plaque de séquence d'un Septa gris 96 puits
- 17- Centrifuger la plaque 1 minute à 2 000 rpm
- 18- Installer la plaque + Septa dans un portoir 3730XL noir, fermer le montage avec le couvercle blanc en veillant à bien respecter l'orientation de la plaque donnée par l'angle A12 cassé
- 19- Installer dans le Stacker Input du Séquenceur ABI3730XL, en tirant vers soi le tiroir stacker, et ouvrant la porte située sur la droite lorsqu'on se trouve devant. Installer la plaque montée dans son portoir toujours en veillant à bien respecter l'orientation de la plaque donnée par l'angle A12 cassé
- 20- Refermer la porte, repousser le tiroir du Stacker à fond devant soi, on doit entendre un petit clic et la lampe indicatrice de l'état du stacker doit arrêter de clignoter et revenir au vert fixe
- 21- Lancer le RUN de la plaque après avoir vérifié que la FDR du RUN a été correctement rentrée et prise en compte par l'appareil. Le RUN va durer 1h00 à 2h00 selon qu'il s'agisse d'un RUN dit FAST (pour produits PCR courts < à 600 bases) ou d'un RUN dit LONG (pour séquences longues > à 800 bases)

Annexe 3

Les séquences des 4 souches *Metarhizium anisopliae* obtenues après traitement par le logiciel Chromas

La souche M1 :

CCCAACCCCTGTGATTATACCTTTAATTGTTGCTTCGGCGGGACTTCGCGCCCGCC
GGGGACCCAAACCTTCTGAATTTTTTAATAAGTATCTTCTGAGTGGTTAAAAAAA
TGAATCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCA
GCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTG
AACGCACATTGCGCCCGTCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTA
CGCCCCTCAAGTCCCCTGTGGACTTGGTGTGGGGATCGGCGAGGCTGGTTTTCC
AGCACAGCCGTCCTTAAATTAATTGGCGGTCTCGCCGTGGCCCTCCTCTGCGCA
GTAGTAAAACACTCGCAACAGGAGCCCGGCGCGGTCCACTGCCGTAAAACCCCC
CAACTTTTTATAGTTGACCTCGAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCAT
ATCAATAAGGCGGAGGAA

La souche M2 :

CTGTGGCAGCATCCTTGCATAAAGCGCGAACCTCAGCCCGCCACAGGGTATTACG
CAATGGGCTATAACACTCCCGAGGGAGCCACATTCCCAAAGCCTTTATCCCCCGG
AGCGAACTGATGCTGGCCTGAACCCCGGCAAAGTGCACCAGCGGGAACCGCTGG
ATGATTCACCGGGGCCAAGTCTGGTCATAAGTGCTTCCCTTTCAACAATTTACGT
ACTATTTAACCTCTTTTCAAAGTGCTTTTCATCTTTCGATCACTCTACTTGTGCGC
TATCGGTCTCTGGCCAATATTTAGCTTTAGAAGACATATACCTCCCATTTAGAGCA
GCATTCCCAAACACTACTCGACTCGTCGAAGGAGCTTTACAGAGGCTCGGTATCCAA
CCAGACGGGGCTCTCACCTCTATGGCGTCCCGTTCCAGGGAACCTCGGAAGGCAC
CTCACCAAAGCATCCTCTGCAAATTACAACTCGGGCCCTGGGGACCAGATTTCA
AATTTGAGCTGTTGCCGCTTCACTCGCCGTTACTGGGGCAATCCCTGTTGGTTTCT
TTTCTCCGTAATGGRATACA

La souche M3 :

GGCATGCCCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAACAGCTCAAATTTGAAATCTGGT
CCCCAGGGCCCGAGTTGTAATTTGCAGAGGATGCTTTTGGTGAGGTGCCTTCCGA
GTTCCCTGGAACGGGACGCCATAGAGGGTGAGAGCCCCGTCTGGTTGGATACCG
AGCCTCTGTAAAGCTCCTTCGACGAGTCGAGTAGTTTGGGAATGCTGCTCTAAAT
GGGAGGTATATGTCTTCTAAAGCTAAATATTGGCCAGAGACCGATAGCGCACAA
GTAGAGTGATCGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGGGTTAAATAGTACGTG
AAATTGTTGAAAGGGAAGCACTTATGACCAGACTTGGCCCCGGTGAATCATCCAG
CGGTTCCCGCTGGTGCACCTTGCCGGGGTTCAGGCCAGCATCAGTTCGCTCCGGG
GGATAAAGGCTTTGGGAATGTGGCTCCCTCGGGAGTGTTATAGCCCATTGCGTAA
TACCCTGTGGCGGGCTGAGGTTTCGCGCTTTATGCAAGGATGCTGGCATAATGGTC
ATCAGTGACCCGTCTWGCACSGGGACCCAT

La souche M5 :

CCCAACCCCTGTGATCATACCTTTAATTGTTGCTTCGGCGGGACTTCGCGCCCGCC
GGGGACCCAAACCTTCTGAATTTTTTAATAAGTATCTTCTGAGTGGTTAAAAAAA
ATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGC
AGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTT
GAACGCACATTGCGCCCGTCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATT
ACGCCCTCAAGTCCCCTGTGGACTTGGTGTGGGGATCGGCGAGGCTGGTTTTTC
CAGCACAGCCGTCCCTTAAATTAATTGGCGGTCTCGCCGTGGCCCTCCTCTGCGC
AGTAGTAAAGCACTCGCAACAGGAGCCCGGCGCGGTCCACTGCCGTAAAACCCC
CCAACTTTTTATAGTTGACCTCGAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCA
TATCAATAAGCGGAGGAA

Annexe 4

Tableau 19 : Transformation du temps en Logarithme décimal et les pourcentages de mortalité cumulés des larves en Probits

Temps (Jours)	Log temps	D1 (10 ⁵ spores/ml)		D2 (10 ⁶ spores /ml)		D3 (10 ⁷ spores /ml)		D4 (10 ⁸ spores /ml)		D5 (10 ⁹ spores /ml)	
		MC%	Prob	MC%	Prob	MC%	Prob	MC%	Prob	MC%	Prob
1	0.00	4	3.25	8	3.59	32	4.53	40	4.75	52	5.05
2	0.30	8	3.59	12	3.82	44	4.85	52	5.05	68	5.47
3	0.48	20	4.16	32	4.53	64	5.36	72	5.58	84	5.99
4	0.60	40	4.75	48	4.95	76	5.71	88	6.18	96	6.18
5	0.70	40	4.75	52	5.05	80	5.84	96	6.75	100	8.09
6	0.78	48	4.95	64	5.36	88	6.18	100	8.09	100	8.09
7	0.84	52	5.05	72	5.58	92	6.41	100	8.09	100	8.09
8	0.90	72	5.58	84	5.99	92	6.41	100	8.09	100	8.09
9	0.95	84	5.99	92	6.42	100	8.09	100	8.09	100	8.09
10	1	100	8.09	100	8.09	100	8.09	100	8.09	100	8.09

Annexe 5

Tableau 26 : Transformation du temps en Logarithme décimal et les pourcentages de mortalité cumulés des larves en Probits

Temps (Jours)	Log temps	D1 (10 ⁵ spores/ml)		D2 (10 ⁶ spores /ml)		D3 (10 ⁷ spores /ml)		D4 (10 ⁸ spores /ml)		D5 (10 ⁹ spores /ml)	
		MC%	Prob	MC%	Prob	MC%	Prob	MC%	Prob	MC%	Prob
1	—	5.33	3.35	5.33	3.35	8	3.59	9.33	3.66	20	4.16
2	0.30	12	3.82	16	4.01	16	4.01	22.66	4.23	36	4.64
3	0.48	21.33	4.19	22.66	4.23	30.66	4.48	45.33	4.87	61.33	5.28
4	0.60	32	4.53	34.66	4.59	42.66	4.80	66.66	5.41	89.33	6.23
5	0.70	60	5.25	65.33	5.38	66.66	5.41	82.66	5.92	97.33	6.88
6	0.78	73.33	5.61	80	5.84	81.33	5.88	93.33	6.48	100	8.09
7	0.84	81.33	5.88	81.33	5.88	93.33	6.48	96	6.75	100	8.09
8	0.90	92	6.41	92	6.41	96	6.75	100	8.09	100	8.09
9	0.95	96	6.75	96	6.75	100	8.09	100	8.09	100	8.09
10	1	97.33	6.88	100	8.09	100	8.09	100	8.09	100	8.09

Annexe 6

Tableau 33 : Transformation du temps en Logarithme décimal et les pourcentages de mortalité cumulés des larves en Probits

Temps (Jours)	Log temps	D1 (10 ⁵ spores/ml)		D2 (10 ⁶ spores /ml)		D3 (10 ⁷ spores /ml)		D4 (10 ⁸ spores /ml)		D5 (10 ⁹ spores /ml)	
		MC%	Prob	MC%	Prob	MC%	Prob	MC%	Prob	MC%	Prob
1	-----	0	0	1.33	2.67	4	3.25	10.66	3.72	12	3.82
2	0.30	4	3.25	5.33	3.35	9.33	3.66	20	4.16	20	4.16
3	0.48	12	3.82	24	4.29	28	4.42	36	4.64	44	4.85
4	0.60	20	4.16	36	4.64	54.66	5.10	60	5.25	65.33	5.38
5	0.70	40	4.75	53.33	5.08	65.33	5.38	70.66	5.82	77.33	5.74
6	0.78	54.66	5.10	70.66	5.52	81.33	5.88	82.66	5.92	85.33	6.04
7	0.84	69.33	5.50	88	6.18	90.66	6.28	94.66	6.56	97.33	6.88
8	0.90	77.33	5.74	92	6.41	96	6.75	100	8.09	100	8.09
9	0.95	86	6.08	97.33	6.88	100	8.09	100	8.09	100	8.09
10	1	97.33	6.88	100	8.09	100	8.09	100	8.09	100	8.09

Annexe 7

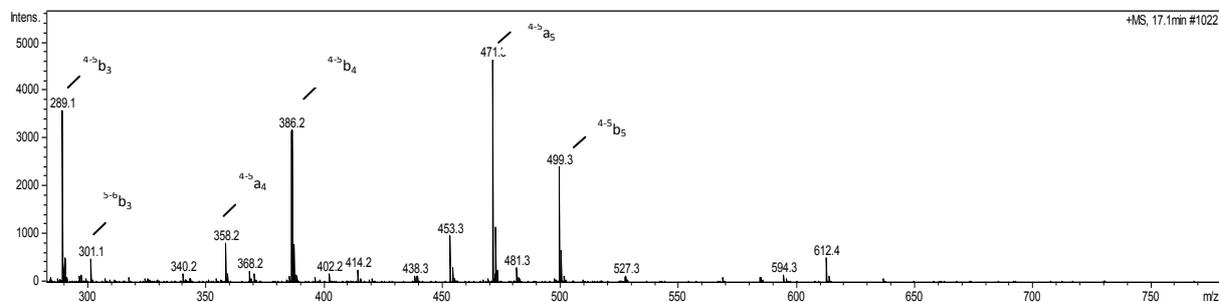
Tableau 40: Transformation du temps en Logarithme décimal et les pourcentages de mortalité cumulés des larves en Probits

Temps (Jours)	Log temps	D1 (10 ⁵ spores/ml)		D2 (10 ⁶ spores /ml)		D3 (10 ⁷ spores /ml)		D4 (10 ⁸ spores /ml)		D5 (10 ⁹ spores /ml)	
		MC%	Prob	MC%	Prob	MC%	Prob	MC%	Prob	MC%	Prob
1	-----	60	5.25	80	5.84	88	6.18	92	92	96	6.75
2	0.30	80	5.84	92	6.41	96	6.75	100	8.09	100	8.09
3	0.48	88	6.18	96	6.75	100	8.09				
4	0.60	92	6.41	96	6.75						
5	0.70	96	6.75	96	6.75						
6	0.78	96	6.75	96	6.75						
7	0.84	100	8.09	100	8.09						

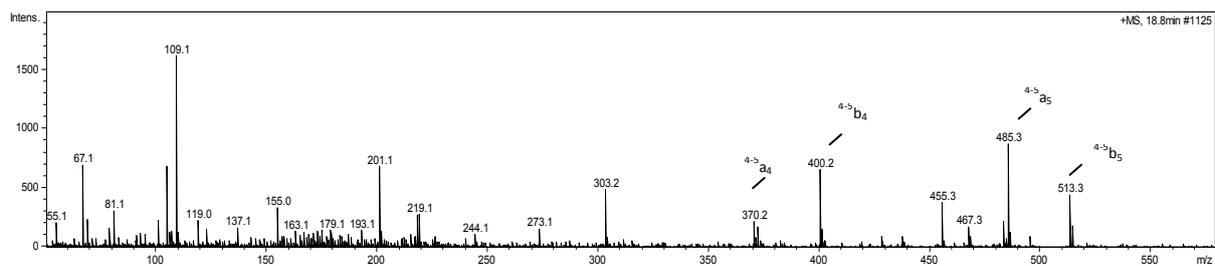
Annexe 8

Les spectres de fragmentation des destruxines (MS/MS)

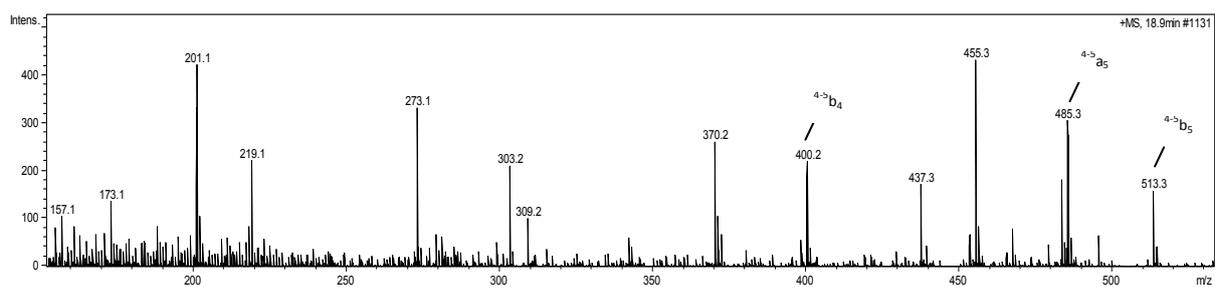
1. Destruxine Ed



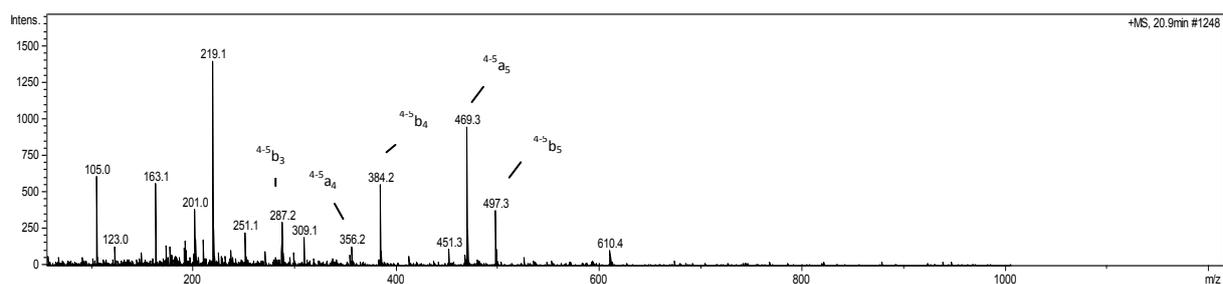
2. Destruxine F



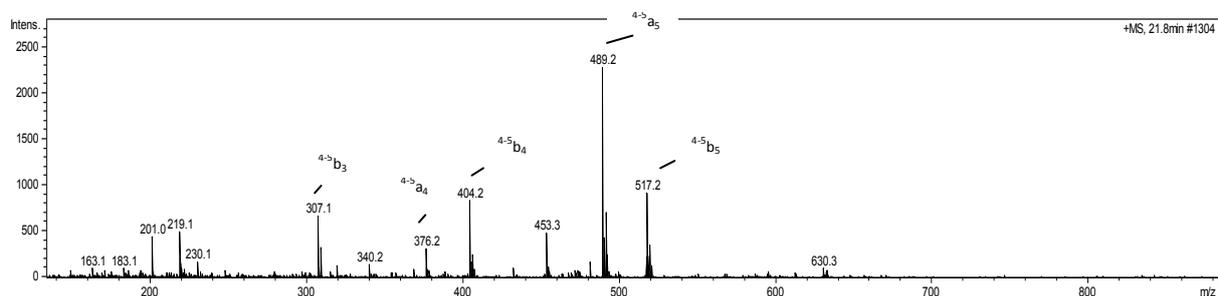
3. Destruxine Ed1



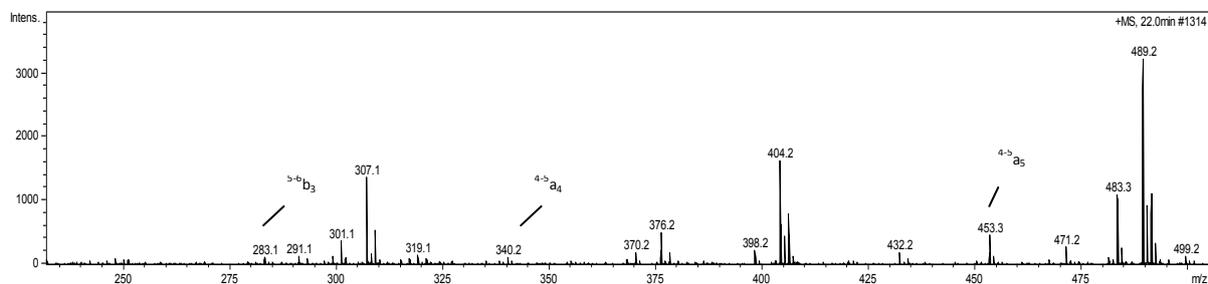
4. Destruxine C



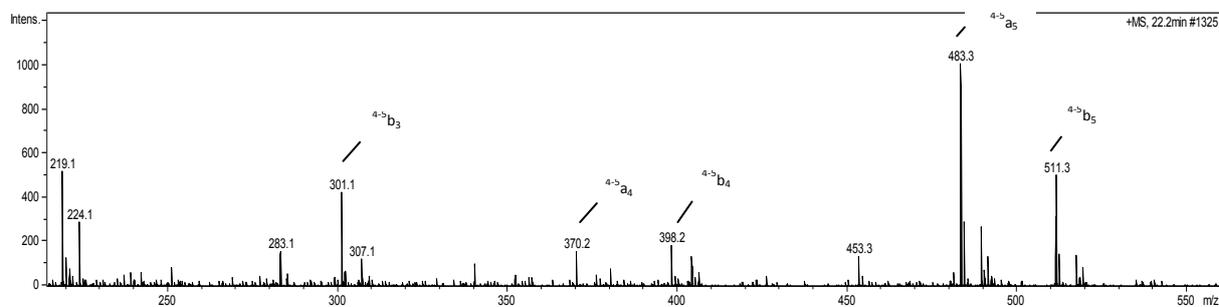
5. Destruxine E chloro



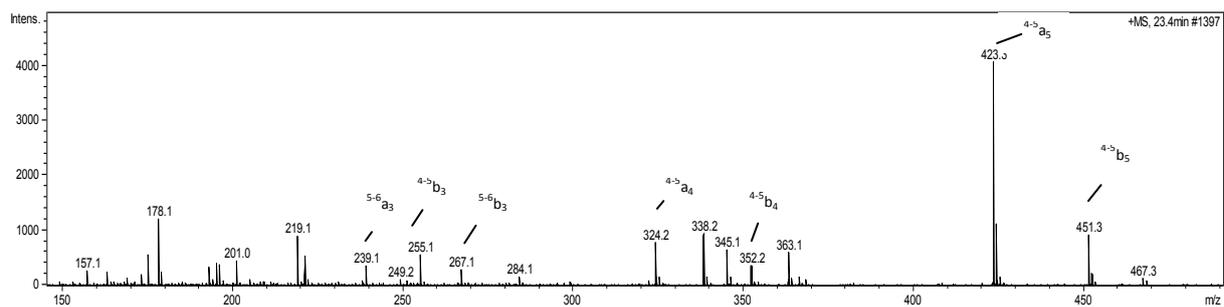
6. Destruxine E



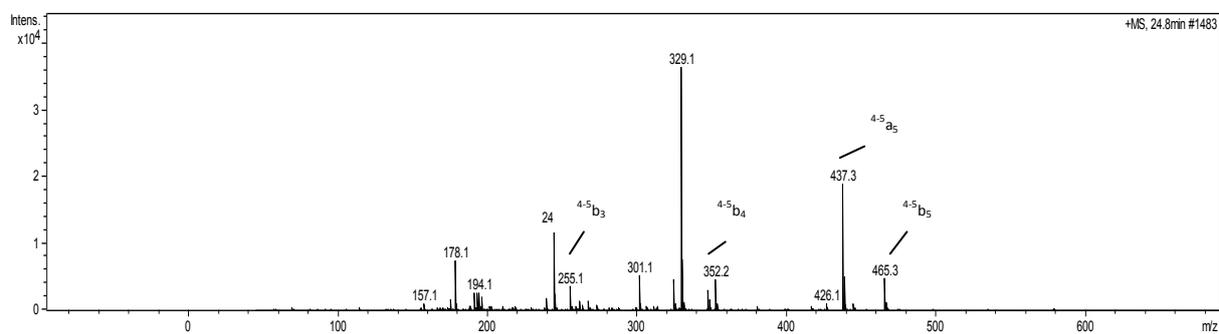
7. Destruxine D



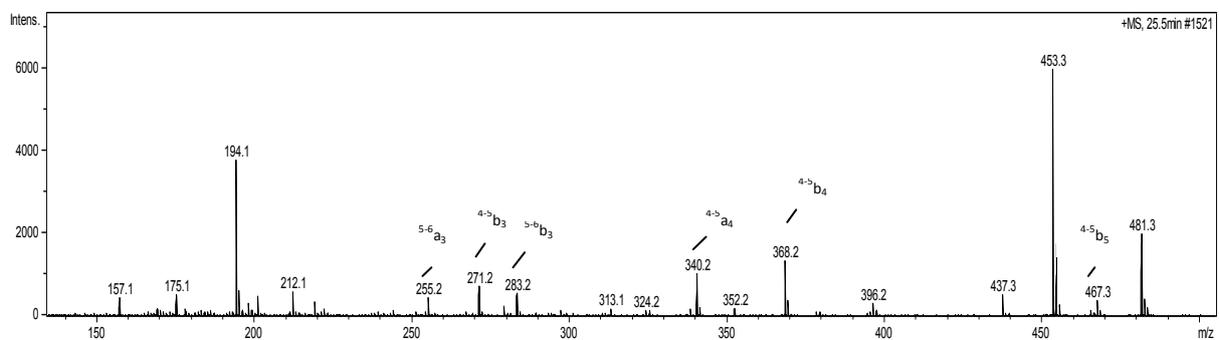
8. Destruxine A2



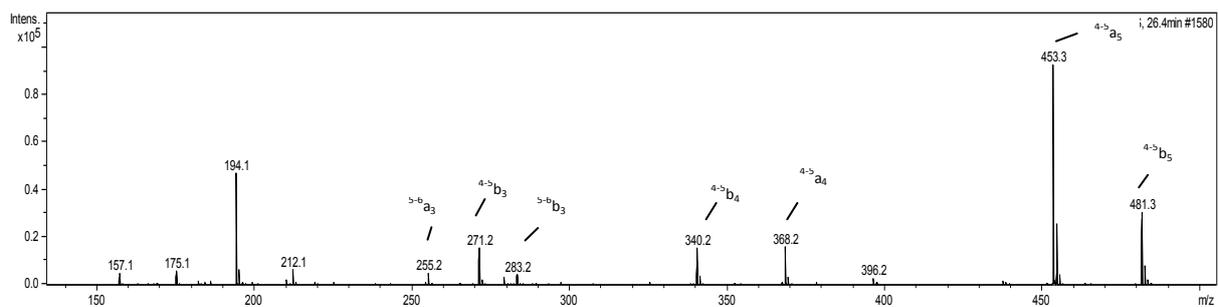
9. DA



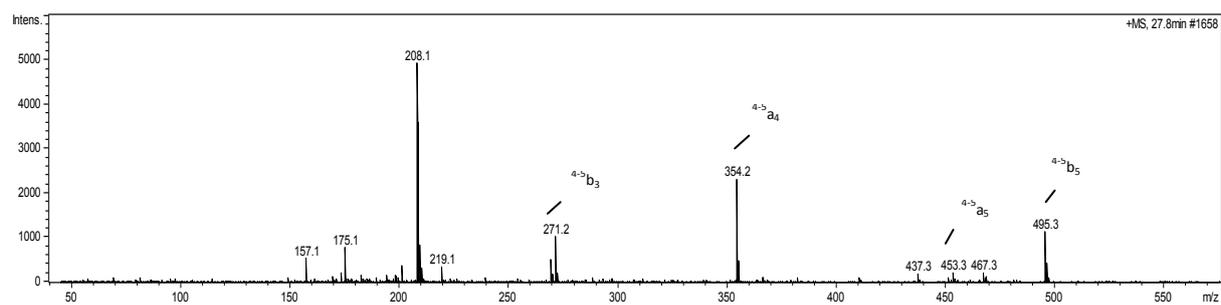
10. DB2



11. DB



12. D B1



Production scientifique

Publications et Communications

Une partie des résultats de ce travail a été présentée sous forme de communications dans différents congrès, et fait l'objet de deux publications dans des revues internationales impactées.

Publications:

- 1) **O.Benserradj and I.Mihoubi.** Larvicidal activity of entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* against mosquito larvae in Algeria. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci* (2014),3(1): 54-62.
- 2) **Benserradj O, Albreix F, Mihoubi I.** Production and identification of Destruxins in crude extract of the fungus *Metarhizium anisopliae* by liquid chromatography-electrospray time-of-flight mass spectrometry. *Int. J.Pharm.Sci.Rev.Research* (2014), 27 (1) :172-177.

Communications:

- 1) BENSERRADJ O., MIHOUBI I., GHORRI S., MILET E., KACEM CHAOUCHE N. **Isolement et identification, à partir du sol, de deux genres de champignons entomopathogènes: *Metarhizium* et *Beauveria*.** 1^{ier} congrès de Biotechnologie et Valorisation des Bio-Resources (BVBR) Tunisie, (Mars 2013).
- 2) BENSERRADJ O, GHORRI S., MIHOUBI I , KACEM CHAOUCHE N. **Isolement d'une souche de champignon entomopathogène (*Metarhizium anisopliae*) virulente contre les larves de moustiques.** 4^{ème} journées scientifiques internationales sur la valorisation des bio ressources (ATVAB). Sousse –Tunisie(Mai 2013).
- 3) BENSERRADJ O,GHORRI S., MIHOUBI I , KACEM CHAOUCHE N. **Evaluation de l'activité larvicide des champignons entomopathogènes *Metarhizium anisopliae*.** 4^{ème} journées scientifiques internationales sur la valorisation des bio ressources (ATVAB). Sousse –Tunisie (Mai 2013).
- 4) BENSERRADJ O, ,GHORRI S., HAFIRASSOU A Z, MIHOUBI I , KACEM CHAOUCHE N. **Evaluation du potentiel infectieux d'un champignon entomopathogène contre les moustiques vecteurs de maladies.** XVIIème journée nationale de Parasitologie-Mycologie. Institut Pasteur d'Algérie, Alger (Mai 2013).
- 5) BENSERRADJ O, GHORRI S., MIHOUBI I , KACEM CHAOUCHE N. **Essai de détermination de la sensibilité de *Culex pipiens* aux bio-insecticides.** Alger (Avril 2014).

Résumés

In the search for alternative methods to chemical control, the use of the biopesticides is developed more and more against mosquitoes vectors of infectious diseases. The strains of fungus are most promising from this new point of view. In this study, we did a biological test of the local entomopathogenic fungi isolated from agricultural soils of Constantine. Based on morphological properties and 18S rRNA gene sequence analysis, For isolates were identified to the following species *Metarhizium anisopliae* .

The susceptibility of *Culex pipiens* larvae to the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* was examined under laboratory conditions. Five doses were used D1= 10^5 spores/ml, D2= 10^6 spores/ml, D3= 10^7 spores/ml, D4= 10^8 spores/ml and D5= 10^9 spores/ml. we have tested the efficiency of for strains of *Metarhizium anisopliae* on the LD50 and LT50. Results obtained demonstrate that larvae mortality increased with increasing concentration and time of exposure to treatment. The evaluation of larvicidal activity of *Metarhizium anisopliae* against *Culex pipiens* larvae depicted as a good biocontrol agent. From *Metarhizium anisopliae* strains, twelve molecules have been purified and identified by means of several chromatographic (HPLC) and spectroscopic techniques (LC/MS and LC/MS/MS), It is a toxin (destruxins). All molecules exhibit insecticidal activities against mosquito larvae.

Key words: Entomopathogenic fungi, *Metarhizium anisopliae*, Mosquitoes, *Culex pipiens*, Larvicidal activity, Destruxins

فسي إطار البحث ع طوق تبني ع ل نقلت راي يقيت بلخ خناو لبي ذات لويوني مختفي ي دال ل نقلت ل مجيبت
 نبعي ض ل ق م العراض هي الاخ دا هات ل حثت لخي حظ بلقيزي الاخ اوفي لفق ج ل زا ه ج ج ز ل طرياث
 ل رضت نه شزات ي لئز ل طزق لواع ذفي مذل دال .
 نذلي مذل ل حث ل اجزاء ائجار بيك زويوني خي بلخ خناو ل طرياث ل رضت نه شزات شي عون هاي جي اي ايع
 ي خعتي ح زنتس راي ي قس طي ض نيقا ل طعي ضي ل ل ع *Culex pipiens* .
 ابعف طرياثي رضت نه شزات شي عون ها, اخ ادا ع ل خ لوص ل فوعني نيت و ح جي م ل ي DNA 18S
 بي ا مذل الأجهزة ح ح ل ل اللت *Metarhizium anisopliae* .
 وقي فع ل طرياث ل رضت نه شزات *Metarhizium anisopliae* ض نيقا ل *Culex pipiens* جي ي ع ليخ ها
 بخ سبت ح ليشي خسترك فطر ث $10=1$ خثويت/ي م, ث $10=2$ خثويت/ي م, ث $10=3$ خثويت/ي م, ث $10=4$
 خثويت/ي م و ث $10=5$ خثويت/ي م جي يوقا رتفع ل طرياث سب ل م ي ل خ ليش ل ق م DL50 و ل ذة
 لشي يوقا ل LT50 نيقا ل .
 اظهز ل ح ل ع ل يمتبا سبت ي يوقا ل شراي فبشراي ذ ل خ ليش وي ذة ل ع ل يمتبا خ هف ل طرياث اظهز ل يمتبا
 ل نقلت ل يوقا ل طعي ض *Culex pipiens* .
 ي خت اخزي جي اج 12 عي ل ل و ل طوي لخي ح ز فسل شخز و لسي (Destruxines) جي ح شي ها و ش يخص ها
 بلخ خناو طزق كزوي اي غوليت (HPLC) و س ل خ زوي نيت (LC/MS و LC/MS/MS). و ق ذا ظهز مذل الأجهزة
 ش اطس ي ض ذ ل شزات .

للالامات لغت اجهزة: *Metarhizium anisopliae*, فطرياثي رضت نه شزات, طعي ض, *Culex pipiens*
 ش اطسي ذنيوقا ل ل ل و ل طوي لخي ح ز (Destruxines) .

NOM : BENSERRADJ Prénom : Ouafa	Diplôme : Doctorat 3ème Cycle LMD
Date de soutenance : 13/10/2014	
Titre : Evaluation de <i>Metarhizium anisopliae</i> à titre d'agent de lutte biologique contre les larves de moustiques	
<p>Résumé</p> <p>Dans la recherche de méthode alternative à la lutte chimique, l'utilisation des biopesticides est de plus en plus développée contre les moustiques vecteurs de maladies. Les souches des champignons sont les plus prometteuses dans cette nouvelle perspective. Pour apporter notre contribution, nous nous sommes intéressés à la réalisation des biotests microbiologiques en utilisant des souches, de champignons entomopathogènes, locales isolées à partir de différents sols agricoles de Constantine contre les larves de moustiques (<i>Culex pipiens</i>). L'identification des souches fongiques isolées était basée sur les caractéristiques morphologiques et l'analyse du gène de l'ARNr 18S. Quatre souches ont été isolées et identifiées comme appartenant à l'espèce entomopathogène <i>Metarhizium anisopliae</i>.</p> <p>La sensibilité des larves de <i>Culex pipiens</i> à <i>Metarhizium anisopliae</i> a été examinée dans des conditions de laboratoire. Cinq doses ont été utilisées: D1= 10⁵ spores/ml, D2= 10⁶ spores/ml, D3= 10⁷ spores/ml, D4= 10⁸ spores/ml et D5= 10⁹ spores/ml. Nous avons comparé l'efficacité des quatre souches de <i>M. anisopliae</i> sur la DL₅₀ et le TL₅₀ des larves de <i>Culex pipiens</i>. D'après nos résultats nous avons constaté que la mortalité des larves évolue avec les doses appliquées et la durée de traitement. Les différentes souches ont été révélées très agressives à l'égard des larves traitées. A partir des quatre souches de <i>Metarhizium anisopliae</i>, douze molécules ont été purifiées et identifiées par le biais de plusieurs techniques chromatographiques (HPLC) et spectroscopiques (LC/MS et LC/MS/MS), il s'agit des toxines (Destruxines). Ces molécules ont présenté des activités insecticides intéressantes vis à vis des larves de <i>Culex pipiens</i>.</p>	
<p>Mots clés : <i>Metarhizium anisopliae</i>, Champignon entomopathogène, Moustiques, <i>Culex pipiens</i>, Activité larvicide, Destruxines.</p>	