

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE  
UNIVERSITE AKLI MOHAND OULHADJ – BOUIRA  
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET DES SCIENCES DE  
LA TERRE  
DEPARTEMENT DE BIOLOGIQUE



Réf : ...../UAMOB/FSNVST/DSA/2023

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME MASTER

Domaine : SNV      Filière : Sciences biologique

Spécialité : Microbiologie appliquée

Présenté par :

LACHACHI Chahinez et MESSOUADI Aicha Rima

*Thème*

**Recherche et identification des champignons  
entomopathogènes locales du groupe des hyphomycètes**

Soutenu le : 02 / 07 /2023 Devant le jury composé de :

<i>Nom et Prénom</i>	<i>Grade</i>		
<i>Mr. Arab A</i>	<i>MCA</i>	<i>Unvi .de Bouira</i>	<i>Président</i>
<i>Mme Hamid S</i>	<i>MCA</i>	<i>Unvi .de Bouira</i>	<i>Promotrice</i>
<i>Mme Messad S</i>	<i>MCA</i>	<i>Unvi .de Bouira</i>	<i>Examinatrice</i>

Année Universitaire : 2022/2023



## Remerciements

Avant tout, je remercie Dieu de tout puissant qui m'a guidé et donné des efforts par effectuer le travail.

Nous commençons par exprimer notre profonde reconnaissance et nos vifs remerciements à Madame **Hamid Sonia** qui nous a honoré en acceptant de diriger ce travail, pour ses encouragements, ses conseils, sa disponibilité et surtout pour sa patience dans l'encadrement de ce mémoire. Nous avons été satisfaits de sa qualité exceptionnelle d'une bonne enseignante, Merci de nous avoir guider avec patience et d'avoir consacré autant d'heures pour les corrections de ce manuscrit, veuillez trouver ici toutes les expressions de notre profonde gratitude et nos sentiments de respect.

Nos remerciements s'étendent également les membres de jury monsieur **Arab Amar** et madame **Messad Sara** Pour leur contribution à l'évaluation de notre travail.

Nos remerciements s'étendent également à tous nos enseignants durant nos études universitaires. Nous remercions tous les membres du « Laboratoire 08 de Microbiologie du l'Université de Bouira »

Nos remerciements vont également à tous ceux qui ont contribué de loin ou de près à la réalisation de ce travail.

*Chahinez*

*Rima*

## *Dédicaces*

*Avec l'expression de ma reconnaissance, je dédie ce modeste travail à ceux qui, quels que soient les termes embrassés, je n'arriverai jamais à leur exprimer mon amour sincère.*

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

*A la femme qui a souffert sans me laisser souffrir, qui n'a jamais dit non à mes exigences et qui n'a épargné aucun effort pour me rendre heureuse, mon adorable maman : **Dalila**.*

*A mon frère, mon héros, **Ahmed**.*

*A mon petit cœur **Abdessamad** et mon prince **Abdallah**.*

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

*En leurs souhaitant le bonheur, la santé et toute la réussite dans la vie.*

*A tous mes cousines et les amis que j'ai connu jusqu'à maintenant. Merci pour leurs amours et leurs encouragements.*

*A mon binôme, aux moments inoubliables passés avec toi **Rima**.*

*A mes meilleures copines : **Nesrine, Nouara**.*

*Et à toute personne qui est loin de moi, mais si proche du cœur.*

*Tout mon amour vous est destiné.*

**Chahinez**

## *Dédicaces*

*A **Papa et Maman**, pour votre amour et votre confiance à chaque moment de ma vie... pour*

*Votre soutien dans les moments les plus difficiles... pour l'éducation et les valeurs que vous*

*Nous avons inculqué. Ces quelques lignes ne peuvent Résumer tout l'amour que je porte dans*

*Mon cœur pour vous.*

*A mes adorables frères et sœurs*

***Amine, Khadîdja, Zakaria et anes** et à ma belle-sœur **soumia***

*A mes chères cousines*

***Nawal, Imane, Yasmine, nesrine, Amina***

*A mon adorable nièce **alea***

*Sans oublier d'exprimer ma profonde gratitude à ma chère binôme **chahinez**, qui ma*

*Réserve toujours compréhension, tendresse et amour.*

*Qui me fait toujours sourire.*

***Rima***

Remerciements	
<i>Dédicaces</i>	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des abréviations	
Introduction générale.....	1

## **Partie I: synthèses bibliographiques**

I. Les moyens de lutte Contre les moustiques .....	5
I.1. Les maladies à transmission vectorielle.....	5
I.1.1. Le Vecteur .....	5
I.1.2. Mode de transmission de l'agent pathogène .....	6
I.1.3. Le système vectoriel.....	6
I.2. Les moustiques.....	10
I.2.1. <i>Culex pipiens</i> .....	10
I.2.2. Distribution géographique et habitat du <i>Culex pipiens</i> .....	11
I.2.3. Alimentation du <i>culex</i> .....	12
I.2.4. Les Stades biologiques des moustiques .....	12
I.2.5. Le processus de développement des moustiques .....	13
I.2.6. Facteurs influencent le développement des moustiques .....	15
I.2.7. Méthode de la lutte biologique.....	15
I.3. La classification des champignons.....	16
I.3.1. Les champignons entomopathogènes.....	16
I.3.1.1. Les deutéromycètes .....	17
I.3.1.2. Les hyphomycètes .....	17
I.3.2. Facteurs impactant la croissance des champignons entomopathogènes .....	18
I.3.3. Les mécanismes d'action des champignons entomopathogènes .....	19
I.3.4. Les champignons entomopathogènes les plus utilisés .....	21
I.3.4.1. <i>Metarhizium anisopliae</i> .....	21
I.3.4.2. <i>Verticillium lecanii</i> .....	22
I.3.4.3. <i>Beauveria bassiana</i> .....	22

## **Partie II: Matériel et méthode**

II. Matériel et méthode .....	25
II.1. Matériel biologique.....	25
II.1.1. Prélèvement du sol.....	25

II.1.2. Matériel entomologique : <i>Culex pipiens</i> .....	25
II.2. Matériel non biologique.....	25
II.2.1. Prélèvement du sol et sites d'isolement .....	25
II.2.2. Analyses physico-chimiques du sol .....	27
II.2.2.1. Mesure du pH des échantillons .....	27
II.2.2.2. Mesure de la conductivité .....	27
II.2.3. Isolement des champignons à partir du sol .....	28
II.2.4. Purification et conservation des souches isolées .....	29
II.2.5. Méthodes d'identification .....	30
II.2.5.1. Observation macroscopique .....	30
II.2.5.2. Identification microscopique .....	31
II.2.6. La collecte des stades pré imaginaires des Culicidés .....	32
II.2.7. Le relevé de l'abondance des souches fongiques isolées.....	33
II.2.7.1. L'élevage des larves .....	33
II.2.7.2. Application des champignons entomopathogènes sélectionnés sur les différents stades aquatiques du <i>Culex pipiens</i> .....	33
II.2.7.2.1. Préparation de la solution fongique.....	33
II.2.7.3. Traitement .....	34
II.2.7.4. Mode d'administration de la suspension fongique.....	35

### **Partie III: Résultats et discussion**

III. Les résultats et la discussion .....	37
III.1. Résultats des analyses physico-chimiques de sol.....	37
III.2. Résultats d'isolement des souches fongiques.....	38
III.2.1. Résultat d'identification morphologique des souches obtenus.....	38
III.2.2. Le relevé d'abondance des souches isolées .....	44
III.3. Le processus de sélection des souches fongiques entomopathogènes .....	47
III.4. Toxicité des champignons entomopathogènes sélectionnés sur les différents stades aquatiques du <i>Culex pipiens</i> .....	47
III.5. Le comportement des stades aquatiques et nymphales du <i>Culex</i> après le traitement .....	49
III.6. Les Effets des trois entomopathogènes <i>Beauveria sp</i> <i>Verticillium sp</i> et <i>Cladosporium sp</i> sur les différents stades aquatiques et les nymphes de <i>Culex pipiens</i> .....	50
Conclusion générale .....	56
Annexes	
Référence Bibliographique	

Liste des figures

Figure 1: Une représentation graphique est présentée, dépeignant de manière explicite un schéma représentatif d'un système vectoriel ..... 7

Figure 2: Les éléments qui exercent une influence sur un système vectoriel.. ..... 7

Figure 3: Morphologie du *Culex pipiens* ..... 11

Figure 4: Les Stades biologiques des moustiques ..... 13

Figure 5: Cycle du développement de *Culex pipiens*..... 14

Figure 6: La systématique des champignons..... 16

Figure 7: Le mécanisme de pénétration des champignons entomopathogènes à travers la cuticule des insectes.. ..... 21

Figure 8: Les Spores de *Beauveria bassiana*. ..... 23

Figure 9: (A) L'agitation de la suspension ;(B) Mesure du pH avec un pH-mètre..... 27

Figure 10: (A) l'agitation de la suspension ;(B) la mesure de la conductivité à l'aide d'un conductimètre. .... 28

Figure 11: (A) Préparation des suspensions dilutions du sol;(B) étalement de 1 ml dans chaque boîte de pétri ;(C) ensemencement à l'aide d'un râteau ;(D) incubation dans l'étuve à 28° pendant 07 jours..... 29

Figure 12: (A) et (B) Les étapes de purification et repiquage des isolats fongiques ; (C) et (D) préparation des tubes sur gélose inclinée pour la conservation. .... 30

Figure 13: Observation sous microscope optique au grossissement (40). ..... 32

Figure 14: La récolte des larves du *Culex pipiens* (dipping). ..... 32

Figure 15: Tri des stades larvaires de *Culex pipiens*. ..... 33

Figure 16: Les étapes de préparation de solution fongique..... 34

Figure 17: Réalisation du traitement de la solution fongique sur les larves et nymphes du *C. pipiens*. ..... 35

Figure 18:Le relevé d'abondance des souches isolées. .... 45

Figure 19: La dynamique de mortalité des larves et des nymphes infectés par champignons *Beauveria sp.* ..... 48

Figure 20: La dynamique de mortalité des larves infectés par champignons *Verticillium sp.*.. 48

Figure 21: La dynamique de mortalité des larves et des nymphes infectés par champignons *Cladosporium sp.* ..... 49

Figure 22: Larves stade II, III et IV de *Culex pipiens* témoins (A) et traitées (B, C, D, E, F) vues sous loupe..... 50

Figure 23: Prolifération du mycélium de couleur vert grisâtre sur les larves de *Culex pipiens* traités à une suspension fongique *Cladosporium sp.* ..... 51

Figure 24: Effet de *Cladosporium sp* sur les différents stades aquatiques de *Culex pipiens*. .. 51

Figure 25: Développement des spores du *Verticillium sp* sur le corps des larves et des nymphes vue sous loupe. .... 52

Figure 26: Témoins (A), Mort de la nymphe après traitement(B), interruption de l'émergence aux différents niveaux (c) vues sous loupe. .... 53

Figure 27: Apparition des ailes atrophiées chez un adulte traité au *Verticillium sp* en comparant avec le témoin..... 53

**Liste des tableaux**

Tableau 1: Les principales maladies à transmission vectorielle avec leurs principales caractéristiques .....	9
Tableau 2: La classification de <i>Culex pipiens</i> .....	11
Tableau 3: Caractéristiques des échantillons du sol utilisés. ....	26
Tableau 4: Les Suspensions fongiques et leur concentration en spores / ml. ....	34
Tableau 5: Paramètres physico-chimiques des échantillons de sol prélevés. ....	37
Tableau 6: Les caractères macroscopique et microscopiques des genres fongiques isolés. ....	41

### Liste des abréviations

MTV : maladies à transmission vectorielle

C : Concentration.

Cm : centimètre

L : Litre

G : Gramme

Ml : millilitre

PH : potentiel d'Hydrogène

% : Pourcentage

°C : Degré Celsius

H : Heure

*Cx* : *Culex*

Sp : Species

Oms : organisation mondiale de la santé

W: Wilaya

*B. bassiana*: *Beauveria bassiana*

OGA: Oxytetracycline-Glucose-Yeast Extract Agar

X : Grossissement.

# **Introduction générale**

### Introduction générale

Les maladies à transmission vectorielles figurent parmi les principales causes de la morbidité et la mortalité pour l'homme et pour les animaux. Leur impact sur la santé publique et l'économie est considérable. La maîtrise de ces pathologies requiert une connaissance approfondie des vecteurs qui les transmettent.

Les vecteurs sont des arthropodes qui ont la capacité de transmettre des maladies infectieuses d'un hôte à un autre, qu'il s'agisse d'animaux ou d'humains. Il s'agit souvent d'insectes hématophages qui ingèrent des micro-organismes pathogènes tels que des bactéries, des parasites ou des virus lorsqu'ils se nourrissent de sang d'un hôte infecté. Par la suite, ces micro-organismes sont réinjectés dans un nouvel hôte lors du prochain repas sanguin. Parmi ces vecteurs, les moustiques sont les mieux étudiés (OMS, 2012).

Les moustiques sont des insectes présents dans presque tous les types de climats à travers le monde, des régions arctiques aux tropiques. Ils ont la capacité de survivre aux hivers rigoureux et aux saisons sèches, en fonction de leur habitat. Selon l'espèce, ils peuvent se reproduire dans diverses sources d'eau, allant des flaques fortement polluées aux eaux propres, des petites accumulations d'eau dans des récipients en étain aux étangs et aux ruisseaux. Leur capacité d'adaptation est remarquable, Parmi les maladies transmises par les moustiques à l'homme, le paludisme (ou malaria) occupe une place prépondérante. Cette maladie touche environ 500 millions de personnes dans le monde et provoque plus d'un million de décès humains chaque année. *L'Anophèles Gambiae* est le principal vecteur du paludisme (Lalami et al., 2009). D'autres maladies transmises par les moustiques comprennent la fièvre jaune, la dengue (qui provoque des fièvres hémorragiques) avec plus de 30 000 décès par an (Boyer, 2006), des arboviroses (causant des hémorragies et des méningo-encéphalites), des filarioses lymphatiques (infections sanguines), divers virus (causant des symptômes grippaux), la maladie de Lyme, le Chikungunya et même la peste porcine. Ces maladies concernent également les animaux, tels que la myxomatose (Schaffner, 2004 ; Himmi, 2007).

La lutte contre ces maladies représente un défi majeur de nos jours. D'une part, il est crucial de comprendre les mécanismes de transmission de la maladie afin de pouvoir contrôler efficacement. Cependant, en raison de leur mode de propagation indirecte, cela s'avère généralement très complexe (Pichard, 2008).

Malheureusement, l'utilisation de pesticides chimiques a entraîné des conséquences néfastes sur l'environnement, telles que la pollution de l'eau, la présence de résidus toxiques

dans les aliments et les effets sur la santé humaine. De plus, elle a réduit le potentiel biologique en entraînant une augmentation de la résistance aux insecticides et en pouvant être toxique pour les prédateurs naturels. C'est pourquoi l'approche biologique est couramment employée pour lutter efficacement contre les principaux arthropodes nuisibles dans les cultures en serre. La lutte biologique repose sur l'utilisation d'organismes vivants pour réduire la densité de population ou l'impact d'un organisme ciblé, le rendant ainsi moins abondant ou moins nuisible que s'il était laissé sans intervention (**Eisenberg et al., 2001**).

Plus de 500 espèces de champignons ont été identifiées comme ayant le potentiel d'être utilisées comme agents de lutte biologique contre les insectes nuisibles (**Sternes et al., 1993**). La plupart voire toutes, ces espèces de champignons entomopathogènes ont un cycle de vie qui est en synchronisation avec les étapes d'infection de l'hôte ainsi qu'avec les conditions environnementales. Parmi les champignons entomopathogènes étudiés, de nombreuses espèces appartiennent à la classe des Zygomycètes, plus précisément à l'ordre des Entomophthorales. Ces champignons sont connus pour leur capacité à causer des infections chez les insectes et sont donc particulièrement intéressants pour les pathologistes en raison de leur fort potentiel dans le contrôle biologique des ravageurs (**Samson et al., 1988**).

Contrairement à d'autres microorganismes, les champignons entomopathogènes ont la capacité de pénétrer à l'intérieur de l'insecte et d'affecter individuellement leur hôte (**Lacey et al., 1996**).

Selon les recherches mycologiques, notamment celles se concentrant sur des champignons tels que *Beauveria bassiana*, *Verticillium lecanii* et divers autres spécimens, leur potentiel prometteur a été mis en évidence. En tant que champignons pour le contrôle biologique (**Wright et al., 2007**), *B. bassiana* et *V. lecanii* sont largement reconnus comme des agents de biocontrôle virulents efficaces contre diverses cultures, forêts et organismes nuisibles domestiques. Ces champignons ont par ailleurs fait la preuve de leur efficacité dans des contextes diversifiés, incluant les écosystèmes arides, les secteurs agricoles ainsi que les environnements forestiers. (**Druart, 2017**).

Dans ce contexte, nous avons réalisé notre travail dont les objectifs visent à :

- ✓ Évalué l'effet entomopathogène des champignons sur les stades aquatique de l'espèce *Culex pipiens*.
- ✓ Évaluer la prépondérance des champignons entomopathogènes dans la régulation des effectifs des insectes.
- ✓ Identifier les caractères généraux des champignons entomopathogènes.

- ✓ Signaler les espèces les plus utilisées dans la lutte biologique.

Ce contexte est composé d'une introduction et trois parties et une conclusion.

La première partie est consacrée aux données bibliographiques sur les maladies à transmission vectorielle et le moustique domestique *Culex pipiens* ainsi que les champignons entomopathogènes (*Metarhizium anisopliae*, *Verticillium lecanii* et *Beauveria bassiana*) et les moyens de lutte contre les moustiques.

La seconde partie présente l'ensemble du matériel et les différentes méthodes utilisées, la troisième partie présente les résultats et les discussions de chaque partie étudiée à savoir l'isolement et caractérisation de souches entomopathogènes locales, toxicité de ces dernières sur les stades aquatiques de *Culex pipiens*, symptomatologie.

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

**Partie I :**  
**Synthèses Bibliographiques**

## I. Les moyens de lutte Contre les moustiques

### I.1. Les maladies à transmission vectorielle

Les maladies à transmission vectorielle sont des affections dans lesquelles un agent pathogène, tel qu'un virus, une bactérie ou un parasite, est transmis d'un individu infecté (un hôte vertébré, qu'il s'agisse d'un humain ou d'un animal) à un autre par le biais d'un arthropode hématophage, comme un insecte ou une tique. Ces maladies, parmi lesquelles figurent le paludisme et la dengue chez l'humain, ont un impact considérable sur la santé à l'échelle mondiale. En effet, elles sont particulièrement sensibles aux changements écologiques qui peuvent altérer la répartition des pathogènes et/ou des vecteurs, favorisant ainsi la propagation de la maladie (OMS, 2004).

#### I.1.1. Le Vecteur

Les trois définitions susmentionnées proviennent de l'ouvrage de référence (Robert, 2017). Selon ce dernier, un vecteur se réfère à tout organisme impliqué dans la transmission d'un agent infectieux, ou à tout arthropode qui assure activement la transmission d'un agent infectieux. De plus, il englobe également tout arthropode hématophage qui joue un rôle actif dans la transmission biologique d'un agent pathogène d'un vertébré à un autre.

Cependant, cette transmission peut simplement être mécanique, sans que le pathogène ne subisse de transformation dans le vecteur. Le rôle du vecteur se limite alors à celui d'une seringue volante. Ce sont les parties buccales du vecteur, contaminées lors d'un repas de sang interrompu sur un hôte infecté, qui transfèrent le pathogène à un hôte sain. Pour cela, le délai entre les deux hôtes doit généralement être très court afin que le pathogène reste viable. Ces conditions nécessitent des circonstances particulières, telles qu'une forte concentration d'hôtes potentiels et de vecteurs dans les mêmes endroits.

La plupart du temps, la transmission est qualifiée de biologique. L'agent pathogène subit un cycle à l'intérieur du vecteur, au cours duquel il peut se multiplier, passer par des stades de reproduction asexuée appelés schizogonie, ou des stades de reproduction sexuée appelés sporogonie. Finalement, le pathogène se retrouve dans un stade infectieux, prêt à infecter un hôte sain lors du prochain repas sanguin du vecteur. On peut citer par exemple le cycle du Plasmodium, l'agent responsable du paludisme, chez son vecteur l'anophèle. Ou encore le cycle du trypanosome chez la glossine ou mouche tsé-tsé, ainsi que celui des filaires chez les simulies, les taons ou les moustiques (Duvallet, 2006).

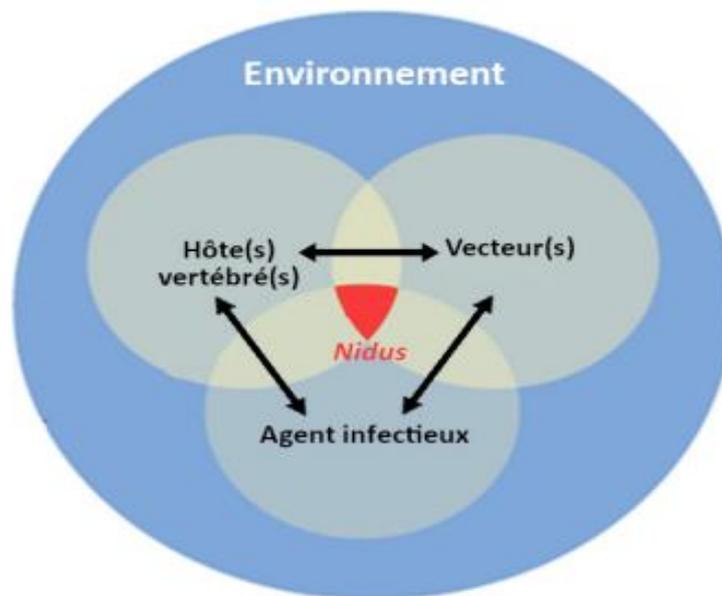
### I.1.2. Mode de transmission de l'agent pathogène

Chez les vertébrés, les vecteurs s'infectent en prélevant un agent pathogène sur un hôte infecté lors de la prise d'un repas sanguin : on parle d'hématophage. Les agents pathogènes utilisent divers modes de transmission pour infecter de nouveaux hôtes, parmi lesquels les plus courants sont les suivants :

- ✓ Injection de salive lors d'une nouvelle piqûre : certains moustiques transmettent des virus et la glossine (ou mouche tsé-tsé) transmettent le parasite responsable de la maladie du sommeil par le biais de leur salive lorsqu'ils piquent.
- ✓ Déjections : par exemple, le parasite responsable de la maladie de Chagas est transmis par les déjections de certains insectes.
- ✓ Régurgitation : les puces transmettent la bactérie responsable de la peste (*Yersinia pestis*) lorsqu'elles régurgitent. (**Johanna, 2018**).

### I.1.3. Le système vectoriel

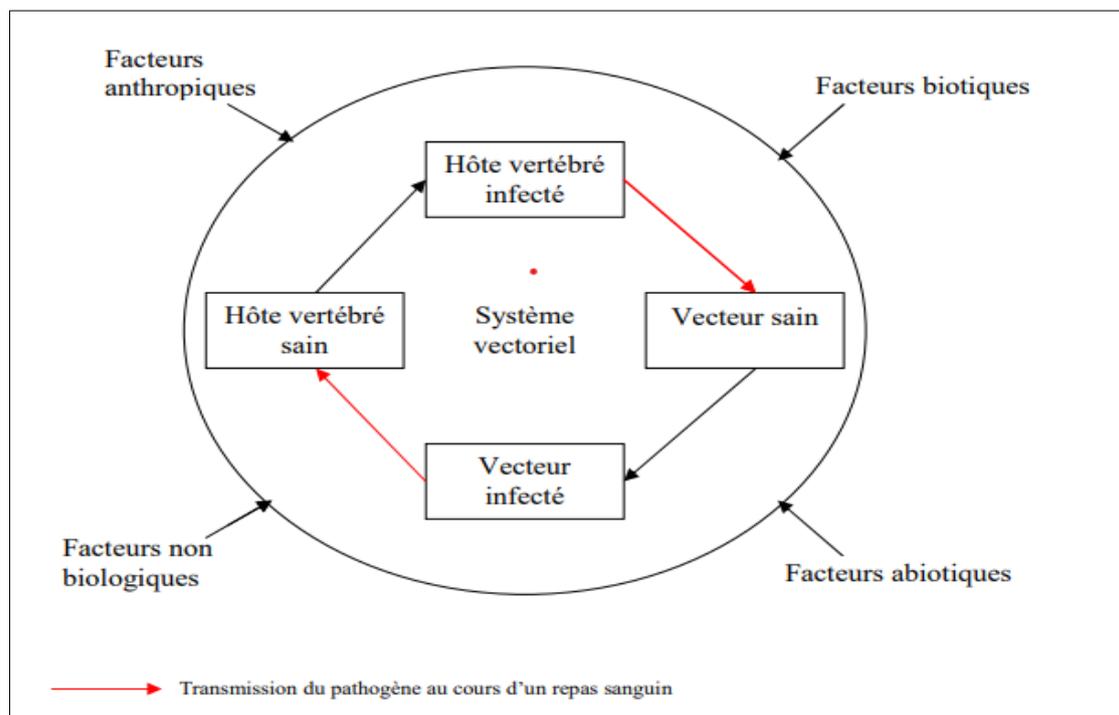
Afin que la transmission vectorielle d'un agent infectieux puisse s'effectuer, il est essentiel que les hôtes, les vecteurs et les agents infectieux interagissent au sein d'un environnement propice, comme mentionné par **Reisen (2010)**. Ces trois acteurs, à savoir les hôtes, les vecteurs et les agents infectieux, constituent la triade vectorielle. De plus, cette triade, en conjonction avec l'environnement dans lequel elle évolue et l'ensemble des interactions entre les acteurs et l'environnement, forme le système vectoriel dans son ensemble, comme illustré dans la Figure 01.



**Figure 1:** Une représentation graphique est présentée, dépeignant de manière explicite un schéma représentatif d'un système vectoriel (**Reisen, 2010**).

Les systèmes vectoriels sont influencés par divers facteurs.

Divers facteurs sont susceptibles d'exercer une influence sur le cycle épidémiologique d'une maladie à transmission vectorielle en affectant l'un ou plusieurs des éléments essentiels du cycle, notamment l'agent pathogène, le vecteur ou l'hôte.



**Figure 2:** Les éléments qui exercent une influence sur un système vectoriel (**Amandine, 2008**).

La figure illustre de manière explicite comment les différents acteurs d'un système vectoriel sont soumis à l'influence de facteurs biologiques. Parmi ces facteurs, il convient de souligner :

Les facteurs biotiques : Les activités humaines, la prédation et la compétition entre espèces exercent une influence sur l'abondance des populations de vecteurs et d'hôtes.

Les facteurs abiotiques : Le climat, incluant des paramètres tels que la température, l'humidité et les précipitations, joue un rôle essentiel dans la survie, l'abondance et la reproduction des vecteurs, ainsi que dans la durée d'incubation des agents pathogènes.

Il est également important de souligner que des facteurs non biologiques exercent une influence significative sur le système vectoriel, comme relevé par **Randolph (2003)**. Parmi ces facteurs, on peut mentionner les voyages, les transports, le commerce, les comportements humains, l'occupation du territoire, les conditions socio-économiques et politiques, ainsi que les activités de santé publique.

Par conséquent, toute modification de ces facteurs peut avoir des répercussions positives ou négatives sur le cycle de transmission d'un agent pathogène au sein d'un système vectoriel. Concernant spécifiquement le vecteur, tous les facteurs mentionnés précédemment peuvent influencer l'abondance de sa population, ses préférences écologiques et trophiques, sa longévité, sa reproduction et sa dispersion géographique (**Gubler et al., 2001**).

Dans le contexte de la transmission vectorielle, une grande diversité d'agents infectieux peut être transmise, tels que des virus, des bactéries, des protozoaires et des métazoaires. Bien que ces agents soient toujours infectieux, ils ne sont pas toujours pathogènes. Certains "parasites" sont remarquablement bien tolérés par leurs hôtes transmis, qui ne présentent aucun signe ni symptôme de la maladie. Les hôtes peuvent être des humains ou des animaux, parfois même les deux dans le cas des zoonoses. La liste des maladies humaines qui se transmettent par vecteur est considérable. Un aperçu de ces maladies est présenté dans le tableau. 01 :

**Tableau 1:** Les principales maladies à transmission vectorielle avec leurs principales caractéristiques (Kimberly et al., 2020).

Le vecteur	La maladie	L'agent Pathogène	Le mode De Contamination	Les Symptômes
Moustiques Genre <i>Aedes</i>	Fièvre jaune	Virus	Piqûre	La fièvre ; La myalgie (surtout dans le dos) ; Les frissons ; Les maux de tête.
Moustiques Femelles Anophèles	Malaria	Parasites	Piqûre	La fièvre, des frissons, des sueurs, Des maux de tête, des nausées et des vomissements, des douleurs corporelles et un malaise général.
Moustiques Genre <i>Culex</i>	Encéphalite Japonaise	Virus	Piqûre	Les maux de tête ; La fièvre ; Des vomissements.
Moustiques Genre <i>Culex</i>	Fièvre à West Nile	Virus	Piqûre	La fièvre, des céphalées, Une asthénie, des douleurs, des nausées, des vomissements et, à l'occasion, une éruption cutanée (Sur le tronc) et une adénopathie (gonflement des ganglions).
Phlébotomes	Leishmaniose	Parasite	Piqûre	La leishmaniose viscérale : Caractérise par des accès de fièvres irrégulières, Une perte de poids, Une hépatomégalie, Une splénomégalie et une anémie. La leishmaniose cutanée : de lésions cutanées et D'ulcères, soumettant la personne infectée à des Cicatrices permanentes. La leishmaniose cutanée : entraîne une Destruction partielle ou complète des muqueuses du Nez, De la bouche et de la gorge.
Les tiques	La maladie de Lyme	Bactérie <i>Borrelia</i>	Piqûre	Fièvre, de frissons, de maux de tête, de fatigue Et de douleurs musculaires et articulaires. L'infection Peut s'étendre aux articulations, au cœur et au Système nerveux central, provoquant de l'arthrite.

La mouche <i>Tsé-tsé</i>	Maladie du sommeil (trypanosomiase africaine)	Parasite	Piqûre	La fièvre, l'hypertrophie des ganglions lymphatiques Et les douleurs articulaires.
Moustiques <i>Culex</i>	La Filariose lymphatique	Parasite	Piqûre	Un éléphantiasis des membres ; Ou à une hydrocèle ; Un lymphœdème.

## I.2. Les moustiques

Les moustiques sont largement reconnus comme étant les principaux vecteurs de maladies. En plus d'être une source de nuisance avec leurs piqûres douloureuses et gênantes, ils jouent également un rôle essentiel dans la transmission de maladies parasitaires (Carnevale et Robert, 2009).

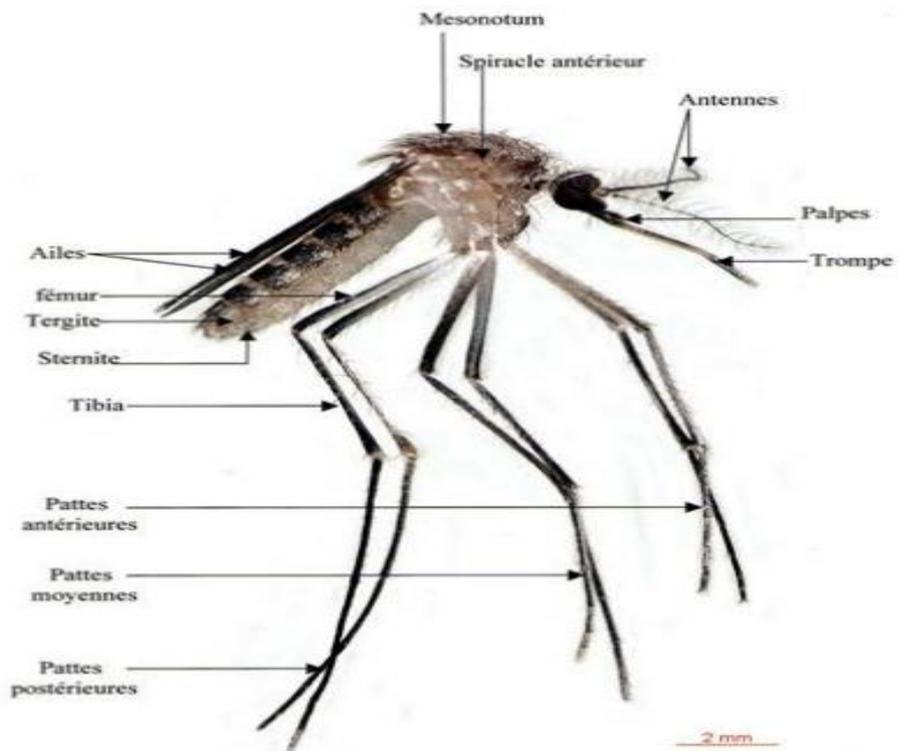
### I.2.1. *Culex pipiens*

Le *Culex pipiens*, désigné sous le nom de maringouin, représente une espèce de moustique faisant partie de la famille des Culicidae. Les Culicidés, insectes ailés holométaboles, font partie du phylum Insecta et Arthropoda. Ces derniers présentent trois paires d'appendices locomoteurs. Étant classés dans l'ordre des Diptères, ils sont munis d'une unique paire d'ailes mésothoraciques, tandis que la deuxième paire se transforme en halteres (Aouati, 2016).

La classification des moustiques englobe près de 3200 espèces et environ 40 genres, qui se trouvent largement réparties dans pratiquement toutes les régions du globe (Coutin, 1988). Ils résident à la fois dans des milieux naturels et urbains (Fondje et al., 1992). La famille des moustiques est subdivisée en trois sous-familles : les Toxorhynchitinae, la sous-famille des Anopheles et la sous-famille des Culicidae (Brunhes et al., 1999).

Le *Culex pipiens* est une espèce variée et abondante pendant les saisons estivales et automnales. Les femelles adultes se réfugient dans des caves, des écuries, des terriers et d'autres abris naturels pour hiberner. Elles déposent leurs œufs à la surface de l'eau, avec une moyenne de 240 à 340 œufs par récipient, dont environ 30 à 40 sont spontanés. Les larves se développent dans des eaux fortement contaminées par des matières organiques, telles que les fosses septiques, les mares improvisées en périphérie des villes, etc. Elles peuvent également être présentes dans les habitations où de l'eau propre est disponible. Les femelles piquent les animaux à sang chaud, en particulier pendant la nuit, et se nourrissent également à l'intérieur

des habitations. Cette espèce joue le rôle de vecteur pour des virus tels que le virus du Nil occidental et le Plasmodium aviaire, et est sensible au virus du tahini (Schaffner et al., 2001).



**Figure 3:** Morphologie du *Culex pipiens* (Boukraa, 2010).

Selon Brunhes et al., 1999, l'espèce *Culex pipiens* est classée comme suit :

**Tableau 2:** La classification de *Culex pipiens* (Brunhes et al., 1999).

Règne	Animalia
Sous-règne	Metazoa
Embranchement	Arthropoda
Sous-embranchement	Hexapoda
Classe	Insecta
Sous-classe	Pterygota
Sous-ordre	Nematocera
Famille	Culicidae
Genre	<i>Culex</i> (Linné, 1758)

### I.2.2. Distribution géographique et habitat du *Culex pipiens*

Le *Culex pipiens* est largement utilisé dans les régions tempérées d'Afrique, d'Europe, d'Asie, d'Amérique et d'Australie (Farajollali et al., 2015). En Algérie, il est l'espèce de moustique la plus courante, présente dans de nombreux endroits, en particulier en milieu

urbain (**Berchi et al., 2012**). La répartition des moustiques est activée par leurs habitats larvaires respectifs : les moustiques anophèles, qui se développent dans les zones côtières, préfèrent les eaux salées ou saumâtres. Les moustiques *Aedes*, quant à eux, préfèrent les eaux douces des rivières. Le *Culex pipiens* se développe dans des eaux claires et propres, tandis que le *Culex pipiens* peut se développer dans des eaux polluées, comme les égouts ou les regards (**Rodhaine et Perez, 1995**).

### **I.2.3. Alimentation du *culex***

Les femelles moustiques se nourrissent principalement de sang, ce repas sanguin étant essentiel pour la ponte des œufs, tandis que Les individus mâles se sustentent en se nourrissant de la sève des végétaux. Les larves se nourrissent de débris organiques et d'organismes microscopiques tels que les algues et les bactéries. À l'aide des mouvements de leur bouche, elles créent suffisamment de courant pour absorber ces éléments. Différentes espèces de moustiques se distinguent par leurs préférences alimentaires : zoophiles (piquant les animaux), anthropophiles (piquant les humains), zoo-anthropotropes (piquant les animaux et les humains), exotopes (piquant à l'extérieur) ou endophiles (piquant à l'intérieur des habitations) (**Himmi, 2007**).

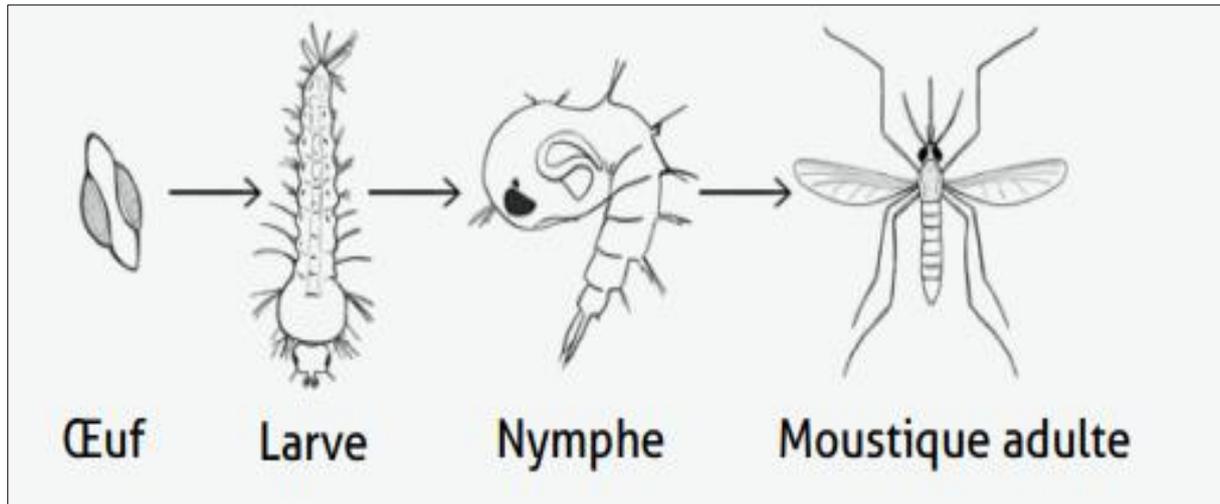
### **I.2.4. Les Stades biologiques des moustiques**

**Œuf :** Après avoir pris un repas sanguin, la femelle adulte du moustique pond entre 50 et 300 œufs lors d'une seule ponte, généralement dans un délai d'un ou deux jours. Tout au long de son existence, elle est capable de déposer individuellement jusqu'à 800 à 1000 œufs. Ces œufs sont soigneusement déposés à la surface de l'eau et elles sont libérés de flotteurs de chaque côté. Ils ne peuvent pas survivre en cas de sécheresse et éclosent en 2 à 3 jours.

**Larve :** Chaque œuf donne naissance à une larve qui flotte près de Afin de satisfaire ses besoins respiratoires, elle se maintient à la surface de l'eau. Elle se nourrit des particules présentes dans ce milieu aqueux. Au stade initial, la larve présente une taille d'environ 1 mm, mais elle connaît trois mues successives avant d'atteindre une taille d'environ 5 mm lors de sa quatrième phase de développement. Les larves peuvent être observées dans divers habitats, mais la majorité des espèces privilégient les eaux claires et non polluées. Une fois qu'elles atteignent le quatrième stade, les larves se transforment en nymphes.

**Nymphe :** La nymphe présente une forme en virgule lorsqu'elle se manifeste de côté. Comme la larve, la nymphe doit remonter régulièrement à la surface de l'eau pour respirer grâce à des trompettes respiratoires placées sur son céphalothorax. Après quelques jours, les moustiques

adultes émergent du stade nymphal. En général, Le cycle entier du moustique, depuis l'éclosion de l'œuf jusqu'à l'émergence de l'adulte, s'étend sur une période allant de 9 à 20 jours.



**Figure 4:** Les Stades biologiques des moustiques (Clements, 1999).

**L'adulte :** Le moustique adulte est un insecte de taille mince et allongée, entre 5 et 10 mm de long. Il présente généralement une couleur brun clair et est dotée de pattes longues et fines (Blenghien, 2007). Son corps se compose de trois parties bien définies : la tête, le thorax et l'abdomen (Rodhain et Perez, 1985).

#### **1.2.5. Le processus de développement des moustiques**

Le cycle de développement des moustiques se caractérise par une métamorphose complète (holométabole), se déroulant en deux phases bien différenciées :

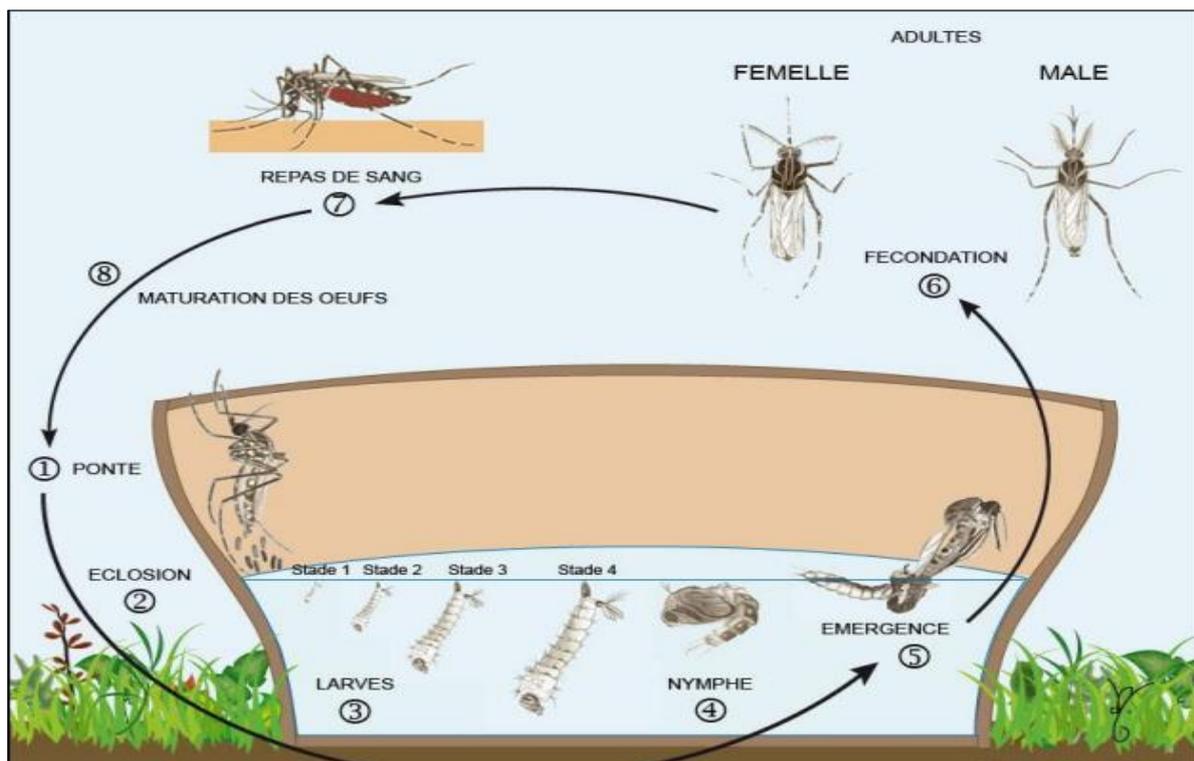
La première phase, appelée phase aquatique, englobe l'éclosion de l'œuf, les différents stades larvaires et la période de nymphe.

La seconde phase, nommée phase aérienne, concerne l'émergence de l'adulte, également connu sous le nom d'imago, qui possède des ailes fonctionnelles.

La phase aquatique du développement des moustiques se déroule selon une séquence précise : peu de temps après la fécondation, les œufs de *Culex pipiens* sont déposés perpendiculairement à la surface de l'eau, formant une structure en forme de nacelle, comme décrit par Benkalfate (1991). Après l'éclosion des œufs, les larves se forment et traversent quatre stades distincts, séparés par trois mues successives. La durée de cette phase larvaire varie en fonction de l'espèce de moustique, de la température ambiante, de la densité des larves et de la disponibilité de Nourriture. Après environ six à dix jours, voire plus, la

quatrième mue marque le passage à la phase de nymphe, également connue sous le nom de nymphose. Cette étape dure généralement de 1 à 3 jours, pendant laquelle la nymphe ne se nourrit pas, conformément aux observations de **Himmi et al., (1995)**. À la fin de cette période, la nymphe s'étire, son exosquelette se fend dorsalement, et progressivement, le moustique adulte émerge de l'exuvie dans un processus connu sous le nom d'émergence. (**Rodhain et Perez, 1985**).

La phase aérienne du développement des moustiques se déroule de la manière suivante : une fois éclos, les moustiques adultes demeurent à la surface de l'eau, où ils gagnent en force jusqu'à ce qu'ils soient capables de prendre leur envol et de rechercher leur source de nourriture. (**Bezzaoui, 2013**). Dès leur émergence, aussi bien les mâles que les femelles s'alimentent en se nourrissant de nectar. Les mâles sont attirés par les fréquences sonores et les phéromones émises par les femelles. Peu de temps après leur émergence, l'accouplement a lieu lors d'un vol en essaim à proximité des sites de reproduction des larves. (**Lefèver et al., 2003**).



**Figure 5:** Cycle du développement de *Culex pipiens* (**Guilaumot, 2005**).

La femelle ne s'accouple qu'une seule fois au cours de sa vie (**Darriet, 1998**). Après l'accouplement, la femelle stocke les spermatozoïdes dans un organe spécialisé appelé la spermathèque. Pour le développement de ses ovaires et la maturation des follicules, la femelle a besoin de se nourrir de sang en prenant un repas sanguin. (**Thierry, 2011**). Après la

fécondation, la femelle recherche un site de ponte approprié pour assurer le développement de ses larves. La ponte a généralement lieu au crépuscule. En automne, les femelles cherchent un abri où elles peuvent passer plusieurs mois sans se nourrir, un phénomène appelé diapause. Pendant cette période, elles peuvent survivre en utilisant les réserves lipidiques libérées à partir des sucres végétaux. Au printemps, elles sortent de leur période de repos et recommencent à se nourrir de sang. **(Rességuier, 2011)**.

#### **I.2.6. Facteurs influencent le développement des moustiques**

Plusieurs facteurs influencent le développement des moustiques. Ils ont une préférence pour les températures chaudes, bien que celles-ci ne doivent pas être excessivement élevées. On a observé que les œufs ne se transforment pas en larves en cas de temps froid, et ils n'éclosent pas non plus lorsque la température dépasse les 30°C. La prolifération des moustiques est favorisée par différents éléments essentiels tels que la température ambiante, le pH de l'eau, la nature et l'abondance de la végétation aquatique, ainsi que la faune associée. **(Kpondjo, 2008)**.

#### **I.2.7. Méthode de la lutte biologique**

La lutte biologique par le recours à des micro-organismes entomopathogènes constitue une méthode prometteuse en vue d'assurer une protection phytosanitaire efficace. Cette approche exploite les agents microbiologiques naturellement présents dans les écosystèmes, caractérisés par leur diversité, leur capacité de dissémination, leur spécificité d'action et leur persistance dans l'environnement. **(Ahmed et Leather, 1994)**.

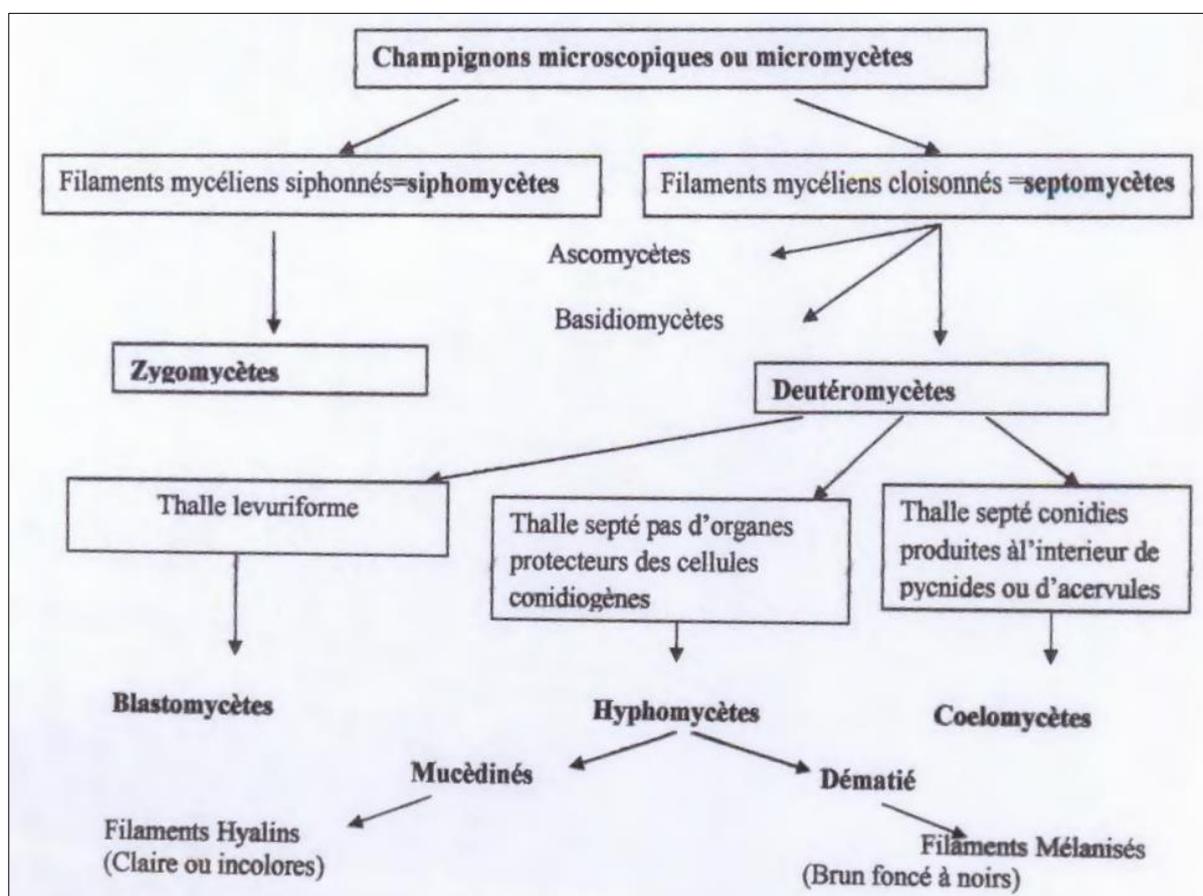
Les micro-organismes utilisés dans cette lutte microbiologique comprennent différentes catégories taxonomiques, telles que les virus, les bactéries, les microchampignons, les nématodes et les protozoaires. Jusqu'à présent, des milliers de micro-organismes entomopathogènes et pathogènes pour les mauvaises herbes ont été identifiés, dont plus d'une centaine d'espèces sont utilisées sur le terrain **(Ignoffo et al., 1977)**.

En utilisant des micro-organismes comme agents de lutte biologique, il devient possible de contrôler de manière spécifique et respectueuse de l'environnement les ravageurs et les mauvaises herbes. Cette approche présente de nombreux avantages grâce à la présence naturelle des agents microbiologiques dans les écosystèmes, favorisant leur dissémination aisée et leur persistance à long terme **(Pintureau, 2009)**.

En résumé, la lutte biologique qui fait appel aux micro-organismes entomopathogènes se révèle une alternative prometteuse pour garantir une protection phytosanitaire, en exploitant les propriétés spécifiques efficaces de ces agents microbiologiques (Anes, 2011).

### I.3. La classification des champignons

La classification établie par **Hawksworth, Sutton et Ainsworth (1970)**, ultérieurement modifiée par **Kwon Chung et Bennett (1992)**, puis par **De Hoog (1995)**, est actuellement largement adoptée. Selon ces éminents chercheurs, les champignons sont regroupés en quatre classes principales : les Ascomycètes, les Basidiomycètes, les Deutéromycètes et les Zygomycètes.



**Figure 6:** La systématique des champignons (selon Botton et al., 1990).

#### I.3.1. Les champignons entomopathogènes

Les champignons entomopathogènes désignent des agents pathogènes eucaryotes qui ont la capacité d'infecter les insectes et de provoquer des maladies chez eux. Ils font partie intégrante des pathogènes d'insectes connus sous le nom d'entomopathogènes, comprenant également les bactéries telles que *Bacillus thuringiensis* et *B. sphériques*, les protozoaires tels que les *Amoebidea*, ainsi que les virus tels que *l'Entomopox virus*.

Les champignons entomopathogènes se distinguent en tant qu'organismes eucaryotes dotés de noyaux, d'organites bien définis et d'une paroi cellulaire composée de chitine. Leur existence peut prendre forme de cellules individuelles, mais plus fréquemment, elles se manifestent sous la forme de filaments appelés hyphes, lesquels s'entremêlent pour constituer un réseau complexe nommé mycélium. Les cellules sont disposées le long de ces hyphes. La reproduction des champignons entomopathogènes s'effectue par la formation de spores, qu'elles soient de nature sexuée ou asexuée (**Humber, 1997 ; Tzean et al., 1997**).

#### **I.3.1.1. Les deutéromycètes**

Les deutéromycètes, également connus sous le nom de champignons imparfaits, constituent une classe polyphylétique de champignons. Cette classe regroupe un grand nombre d'espèces d'intérêt médical et utilisées dans la lutte biologique. Les deutéromycètes sont très diversifiés, se présentant sous forme unicellulaire ou sous forme de filaments septés. Leur mode de reproduction asexuée se caractérise par la formation externe de spores, En général, la reproduction des champignons entomopathogènes s'effectue par bourgeonnement à partir d'une cellule spécialisée connue sous le nom de cellule conidiogène. Ces organismes produisent des spores asexuées, communément appelées conidies (**Bedossa, 2002 ; Chabasse et al., 2002**).

#### **I.3.1.2. Les hyphomycètes**

Les hyphomycètes sont des champignons filamenteux, stériles ou produisent des spores directement sur les hyphes ou sur des conidiophores simples ou agrégés sur deux types d'opposition hyphomycètes : les hyalins ou clairs (hyalohyphomycètes) appartenant à la famille des *Moroniaceae* et les foncés ou noirs s'appelés Dématies ou phaeohyphomycètes apparentant à la famille des *Dématricée* (**Botton, 1990 ; Chabasse et al., 2002**). Les conidies sont des cellules banales ou des cellules spécialisées souvent portées par un filament différencié ou par le conidiophore Certaines Hyphomycètes (*Rhizoctonia*, *Sclerotium*) jamais forment des spores ; ils sont classés dans le groupe *Micelia sterilia*. Chez les Hyphomycètes, les conidiospores et les cellules conidiogènes peuvent se présenter dispersées, agrégées en faisceaux ou en forme de coussin (*sporodochies*). Les spores peuvent être :

- ✓ Des chlamydospores : spores de résistance, souvent à paroi épaisse, terminales ou intercalaires, différenciées par transformation de cellules du mycélium (*Trichoderma*, *Fusarium*).

- ✓ Des arthrospores (arthroconidies) : formes par fragmentation d'hyphes non différenciées. Des conidies proprement dites, souvent bourgeonnées par des cellules spécialisées nommées phialidies. (**Botton et al., 1990**).

Les Caractéristiques peuvent varier et peuvent sur tout changer avec les conditions de croissance et de maturité de ces champignons (**Von Arx, 1986**). Les champignons entomopathogènes sont très répons dans l'environnement naturel, il est plus de 700 espèces de microchampignons sont entomopathogènes. Ils provoquent des infections chez un large éventail d'insectes et des acariens. Ils produisent des spores qui infectent leur hôte insecte par germination sur sa surface, puis de plus en plus dans son corps (**Starnes et al., 1993**).

La mort prend entre 4 et 10 jours selon le type de champignons et le nombre de spores sur le cadavre qui se dispersent et continuent leur cycle de vie sur les nouveaux hôtes. Ils jouent un rôle important dans la régulation naturelle des populations. Ils produisent des spores qui infectent leur hôte insecte par germination sur sa surface, puis de plus en plus dans son corps (**De Kouassi, 2001**).

La mort prend entre 4 et 10 jours selon le type de champignons et le nombre de spores sur le cadavre qui se dispersent et continuent leur cycle de vie sur les nouveaux hôtes. Ils jouent un rôle important dans la régulation naturelle des populations d'insectes. Ils produisent des spores qui infectent leur hôte insecte par germination sur sa surface, puis de plus en plus dans son corps. La mort prend entre 4 et 10 jours selon le type de champignons et le nombre de spores sur le cadavre qui se dispersent et continuent leur cycle de vie sur les nouveaux hôtes. Ils jouent un rôle important dans la régulation naturelle des populations d'insectes (**Wraight et Roberts, 1987**).

### **I.3.2. Facteurs impactant la croissance des champignons entomopathogènes**

L'impact de la lumière sur le développement et la progression de la croissance des champignons entomopathogènes est notable, que ce soit par la destruction photochimique des composants du milieu ou par son impact direct sur le développement fongique lui-même (**Patrick, 1996**). Les radiations ultraviolettes constituent le principal facteur abiotique qui restreint la survie des spores fongiques présentes sur les feuilles. L'exposition aux rayonnements peut engendrer des conséquences significatives sur la mortalité des larves d'*Ostrinia nubilalis*, un nuisible du maïs, causée par les isolats de *B. bassiana*, en perturbant leurs caractéristiques physiologiques (**Cagani et Svercel, 2001**).

Le pH joue un rôle crucial dans la croissance des champignons, car il peut influencer leur développement de deux manières principales. Tout d'abord, le pH peut avoir un effet indirect en modifiant la disponibilité des éléments nutritifs dans le milieu environnant. Ensuite, il peut

agir directement sur la membrane cellulaire des champignons. De plus, le métabolisme des champignons peut influencer le pH en utilisant les anions ou les cations présents dans leur environnement, ou en produisant des acides organiques et de l'ammoniac. Ces mécanismes de régulation du pH. Il est primordial de considérer cette variable lors de la culture et de l'analyse des champignons. (**Jaronski et Goettel, 1997**).

La température est un élément crucial de l'environnement qui exerce une influence significative sur le développement des champignons entomopathogènes, tels que les Hyphomyces, ainsi que sur la germination et la sporulation des spores des entomophthorales. Les spores de ces derniers semblent être plus sensibles aux variations de température que celles des deutéromycètes. Chaque champignon possède une plage de température optimale spécifique qui favorise sa survie, et cette plage peut varier en fonction des taxons. En règle générale, la plupart des champignons entomopathogènes préfèrent des températures situées entre 25 et 30°C. Au-delà de 35°C, La progression et l'évolution de ces champignons dans leur croissance et leur développement sont entravés, bien que certaines espèces thermotolérantes puissent tolérer des températures allant jusqu'à 50°C (**McCoy et al., 1990 ; Luis et Toñi, 1999**).

L'humidité du sol est un facteur déterminant pour l'augmentation de l'infection racinaire par Phytophthora. Cette augmentation est directement liée à un volume d'eau plus élevé dans le sol (**Workneh et al.,1993**).

### **I.3.3. Les mécanismes d'action des champignons entomopathogènes**

Le champignon entomopathogène parvient à infecter l'insecte par un contact direct, sans nécessiter une ingestion par l'hôte pour initier l'infection. Le processus d'infection de ce champignon peut être divisé en quatre phases distinctes, à savoir l'adhésion, la germination, la différenciation et la pénétration. L'observation et l'étude de ces différentes phases ont été réalisées à l'aide de la microscopie électronique.

**La phase d'adhésion :** La phase préliminaire primordiale du processus d'infection des champignons entomopathogènes réside dans la formulation initiale, étape qui se caractérise par un mécanisme intrinsèquement complexe de reconnaissance et de compatibilité entre les conidies fongiques et le tégument de l'insecte cible. Au niveau moléculaire, cette étape implique une interaction spécifique entre les récepteurs présents sur le tégument de l'insecte, principalement des glycoprotéines, et les conidies du champignon. Ces interactions spécifiques facilitent une adhésion précise et efficace des conidies à la surface de l'insecte. Ceci permet au champignon de tisser des liens étroits avec son hôte, favorisant ainsi la

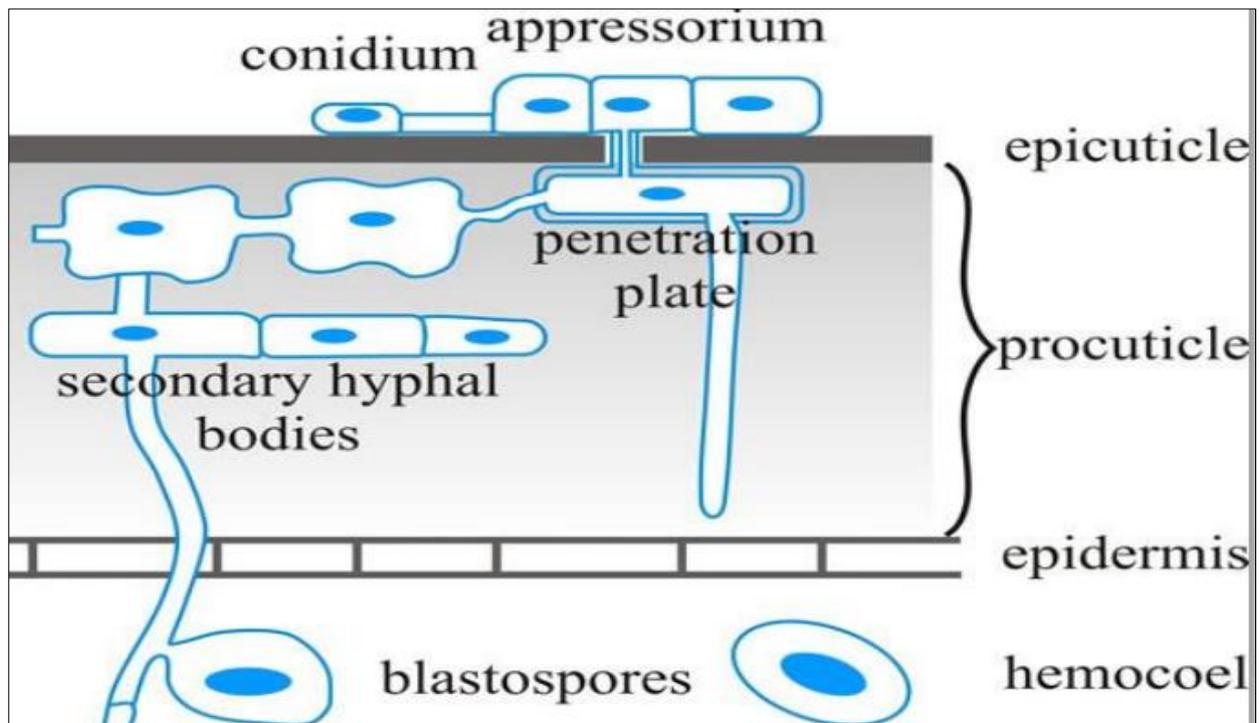
préparation préliminaire des conditions propices à l'avancement des étapes subséquentes de l'infection. La phase d'adhésion est essentielle pour assurer la fixation et la stabilité des conidies sur l'insecte, constituant ainsi le point de début de l'infection fongique (**Tanada et Kaya, 1993 ; Vey et al., 1982**).

**La phase de germination** : constitue la deuxième étape du processus d'infection des champignons entomopathogènes. Au cours de cette phase, le champignon se multiplie rapidement en formant des bourgeons ou en procédant à des scissions des hyphes, Cela entraîne la génération disséminée de cellules lévuriformes à travers l'organisme de l'insecte, un phénomène qui découle de la germination des conidies. Cette germination est tributaire de multiples facteurs, dont les conditions environnementales et la physiologie de l'hôte, notamment la composition biochimique de sa cuticule. En effet, ladite cuticule peut agir comme un catalyseur ou un frein à la germination des conidies, selon sa composition chimique spécifique. Certaines composantes présentes dans la cuticule peuvent ainsi favoriser l'éclosion, tandis que d'autres peuvent exercer une action inhibitrice. Cette étape de germination revêt une importance cruciale car elle permet au champignon de se multiplier à l'intérieur de l'insecte et de se préparer aux phases ultérieures de différenciation et de pénétration (**Ferron et al., 1996**).

**La phase de différenciation** : est une étape cruciale du processus d'infection des champignons entomopathogènes. Pendant cette phase, la spore germée se développe pour former une structure spécialisée appelée appressorium. L'appressorium occupe une position primordiale, remplissant un rôle essentiel en tant que point d'ancrage sur la surface de l'insecte, tout en étant responsable de l'amollissement de la cuticule. Cette fonction cruciale facilite ainsi la pénétration de la spore à travers cette barrière protectrice. La formation de l'appressorium dépend de la valeur nutritionnelle de la cuticule de l'insecte hôte, c'est-à-dire de la disponibilité des nutriments nécessaires à la croissance et au développement du champignon. La capacité du champignon à former des appressoria est donc influencée par la composition biochimique spécifique de la cuticule de l'insecte. Cette phase de différenciation est essentielle car elle permet au champignon de préparer le chemin pour la pénétration dans l'insecte et l'établissement d'une infection réussie (**Magalhaes et al., 1989**).

**La phase de pénétration** : La phase de pénétration des microchampignons à l'intérieur de l'hôte représente un processus de grande complexité, nécessitant la traversée de la barrière protectrice formée par la cuticule de l'insecte. La cuticule, qui constitue la couche externe de l'insecte, présente une structure complexe ainsi qu'une composition chimique qui confèrent

une résistance accrue à la pénétration fongique. Plus particulièrement, l'épicuticule, composante essentielle de la cuticule, joue un rôle crucial dans la formation de cette barrière protectrice. (Andersen, 1979 ; Oudard, 1999).



**Figure 7:** Le mécanisme de pénétration des champignons entomopathogènes à travers la cuticule des insectes (Clarkson et Charmley, 1996).

### I.3.4. Les champignons entomopathogènes les plus utilisés

#### I.3.4.1. *Metarhizium anisopliae*

*Metarhizium anisopliae*, qui fut le tout premier pathogène à être intentionnellement utilisé pour la lutte contre les ravageurs des cultures, a été découvert et utilisé par le scientifique russe Élie Metchnikoff. Considéré comme le père de la lutte microbiologique, Metchnikoff a initié cette utilisation dès les années 1880.

Au fil des années, la classification de *Metarhizium anisopliae* a connu plusieurs révisions. Historiquement, cette espèce était principalement classée dans la division des Deutéromycètes, au sein de la classe des Hyphomycètes. Cette classe regroupe des champignons qui produisent rarement, voire jamais, des spores sexuées. Les Hyphomycètes se distinguent par la présence de structures mycéliennes portant des conidies, des spores asexuées, produites par des cellules conidiogènes spécialisées. La classification de ce genre, incluant *Metarhizium anisopliae*, reposait principalement sur des caractéristiques morphologiques des cellules et des conidies. Cependant, ces caractéristiques morphologiques

présentent souvent des limites, ce qui a rendu la taxonomie de ce genre complexe (**Bidochka et Small, 2005**).

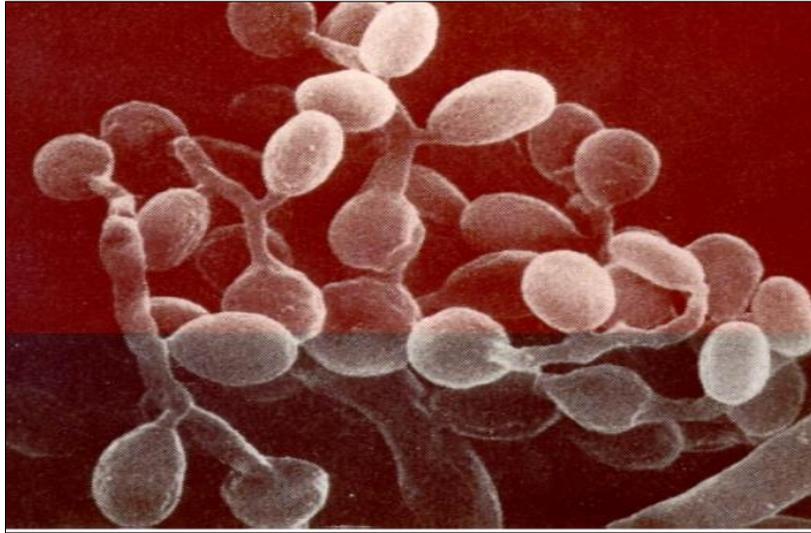
#### **I.3.4.2. *Verticillium lecanii***

La spécificité du genre *Verticillium* réside dans la présence de conidiophores rigoureusement verticillés, accompagnés de phialides allongées. Il est également possible d'observer des pénicilles similaires, dotés de phialides longues et verticillées. *Verticillium lecanii* se distingue par un thalle de croissance floconneux, d'une teinte blanche à jaune pâle, et un revers dépourvu de couleur ou teinté de jaune foncé. Les phialides se présentent soit de manière isolée, soit en verticilles, et sont estimées à environ 12-40 µm de longueur pour 1-3 µm de largeur. Les conidies, quant à elles, sont de forme elliptique à cylindrique, mesurant entre 2,5 et 10 µm de longueur et de 1 à 1,25 µm de largeur. Il convient de noter que ce champignon n'est pas susceptible de produire des chlamydospores (**Button et al., 1990**).

#### **I.3.4.3. *Beauveria bassiana***

Les différentes espèces du genre *Beauveria* se distinguent par la formation de colonies floconneuses de teinte blanche à jaunâtre. Les conidies, également connues sous le nom de spores, sont portées par de longs filaments composés d'hyphes transparents et segmentés, dont le diamètre varie entre 2,5 et 25 µm. En présence d'oxygène, ce champignon a engendré des conidiospores de forme sphérique ou ovale. Cependant, en milieu sans oxygène, il produit des blastopores de forme ovale, comme indiqué dans les travaux de **Weiser (1972)** et **Lipa (1975)**.

La reproduction du champignon *Beauveria bassiana* s'effectue par voie végétative. Initialement, les cellules conidiogènes se trouvent soit isolées, soit regroupées en petits bouquets comprenant de 2 à 5 éléments, le long des filaments végétaux ou sur de courtes ramifications. Ces cellules conidiogènes, qui se forment rapidement en amas denses, présente une partie inférieure légèrement élargie, supposée environ 3 à 6 µm de longueur sur 2,5 à 3,5 µm de largeur. Leur aspect peut être plus ou moins anguleux. Les conidies du champignon *Beauveria bassiana* sont unicellulaires, transparentes et lisses. Elles ont une forme globuleuse à subglobuleuse, censée être entre 2 et 3 µm de longueur sur 2 à 2,5 µm de largeur. Il est essentiel de noter que *Beauveria bassiana* infecte les insectes par simple contact et n'exige pas d'être ingéré par son hôte pour prévenir l'infection, comme le mentionnent **Boucias et Pandland (1991)**.



**Figure 8:** Les Spores de *Beauveria bassiana* (Dannon ,2020).

**Partie II :**  
**Matériel et méthode**

**II. Matériel et méthode**

Notre étude avait pour objectif de procéder à l'isolement et à l'identification des champignons entomopathogènes présents dans le sol de la région de Bouira. Après avoir procédé à la collecte d'échantillons, nos travaux ont été conduits au sein du laboratoire microbiologique de la faculté des sciences et de la vie de Bouira. Une analyse approfondie du sol de chaque échantillon a été entreprise dans le but d'évaluer les paramètres physico-chimiques et d'étudier leur influence sur le développement et l'abondance des champignons isolés. Par la suite, des tests de pathogénicité ont été réalisés sur les larves et les nymphes de *Culex pipiens*, qui représentent les stades aquatiques du moustique.

**II.1. Matériel biologique****II.1.1. Prélèvement du sol**

Nous avons collecté des échantillons de sol dans trois régions différentes de la wilaya de Bouira, provenant de divers champs : Sour el Ghozlane (cultures de blé et d'abricots), Aïn Bassem (figuier et chêne) et Lakhdaria (olivier et pin d'Alep).

**II.1.2. Matériel entomologique : *Culex pipiens***

Nous avons étudié l'activité biologique de nos souches en utilisant les larves et les nymphes du *Culex pipiens*.

**II.2. Matériel non biologique**

Nous avons utilisé principalement du matériel de collecte tel que des louches, de la tulle moustiquaire, des contenants, ainsi que des gobelets et de la poudre de biscuit sec. En plus de cela, nous avons utilisé d'autres équipements Parmi les éléments requis, on peut citer des équipements tels que de la verrerie, des produits chimiques et des milieux de culture. Ces éléments sont présentés en annexes n°02.

**II.2.1. Prélèvement du sol et sites d'isolement**

Les échantillons de sol utilisés dans notre étude ont été prélevés avec rigueur à partir de trois sols agricoles localisés dans diverses localités de la wilaya de Bouira. : Sour el Ghozlane, Aïn Bessem et Lakhdaria. La sélection de ces régions a été basée sur des facteurs connus pour influencer la croissance des champignons, Lors du prélèvement des échantillons, nous avons écarté les cinq premiers centimètres de sol et prélevé une quantité adéquate de terre à une profondeur de 15 à 20 cm. Cette terre a été déposée sur un sac stérile à l'aide d'une spatule, puis transportée au laboratoire dans les 24 heures suivant le prélèvement.

Où ont été maintenus à une température de 4°C dans des conditions de conservation appropriées en attente de leur analyse ultérieure.

**Tableau 3:** Caractéristiques des échantillons du sol utilisés.

Echantillons Date	Site de prélèvement	Le champ Végétal	Le sol	La Description
E1 11/4/2023	Sour El Ghozlane (W. Bouira)	Blé		Sol granuleux Couleur gris
		Abricot		Sol granuleux Couleur marron
E2 11/4/2023	Lakhdaria (W. Bouira)	Olivier		Sol sableux Couleur marron clair
		Pin d'Alep		Sol sableux Couleur marron clair
E3 12/4/2023	Ain Bassem (W. Bouira)	Figuier		Sol granuleux Couleur marron foncé

		Chêne		Sol humide, Eau trouble, terre rouge Et boueuse.
--	--	-------	--	---

## II.2.2. Analyses physico-chimiques du sol

### II.2.2.1. Mesure du pH des échantillons

La mesure du pH des échantillons de sol est une étape fondamentale des analyses physico-chimiques. L'objectif de cette démarche consiste à évaluer le pH d'une suspension de sol filtrée, préparée en mélangeant précisément 10 grammes de sol avec 90 millilitres d'eau distillée (Davet, 1996).

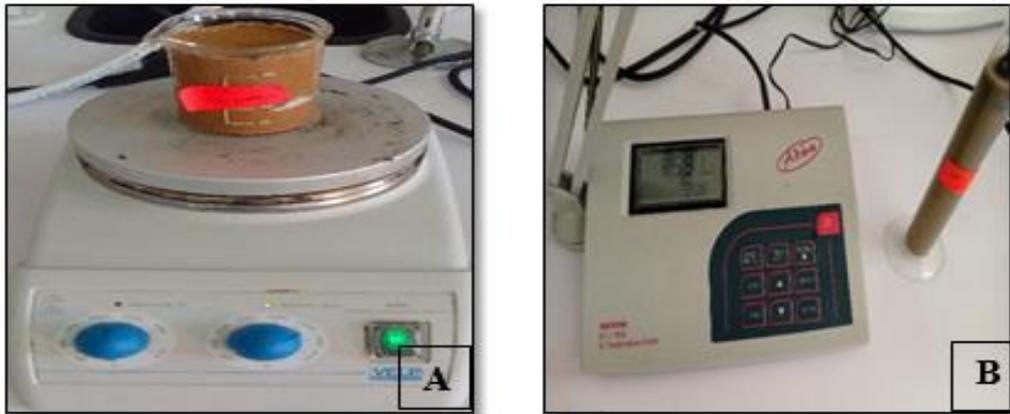
Dans chaque région, nous avons procédé à la collecte de 10 grammes de sol, que nous avons déposés dans des béchers contenant 90 millilitres d'eau distillée stérile. Les suspensions ont été ensuite agitées sur une plaque d'agitation pendant une durée d'une heure. Par la suite, nous avons utilisé un pH-mètre afin d'effectuer la mesure du pH des échantillons.



**Figure 9:** (A) L'agitation de la suspension ;(B) Mesure du pH avec un pH-mètre.

### II.2.2.2. Mesure de la conductivité

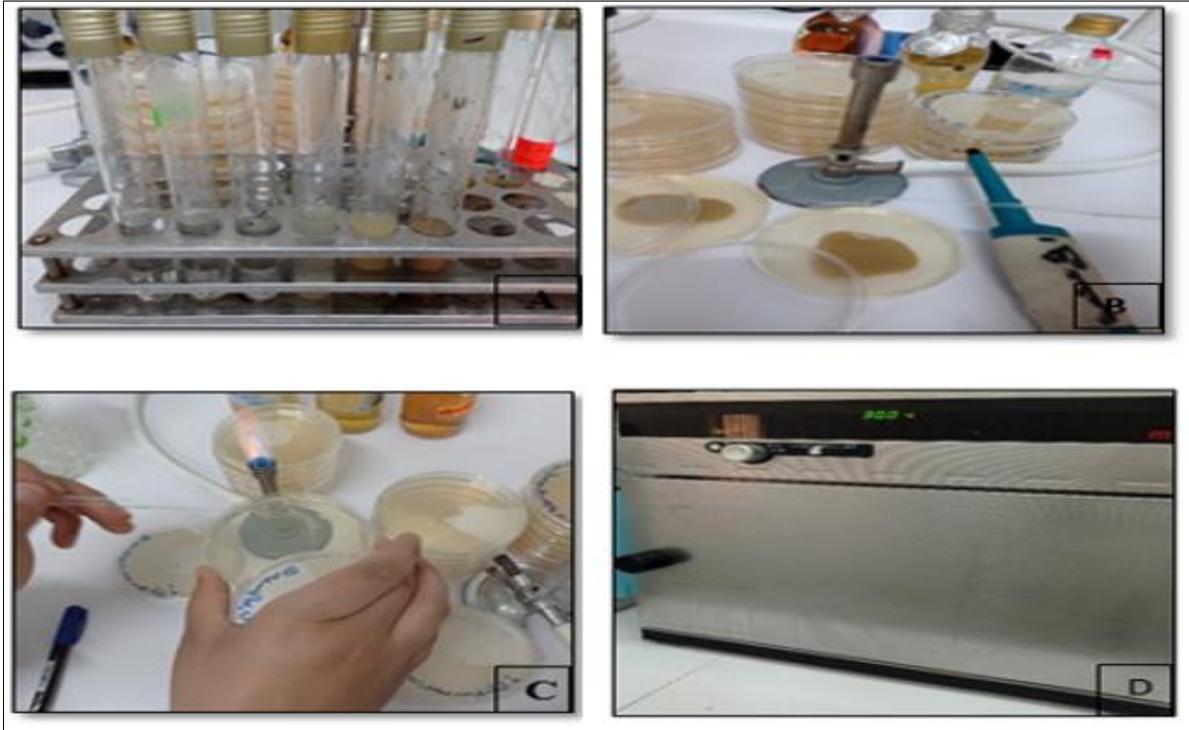
La salinité des sols est attribuée à travers la mesure de la conductivité électrique, comme décrit par Moradi et al., (2011). Pour déterminer cette conductivité électrique, nous avons prélevé 10 grammes de sol provenant de chaque région et les avons disposés dans des béchers contenant 50 millilitres d'eau distillée. Après une période d'agitation d'une heure, nous avons procédé à la mesure de la conductivité électrique à l'aide d'un conductimètre.



**Figure 10:** (A) l'agitation de la suspension ;(B) la mesure de la conductivité à l'aide d'un conductimètre.

### II.2.3. Isolement des champignons à partir du sol

La préparation des dilutions consiste à ajoutant d'abord une quantité mesurée de terre, nous avons utilisé une quantité de 1 gramme de sol que nous avons mélangé avec précision à 9 millilitres d'eau distillée stérile, puis en agitant pendant un temps donné à l'aide d'un vortex (généralement 30 secondes). Cela correspond à la dilution initiale de  $10^{-1}$ , à partir de laquelle d'autres dilutions sont préparées jusqu'à atteindre une dilution de  $10^{-5}$ . Chaque dilution de l'échantillon est ensuite répartie en surface des milieux gélinifiés (Sabouraud) en utilisant une quantité de 1 ml par dilution. En réalise cette opération par l'utilisation une pipette pasteur graduée et préalablement stérilisée. On aspire 1 ml de la suspension mère ( $10^{-1}$ ) et on les dépose sur les boîtes de pétri qui contient milieu de culture solide Sabouraud. Ensuite en étale 1ml de la suspension sur la surface de la gélose à l'aide d'une pipette pasteur incurvée (forme d'un râteau) bien stérilisé, on referme rapidement la boîte de Pétri pour éviter toute contamination extérieure. Cette manipulation est répétée pour tous les échantillons, puis ils sont mis dans l'étuve pendant 7 jours (**Laporte, 1947**).



**Figure 11:** (A) Préparation des suspensions dilutions du sol;(B) étalement de 1 ml dans chaque boîte de pétri ;(C) ensemencement à l'aide d'un râteau ;(D) incubation dans l'étuve à 28° pendant 07 jours.

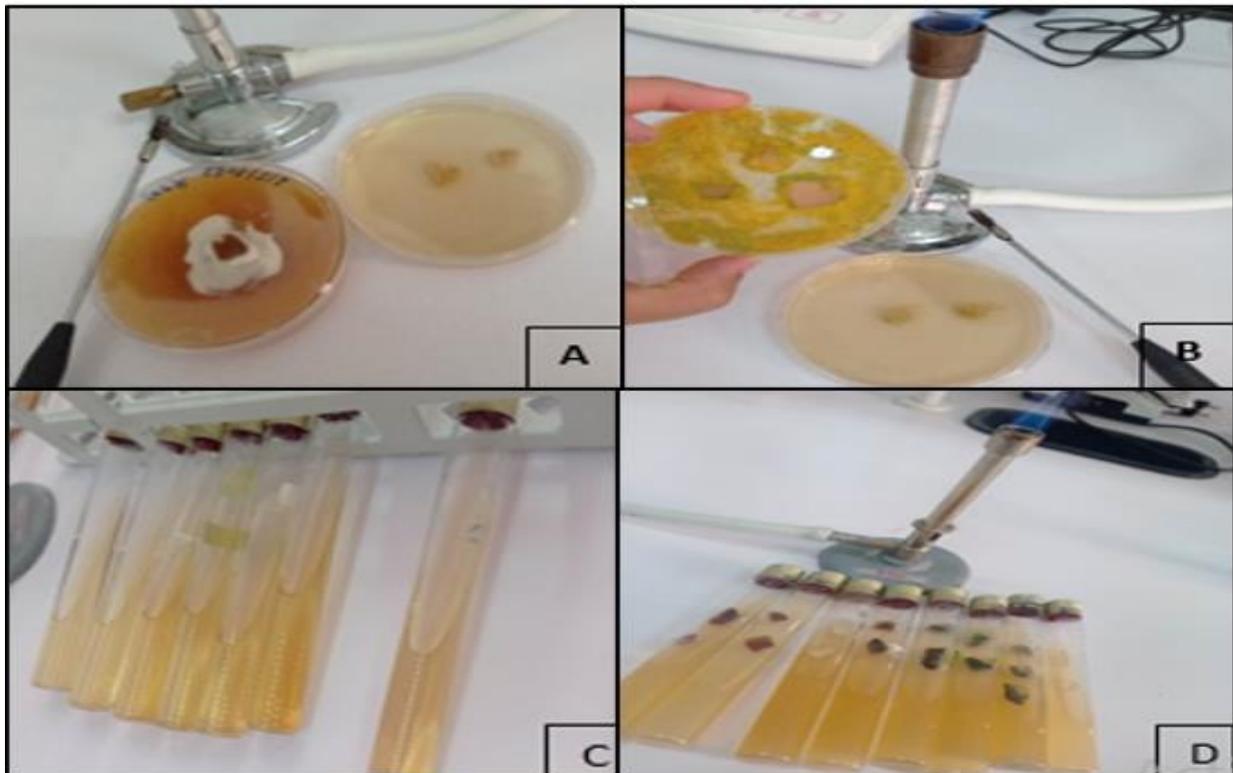
#### II.2.4. Purification et conservation des souches isolées

Une fois que les souches atteignent un développement satisfaisant, nous avons réalisé des repiquages individuels. Ce processus a été répété jusqu'à l'obtention d'une seule colonie d'un champignon spécifique isolée dans chaque boîte de Pétri (**Guiraud, 1998**).

La technique de repiquage a été employée pour isoler les souches de manière délicate, en prélevant un fragment de colonie à l'aide d'une anse stérilisée, en évitant tout contact avec les autres colonies. Ce fragment a été déposé au centre d'une nouvelle boîte de Pétri contenant le même milieu OGA, respectant toutes les coordonnées spécifiées pour chaque boîte. Le repiquage s'est effectué dans des conditions stériles, près de la flamme d'un bec Bunsen. Les boîtes de Pétri ont ensuite été placées dans un incubateur à une température de 28°C pendant une période de six jours pour favoriser le développement et la multiplication des colonies de champignons. Des repiquages successifs ont été réalisés en prélevant à chaque fois un fragment de la colonie isolée précédente afin d'obtenir des souches pures.

Pour la conservation des souches, la méthode couramment utilisée et simple consiste à les repiquer sur des tubes contenant une gélose inclinée. Les cultures ainsi obtenues sont maintenues à une température de 28°C pendant 7 jours. Par la suite, les tubes sont stockés à

une température de 4°C, ce qui garantit la viabilité des souches tout en minimisant les risques de mutations. (Botton *et al.*, 1990).



**Figure 12:** (A) et (B) Les étapes de purification et repiquage des isolats fongiques ; (C) et (D) préparation des tubes sur gélose inclinée pour la conservation.

### II.2.5. Méthodes d'identification

Pour identifier les souches, on recourt à deux méthodes classiques, à savoir l'observation macroscopique et l'étude microscopique des échantillons. Ces deux approches sont souvent adéquates pour parvenir à déterminer le genre des moisissures isolées de manière satisfaisante.

#### II.2.5.1. Observation macroscopique

Pour procéder à l'observation macroscopique des champignons, il est indispensable de caractériser les isolats en les cultivant sur un milieu de culture OGA, puis d'examiner attentivement l'aspect des colonies obtenues. L'identification repose principalement sur une évaluation visuelle, où l'œil nu est sollicité pour observer et analyser les caractéristiques suivantes : la vitesse de croissance (rapide, moyenne, lente), la texture des colonies, la couleur des colonies, la couleur de la face inférieure de la culture, ainsi que le mode de reproduction. Ces attributs perceptibles à l'œil non assisté fournissent des indices précieux permettant de distinguer et de classer les champignons étudiés (Hamid,2015).

### II.2.5.2. Identification microscopique

D'après **Chabasse (2002)**, l'examen microscopique d'une souche fongique nécessite un étalement entre lame, scotch et coloration préalable. En général, l'utilisation d'un objectif 40 est suffisante pour détecter la majorité des éléments importants. L'identification des champignons, selon **Botton et al., (1985)**, se base principalement sur leurs caractères cultureux et morphologiques.

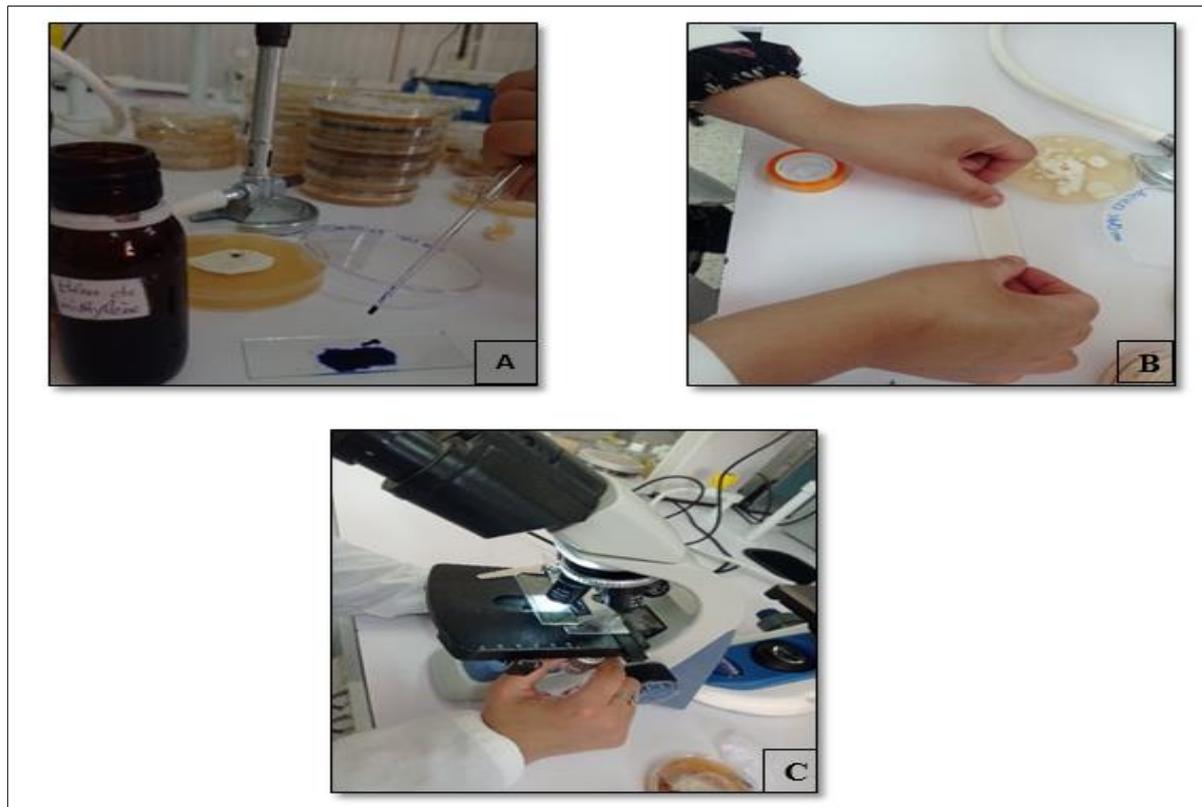
Les caractéristiques culturelles englobent des éléments tels que la vitesse de croissance apicale, la texture, la marge, l'épaisseur et la couleur de la colonie, ainsi que la pigmentation de l'agar, la production d'exsudat et l'odeur des colonies.

Concernant les caractéristiques morphologiques, on peut les diviser en deux catégories principales : a) Le mycélium : il est crucial d'observer la présence ou l'absence de cloisons, la couleur, les dimensions, l'ornementation des parois, le mode de ramification et la différenciation des thallospores. b) Les organes différenciés et leur contenu : il est pertinent de noter la forme, la couleur, les dimensions et la texture des parois, ainsi que les ornements.

La méthode de l'adhésif en ruban est utilisée pour l'observation sur place de la morphologie des chaînes de spores et du mycélium.

Une méthode utilisant le ruban adhésif a été utilisée. Cette technique implique de prélever un fragment de mycélium provenant d'une culture jeune en utilisant un morceau de ruban adhésif, puis de le coller sur une lame préparée avec quelques gouttes de bleu de méthylène. Cette opération a été effectuée avec précaution afin d'éviter toute contamination des souches pures,

En réalisant les observations à proximité d'un bec Bunsen, Les observations microscopiques ont été effectuées à un grossissement de 40 à l'aide d'un microscope photonique (**chabasse, 2002**)



**Figure 13:** Observation sous microscope optique au grossissement (40).

#### II.2.6. La collecte des stades pré imaginaires des Culicidés

La collecte des larves est réalisée par la méthode du "coup de louche" ou "dipping" (Messai *et al.*, 2010). La technique décrite consiste à plonger doucement une louche dans l'eau, puis la déplacer de manière uniforme en évitant de créer des remous. L'objectif est de ne pas déranger les larves présentes dans l'eau et de veiller à ce qu'elles ne disparaissent pas au fond (Bouabida *et al.*, 2012). Le contenu de la louche est versé dans des bouteilles en verre, non fermé hermétiquement, installés à l'ombre, jusqu'à ce que les échantillons soient ramenés au laboratoire.



**Figure 14:** La récolte des larves du culex pipiens (dipping).

### II.2.7. Le relevé de l'abondance des souches fongiques isolées

Nous avons procédé au calcul du relevé de l'abondance des espèces fongiques isolées à partir du sol dans un but d'estimer les espèces des champignons telluriques qui prédominent au niveau de ce dernier, les calculs sont réalisés selon la formule suivante (Jean-Michel, 2006).

$$p(s) = \frac{N(s)}{N(t)} \times 100$$

P (s) : Taux d'abondance de l'isolat fongique exprimé en %.

N (s) : Nombre d'isolats appartenant à une même espèce.

#### II.2.7.1. L'élevage des larves

Madame Hamid compte et identifie les larves de moustiques par genres et espèces dans des bacs propres en plastique contenant 500 ml d'eau de gîte au laboratoire. Après cela, les larves sont triées en fonction de leur stade de développement. Les bacs contenant les larves sont ensuite recouverts d'un morceau de tulle moustiquaire (Koua, 1994).

Les larves sont nourries avec de la farine de biscuit (Rehimi et Soltani, 1999).



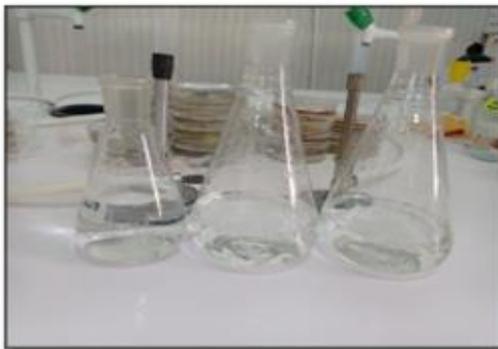
Figure 15: Tri des stades larvaires de *Culex pipiens*.

#### II.2.7.2. Application des champignons entomopathogènes sélectionnés sur les différents stades aquatiques du *Culex pipiens*

##### II.2.7.2.1. Préparation de la solution fongique

Pour préparer la solution mère, on introduit plusieurs colonies du champignon âgées de 9 à 15 jours dans un erlenmeyer de 500 ml contenant 250 ml d'eau distillée stérile. L'erlenmeyer est fermé pour éviter toute contamination (figure 16). Ensuite, on agite l'erlenmeyer pendant 30 minutes à une vitesse de 1500 tours/minute, Pour faciliter la libération des spores, il est recommandé d'ajouter 2 à 3 gouttes du réactif Tween 80. La

concentration en spores peut ensuite être évaluée à l'aide d'une cellule hématimétrique, communément appelée cellule de Malassez.



Trois erlenmeyers de 500 ml contenant 250 ml d'eau distillé stérile.



Introduisant plusieurs colonies du champignon issues des cultures âgées.



En ajoutant 2 à 3 gouttes de réactif.



L'agitation de solution fongique Pendant 30 minutes.

**Figure 16:** Les étapes de préparation de solution fongique.

### II.2.7.3. Traitement

Pour étudier la toxicité des entomopathogènes sélectionnés contre les larves et les nymphes du moustique *C. pipiens*, nous avons choisi une dose de  $10^8$  spores/ml pour les différentes suspensions fongiques indiqué dans le tableau ci-dessous :

**Tableau 4: Les Suspensions fongiques et leur concentration en spores / ml.**

La souche (suspension fongique)	La dose appliquée
<i>Beauveria sp</i>	$0,20 \times 10^8$ spores/ ml
<i>Verticillium sp</i>	$0,40 \times 10^8$ spores/ ml
<i>Cladosporium sp</i>	$0,18 \times 10^8$ spores/ ml

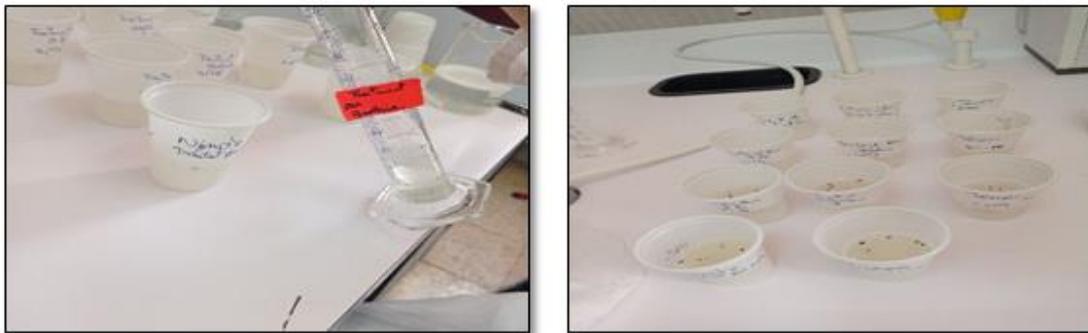
#### II.2.7.4. Mode d'administration de la suspension fongique

Nous avons opté pour une administration par contact et ingestion de la solution fongique à nos arthropodes (**Butt et Goettel, 2000**).

Pour créer une voie d'entrée préférentielle et habituelle pour les champignons entomopathogènes ensuite, un bécher qui contient 30 ml d'eau de gîte, dans lequel nous avons ajouté 10 larves et nymphes. Ensuite, nous avons ajouté 20 ml de la solution entomologique (Figure 17).

Les individus témoins, comprenant également des larves et des nymphes, ont été répartis de la même manière et en même nombre que les individus traités, à la différence que nous avons ajouté de l'eau distillée stérile au lieu de la solution fongique.

Les mortalités cumulées, les symptômes, le comportement et le renouvellement de la nourriture sont vérifiés quotidiennement.



**Figure 17:** Réalisation du traitement de la solution fongique sur les larves et nymphes du *C. pipiens*.

**Partie III :**  
**Résultats et discussion**

### III. Les résultats et la discussion

#### III.1. Résultats des analyses physico-chimiques de sol

Les données relatives aux paramètres physico-chimiques des échantillons de sol sont présentées dans le tableau ci-dessous, provenant des prélèvements effectués dans les trois régions.

**Tableau 5: Paramètres physico-chimiques des échantillons de sol prélevés.**

Le sol \ Paramètre	Blé	Abricot	Olivier	Pin d'Alep	Figuier	Chêne
Le pH	7,49	7,44	7,45	7,26	7,61	8,00
La conductivité	591 ppm	385 ppm	95,1 ppm	120 ppm	88 ppm	176 ppm
La température	20,8°C	24,3°C	23°C	23,8°C	21,8°C	23,7°C

Le pH représente un paramètre essentiel de la composition chimique du sol, et il exerce une influence déterminante sur la disponibilité des éléments nutritifs pour les végétaux et les microorganismes qui y résident (**Doucet, 2006 ; Borah et al., 2010**).

Les échantillons de sol que nous avons prélevés révèlent des variations significatives de pH d'un sol à un autre. Les sols associés au blé, à l'abricot, à l'olivier et au figuier se caractérisent par une légère alcalinité, tandis que celui du chêne démontre une légère acidité à neutralité. Quant au sol de pin d'Alep, il se distingue par une alcalinité prononcée, selon les ouvrages spécialisés en agronomie.

Cette diversité de pH peut être expliquée par l'augmentation des ions d'hydrogène, entraînant une diminution du pH de la solution (qui devient ainsi plus acide). À un pH de 7, la solution est considérée comme neutre. À mesure que l'acidité s'augmente, le nombre correspondant diminue, alors qu'une augmentation de l'alcalinité se traduit par une augmentation de ce nombre (**Hanna, 2013**).

La plupart des champignons se développent dans un intervalle de pH situé entre 4 et 7. Les variations du pH du sol, attribuables aux changements de son taux d'humidité et aux saisons, occasionnent une diminution au printemps et en automne, ainsi qu'une augmentation en hiver. Ces fluctuations sont principalement engendrées par la production d'acides

organiques lors de périodes d'activité biologique intense, encouragées par les conditions chaudes et humides prévalant dans le sol (**Anonyme, 2008**).

Il est important de souligner que la valeur du pH du sol peut subir des changements au fil du temps et être influencée par divers facteurs, tels que la nature de l'eau utilisée pour l'irrigation, dont l'alcalinité ou l'acidité spécifique peut avoir un impact sur le pH. De plus, le choix des engrais peut logiquement entraîner une diminution ou une augmentation significative du pH (**Antoine, 2006**).

La mesure de la salinité de nos échantillons a été évaluée en se basant sur les valeurs de conductivité électrique des sols de trois régions différentes. Nous avons relevé une salinité moyenne (176 et 120 ppm) pour les sols abritant des pins d'Alep et des chênes, tandis que les sols où se trouvent des oliviers et des figuiers présentent une salinité faible (95,1 et 88 ppm). Les sols où poussent du blé et des abricotiers affichent une salinité excessive (591 et 385 ppm).

### **III.2. Résultats d'isolement des souches fongiques**

Suite à la collecte des isolats fongiques présents dans le sol, nous avons entrepris une analyse approfondie de leur identification, tant au niveau macroscopique que microscopique, afin de déterminer les différents genres fongiques prélevés et d'estimer leur abondance relative.

Les souches fongiques sont ubiquitaires dans l'ensemble de l'univers : sol, air et eau... Étant donné la diversité des microorganismes présents dans ces écosystèmes, Pour parvenir à isoler les moisissures, il est nécessaire de se débarrasser des autres microorganismes qui, de par leur aptitude à envahir, entravent la croissance des moisissures. Il est donc impératif d'utiliser des méthodes sélectives afin de pouvoir isoler les souches fongiques.

Afin de prévenir la condensation des microorganismes et de réduire leur nombre, il est recommandé d'effectuer des dilutions décimales. De plus, il est conseillé de choisir des milieux présentant un pH acide propice au développement des moisissures (**Botton, 1990**).

Parmi les six échantillons de sol prélevés, nous avons réussi à isoler 17 souches réparties en fonction des sites d'échantillonnage (tableau n06).

#### **III.2.1. Résultat d'identification morphologique des souches obtenus**

L'identification de ces genres repose principalement sur la clé d'identification "**Illustrated Genera of Imperfect Fungi**" de **Barnett et Hunter (2000)**, ainsi que sur les

moisissures d'intérêt médical de **Chabasse et al. (2002)**. Cette identification se base sur les caractères macroscopiques des colonies (aspect, couleur, forme, contour, etc.) ainsi que sur les caractères microscopiques du mycélium, des conidies ou spores (cloisonnement du mycélium, forme des spores, forme des organes de fructification, etc.).

**L'étude macroscopique :** Les caractéristiques macroscopiques des différentes souches sont examinées sur le milieu OGA. Le tableau 06 présente l'aspect du mycélium des souches isolées, la consistance des colonies et la couleur caractéristique de chaque souche.

**L'étude microscopique :** L'étude microscopique porte sur l'observation des structures caractéristiques des 17 souches fongiques (conidiophores, conidies et mycélium). (Tableau 06).

Parmi les principaux champignons étudiés

- ✓ Les souches S3, S8, S15 et S17 présentent les caractéristiques microscopiques et macroscopiques suivantes :

La présence d'un mycélium doté de cloisons est associée aux caractéristiques suivantes :

De nombreux conidiophores dressés et non ramifiés, se déterminant par une vésicule.

Des phialides formées directement sur la vésicule.

Des conidies disposées en chaînes divergentes.

Des cellules présentant une paroi épaisse.

Ces souches semblent appartenir au genre *Aspergillus*.

- ✓ Les souches S10, S13 et S16 se caractérisent par la présence de conidiophores individuels accompagnés de pénicilles, composés de phialides rattachés directement à l'extrémité du conidiophore.

Appartiennent au genre *Penicillium*.

- ✓ Les souches S4 et S5, Elles se distinguent par des conidiophores dressés de teinte claire, formant plusieurs groupes de verticilles. Chaque verticille contient 3 à 4 phialides produisant de nombreuses conidies unicellulaires de forme ovoïde à ellipsoïde sont classées dans le genre *Verticillium*.
- ✓ La souche S1 se distingue par la présence d'hyphes pourvus de cloisons, de conidiophores en forme de zigzag et de conidies unicellulaires regroupées en grappes. L'extrémité de la cellule conidiogène présente une apparence étroite, anguleuse et

présentant des denticules. Selon les caractéristiques présentées, cette souche semble appartenir au genre *Beauveria*.

- ✓ La souche S2 se distingue par son thalle végétatif composé de filaments dotés de cloisons disposés de manière parallèle. Les phialides, qui sont minces et cylindriques, émergent directement des filaments végétatifs. Les conidies, qu'elles soient cylindriques ou elliptiques, se regroupent en amas à l'extrémité des phialides. Selon les caractéristiques observées, cette souche semble être affiliée au genre *Acremonium*.
- ✓ Une souche S7 caractérisé par la présence de conidies en chaînes acropétales qui s'étirent vers le sommet, avec des cloisons longitudinales et transversales.

Ces caractéristiques morphologiques responsables que cette souche est probablement affiliée au genre *Alternaria*.

- ✓ Une souche spécifique, S14 qui présente les caractéristiques morphologiques suivantes :
  - Des conidiophores qui sont à la fois ramifiés.
  - Des conidies en chaîne acropétale,
  - Des cloisons internes, et plusieurs sites conidiogènes.

Ces observations fortement favorisées que ces souches sont probablement affiliées au genre *Cladosporium*.

- ✓ Une souche S6 présente les caractères suivants :
  - Filaments mycéliens cloisonnés pigmentés ;
  - Conidiogène de type blastique porique ;
  - Conidiophores géniculés (tortueux) simples ou ramifiés ;
  - Conidies légèrement incurvées à l'extrémité arrondie pluricellulaires, cloisons toujours transversales : cellule centrale volumineuse plus foncée ;

Cette souche semble appartenir au genre *Curvularia*.

- ✓ La souche S12 présente les traits distinctifs suivants :
  - Des filaments mycéliens larges, irréguliers, peu ou non cloisonnés, avec des ramifications à angle droit.
  - Des spores unicellulaires, de forme ovale ou elliptique, avec des contours irréguliers et souvent anguleux.

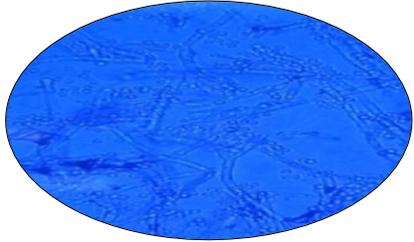
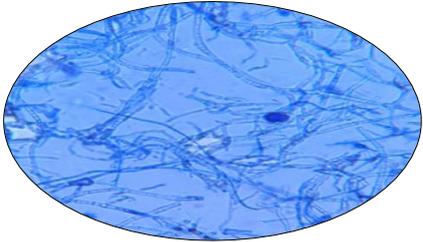
- Il est possible d'observer des chlamydo-spores isolées ou en chaînettes. Ces caractéristiques connues que ces souches appartiennent probablement au genre **Rhizopus**.
- ✓ Une souche S11 se caractérise par :
  - Hyphes septés hyalins à brins portent des phialides solitaire ou groupés ;
  - Conidiophores courts ;
  - Conidies globuleuses à elliptiques, hyalines ou fortement noirâtre ;

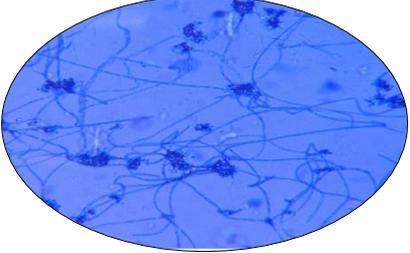
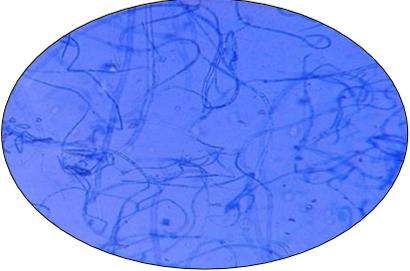
Ces critères rejoignent ceux du genre *Phialophora*.

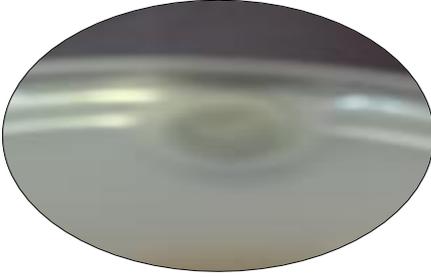
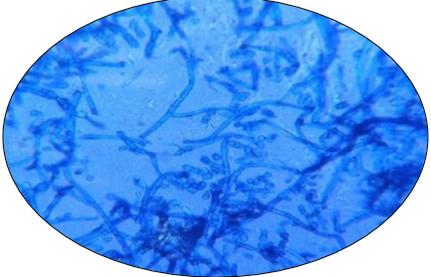
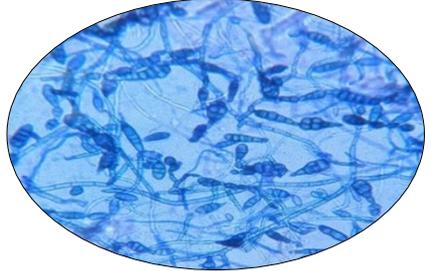
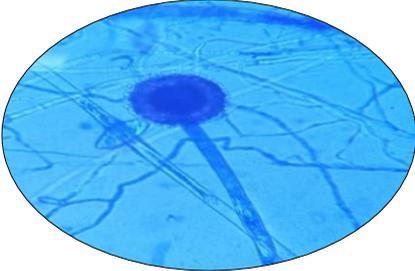
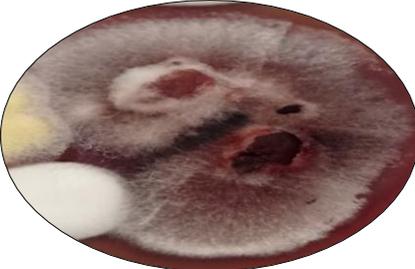
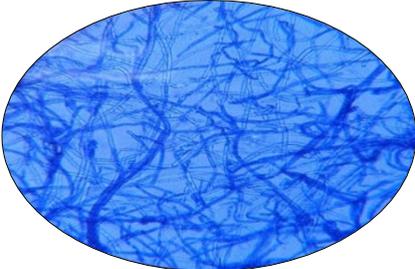
- ✓ Une souche S9 présente les caractères suivants :
  - Des microconidies : qui sont des conidies uni (ou bi) cellulaire, allongées, ovales ou cylindriques.
  - Des macroconidies : qui sont des conidies pluricellulaires, elles sont fusiformes, courbés, assez pointues aux extrémités.

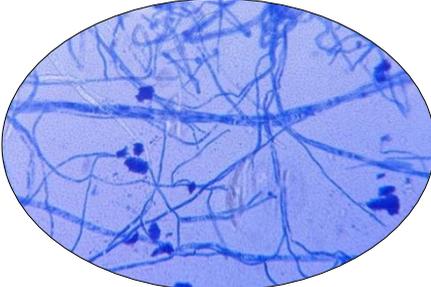
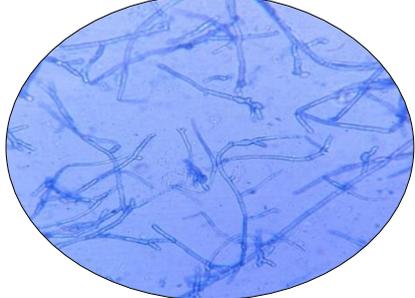
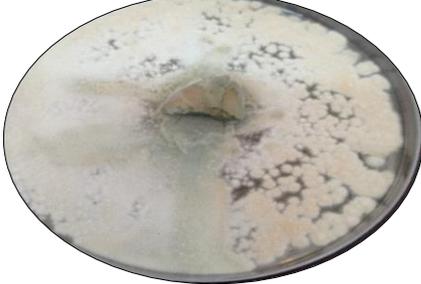
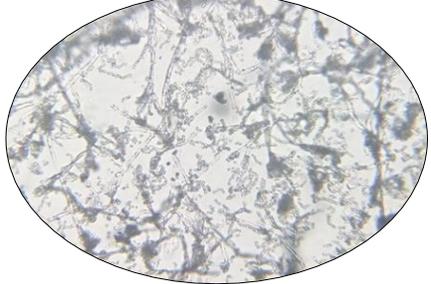
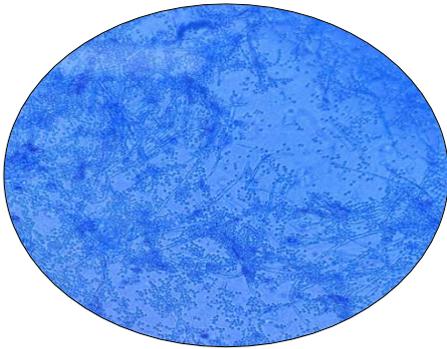
Cette souche semble appartenir au genre *Fusarium*.

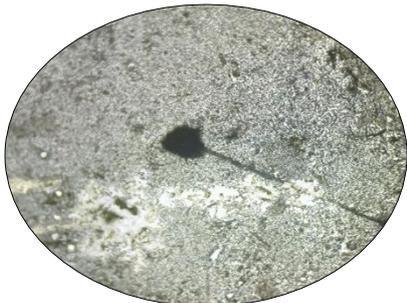
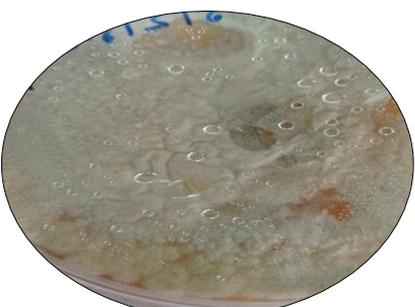
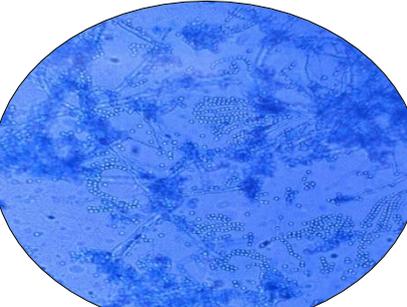
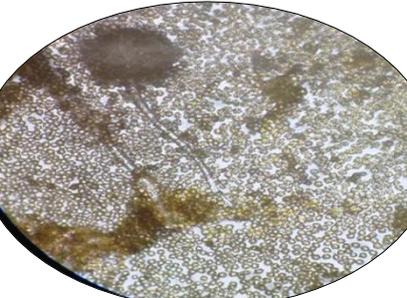
**Tableau 6:** Les caractères macroscopique et microscopiques des genres fongiques isolés.

L'espèce Fongique	Aspect macroscopique	Aspect microscopique (G X40)
Souche 01 <i>Beauveria sp</i>		
Souche 02 <i>Acremonium sp</i>		
Souche 03 <i>Aspergillus sp</i>		

<p>Souche 04 <i>verticillium sp</i></p>		
<p>Souche 05 <i>Verticillium sp</i></p>		

<p>Souche 06 <i>Curvularia sp</i></p>		
<p>Souche 07 <i>Alternaria sp</i></p>		
<p>Souche 08 <i>Aspergillus sp</i></p>		
<p>Souche 09 <i>Fusarium sp.</i></p>		

<p>Souche 10 <i>Penicillium sp</i></p>		
<p>Souche 11 <i>Phialophora sp</i></p>		
<p>Souche 12 <i>Rhizopus sp</i></p>		
<p>Souche 13 <i>Penicillium sp</i></p>		
<p>Souche 14 <i>Cladosporium sp</i></p>		

Souche 15 <i>Aspergillus sp</i>		
Souche 16 <i>Penicillium sp</i>		
Souche 17 <i>Aspergillus sp</i>		

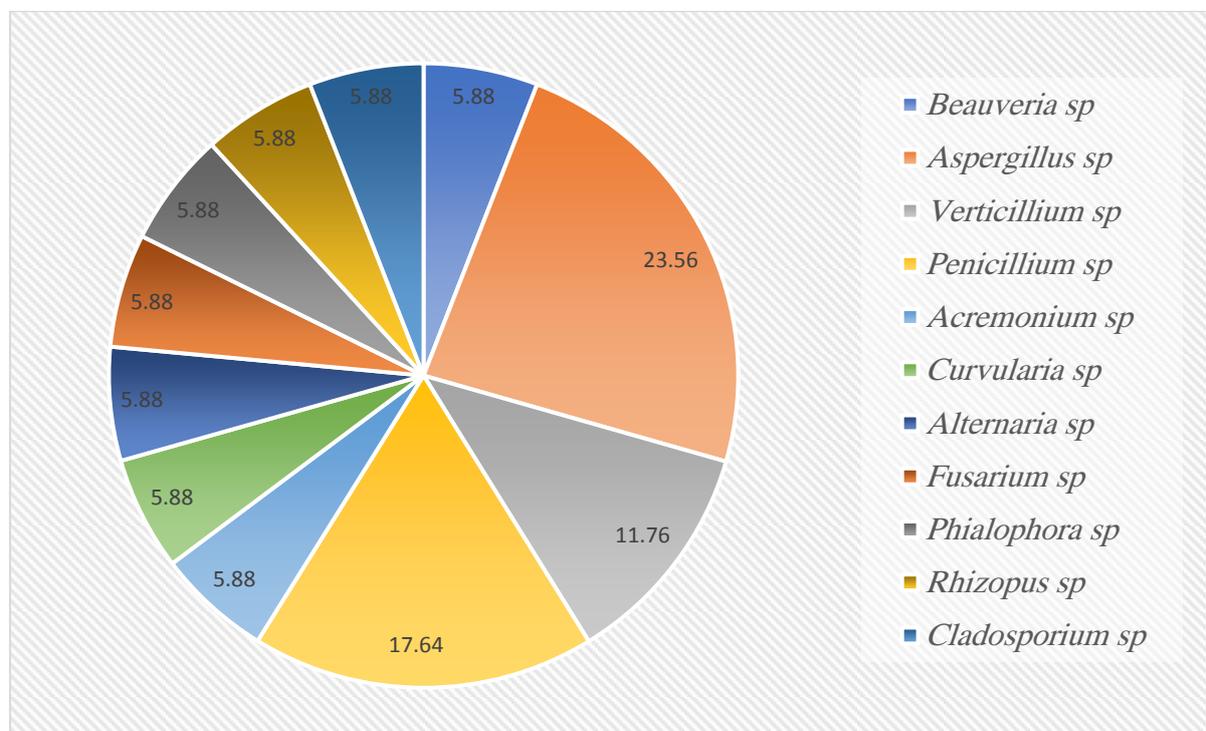
L'identification macroscopique et microscopique du genre *Aspergillus* correspond parfaitement à celles décrites par **Chabasse (2002)**, **Collier et son équipe (1998)**. Les caractéristiques du genre *Mucor sp.* Sont en accord avec celles rapportées par **Koenraad et al., (2004)** et **Bukhari et al., (2011)**. Les critères d'identification du genre *Cladosporium* sont très similaires à ceux mentionnés par **Pritchard et ses collaborateurs (1987)** et **Sutton et son équipe (1998)**.

De **Hoog et son équipe (2000)** ont également décrit les mêmes critères d'identification pour le genre *Penicillium*. De plus, les critères d'identification du genre *Verticilium* ont été cités par **Dufresne et al., (2013)**. L'identification des autres genres est réalisée selon les directives de **Barnett et Hunter (2000)** ainsi que le cahier de formation "Bioforma - Les moisissures d'intérêt médical" de **Chabasse (2002)**.

### III.2.2. Le relevé d'abondance des souches isolées

Le recensement des souches fongiques isolées et leur abondance dans les six sols agricoles ont révélé la présence de 17 isolats distincts. L'analyse Le recensement des espèces a révélé que le genre prédominant est *Aspergillus*, représentant 23,56 % du total, suivi de

*Penicillium sp*, avec un taux de 17,64 %. En troisième position se trouve *Verticillium sp*, avec une représentation de 11,76 %. Les huit autres genres identifiés, à savoir *Beauveria sp*, *Acremonium sp*, *Curvularia sp*, *Alternaria sp*, *Fusarium sp*, *Phialophora sp*, *Rhizopus sp* et *Cladosporium sp*, présentent tous un taux d'abondance équivalent de 5,88 %.



**Figure 18: Le relevé d'abondance des souches isolées.**

À partir de ces résultats, il est observé que le genre *Aspergillus* se distingue comme étant le plus prédominant parmi les souches fongiques isolées. Il appartient au phylum des Ascomycètes. Ce genre présente une répartition géographique étendue, bien qu'il soit plus fréquemment associé aux régions caractérisées par un climat chaud. Il trouve son développement sur des matières organiques en décomposition, Divers milieux tels que le sol, le compost, les denrées alimentaires et les céréales peuvent être colonisés par des espèces d'*Aspergillus*. Il est important de souligner que certaines de ces espèces peuvent être directement pathogènes pour les êtres humains et les animaux, étant capables de coloniser les tissus vivants et de provoquer des aspergilloses (**Bougharef, 2008**).

Les genres *Aspergillus* et *Penicillium* ont clairement marqué leur présence, contrairement aux autres souches qui étaient présentes en nombre très limité, un résultat similaire à celui rapporté par **Fenghour et al., (2002)** lorsqu'ils ont isolé 22 souches fongiques à partir d'un sol de la région d'El Kala dans le cadre d'une recherche sur leur activité pectinolytique.

La prédominance significative des *Penicillium* s'explique par leur capacité élevée de sporulation et leur aptitude à coloniser des milieux très variés, y compris les plus complexes, comme l'a souligné **Bensmira (2006)**. Des souches fongiques similaires ont également été isolées par **Bensmira (2006)**, qui a observé une abondance marquée du genre *Aspergillus sp.* Lors de son étude sur l'isolement et la caractérisation de souches fongiques productrices de cellulases thermostables à intérêt industriel à partir du sol de la région de Biskra.

A partir des données présentées dans le tableau 06, il est évident que la distribution des genres fongiques varie de manière hétérogène parmi les six sols étudiés.

La fréquence d'apparition des espèces fongiques dépend de divers facteurs, notamment de l'humidité relative, qui revêt une importance cruciale pour déclencher la manifestation des champignons, ainsi que du pH (**Amrouche, 2007**). Bien que les champignons ne soient pas les micro-organismes les plus nombreux dans le sol, leur poids est considérable en raison de leur taille relativement grande par rapport aux autres micro-organismes (**Huber et Schaub, 2011**).

La diminution constatée peut être attribuée à la préférence des champignons pour les environnements acides, où ils ne sont pas en compétition avec les bactéries. Cette préférence pour les milieux acides pourrait être une caractéristique inhérente aux champignons, ce qui explique leur moindre abondance dans les milieux moins acides où les bactéries prédominent. En d'autres termes, les champignons ont tendance à prospérer dans des conditions acides qui favorisent leur développement, tandis que les bactéries sont plus compétitives dans des milieux moins acides (**Morel, 1989**). Les mycètes préfèrent les milieux acides, et leur métabolisme peut contribuer à l'acidification accrue de ces environnements. Leur croissance optimale se produit dans un pH comprise entre 4 et 6. Par conséquent, les champignons montrent une affinité spécifique pour les conditions acides, et leur activité métabolique peut avoir un impact sur le pH du milieu dans lequel ils se développent (**Nicklin et al., 2000**). La faible densité des champignons dans nos sols peut être attribuée à leur pH alcalin. Cependant, il convient également de noter que la différence de pH entre les trois sites peut également avoir une influence sur cette densité.

Les analyses des échantillons de sol confirment les résultats précédents concernant l'abondance des champignons. Les sols présentant un pH élevé, atteignant 8, limitent le développement des champignons, ce qui explique les pourcentages d'abondance relativement faibles observés pour ces espèces dans toutes les régions étudiées. Ces observations sont en accord avec les conclusions de **Doucet en 2006**, qui a également observé que l'augmentation

du pH avait un impact sur le développement des champignons, se traduisant directement par une diminution du nombre de spores par gramme de sol.

### III.3. Le processus de sélection des souches fongiques entomopathogènes

Sur les 17 souches fongiques isolées à partir des trois régions étudiées, nous avons identifié quatre souches qui présentent des propriétés entomopathogènes. Ces souches sont *Beauveria sp*, *Verticillium sp*, *Cladosporium sp* et *Alternaria sp*.

Parmi les quatre souches, *Beauveria sp*, *Verticillium sp* et *Cladosporium sp* ont été sélectionnées comme les souches principales utilisées dans notre étude sur les moisissures. Cette sélection est basée sur les informations présentes dans la littérature scientifique concernant l'activité biologique intéressante de ces souches. De plus, nous avons pris en considération le fait que ces souches ne sont pas pathogènes pour les êtres humains.

En résumé, nous avons isolé cinq souches fongiques entomopathogènes à partir des sols agricoles étudiés. Parmi celles-ci, *Beauveria sp*, *Verticillium sp* et *Cladosporium sp* ont été choisies en tant que souches principales pour notre étude en raison de leurs propriétés biologiques bénéfiques et de leur innocuité pour l'homme.

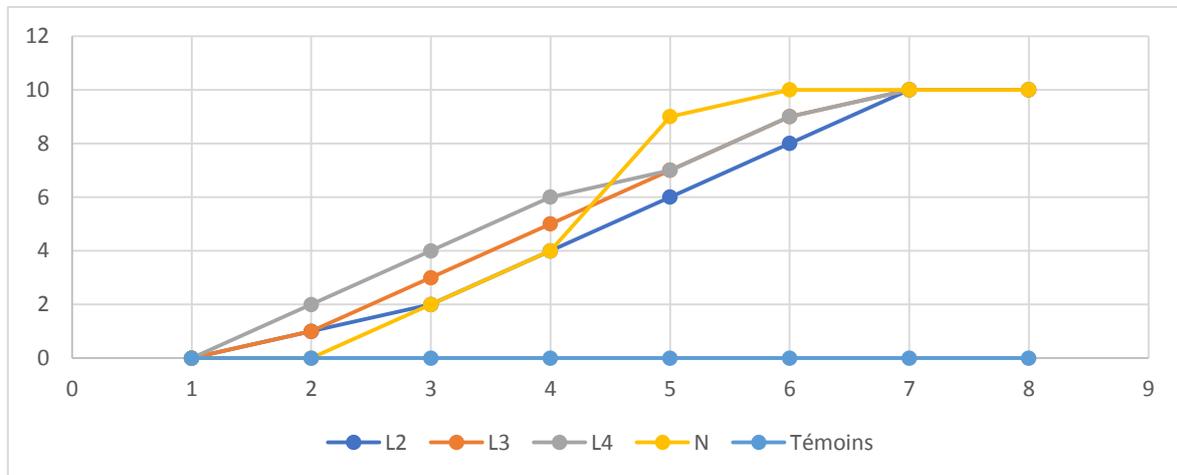
L'agent de lutte biologique *Beauveria bassiana* présente un intérêt considérable en tant qu'entomopathogène (De kouassi, 2001). *Beauveria bassiana* présente l'avantage d'être non pathogène pour les humains et tout un animal à sang chaud, ce qui le rend sûr et sans danger lorsqu'il est utilisé comme agent de lutte biologique (Tong-kwee et al., 1989 ; Laird et al., 1990).

Comme *Beauveria bassiana*, la souche *Verticillium lecanii* présente également un large spectre d'hôtes, ce qui signifie qu'il peut infecter différentes espèces d'arthropodes. En outre, selon les souches spécifiques, il est capable de contaminer des insectes appartenant à d'autres ordres tels que les coléoptères, les lépidoptères, les diptères ou encore les orthoptères. (Champion, 1997). La souche *Cladosporium sp* présente une activité insecticide remarquable (Heuchert et al., 2005).

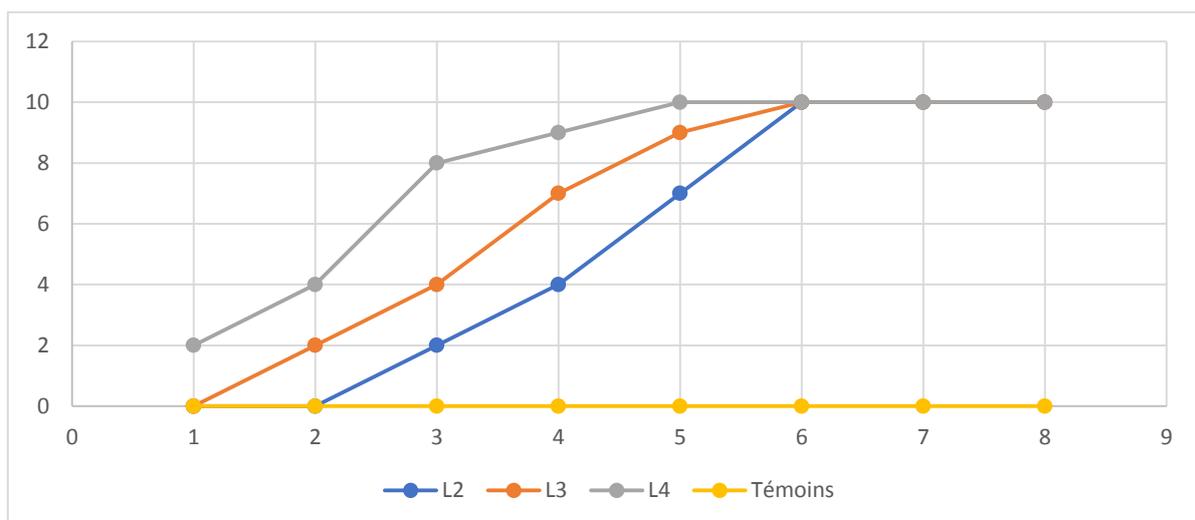
### III.4. Toxicité des champignons entomopathogènes sélectionnées sur les différents stades aquatiques du *Culex pipiens*

Nous avons enregistré les taux de mortalité résultant du traitement des stades larvaires L2, L3 et L4, ainsi que du stade nymphal, avec des suspensions fongiques contenant les trois champignons sélectionnés. Ces données nous ont permis d'établir la cinétique de mortalité.

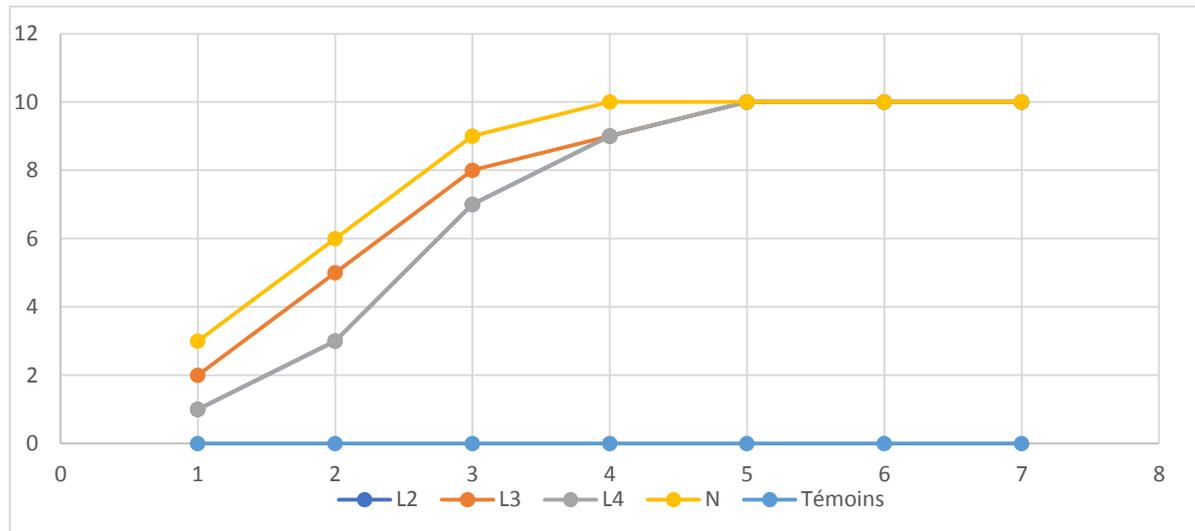
Les graphiques suivants représentent les taux de mortalité observés chez les stades aquatiques et nymphal du *Culex pipiens* traités avec différentes doses des champignons entomopathogènes, pendant une période de traitement de 10 jours.



**Figure 19:** La dynamique de mortalité des larves et des nymphes infectés par champignons *Beauveria sp.*



**Figure 20:** La dynamique de mortalité des larves infectés par champignons *Verticillium sp.*



**Figure 21:** La dynamique de mortalité des larves et des nymphes infectés par champignons *Cladosporium sp.*

Les courbes présentent l'évolution des taux de mortalité des larves de *Culex pipiens* traitées avec les souches *Verticillium sp* et *Cladosporium sp*. On constate une augmentation progressive du taux de mortalité des larves traitées avec *Verticillium sp*, avec une augmentation significative dès le premier jour de traitement, où une mortalité de 20% est observée., qui atteint 60% de mortalité après cinq jours, pour finalement atteindre 90% de mortalité au septième jour. Cette évolution démontre l'efficacité croissante de *Verticillium sp* dans la lutte contre les larves de *Culex pipiens*.

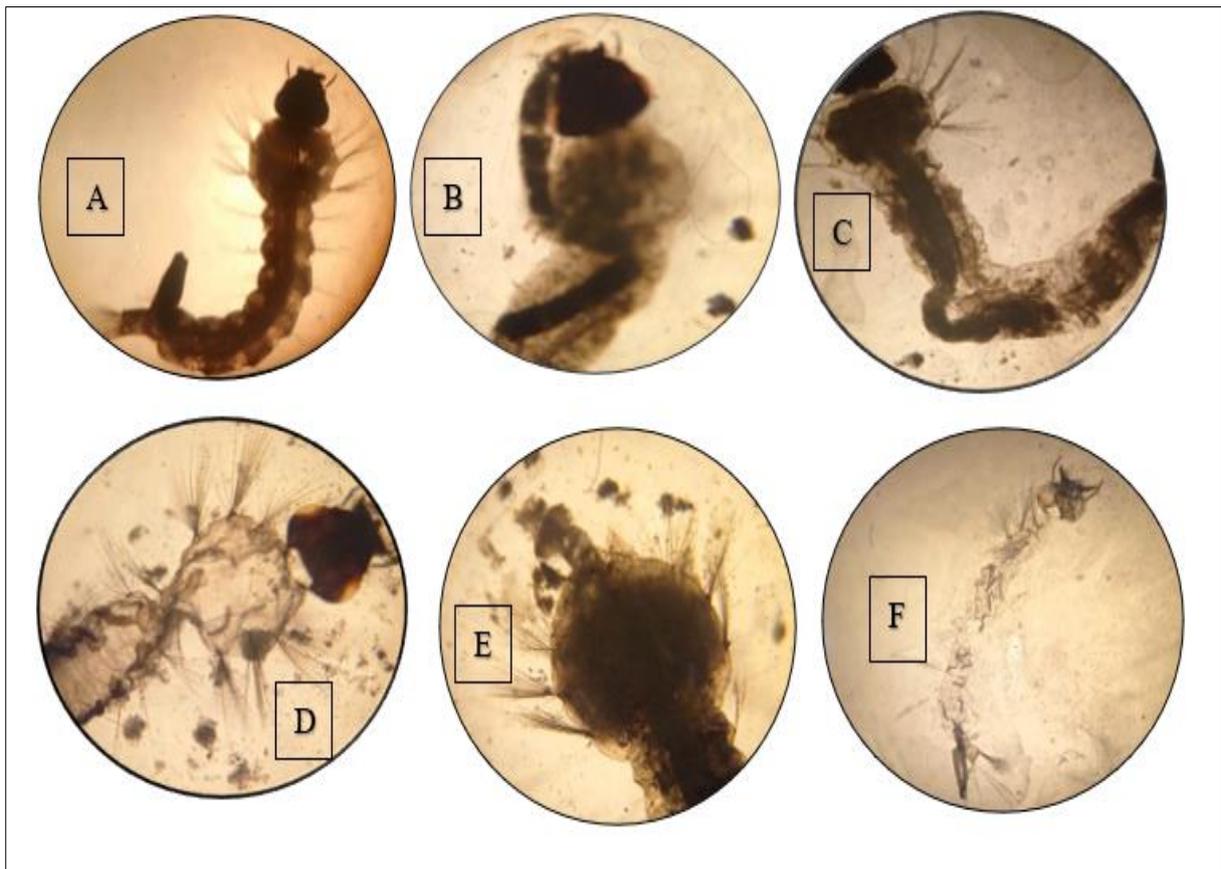
Selon les observations de **Chabane et Harrache (2013)**, suite au traitement des larves de *Culex pipiens* au stade L1 avec une suspension fongique de *Verticillium lecanii* à une concentration de  $0,29 \times 10^7$  spores/ml, une mortalité de 75% a été constatée au huitième jour de traitement. Ces résultats confirment l'efficacité du *Verticillium lecanii* dans la lutte contre les larves de *Culex pipiens*.

### III.5. Le comportement des stades aquatiques et nymphales du *culex* après le traitement

Les symptômes observés lors de l'infection de nos moustiques par les souches entomopathogènes sélectionnées présentent une similitude remarquable avec ceux décrits par **Seye et Ndiaye (2012)** dans leur étude portant sur l'isolement d'une souche de champignon entomopathogène hautement virulent contre les larves de moustiques tels que *Anopheles gambiae*, *Aedes aegypti* et *Culex quinquefasciatus*. De plus, les sites d'action des champignons sont également similaires.

### III.6. Les Effet des trois entomopathogènes *Beauveria sp* *Verticillium sp* et *Cladosporium sp* sur les différents stades aquatiques et les nymphes de *Culex pipiens*

Suite au traitement des larves du *Culex pipiens*, on observe une réduction des mouvements suivie d'une mortalité. Immédiatement après la mort, on constate l'adhésion des spores du champignon à la cuticule, tandis que d'autres spores sont en phase initiale de germination (figure 22).

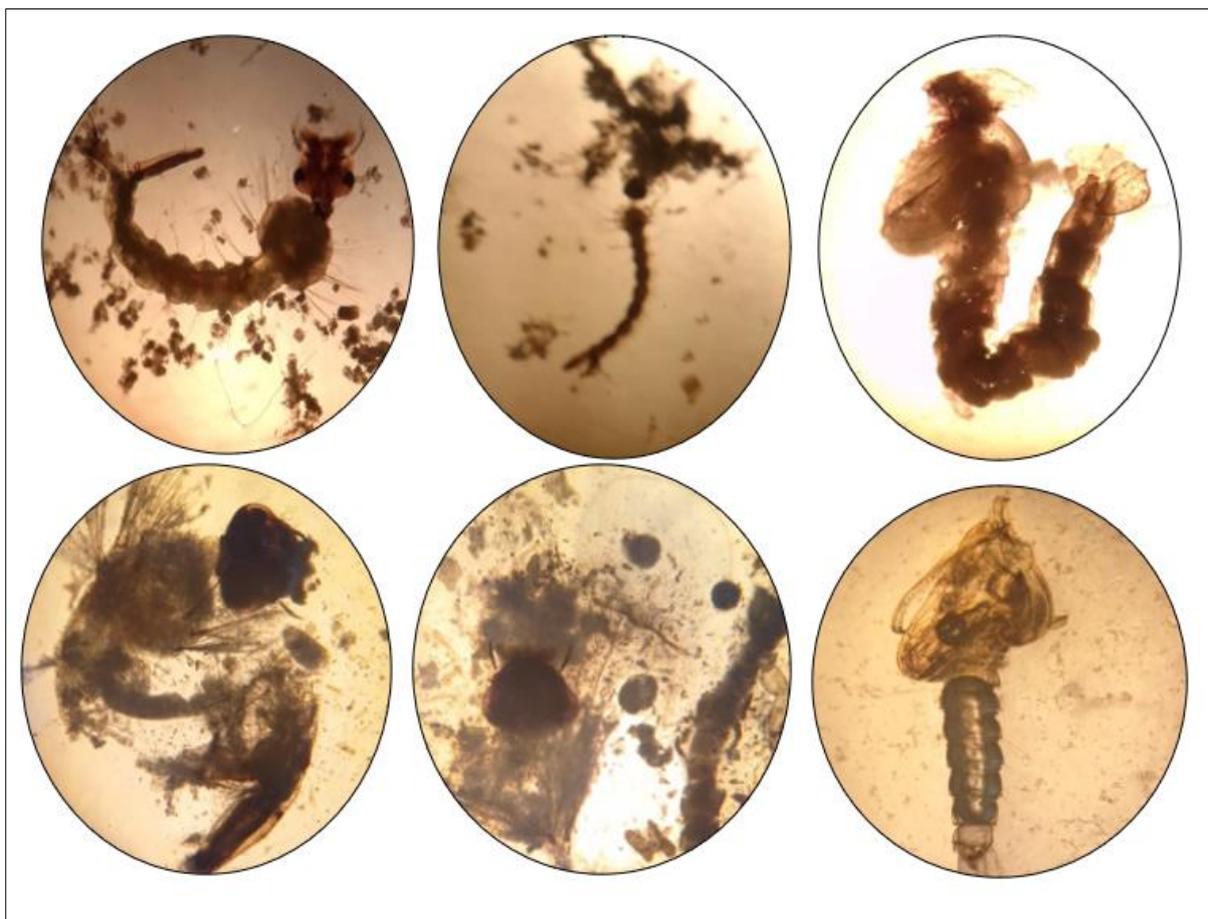


**Figure 22:** Larves stade II, III et IV de *Culex pipiens* témoins (A) et traitées (B, C, D, E, F) vues sous loupe.

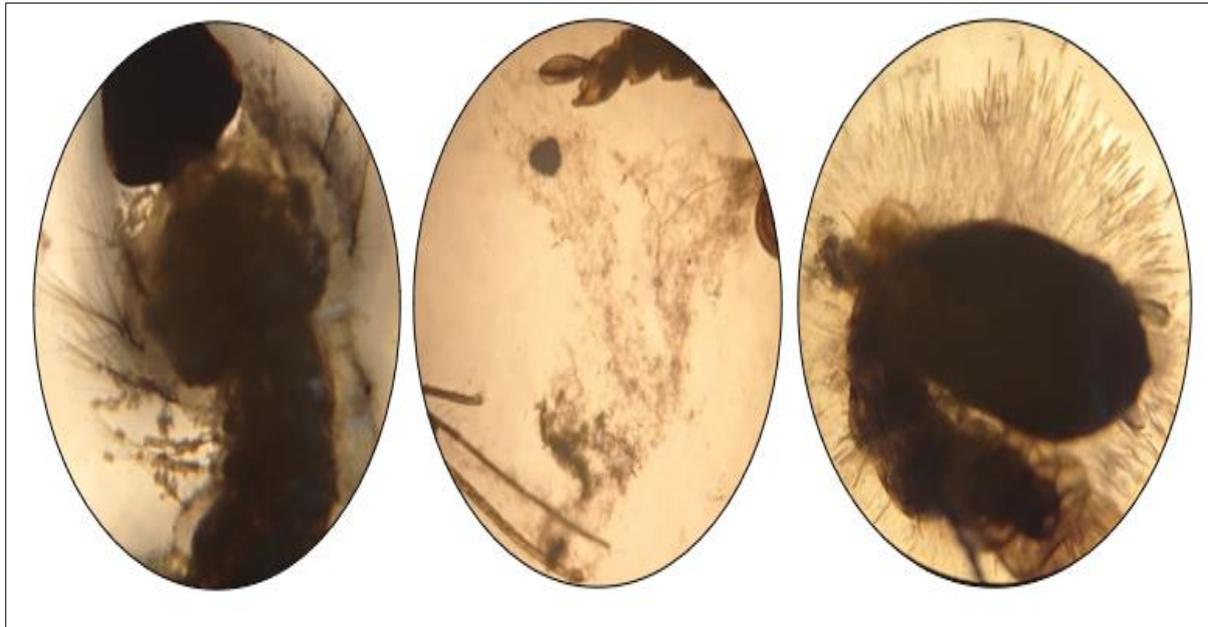
L'application des souches entomopathogènes *Verticillium sp* et *Cladosporium sp* sur les différents stades aquatiques du *Culex pipiens* entraîne l'apparition de symptômes similaires. Les individus traités présentent des taches au niveau de leurs abdomens suite à l'ingestion des spores des champignons (voir figure 32). L'apparition de ces taches est rapidement suivie d'une réduction des mouvements des larves et d'une diminution de la fréquence de prise de nourriture.



**Figure 23:** Prolifération du mycélium de couleur vert grisâtre sur les larves de *Culex pipiens* traités à une suspension fongique *Cladosporium sp.*



**Figure 24:** Effet de *Cladosporium sp.* sur les différents stades aquatiques de *Culex pipiens*.



**Figure 25:** Développement des spores du *Verticillium* sp sur le corps des larves et des nymphes vue sous loupe.

Les larves de *Culex pipiens*, une fois traitées avec *Cladosporium* sp, présentent une réduction de leur activité motrice suivie d'une mortalité. Après leur décès, on observe l'attachement des spores du champignon à la cuticule des larves, avec certaines d'entre elles commençant à germer.

Un mycélium vert se développe sur le corps des larves de *Culex pipiens* mortes, résultant de la germination de *Cladosporium* sp. En l'espace de 12 à 24 heures, le corps de la larve se dégrade entièrement.

Par ailleurs, lors du traitement des nymphes de *Culex pipiens*, une mortalité précoce survient avant leur émergence, généralement environ 3 jours après le début du traitement.

En résumé, l'application de *Cladosporium* sp sur les larves de *Culex pipiens* entraîne une diminution de leur activité motrice, une mortalité accompagnée de l'adhésion et de la germination des spores du champignon, ainsi qu'une dégradation complète du corps de la larve. De plus, les nymphes de *Culex pipiens* traitées présentent une mortalité avant leur émergence.

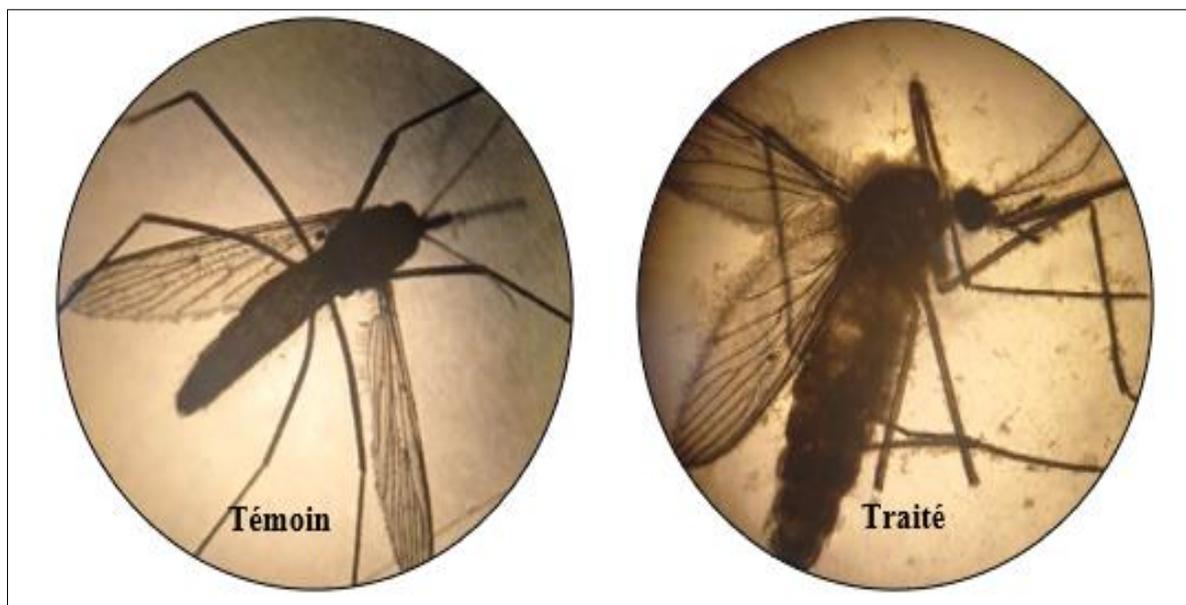
De manière générale, les spores des souches fongiques ont la capacité de pénétrer la cuticule des insectes et de se développer dans leur hémocèle. Une fois à l'intérieur, ces spores produisent des composés organiques spécifiques qui déclenchent des mécanismes internes de destruction (Gillespie et Clayton, 1989). Ces processus conduisent à des infections fongiques chez les insectes, entraînant ultimement leur mort. En outre, il est parfois observé une

perturbation de l'émergence normale des insectes infectés (figure 25), ceci est cohérent avec les résultats de **Bukhari et al., 2011**.



**Figure 26:** Témoins (A), Mort de la nymphe après traitement(B), interruption de l'émergence aux différents niveaux (c) vues sous loupe.

L'observation des adultes émergents à partir de nymphes traitées avec l'entomopathogène *Verticillium sp* a révélé la présence de certaines malformations, la plus significative étant l'atrophie des ailes par rapport à un adulte témoin (figure 27).



**Figure 27:** Apparition des ailes atrophiées chez un adulte traité au *Verticillium sp* en comparant avec le témoin.

En effet, les champignons entomopathogènes étudiés ont révélé une action précoce dès le premier jour de traitement, ce qui est en accord avec les observations rapportées par **Alves et al., (2002)** qui ont constaté une mortalité des larves de *Culex quinquefasciatus* dès le premier jour de traitement, bien que le taux de mortalité à ce stade soit de 50 %.

De plus, nous avons effectué une comparaison de l'efficacité des trois souches sur les larves de *Culex pipiens*. Après une analyse des résultats de mortalité, nous avons observé que la souche *Cladosporium sp* présente une mortalité plus rapide et plus intense que les souches *Beauveria sp* et *Verticillium sp*. En effet, la mortalité complète des larves a été atteinte au quatrième jour pour *Cladosporium sp*, au sixième jour pour *Verticillium sp* et au septième jour pour *Beauveria sp*.

D'après les recherches de **Roberts (1967)**, les champignons entomopathogènes ont une préférence pour cibler les larves de moustiques en passant par leur siphon respiratoire. Ainsi, lorsque ces agents pathogènes sont appliqués à la surface de l'eau, leur impact sur la mortalité des moustiques est considérablement amplifié.

L'étude réalisée pour évaluer l'effet des trois souches sur la mortalité des larves de *Culex pipiens* a révélé une efficacité remarquablement significative par rapport aux groupes témoins.

# **Conclusion générale**

### Conclusion générale

Les maladies à transmission vectorielle demeurent une préoccupation majeure en matière de santé publique en raison de leur distribution géographique étendue et des maladies graves qu'elles entraînent. Il est essentiel que les professionnels de la santé prennent en compte l'impact mondial de ces maladies et contribuent à leur contrôle et à leur gestion.

La lutte biologique, qui inclut notamment l'utilisation des micro-organismes entomopathogènes, se présente comme une alternative extrêmement prometteuse en vue d'assurer une protection efficace. En effet, les micro-organismes présents de manière naturelle dans les écosystèmes offrent de nombreux avantages dans le cadre de la lutte biologique. Leur grande diversité, leur capacité de dissémination, leur action spécifique et leur persistance dans l'environnement sont autant de caractéristiques qui les rendent précieux dans ce domaine.

Les micro-organismes utilisés pour la lutte biologique comprennent notamment les virus, les bactéries, les microchampignons, les nématodes et les protozoaires. Grâce à leurs propriétés spécifiques, ils peuvent être utilisés de manière ciblée pour contrôler efficacement les populations nuisibles sans nuire à l'environnement.

Parmi les différentes méthodes de lutte contre les vecteurs, l'utilisation de biopesticides à base de champignons représente une voie prometteuse, comme en témoignent les résultats obtenus lors des essais en laboratoire. Les conclusions de notre étude ont clairement démontré l'efficacité des isolats de *Beauveria sp*, *Verticillium sp* et *Cladosporium sp* contre les stades aquatiques du moustique *Culex pipiens*. Ces résultats renforcent la création des champignons entomopathogènes en tant qu'acteurs importants de la lutte biologique, offrant ainsi une alternative viable aux pesticides synthétiques. Cette approche présente de nombreux avantages, tels que la réduction de la pollution environnementale, la prévention de l'émergence de résistances chez les espèces pathogènes et la préservation

Dans le cadre des perspectives futures de notre travail, nous recommandons les études suivantes :

- ✓ Réaliser un élevage en laboratoire afin de mieux comprendre le cycle de développement de *Culex pipiens*.
- ✓ Faire une étude histologique afin d'identifier les différentes structures corporelles affectées par le traitement fongique.

- ✓ Envisager la possibilité de réaliser des nouveaux essais dans des conditions naturelles, à plus grande échelle sur le terrain, afin de confirmer les résultats obtenus dans notre étude.
- ✓ Tester l'efficacité des champignons entomopathogènes vis-à-vis des adultes du moustique *Culex pipiens* et comparer la sensibilité entre les femelles et les mâles lors du traitement, car il peut y avoir des différences entre les deux sexes.
- ✓ En poursuivant ces recherches, nous pourrions approfondir nos connaissances sur l'utilisation des champignons entomopathogènes dans la lutte contre les moustiques *Culex pipiens*, et ainsi développer des stratégies plus efficaces et ciblées pour contrôler ces vecteurs de maladies.

# **Annexes**

## Annexes

### 1-Matériels non biologique

#### 1. Les verreries

- ✓ Béchers (15ml, 25ml, 50ml, 100ml, 500ml)
- ✓ Fioles (100ml, 500ml, 1000ml)
- ✓ Pipettes pasteurs
- ✓ Boites de pétri
- ✓ Lames
- ✓ Les tubes
- ✓ Ance de platine
- ✓ Entonnoir
- ✓ Passoire

#### 2- Equipements

- ✓ Balance
- ✓ Plaque chauffante
- ✓ Ph- mètre
- ✓ Multi paramétrés (le conductimètre)
- ✓ Microscope optique
- ✓ Etuve
- ✓ Agitateur
- ✓ Etuve

### 2 - Milieux de culture

#### 2.1. Milieux Sabouraud

Peptone 10 g

Glucose massé 20 g

Agar-agar 15 g

Eau distillée 1000ml

PH 6,0

## 2 .2. Milieux OGA

Extrait autolytique de levure 5 g

Glucose 20 g

Agar bactériologique 15 g

Eau distillé 1000ml

PH 6,6

## 3 - Calcul de la concentration de la solution mère

### ❖ Principe

La numération cellulaire est la détermination du nombre de cellules contenues dans un volume précis de milieu liquide. On exprime le résultat de la numération en concentration cellulaire, c'est à dire en nombre de cellules par litre.

La numération cellulaire est réalisée directement par comptage au microscope, à l'aide d'une lame de comptage spéciale ou cellule de Malassez

Le volume de comptage est déterminé par :

- ✓ La surface du quadrillage gravé sur la lame.
- ✓ La profondeur de la chambre.

La cellule de Malassez possède un quadrillage spécifique comportant 100 rectangles.

Parmi les 100 rectangles totaux, on trouve 25 rectangles qui sont divisés en 20 petits carrés afin de faciliter le comptage (**Hazrat et al. 2012**).

### ❖ Remplissage de la cellule de numération

- ✓ Humecter les deux plateaux latéraux. Faire adhérer parfaitement la lamelle aux plateaux latéraux : pour cela placer la lamelle sur ces plateaux, puis à l'aide des pouces posés sur la lamelle, exercer une pression sur la lamelle tout en pratiquant un mouvement de va et vient jusqu'à perception d'une résistance.
- ✓ Placer la cellule de comptage sur une surface plane. Homogénéiser la suspension cellulaire, et prélever celle-ci à l'aide d'une pipette Pasteur. Remplir la chambre de comptage par capillarité, en plaçant la pointe de la pipette légèrement inclinée près de la lamelle sur la plate-forme centrale quadrillée

- ✓ Le remplissage doit être fait en une seule fois, sans bulles d'air, et sans faire déborder le liquide dans les rigoles. Laisser sédimenter les cellules sur le quadrillage quelques minutes, et passer à la numération.
- ✓ Après utilisation, la lame porte-objet et la lamelle planée sont immergés dans un bain d'eau de Javel pendant 5 minutes, puis sont rincées avec de l'eau distillée et essuyées avec du papier (sans frotter, en particulier au niveau du quadrillage).

❖ **Numération**

- ❖ Observer à l'objectif x10 pour repérer la position du quadrillage, et vérifier l'homogénéité de la répartition des cellules à compter (si la répartition est mauvaise, recommencer).
- ❖ Observer ensuite à l'objectif x40 pour réaliser le comptage (1 rectangle par champ).

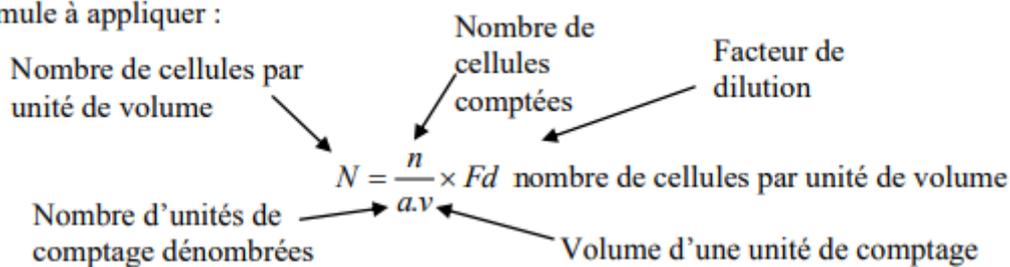
Le quadrillage est donc constitué de 10 bandes verticales de 0.25 mm de large et de 10 bandes horizontales de 0,22 mm de large formant ainsi 100 rectangles. On ne comptera les cellules que dans 10 des 25 rectangles non contigus pris au hasard dans la cellule. On totalise le nombre des cellules présentes dans chaque rectangle, arbitrairement, il est convenu de ne tenir compte que des cellules positionnées sur les cotés droits et supérieurs.

On fait ensuite la somme des cellules observées dans chaque rectangle, on divise ce nombre par le nombre de rectangles comptés, on obtient ainsi le nombre de cellules par rectangle, il suffit de multiplier le nombre obtenu par 100 pour connaître le nombre d'entités cellulaires par mm<sup>3</sup>. Sachant que 0.01mm<sup>3</sup>=10<sup>-5</sup>ml (1 ml=1 cm<sup>3</sup>=10mm<sup>3</sup>).

Donc la concentration cellulaire (nombre de spore/ml)= nombre de spores dans un rectangle x 105 x facteur de dilution).

**Calculs**

Formule à appliquer :



**Appliquer pour la solution de *Beauveria sp***

Le dénombrement de 10 rectangles donne les résultats suivants : 20, 18, 15, 17,24, 27, 17, 23,23 et 21cellules pour chaque unité de comptage (rectangle).

$$\text{Concentration} = \frac{N}{a.v} \times Fd = \frac{205}{10 \times 0,01 \times 10^{-3}} \times 10 = 0,20 \times 10^8 \text{ spore /ml.}$$

**Appliquer pour la solution de *Verticillium sp***

Le dénombrement de 10 rectangles donne les résultats suivants :33, 39, 39, 51,32, 32, 41,

$$\text{Concentration} = \frac{N}{a.v} \times Fd = \frac{401}{10 \times 0,01 \times 10^{-3}} \times 10 = 0,401 \times 10^8 \text{ spore /ml.}$$

**Appliquer pour la solution de *Cladosporium sp***

Le dénombrement de 10 rectangles donne les résultats suivants : 29, 18, 22, 15,13, 12, 14, 22, ,15 et 20 cellules pour chaque unité de comptage (rectangle).

$$\text{Concentration} = \frac{N}{a.v} \times Fd = \frac{180}{10 \times 0,01 \times 10^{-3}} \times 10 = 0,18 \times 10^8 \text{ spore /ml.}$$

**Tableau 01** : Les mortalités des larves et des nymphes traitées aux champignons *Beauveria sp*.

Les stades	L2	L3	L4	N	Témoins
J1	0	0	0	0	0
J2	1	1	2	0	0
J3	2	3	4	2	0
J4	4	5	6	4	0
J5	6	7	7	9	0
J6	8	9	9	10	0
J7	10	10	10	10	0
Total	10	10	10	10	0

**Tableau 02** : Les mortalités des larves traitées aux champignons *Verticillium sp.*

Les stades	L2	L3	L4	Témoins
J1	0	0	2	0
J2	0	2	4	0
J3	2	4	8	0
J4	4	7	9	0
J5	7	9	10	0
J6	10	10	10	0
J7	10	10	10	0
Total	10	10	10	0

**Tableau 03** : La mortalité des larves et nymphes traitées aux champignons *Cladosporium sp.*

Les stades	L2	L3	L4	N	Témoins
J1	1	2	1	3	0
J2	3	5	3	6	0
J3	7	8	7	9	0
J4	9	9	9	10	0
J5	10	10	10	10	0
J6	10	10	10	10	0
Total	10	10	10	10	0

## **Références bibliographiques**

### Référence Bibliographique

- 1) Ahmed S. I., 1994. Suitability and potential of entomopathogenic microorganisms for forest pest management - some points for consideration. *Intern. J. Pest Management* 40: 287-292. Afrikjan, E. G., V. A. Tchilingirlin et L. A. Tchil-Akopln. 1969. Bakteriální inekticidní preparát BIP-805. *Biol. J. Armenii*, t. 22,3-7.
- 2) Alves, S. B., L. Alves, et al. (2002). "Potential of some *Metarhizium anisopliae* isolates for control of *Culex quinquefasciatus* (Dipt., Culicidae)." *Journal of Applied Entomology* 126(9): 504-509.
- 3) Amandine C, 2008 Influence des modifications des facteurs environnementaux, socio-économiques & Culturels sur l'épidémiologie des maladies vectorielles. These pour obtenir le grade de docteur vétérinaire diplôme d'état l'Université Paul-Sabatier de Toulouse. TOU 3 – 4110.
- 4) Andersen, S. O. (1979). "Biochemistry of insect cuticle." *Annual review of entomology* 24(1): 29-59.
- 5) Anonyme., 2008\_ L ABC du conseiller agricole, fiche technique, synthèse des connaissances de base sur l'écologie des vers de terre .28-04-2008.
- 6) Aouati, A. (2016). Etude de la toxicité de certaines plantes sur les larves de *Culex pipiens* (Diptera, Culicidae), Thèse de doctorat en Sciences, Spécialité: Entomologie. Université Des Balenghien, T. (2007). "Les moustiques vecteurs de la Fièvre du Nil Occidental en Camargue." *Insecte* 146(3): 13-17.
- 7) Barnett H.C., Hunter Barry B., 2000. Illustrated genera of imperfect fungi. 4th edition. Freedom Palestine.
- 8) Barnett, H. L., and B. B. Hunter. "Illustrated Genera of Imperfect Fungi., Burgess Pub." *Co. Minneapolis* (2000): 218.
- 9) Bedossa, A. (2002). Cahier de formation -les moisissures d'intérêts médical, p : 16-19.
- 10) Benkalfate-El.H.C., 1991-Cartographie écologique de *Culex pipiens* (Diptera, Bensmira, S. and Z. Meraihi (2006). Isolement et caractérisation de souches fongiques de milieux extrêmes (sol et sebkha de la région de Biskra) productrices de cellulase thermostable à intérêt industriel, Université Frères Mentouri-Constantine 1.
- 11) Berchi, S., A. Aouati, et al. (2012). "Typologie des gîtes propices au développement larvaire de *Culex pipiens* L. 1758 (Diptera-Culicidae), source de nuisance à Constantine (Algérie)." *Ecologia mediterranea* 38(2): 5-16.
- 12) Bidochka, M. J. and C. L. Small (2005). "Phylogeography of *Metarhizium*, an insect pathogenic fungus." *Insect-fungal associations*: 28-49.

- 13) Bokhari T., Takken W et Koenraadt J.M.C., 2011. Development of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* formulations for control of malaria mosquito larvae. Parasite. Vector., DOI10.1186/1756-3305-4-23.
- 14) Botton B., Breton A., Fevre M., Gauthier S., Guy P.H., Larpent J.P., Reymond P., Sanglier J.J., Vayssier Y et Veau P., 1990. Moisissures utiles et nuisibles importance industrielle. 2ème édition. Masson.Collection Biotechnologies. P : 34-428.
- 15) Botton, B., A. Breton, et al. (1990). Moisissures utiles et nuisibles: importance industrielle, Masson Paris.
- 16) Botton, Bernard, A. Breton, and Michel Fèvre. Moisissures utiles et nuisibles : importance industrielle.
- 17) Bougharef, A. (2008). "Les Aspergillomes et Aspergilloses pulmonaires invasives: Données de la littérature et Enquête prospective à l'Hôpital Militaire d'Instruction Mohammed V-Rabat."
- 18) Boukraa Slimane, 2010 ; Bio-systématique des moustiques (Diptera : Culicidae) dans et aux alentours des fermes d'élevage en Belgique, Université de Liege Gembloux Agro Bio-Tech programme AVERROES. Thèse Bio-ingénieur.
- 19) Brunhes, J., A. Rhaim, et al. (1999). "Les moustiques de l'Afrique mediterraneenne CD-ROM d'identification et d'enseignement." Edition IRD, Montpellier, France.
- 20) Brunhes, J., A. Rhaim, et al. (1999). "Les moustiques de l'Afrique mediterraneenne CD-ROM d'identification et d'enseignement." Edition IRD, Montpellier, France.
- 21) Brunhes, J., A. Rhaim, et al. (2000). "Les moustiques de l'Afrique méditerranéenne. Logiciel d'identification et d'enseignement." Montpellier, France: IRD & IPT, CD-Rom collection didactique, Éditions IRD.
- 22) 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.
- 23) Butt, T. and M. Goettel (2000). "Bioassays of entomogenous fungi." Bioassays of entomopathogenic microbes and nematodes: 141-195.
- 24) Cagáň, L. and M. Švercel (2001). "The influence of ultraviolet light on pathogenicity of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin to the European corn borer, *Ostrinia Nubilalis* Hbn.(Lepidoptera: Crambidae)." Journal of Central European Agriculture.
- 25) Carnevale P. ROBERT V. (2009). Les anophèles : Biologie, transmission du Plasmodium et lutte anti vectorielle. Collection Didactiques. Marseille : Éditions IRD.

- 26) Chabane A., Harrache M. (2013). La lutte microbiologique en utilisant deux champignons entomopathogènes *Verticillium lecanii* et *Alternaria* sp contre le moustique domestique *Culex pipiens* (Linné, 1758). Mémoire Présenté pour obtenir le diplôme de l'Ingénieur d'état en Biologie Spécialité : Génie Biologie. Faculté des sciences, département des sciences de la nature et de la vie. Université M'Hamed Bougera de Boumerdes.
- 27) Chabasse, D., M. Pihet, et al. (2018). "BioQuiz/Mycologie."
- 28) Champion, R. (1997). "Identifier les champignons transmis par les semences." Identifier les champignons transmis par les semences: 1-400.
- 29) Clarkson, J. M. and A. K. Charnley (1996). "New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects." Trends in microbiology 4(5): 197-203.
- 30) Clements, A. N. (1999). The biology of mosquitoes. Volume 2: sensory reception and behaviour, CABI publishing.
- 31) Clements, Alan Neville. The biology of mosquitoes. Volume 2: sensory reception and behaviour. CABI publishing, 1999.
- 32) Coutin, R. (1988). "Les moustiques: des insectes nuisibles présents partout."
- 33) Culicidae) En milieu urbain (Ville de Tlemcen Algérie), recherche de causalites de la Culicidae) in New jersey. J Med Entomol. 42 : 490-494.
- 34) Darriet, F. (1998). "La lutte contre les moustiques nuisants et vecteurs de maladies." Editions Karthala 111.
- 35) Davet, P. (1996). Vie microbienne du sol et production végétale, Editions Quae.
- 36) De Kouassi, M. (2001). "Les possibilités de la lutte microbiologique." VertigO-la revue électronique en sciences de l'environnement. De Tlemcen.144p.
- 37) Doucet, R. (2010). Le climat et les sols agricoles, Éditions Berger.
- 38) Druart, F. (2017). "Production de micro-organismes entomopathogènes pour lutter contre les moustiques et caractérisation de leurs métabolites."
- 39) Dufresne, P. and S. Guy (2018). "Identification des champignons d'importance médicale." Institut National de santé publique. Québec: 1-64.
- 40) Duvallet, G. (2006). "Parasites, vecteurs de pathogènes et changements climatiques." Hydroécologie Appliquée 15: 87-96.
- 41) Dynamique démographique des stades pré imaginaux. Thèse de Magister, université entomopathogène *B. bassiana*. La revue électronique en sciences de l'environnement, Université du Québec, Montréal, (Vol : 2), No 2.

- 43) Farajollah A., 2015- Crans Wj. Bryant P., Burkhalter K.I ET Godsey Ms. Detection of Fenghour, H., A. Ladjama, et al. (2002). "Recherche de l'activité pectinolytiques chez 22 souches de champignons microscopiques isolées d'un sol de la région d'el kala." Technologies Avancées **14**: 55-60.
- 44) Ferron, P. (1978). "Biological control of insect pests by entomogenous fungi." Annual review of entomology **23**(1): 409-442.
- 45) Fondjo, E., V. Robert, et al. (1992). "Le paludisme urbain à Yaoundé (Cameroun). II: Etude entomologique dans deux quartiers peu urbanisés. Commentaire." Bulletin de la Société de pathologie exotique **85**(1): 57-63.
- 46) Gillespie, J. P., A. M. Bailey, et al. (2000). "Fungi as elicitors of insect immune responses." Archives of insect biochemistry and physiology **44**(2): 49-68.
- 47) Gubler, D. J., P. Reiter, et al. (2001). "Climate variability and change in the United States: potential impacts on vector-and rodent-borne diseases." Environmental health perspectives **109**(suppl 2): 223-233.
- 48) GUBLER, Duane J., REITER, Paul, EBI, Kristie L., et al. Climate variability and change in the United States: potentiel impacts on vector-and rodent-borne diseases. Environmental health perspectives, 2001, vol. 109, no suppl. 2, p. 223-233.
- 49) Guillaumot, L. (2005). "Les moustiques et la dengue." Institut Pasteur de Nouvelle-Caledonie.
- 50) Guiraud, J.-P. (1998). Microbiologie alimentaire, Dunod.
- 51) Hamid, S. (2015). Isolement et caractérisation de souches fongiques entomopathogènes locales du groupe des hyphomycètes et application sur le moustique responsable des arboviroses, Faculté des Sciences Biologiques.
- 52) Hanna (2013). Instruments France, Le guide pratique pour tester le pH du sol.
- 53) Heuchert, B., U. Braun, et al. (2005). "Morphotaxonomic revision of fungicolous *Cladosporium* species (hyphomycetes)." Schlechtendalia **13**: 1-78.
- 54) Himmi, O. (2007). "Les diptères (Insectes, Diptères) du Maroc: systématiques, Ecologique et études de épidémiologiques pilotes." Thes. Doc. Univ Mohamed V, Rabatt, 289p.
- 55) Hoog de GS, G. J., J. Gene, et al. "Atlas of clinical fungi. Electronic Version 3.1–CBS: Reus, 2011." URL: <http://www.clinicalfungi.org>.
- 56) Hoog, Gerrit Sijbrand, and Josep Guarro. Atlas of clinical fungi. Centraalbureau voor schimmelcultures, 1995. <https://www.hannainstruments.fr> .

- 57) Huber, G. and C. Schaub (2011). "La fertilité des sols: L'importance de la matière organique." Agriculture et terroir, chambre d'agriculture Bas Rhin.
- 58) Ignoffo C.M et Hostetter D.L., 1977. Environmental stability of microbial insecticides. Misc.Publ.Entomol. Soc. Am. 10: 1-80.USA. insecticides. Amer.Entomol.39 :83-91.
- 59) Jaronski S.T et Goettel M. S., 1997. Development of *Beauveria bassiana* for control of grasshoppers and locusts. In Microbial control of grasshoppers and locusts Memoire of entomological society of Canada 171: 400 p.
- 60) Johanna Fite (2018) – chargée de mission « vecteurs » le Centre national d'expertise sur les vecteurs .
- 61) Kimberly Gromek (École de pharmacie Eshelman de l'Université de Caroline du Nord, États-Unis) Matthew Hung (assistant de projets de développement de la pratique du FIP) Nuria Montero (Directrice de la pratique pharmaceutique, Forum pharmaceutique des Amériques, Costa Rica) Gonçalo Sousa Pinto (Responsable FIP pour le développement et la transformation des pratiques.
- 62) Koenraadt, C., S. Majambere, et al. (2004). "The effects of food and space on the occurrence of cannibalism and predation among larvae of *Anopheles gambiae* sl." Entomologia Experimentalis et Applicata 112(2): 125-134.
- 63) Koua, H., S. Han, et al. (1998). "Histopathology of *Anopheles gambiae* sl Giles, 1902 (Diptera, Culicidae) subjected to the larvicidal activity of the aqueous extract of *Persea americana* Miller, 1768 (Lauraceae)." Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique (1990) 91(3): 252-256.
- 64) Kouassi M., 2001. Les possibilités de la lutte microbiologique, Emphase sur le champignon.
- 65) Kpondjo, N. M. "Développement des larves de moustiques dans un écosystème particulier : milieu sous jacinthe d'eau *Eichhornia crassipes* (Mart) Solms-Laubauch." Rapport de fin de cycle, Université d'Abomey-Calavi, 50p (2008).
- 66) Kwon-Chung, K. June, and John Eugene Bennett. "Medical mycology." Revista do Instituto de Medicina.
- 67) Lacey, L. A. and A. H. Undeen (1986). "Microbial control of black flies and mosquitoes." Annual review of entomology 31(1): 265-296.
- 68) Lalami, A. E. O., T. Hindi, et al. (2009). "Inventaire et répartition saisonnière des Culicidae dans le centre du Maroc." Entomologie faunistique-Faunistic entomology.

- 69) Lefevre, p.-c. And j. Blancou (2003). "chermette René Principales maladies infectieuses et parasitaires du bétail (Europe et Régions Chaudes) Editions Tec et Doc, Editions Médicales Internationale." Londres, Paris, New York.
- 70) Licciardi S., Herné et Darriet F., 2006. Lethal and behavioural effect of three synthetic repellents (deet, IR 3535, KBR 3023) on *Aedes aegypti* mosquitoes in laboratory assays, Med. Vet. Entomol. 20, France, pp:288-293.
- 71) Magalhães, B. P., T. M. Butt, et al. (1989). "Formation of appressoria in vitro by the entomopathogenic fungus *Zoophthora radicans* (Zygomycetes: entomophthorales)."
- 72) 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 *Eriopsis connexa*. J.Invertebr.Pathol. 52 :471-473. Maloine S. A. Paris. 458 p.
- 73) McCoy C. W., Samson R. A et Boucias D. G., 1988. Entomogenous fungi. Dans : Ignoffo, C. M. et Mandam N. B. (Éds.) : Handbook of Natural Pesticides Volume V; Microbial Insecticides Part A: Entomogenous Protozoa and Fungi. Florida, USA, CRC Press, pp. 151-236.
- 74) Messai, N., S. Berchi, et al. (2010). "Inventaire systématique et diversité biologique de Culicidae (Diptera: Nematocera) dans la région de Mila (Algérie)." Entomologie faunistique-Faunistic entomology.
- 75) Organisation mondiale de la Santé, O. (2004). "Questions fréquemment posées à propos de l'utilisation du DDT pour la lutte antivectorielle."
- 76) Nicklin J., Graeme-Cook K., Paget T et Killington R., 2000. L'essentiel en microbiologie. Edition.
- 77) Organisation mondiale de la Santé, O. (2004). "Questions fréquemment posées à propos de l'utilisation du DDT pour la lutte antivectorielle." Paris : Masson, 1990.
- 78) Pintureau B., 2009. Application aux arthropodes ravageurs et aux adventices, Ed. Elipses, Paris, 128p.
- 79) Pritchard, R. C. and D. B. Muir (1987). "Black fungi: a survey of dematiaceous hyphomycetes from clinical specimens identified over a five year period in a reference laboratory." Pathology **19**(3): 281-284.
- 80) Pritchard, R. C. and D. B. Muir (1987). "Black fungi: a survey of dematiaceous hyphomycetes from clinical specimens identified over a five year period in a reference laboratory." Pathology **19**(3): 281-284. *quinquefasciatus* en milieu urbain au Burkina Faso. Thèse de doctorat en Entomologie.

- 81) Randolph, S. E. (2003). Faune, climat et politique: Causes possibles aux récents accroissements des zoonoses à tiques. Annales de l'Institut Pasteur. Actualités.
- 82) Rehim, N. and N. Soltani (1999). "Laboratory evaluation of Alsystin, a chitin synthesis inhibitor, against *Culex pipiens* L.(Dip., Culicidae): effects on development and cuticle secretion." Journal of Applied Entomology **123**(7): 437-441.
- 83) Reisen, W. K. (2010). "Landscape epidemiology of vector-borne diseases." Annual review of entomology **55**: 461-483.
- 84) Resseguier, P. (2011). Contribution à l'étude du repas sanguin de *culex pipiens* .
- 85) Robert, V. (1989). La transmission du paludisme humain: la zone des savanes d'Afrique de l'Ouest, Paris 6.
- 86) Robert, V. (2017). "Introduction à l'entomologie médicale et vétérinaire." Entomologie médicale et vétérinaire, Quae & IRD edn: 37-59.
- 87) Rodhain F., Perez C., 1985 - Précis d'entomologie médicale et vétérinaire. Ed. Rodhain, F. and C. Perez (1985). "Precis d'entomologie medicale et veterinaire; notions d'epidemiologie des maladies a vecteurs."
- 88) Rozendaal, J. A. and W. H. Organization (1999). La lutte antivectorielle: Méthodes à usage individuel et communautaire, Organisation mondiale de la Santé.
- 89) Samson, R. A., H. C. Evans, et al. (2013). Atlas of entomopathogenic fungi, Springer Science & Business Media.
- 90) Schaffner, Angel, Geoffroy, P. Herve, Rhaiem, Brunhes. (2001) The Mosquitoes of Europe. Publisher: IRD Editions & EID Méditerranée ISBN: 2-7099-1485-9; <https://mivegec.fr/fr/identiciels>.
- 91) Schaffner, F., W. Van Bortel, et al. (2004). "First record of Aedes (Stegomyia) albopictus in Belgium." Journal of the American Mosquito Control Association **20**(2): 201-203.
- 92) Seye, F., M. Ndiaye, et al. (2012). "Evaluation of entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* formulated with suneem (neem oil) against *Anopheles gambiae* sl and *Culex quinquefasciatus* adults." Malaria Chemotherapy Cont Elim **1**(1-6).
- 93) Soza-Gómez D.R et Alves S. B. (2000). Temperature and relative humidity requirements for conidiogenesis of *Beauveria bassiana* (Deuteromycetes: Monilliceae). Anais da Sociedade Entomológica do Brasil (english version) 29 :515-521.

## Références bibliographiques

---

- 94) Starnes R. L.; Liu C. L et Marone P.G. (1993). History, use and future of microbial insecticides. Amer.
- 95) Starnes, R. L., C. L. Liu, et al. (1993). "History, use, and future of microbial insecticides." American Entomologist **39**(2): 83-91.
- 96) Sutton, D. A., A. W. Fothergill, et al. (1998). Guide to clinically significant fungi, Williams & Wilkins.
- 97) Tanada, Y. and H. K. Kaya (2012). Insect pathology, Academic press.
- 98) Thierry Damien A.O., 2011-Lutte bioécologique contre *Culex pipiens*.
- 99) Tong-Kwee, L., R. Muhamad, et al. (1989). "Studies on *Beauveria bassiana* isolated from the cocoa mirid, *Helopeltis theobromae*." Crop Protection **8**(5): 358-362. Tropical de São Paulo 34 (1992) : 504-504. Université de Ouagadougou. 127p.
- 100) West Nile viral RNA from an overwintering pool of *Culex pipiens* (Diptera: Workneh, F., A. Van Bruggen, et al. (1993). "Variables associated with corky root and Phytophthora root rot of tomatoes in organic and conventional farms." Phytopathology **83**(5): 581-589.
- 101) Wraight, S. and D. W. Roberts (1987). "Insect control efforts with fungi." Developments in industrial microbiology **28**: 77-87.

## Résumé

L'objectif de notre travail consiste à isoler et identifier des champignons entomopathogènes à partir du sol de trois régions d'études et tester leur pathogénicité contre les larves de *Culex pipiens*. Après l'échantillonnage, nous avons analysé le sol de chaque échantillon pour estimer les paramètres physico-chimiques et discuter leur influence sur le développement et l'abondance des champignons isolés. L'isolement des champignons à partir des six sols agricoles a mis en évidence 17 isolats. Le genre le plus abondant est *Aspergillus* avec un taux de 23,56 % suivi par *Penicillium sp* avec un taux de 17,64 %, On a opté pour ces trois souches entomopathogènes *Beauveria sp*, *Cladosporium sp* avec un taux 5,88 % pour les deux genres et *Verticillium sp* avec un taux de 11,76%, puis nous avons fait le test de pathogénicité des champignons entomopathogènes vis-à-vis les stades aquatiques de *Culex pipiens*. Le nombre faible des champignons isolés est due au pH basique du sol qui est un facteur limitant de la croissance des champignons. Chez les larves du *Culex pipiens* traitées, on assiste à une diminution des mouvements puis une mortalité. Tout juste après la mort, les spores du champignon sont en adhésion sur la cuticule et d'autres en début de germination, D'après nos résultats nous avons constaté que la mortalité des larves évolue avec l'entomopathogène utilisé et la durée de traitement. En effet, nous avons aussi constaté que ces champignons agissent dès le premier jour du traitement. D'après les résultats de mortalité nous avons remarqué que la mortalité des larves traitées avec *Cladosporium sp* est plus rapide et intense par rapport à la mortalité des larves traitées avec les souches de *Beauveria sp*, *Verticillium sp*. Ces champignons entomopathogènes attaquent 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.

**Mots clés :** sol, entomopathogènes, isolement, Identification, lutte biologique et *Culex pipiens*.

## Abstract

The aim of our work was to isolate and identify entomopathogenic fungi from the soil of three study regions and test their pathogenicity against *Culex pipiens* larvae. After sampling, we analyzed the soil from each sample to estimate physico-chemical parameters and discuss their influence on the development and abundance of isolated fungi. Isolation of fungi from the six agricultural soils revealed 17 isolates. The most abundant genus was *Aspergillus* with a rate of 23.56%, followed by *Penicillium sp* with a rate of 17.64%. We opted for these three entomopathogenic strains *Beauveria sp*, *Cladosporium sp* with a rate of 5.88% for both genera and *Verticillium sp* with a rate of 11.76%, then tested the pathogenicity of entomopathogenic fungi against the aquatic stages of *Culex pipiens*. The low number of fungi isolated is due to the basic pH of the soil, which is a limiting factor for fungal growth. Treated *Culex pipiens* larvae show a decrease in movement, followed by mortality. Immediately after death, the fungus spores adhere to the cuticle, while others begin to germinate. Our results show that larval mortality evolves with the entomopathogen used and the duration of treatment. In fact, we also found that these fungi were active from the first day of treatment. From the mortality results we noted that the mortality of larvae treated with *Cladosporium sp* was more rapid and intense than that of larvae treated with strains of *Beauveria sp*, *Verticillium sp*. These entomopathogenic fungi attack mosquito larvae preferentially via the respiratory siphon. This is why this germ kills more mosquitoes when applied to the water surface.

**Key words:** soil, entomopathogens, isolation, identification, biological control and *Culex pipiens*.

## ملخص

الهدف من عملنا هو عزل وتحديد الفطريات الممرضة للحشرات من تربة ثلاث مناطق دراسة واختبار مسبباتها المرضية ضد يرقات *Culex pipiens* بعد أخذ العينات، تم تحليل تربة كل عينة لتقدير المعايير الفيزيائية والكيميائية ومناقشة تأثيرها على تطور ووفرة الفطريات المعزولة. كشفت عزل الفطريات عن التربة الزراعية الست عن 17 عزلة. الجنس الأكثر وفرة هو *aspergillus sp* بمعدل 23.56% يليه *penicillium sp* بمعدل 17.64%. اخترنا هذه السلالات الثلاث المسببة للأمراض الحشرية *Beauveria sp*، *Cladosporium sp* بمعدل 5.88% لكل من الأجناس و *Verticillium sp* بمعدل 11.76%، ثم أجرينا اختبار التسبب في أمراض الفطريات الحشرية مقابل المراحل المائية من *Culex pipiens*. يرجع انخفاض عدد الفطريات المعزولة إلى درجة الحموضة الأساسية في التربة والتي تعد عاملاً مقيداً لنمو الفطريات. في يرقات *Culex pipiens* المعالجة، هناك انخفاض في الحركة والوفيات بعد الموت مباشرة، تلتزم جراثيم الفطر بالبشرة وغيرها في الإنبات المبكر، بناءً على نتائجنا وجدنا أن وفاة اليرقات يتطور مع الاستخدام الممرض للحشرات ومدة العلاج. في الواقع، وجدنا أيضاً أن هذه الفطريات تعمل منذ اليوم الأول للعلاج. بناءً على نتائج الوفيات، وجدنا أن وفيات اليرقات المعالجة باستخدام *Cladosporium sp* أسرع وأكثر كثافة مقارنة بوفيات اليرقات المعالجة بسلالات *Beauveria sp*، *Verticillium sp*. تهاجم هذه الفطريات المسببة للأمراض الحشرية يرقات البعوض بشكل تفضيلي من خلال الجهاز التنفسي. هذا هو السبب في أن هذه الجرثومة تقتل المزيد من البعوض عند وضعها على سطح الماء.

**كلمات مفتاحية:** التربة، مسببة للأمراض الحشرية، عزل، تحديد الهوية، المكافحة البيولوجية و *Culex pipiens*