

MINISTRE 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 BIOLOGIE



Réf :/UAMOB/F.SNV.ST/DEP.BIO/2018

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES
EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE MASTER

Domaine : SNV Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biotechnologie microbienne

Présenté par :

BOUKHALFA Saida

Thème

**Isolement et identification des souches fongiques
entomopathogènes locales et application sur le moustique
domestique *Culex pipiens***

Soutenu le : **28/ 06 / 2018** devant le jury composé de :

| <i>Nom et Prénom</i> | <i>Grade</i> | | |
|---------------------------------|--------------|------------------------|---------------------|
| <i>Mme Bouteldja R</i> | <i>MCB</i> | <i>Univ. de Bouira</i> | <i>Présidente</i> |
| <i>Mme Hamid S</i> | <i>MCB</i> | <i>Univ. de Bouira</i> | <i>Promotrice</i> |
| <i>Mme Meribai –Boughelit N</i> | <i>MAA</i> | <i>Univ. de Bouira</i> | <i>Examinatrice</i> |

Année Universitaire : 2017/2018

Résumé

L'utilisation des insecticides chimiques, contre les insectes vecteurs de maladies, présente des effets négatifs pour l'environnement et la santé humaine. Aujourd'hui, Il est devenu nécessaire d'accorder une priorité aux insecticides biologiques comme moyen de lutte alternatif contre les insectes nuisibles. En effet, cette dernière fait appel à l'utilisation des agents entomopathogène (virus, bactéries et champignons). L'objectif de notre travail consiste à isoler et identifier des champignons entomopathogènes à partir du sol de trois régions d'études (Bouira, Alger et Blida) 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. Ensuite nous avons fait le test de pathogénicité des champignons entomopathogènes vis-à-vis les larves de *Culex pipiens* (stade aquatique). L'isolement à partir du sol nous a permis d'identifier la présence de 09 espèces fongiques dont 04 espèces sont entomopathogènes : *Beauveria bassiana*, *Cladosporium sp*, *Aspergillus flavus* et *Verticillium lecanii*. Nous avons enregistré une variabilité dans l'abondance des espèces isolées par région dont 57,14% pour Alger, 28,57% pour Bouira et 14,28% pour Blida. Le nombre faible des champignons isolés est due au pH basique du sol qui est un facteur limitant de la croissance des champignons. Nous avons remarqué une différence dans la pathogénicité des champignons entomopathogènes selon le taux de mortalité des larves traitées, d'après nos résultats on remarque que le *Verticillium lecanii* est le plus efficace et même plus rapide que le *Cladosporium sp*. Dans le présent travail, nous avons confirmé l'utilité des champignons entomopathogènes dans la lutte biologique.

Mots clés : champignons entomopathogènes, lutte biologique, *Culex pipiens*, *Cladosporium sp*, *Verticillium lecanii*.

Abstract

The use of chemical insecticides against insects-vector diseases has negative effects on the environment and human health. Today, it has become necessary to give priority to biological insecticides as a means of alternative pest control. Indeed, there is use of entomopathogenic agents (viruses, bacteria and fungi). The objective of our work is to isolate and identify entomopathogenic fungi from the soil of three study regions (Bouira, Algiers and Blida) and test their pathogenicity against *Culex pipiens* larvae. After sampling, we analyzed the soil of each sample to estimate physicochemical parameters and discuss their influence on the development and abundance of isolated fungi. Then we tested the pathogenicity of entomopathogenic fungi against *Culex pipiens* larvae (aquatic stage). The isolation from the soil allowed us to identify the presence of 09 fungal species of which 04 species are entomopathogenic: *Beauveria bassiana*, *Cladosporium sp*, *Aspergillus flavus* and *Verticillium lecanii*. Regarding the abundance per region, a variability has been recorded for the isolated species (57,14% for Algiers, 28,57% for Bouira and 14,28% for Blida). The low number of isolated fungi is due to the basic pH of the soil, which is a limiting factor in the growth of fungi. We noticed a difference in the pathogenicity of entomopathogenic fungi according to the mortality rate of the treated larvae; according to our results, we note that *Verticillium lecanii* is the most efficient and even faster than *Cladosporium sp*. In this work, we confirmed the usefulness of entomopathogenic fungi in biological control.

Key words: entomopathogenic fungi, biological control, *Culex pipiens*, *Cladosporium sp*, *Verticillium lecanii*.

ملخص

استخدام المبيدات الحشرية الكيميائية ضد الحشرات التي تحمل المرض له آثار سلبية على البيئة وصحة الإنسان. وأصبح من الضروري إعطاء الأولوية للمبيدات الحشرية البيولوجية كوسيلة للتحكم في الآفات البديلة. في الواقع ، هذا الأخير يستلزم استخدام العوامل الممرضة للحشرات (الفيروسات والبكتيريا والفطريات). الهدف من عملنا هو عزل وتحديد الفطريات الممرضة من تربة ثلاث مناطق (البويرة ، الجزائر ، البلدية) واختبار امكانية ترميضاها ضد يرقات *Culex pipiens*. بعد أخذ العينات ، قمنا بتحليل تربة كل عينة لتقدير المعايير الفيزيائية الكيميائية ومناقشة تأثيرها على تطور و وفرة الفطريات المعزولة. ثم قمنا باختبار امكانية ترميض الفطريات الممرضة للحشرات ضد يرقات *Culex pipiens* (المرحلة المائية). بمعزل عن الأرض سمح لنا لتحديد وجود 09 أنواع من الفطريات، 04 الأنواع الممرضة: *Beauveria bassiana*, *Cladosporium sp*, *Aspergillus flavus* et *Verticillium lecanii*. سجلنا تبايناً في وفرة الأنواع المعزولة بحسب المنطقة، بما في ذلك 57,14% للجزائر العاصمة ، و 28,57% في البويرة و 14,28% للبلدية. ويرجع انخفاض عدد الفطريات المعزولة إلى درجة الحموضة الأساسية للتربة ، وهو عامل يحد من نمو الفطريات. لاحظنا فرق في امكانية الترميض للفطريات المعزولة على اساس معدل وفيات اليرقات المعالجة، وفقا لنتائجنا نلاحظ أن *Verticillium lecanii* هو أكفأ وأسرع حتى من *Cladosporium sp*. في هذا العمل ، أكدنا فائدة الفطريات الممرضة للحشرات في مكافحة البيولوجية.

الكلمات المفتاحية: الفطريات الممرضة للحشرات، مكافحة البيولوجية ، *Culex pipiens*,

Cladosporiumsp, *Verticillium lecanii*.

A decorative border surrounds the page, featuring a butterfly in the top left, a butterfly on a yellow flower in the bottom left, and a stem of purple flowers on the right side.

Remerciement

Nous remercions avant tout Allah tout puissant, de nous avoir guidé toutes les années d'étude et nous avoir donné la volonté, la patience et le courage pour terminer ce travail.

Mes remerciements à Mme Hamid Sonia pour avoir proposé ce thème et accepté d'encadrer et suivre ce travail avec patience sans limites.

Mes remerciements à Mme Meribai- Boughelit Naidia pour d'avoir accepté d'examiner ce travail.

J'adresse mes remerciements aussi à la présidente de jury Mme Bouteldja . Razika pour avoir bien voulu présider ce jury.

Enfin, nous remercions, tous ceux qui de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce travail.



Dédicace

Avec respect et amour je dédie ce mémoire :

A mes parents que dieu les protège.

A celle qui attendu avec patience les fruits de sa bonne éducation (chère mère).

A mes deux frère GHani et Yassine que dieu les protège

*A mon mari qui m'a indiqué la bonne voie en me rappelant que la volonté fait
toujours la bonne réussite*

A mes chères amies

*Akila, Amel, Djamila, Farida, Hassiba, Kenza, Sabrine, Sara, Nadia, Karima,
Mames, Kahina, Imen, Hadjer,*

Saida

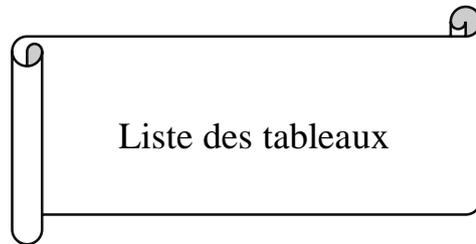
SOMMAIRE

INTRODUCTION

| | |
|--|----------|
| CHAPITRE 1 : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE | 1 |
| I -Généralité sur les champignons | 1 |
| 1. Définition..... | 1 |
| 1.1. Caractéristique structurale..... | 1 |
| 1.1.1. Reproduction..... | 2 |
| 1.1.2. Mode de vie..... | 3 |
| 1.1.3. Respiration..... | 4 |
| 1.1.4 .Classification..... | 4 |
| 2. Identification des champignons..... | 4 |
| 2.1. Caractère macroscopique..... | 5 |
| 2.1.1. Aspect des colonies..... | 5 |
| 2.1.2. Relief des colonies..... | 5 |
| 2.1.3. Couleur des colonies..... | 5 |
| 2.2. Caractères microscopique..... | 5 |
| 3. Besoins nutritifs..... | 5 |
| 3.1. Eléments nutritifs..... | 6 |
| 4. Les conditions environnementales..... | 7 |
| II- Les champignons entomopathogènes..... | 8 |
| 1. Définition..... | 8 |
| 2. Taxonomie..... | 8 |
| 3. Cycle biologique..... | 9 |
| 4. Interactions insectes champignons..... | 12 |
| 5. mode d'action..... | 12 |
| 5.1. Pénétration par cavité buccale et système digestif..... | 12 |
| 5.2. Pénétration par invasion cuticulaire..... | 13 |
| 6. Facteurs affectant l'efficacité des champignons entomopathogènes..... | 13 |
| 6.1 Facteurs liés aux pathogènes..... | 13 |
| 6.2 Facteurs dépendant de l'hôte..... | 13 |

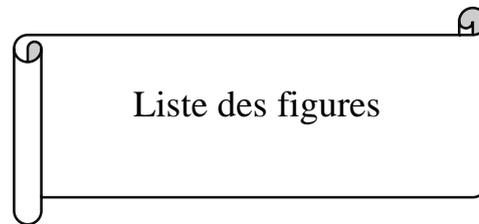
| | |
|---|-----------|
| 6.3 Facteurs de l'environnement..... | 14 |
| 6.3.1 Rayonnement solaire..... | 14 |
| 6.3.2. Température..... | 14 |
| 6.3.3. Humidité..... | 14 |
| 7. utilisation des champignons entomopathogène dans la lutte biologique..... | 14 |
| III. Données bibliographiques sur le moustique <i>Culex pipiens</i>..... | 15 |
| 1. Généralités sur les moustiques..... | 15 |
| 2. Biologie de <i>Culex pipiens</i> | 15 |
| 2.1. Définition..... | 15 |
| 2.2. La position systématique de <i>Culex pipiens</i> | 16 |
| 2.3. Nutrition des <i>Culex pipiens</i> | 16 |
| 2.4. Morphologie de <i>Culex pipiens</i> | 17 |
| 2.4.1. Morphologie des pièces buccales..... | 17 |
| 2.4.1.1. Pièce buccale chez la femelle <i>Culex pipiens</i> | 18 |
| 2.4.1.2. Pièce buccale chez le mâle..... | 18 |
| 2.5. Cycle de développement | 19 |
| 2.5.1. Œufs..... | 20 |
| 2.5.2. La larve..... | 20 |
| 2.5.3. La nymphe..... | 21 |
| 2.5.4. Stade de l'adulte..... | 22 |
| 3. Ecologie de <i>Culex pipiens</i> | 23 |
| 4. Aspect de nuisance chez <i>Culex pipiens</i> | 24 |
| 5. Méthodes de lutte contre le <i>Culex pipiens</i> | 25 |
| 5.1. Méthodes physique..... | 25 |
| 5.2. Méthode chimique..... | 25 |
| 5.3. Méthodes biologique..... | 25 |
| CHAPITRE 2 : MATERIEL ET METHODES..... | 26 |
| 1. Matériel biologique..... | 26 |
| 1-1. Matériel entomologique (<i>Culex pipiens</i>)..... | 26 |
| 1-2. le sol..... | 26 |
| 1.3. Matériels non biologique..... | 26 |
| 2. Echantillonnage et sites d'isolement..... | 26 |
| 3. Analyses chimique du sol..... | 27 |

| | |
|---|-----------|
| 3.1. Détermination du pH des échantillons..... | 27 |
| 3.2. Humidité résiduelle (à 105°C)..... | 27 |
| 3.3. La salinité du sol..... | 28 |
| 4. Isolement des champignons à partir du sol..... | 29 |
| 4.1. Purification et conservation des souches isolées..... | 29 |
| 4.2. Méthodes d'identification..... | 30 |
| 4.2.1. Observation macroscopique..... | 30 |
| 4.2.2. Identification microscopique..... | 30 |
| 4.2.3. Le relevé de l'abondance des souches fongiques isolées..... | 31 |
| 4.3. Sélection des souches fongiques entomopathogènes..... | 31 |
| 5. Activité biologiques de souches fongiques entomopathogènes isolée vis-à-vis le stade aquatique du <i>C. pipiens</i> | 31 |
| 5.1. Récolte des stades larvaires..... | 31 |
| 5.2. Préparation de la solution entomopathogène..... | 32 |
| 5.3. Mode de traitement | 34 |
| 6. Traitement des données..... | 34 |
| 6.1. Calcul du pourcentage de mortalité..... | 34 |
| CHAPITRE 3 : RESULTATS ET DISCUSSION..... | 35 |
| 1. Résultats de la caractérisation chimique des échantillons du sol..... | 35 |
| 2. Résultats d'isolement des souches fongiques..... | 36 |
| 2.1. Caractères microscopiques et macroscopiques des principaux champignons isolés..... | 37 |
| 2.2. Le relevé d'abondance des souches fongiques isolées..... | 43 |
| 3. La sélection des souches fongiques entomopathogènes..... | 45 |
| 3.1. Toxicité des champignons entomopathogènes <i>Verticillium lecanii</i> et <i>Cladosporium sp</i> sur stade aquatique L3 du <i>Culex pipiens</i> | 46 |
| 3.2. Calcul de taux de mortalité..... | 46 |
| 3.3. Symptomatologie..... | 48 |
| Conclusion générale..... | 53 |
| Références bibliographiques | |
| . | |
| Annexes | |



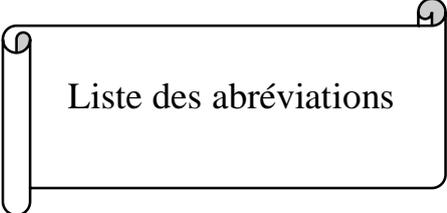
Liste des tableaux

| | |
|---|----|
| Tableau 01 : Classification simplifiée du règne fongique..... | 4 |
| Tableau 02 : Eléments nutritifs des champignons | 6 |
| Tableau 03 : Besoins en températures de différentes catégories des champignons..... | 8 |
| Tableau 04 : Caractéristiques des échantillons du sol utilisés..... | 28 |
| Tableau 05 : La salinité des sols en fonction de la conductivité électrique..... | 29 |
| Tableau 06 : Propriétés chimique des échantillons du sol prélevés..... | 35 |
| Tableau 07 : Les caractères macroscopique et microscopiques des genres fongiques isolées..... | 41 |
| Tableau 08 : Les mortalités enregistré des larves traité par <i>Verticillium lecanii</i> et <i>Cladosporium sp</i> | 46 |
| Tableau 09 : Symptomatologies de l'entomopathogénicité des champignons sélectionnées sur les larves traité..... | 52 |



Liste des figures

| | |
|--|----|
| Figure 01 : Schématisation de la structure de la paroi fongique..... | 2 |
| Figure 02 : Schéma présent la reproduction asexuée et sexuée d'une moisissure..... | 2 |
| Figure 03 : Schéma du cycle biologique des champignons entomopathogène..... | 10 |
| Figure 04 : Mode de pénétration des champignons entomopathogènes dans la cuticule des insectes..... | 11 |
| Figure 05 : <i>Culex pipiens</i> | 16 |
| Figure 06 : œufs de <i>Culex pipiens</i> | 18 |
| Figure 07 : Appendices buccaux d'un insecte, tête en vue latérale..... | 18 |
| Figure 08 : Tête de moustique male à gauche et femelle à droite..... | 19 |
| Figure 09 : Cycle de développement du moustique <i>Culex pipiens</i> | 19 |
| Figure 10 : œufs de <i>culex pipiens</i> | 20 |
| Figure 11 : larve du <i>culex pipiens</i> | 21 |
| Figure 12 : aspect générale d'une nymphe de <i>Cx pipiens</i> | 21 |
| Figure 13 : <i>Cx pipiens</i> au stade adulte (imago)..... | 22 |
| Figure 14 : gîtes larvaires naturels..... | 23 |
| Figure 15 : gîtes artificiels..... | 24 |
| Figure 16 : séchage et refroidissement des échantillons du sol..... | 28 |
| Figure 17 : Isolement des champignons..... | 29 |
| Figure 18 : Purification et conservation des souches isolées..... | 30 |
| Figure 19 : La récolte des larves du <i>culex pipiens</i> | 32 |
| Figure 20 : Les étapes de préparation de solution fongique..... | 33 |
| Figure 21 : taux d'abondance des espèces fongiques isolés..... | 43 |
| Figure 22 : abondance des isolats fongiques par région d'échantillonnage..... | 44 |
| Figure 23 : Cinétiques de mortalité des larves traitées aux champignons <i>Verticillium lecanii</i> et <i>Cladosporium sp</i> | 47 |
| Figure 24 : Les larves traitées par <i>Verticillium lecanii</i> | 49 |
| Figure 25 : développement du mycélium sur la larve de stade III de <i>culex pipiens</i> traité au <i>Verticillium lecanii</i> | 49 |
| Figure 26 : les larves de stade III de <i>Culex pipiens</i> traité au <i>Cladosporium sp</i> | 50 |



Liste des abréviations

| | |
|----------------------------|---------------------------|
| ADN : | Acide Désoxyribonucléique |
| ARN : | Acide Ribonucléique |
| HR : | Humidité relative |
| nm : | Nanomètre |
| (DTX) : | Destruxines |
| Sp : | Species |
| °C : | Degré Celsius |
| % : | Pourcent |
| Mm : | Millimétré |
| Cx : | <i>Culex</i> |
| Km : | Kilomètres |
| H : | Heures |
| VNO : | Virus du Nil Occidental |
| Cm : | Centimètres |
| g : | Gramme |
| w : | Wilaya |
| ml : | Millimètre. |
| CE : | Conductivités électrique |
| E1 : | Echantillon |
| µs/cm : | Microsiemens / Centimètre |
| <i>B bassiana :</i> | <i>Beauveria bassiana</i> |

Introduction

Les maladies transmissibles par des vecteurs zoonotiques d'importance médicale et vétérinaire ont des effets non seulement sur la santé mais également sur le développement socio-économique des pays touchés (**Tran et al., 2005**). La famille des *Culicidae* est la plus importante, elle comprend trois espèces principales pathogènes pour l'être humain : les *Anophèles*, les *Aèdes* et les *Culex*. Chaque année, on relève plus d'un milliard de cas et plus d'un million de décès dans le monde, imputables à des maladies à transmission vectorielle telles que le paludisme, la dengue, la schistosomiase, la trypanosomiase humaine africaine, la leishmaniose, la maladie de Chagas, la fièvre jaune, les filarioses lymphatiques, l'encéphalite japonaise et l'onchocercose (**Rhohain et Perez, 1985**).

Ainsi, le contrôle de ces maladies constitue aujourd'hui un enjeu majeur. Ces contrôles passent par la compréhension des mécanismes de transmission de la maladie, qui sont généralement complexes du fait de leurs modes de transmission indirect. (**Pichard, 2008**). Afin de lutter contre ces insectes piqueurs-suceurs, il devient de plus en plus nécessaire de chercher des moyens pour réduire les populations de ceux-ci, c'est ainsi qu'a commencé l'essor des insecticides chimiques (**Matthewet et al., 2007**). Ces derniers agissent tous au niveau du système nerveux des insectes, soit en bloquant l'acétylcholinestérase (organophosphorés et carbamates) soit en perturbant le fonctionnement des canaux sodium (organochlorés et pyréthrinoides). Cependant, les premières difficultés n'allaient pas tarder à être rencontrées : l'apparition de gènes de résistance aux différents groupes chimiques insecticides, notamment, dans de nombreuses populations culicidiennes vectrices du paludisme, de la filariose et de certaines arboviroses (**Chauvet, 1978**).

Selon le comité d'experts des insecticides (**OMS, 1970**), chez les *Culicidae* : 19 espèces (y compris *Culex pipiens* et *Aedesaegypti*) sont devenues résistantes à un ou plusieurs insecticides.

Par ailleurs, en plus des phénomènes de résistance auxquels se heurtait l'utilisation des produits chimiques (**Hamon et al., 1972**), s'ajoutait le manque de spécificité de ces derniers, en plus que ces produits sont considérés comme un facteur qui provoque la pollution du sol, nutriments et l'air, ainsi que des effets néfastes pour l'homme, l'animal et le végétal.

Donc il est devenu de plus en plus nécessaire d'accorder une priorité aux insecticides microbiologiques (bio-pesticides) comme moyen de lutte alternatif contre les insectes nuisibles, qui consiste à remplacer les produits chimiques par des produits biologiques. En effet, cette dernière fait appel à des insecticides auxiliaires et des agents entomopathogènes qui appartiennent à plusieurs taxons : virus, bactéries et champignons. L'usage des champignons entomopathogènes est le plus étendu, Ils appartiennent au sous-taxon des *Mastigiomycotina*, *Zygomycotina*, *Ascomycotina* et *Deuteuromycotina*. Ces derniers considérés comme une alternative pour assurer une meilleure protection de la santé et de l'environnement (**Lacey et Undeen, 1986**).

Nous avons réalisé ce travail dans un but d'évaluer le grand intérêt des champignons entomopathogènes dans la régulation naturelle des populations d'insectes. Notre objectif consiste à isoler et identifier ce type de champignons à partir du sol de trois régions (Bouira, Alger, Blida). Notre mémoire s'articule autour de 03 chapitres :

- Le premier chapitre est consacré aux données bibliographiques relatives aux champignons entomopathogènes et leur mode d'action sur les insectes, ainsi que la bibliographie du *Culex pipiens*, son habitat et son cycle biologique.
- Le deuxième chapitre concerne la partie expérimentale qui comporte le matériel et les méthodes utilisées pour réaliser notre travail qui s'est basé sur trois points :
 - Le premier point nous nous intéressons aux analyses chimiques du sol qui ont un effet sur le développement des champignons dans le sol.
 - Le deuxième point concerne l'isolement des champignons et leur identification macroscopiques et microscopiques
 - Dans le troisième point notre intérêt s'est porté sur la réalisation d'un test de pathogénicité des deux champignons entomopathogènes identifiés vis à vis le *Culex pipiens* (stade aquatique L3).
- Le troisième chapitre présente les résultats obtenus et leurs discussions.

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

I -Généralité sur les champignons

1. Définitions

Les champignons étaient autrefois classé dans les végétaux, sont des eucaryotes, hétérotrophes, unicellulaires ou filamenteux, sans organisation tissulaire, sont aérobies strictes et rarement anaérobies (**Mathew, 1995 et Tortora *et al.*, 2003**), ayant un métabolisme hétérotrophe car ils tirent leur énergie de la respiration et de la fermentation des matières organiques solubles disponibles dans leur environnement, peuvent se reproduire soit sexuellement soit de façon asexuée (**Botton *et al.*, 1990**).

1.1. Caractéristique structurale

La cellule de champignon compose les différents organites d'une cellule eucaryote (noyau, mitochondries, réticulum endoplasmique, des ribosomes, l'appareil de Golgi, ribosomes, microbodies et vésicules, paroi ...). Les plus importants organites sont :

Noyau : Petite, forme sphérique à ovoïde, structures extrêmement plastique, qui sont capable de passer à travers les minuscules pores septaux.

Mitochondries : Paraissent circulaires, ovales ou allongées, à une membrane externe lisse et une membrane interne qui se prolonge en crêtes qui pénètrent dans la matrice.

Membrane plasmique : ou plasmalemma

Paroi : De type chitineuse protège le corps fongique formé essentiellement de polysaccharides, la paroi cellulaire fongique est un assemblage dynamique complexe de plusieurs composants

Deux formes structurales existent chez les champignons : la forme unicellulaire représentée par les cellules de levure et la structure à forme de filaments. Les filaments individuels sont appelés hyphes. Collectivement les hyphes sont appelés mycélium. Ce dernier est la phase végétative des champignons qui, subséquemment, donne naissance aux structures reproductives. Qu'ils soient sous forme de cellules de levure ou sous forme de filaments constitués en hyphe (**Nwe et Stevens, 2008**).

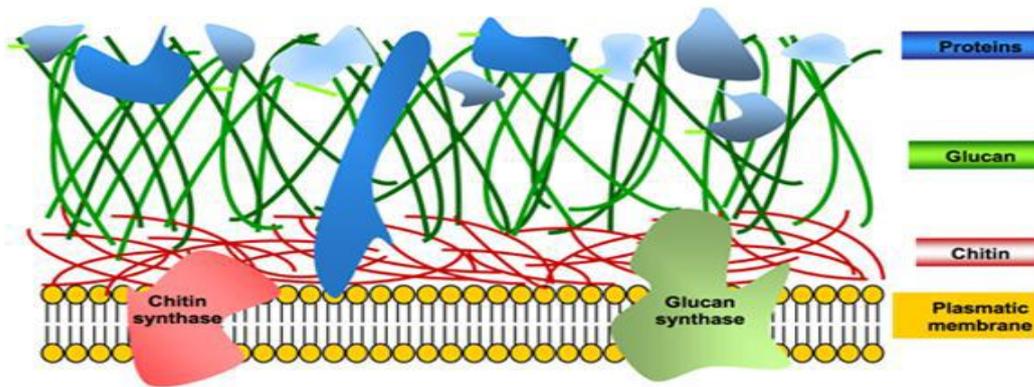


Figure 01 : Schématisation de la structure de la paroi fongique (Nwe & Stevens, 2008).

1.1.1. Reproduction

La reproduction de la plupart des champignons possède deux modalités : la reproduction asexuée (imparfaite ou végétative), et la reproduction sexuée (parfaite) pourrait avoir lieu par production de spores souvent produites dans des structures spécialisées appelées conidiophores qui portent des conidies ou dans des sporanges qui contiennent des sporangiospores ou dans des organes de fructification à formes variées comme les asci qui contiennent des ascospores, ou les acervuli d'où naît une autre sorte de conidies (Jennings et Lysek, 1996). Les types de reproduction varient avec les types de champignons. Cependant, les champignons se reproduisent le plus souvent par reproduction asexuée soit par fragmentation de cellules, par scission binaire ou par bourgeonnement (Carlile et Watkinson, 1994).

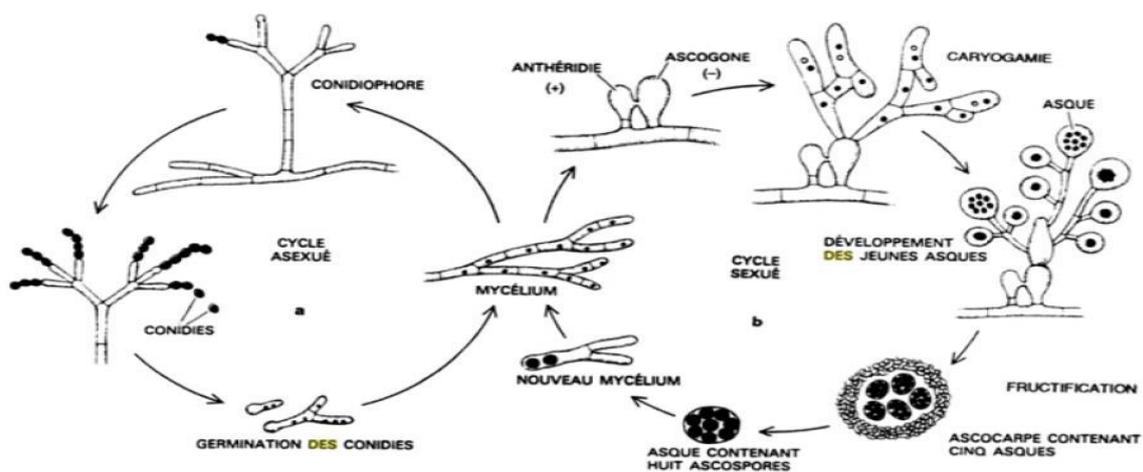


Figure 02 : Schéma présent la reproduction asexuée et sexuée d'une moisissure. (Jennings et Lysek, 1996).

1.1.2. Mode de vie

Les champignons ont un rôle très important dans la dégradation de la matière organique et constituent une part importante des décomposeurs sur Terre. De plus, certains champignons peuvent être phytopathogènes ou provoquer des mycoses chez les animaux. Un troisième mode de vie, symbiotique, est également très répandu (**Lutzoni et al., 2004**).

***Le saprophytisme :** les espèces saprophytes se développent aux dépens des substances mortes d'origines animale ou végétale (**Bouchet et al., 1999**). Ces espèces jouent un rôle essentiel au sein des cycles biologiques en minéralisant les matières végétales ou animales mortes (**Marouf et Reynaud, 2007**).

***Le parasitisme pathogénie :** Plusieurs champignons mènent une vie parasite vis-à-vis des substances organiques on trouvera des parasites obligatoires, facultatifs ou opportunistes (**Lutzoni et al., 2004**). Les opportunistes sont des organismes saprophytes qui vont s'attaquer aux organismes dont les défenses sont affaiblies. Les champignons peuvent attaquer tous les groupes du vivant, comme par exemple les plantes, les insectes, les animaux mais aussi les bactéries et les autres champignons (**Lutzoni et al., 2004**).

***La symbiose :** Selon **Marouf et Reynaud (2007)**, la symbiose est une association étroite et durable entre les organismes d'espèces différentes, pouvant appartenir à des règnes différents, vivant en équilibre les uns avec les autres et tirant les bénéfices mutuels de cette union, mais pouvant vivre séparément.

***Les lichens :** sont constituées d'une association entre champignon (principalement du phylum Ascomycota) et une cyanobactérie. L'algue, capable de photosynthèse, va fournir les molécules organiques carbonées au champignon qui en retour fournira les éléments minéraux à l'algue.

***Les mycorhizes :** sont constituées d'une association entre un champignon et la racine d'une plante. Les mycorhizes constituent la forme de symbiose la plus répandue à l'échelle planétaire. On estime que 90% des végétaux contractent spontanément cette association. Les champignons vont développer un réseau de filaments mycéliens à partir de la racine et vont être impliqués dans la nutrition minérale des plantes. C'est d'ailleurs une association symbiotique qui aurait permis aux plantes de coloniser le milieu terrestre. (**Nasraoui, 2006**).

1.1.3. Respiration

Les champignons transforment leur source de carbone pour produire de l'énergie pour le métabolisme dans la mitochondrie comme toutes les cellules eucaryotes, à travers les voies métaboliques suivantes : la glycolyse, le cycle de Krebs ; et la chaîne de transport électrique est la voie principale utilisée pour la production d'énergie cellulaire (**Larpent,1997**).

1.1.4. Classification

La classification des espèces appartenant au règne de Fungi a connu de nombreuses modifications. Actuellement, la classification des champignons s'est considérablement simplifiée et le règne fongique est divisé en cinq phyla : **Chytridiomycota**, **Zygomycota**, **Ascomycota**, **Basidiomycota**, **Deuteromycota**, définis par le caractère cloisonné ou non du thalle, la présence ou l'absence de gamètes ou de spores mobiles et les caractères morphologiques des organes différenciés de la reproduction sexuée et l'absence de gamètes ou de spores mobiles et les caractères morphologiques des organes différenciés de la reproduction sexuée. (**Leclerc et al., 1983**).

Tableau 01 : classification simplifiée du règne fongique (**Chasseur et al., 2003**)

| Champignons primitifs | « vrais » champignons ou eumycètes (chitine) | |
|-----------------------|--|---|
| | Reproduction sexuée | Reproduction asexuée |
| Myxomycètes | | |
| Oomycètes | 1. Chytridiomycètes (aquatiques et rudimentaire) 2. Zygomycètes 3. Basidiomycètes 4. Ascomycètes | 1. Deutéromycètes Ascomycètes et Basidiomycètes |

2. Identification des champignons

2.1. Caractère macroscopique

2.1.1. Aspect des colonies

Les colonies peuvent être duveteuse, laineuse, cotonneuses, veloutées, poudreuses ou granuleuses, parfois certaines colonies peuvent avoir une apparence glabre (absence ou pauvreté du mycélium aérien) (**Anaïssie, 2009**).

2.1.2. Relief des colonies

Les colonies peuvent avoir un aspect plat ou plissé et la consistance des colonies est variable (molle, friable, élastique ou dure) (**Anaïssie, 2009**).

2.1.3. Couleur des colonies

C'est un élément très important d'identification, les colonies peuvent être de couleur blanche, crème, jaune, orange, vert, brun, allant jusqu'au noir. Les pigments peuvent être localisés au niveau du mycélium ou diffuser dans le milieu de culture (**Hoog, 2011**).

2.2. Caractère microscopique

L'examen microscopique d'une colonie fongique se fait après réalisation d'un étalement entre lame et lamelle. Généralement, un examen à l'objectif 40 est suffisant pour mettre en évidence la plupart des éléments importants à identifier. Les observations microscopiques permettant l'identification des moisissures sont fondées sur les types de spores. En laboratoire, la plupart des organismes ne produisent que des spores asexuées, l'identification est fondée sur l'examen de ces dernières. Les spores peuvent être unicellulaires et de petite taille, bicellulaires, pluricellulaires à cloisons transversales et longitudinales ou étroites, effilées, incurvées et cloisonnées transversalement (**Chasseur et al., 2003**).

3. Besoins nutritifs

Contrairement aux plantes les champignons sont des êtres hétérotrophes, n'ont pas de chlorophylle permettant de fabriquer leurs aliments. Ils dépendent d'autres organismes pour leur source de carbone. Ces organismes exigent des composés organiques comme source d'énergie et de carbone. Les molécules simples (monosaccharides, acide aminés ou acides organiques), traversent facilement la barrière membranaire. Les molécules complexes doivent auparavant être dégradées en monomères par des enzymes excrétées ou liées à la paroi (**Botton et al., 1990**).

3.1. Éléments nutritifs

Les champignons ont besoin de plusieurs éléments nutritifs pour se développer dans la nature et pour leur respiration et leur activités fongiques

Tableau 02 : Éléments nutritifs des champignons (Nasraoui, 2006).

| Éléments nutritifs | Rôles |
|---------------------------|--|
| Oxygène | les champignons utilisent soit l'oxygène direct soit le nitrate. |
| Carbone | Il existe plusieurs sources de carbone à savoir les monosaccharides, les polysaccharides les alcools et acides organiques. |
| L'azote | La majorité des champignons assimile l'azote inorganique nitrates en plus dénitrates l'utilisation d'une large gamme de composés azotés tels que les amino- acide. |
| Soufre | Dans le milieu le besoin fongique en soufre est généralement satisfait par l'incorporation de l'ion sulfate. |
| Phosphore | Le phosphore est un important élément des macromolécules telles que l'ADN, l'ARN et les phospholipides. |
| Calcium | Important pour le fonctionnement des microtubules et des microfilaments |
| Potassium | Cet élément est impliqué dans le processus de transport dans la cellule et dans la régulation du potentiel osmotique cellulaire. |
| Magnésium | impliqué dans la structure et la fonction membranaire. |
| Sodium | Il est nécessaire seulement aux champignons dans la mer et les lacs |
| Macroélément | Sont les éléments traces, sont nécessaire à la majorité des champignons tels que le fer, le |

| | |
|-------------------------------|---|
| | zinc, le cuivre, le manganèse et le molybdène |
| Vitamine | fonctionnent comme des coenzymes ou comme parties constituantes des coenzymes qui catalysent les réactions spécifiques |
| Facteurs de croissance | stimulent la croissance fongique comme la choline, l'hémine, les acides gras, les stérols les flavonoïdes et différents composés volatils tel qu'alcools, aldéhydes et d'autres |

4. Les conditions environnementales

Sont les principaux facteurs qui influencent toutes les activités fongiques qui sont la disponibilité de l'eau, la température, le pH (concentration en ions hydrogène), l'aération et la lumière.

L'eau : Elle assure, pour les champignons la diffusion des substances nutritives dans les cellules, la libération des enzymes extracellulaires et la maintenance de leur cytoplasme. La disponibilité en eau était définie par l'équilibre de l'humidité relative (HR) que doivent être 70%. (Nasraoui, 2006)

Température : On peut grouper les champignons concernant les exigences en température de croissance en trois catégories qui sont résumées dans le tableau ci-dessous :

Tableau 03 : Besoins en températures de différentes catégories des champignons (Nasraoui, 2006)

| Les catégories de champignons | Les besoins en température (°C) | | |
|--------------------------------|---------------------------------|-----------|------------|
| | Le minimum | L'optimum | Le maximum |
| Les champignons thermo-philes | 20 | 40 | 50-60 |
| Les champignons méso-philes | 10 | 20 | 35 |
| Les champignons psychro-philes | 0 | 10 | 20 |

Concentration en ions hydrogène : La plupart des champignons croit dans une gamme de pH 4-8.5, certaines peuvent croître entre pH (3) et (9), leur pH optimum (5) à (7) (Suty, 2010).

Aération : En se basant sur les besoins des champignons en oxygène, on peut être groupé en quatre catégories :

- ✓ Les champignons aérobies obligatoires : comme *Gueuman nomyces*
- ✓ Les champignons aérobies facultatifs : tels que *Fusarium oxysporium* *Mucor hiemalis* et *Aspergillus fumigatus*
- ✓ Les champignons fermentatifs obligatoires l'exemple de *l'Aqualinderella*
- ✓ Les champignons anaérobies obligatoires le cas de Chytridiomycota. (Thiam et al.,2004)

Lumière : la croissance de la plupart des champignons est apparemment non affiée par la lumière visible (longueurs d'onde environ 380-720 nm), bien qu'elle peut causer une zonation de plusieurs cultures fongique sur milieu nutritif. (Nasraoui, 2006).

II-Les champignons entomopathogènes

1. Définition

Les champignons entomopathogène sont des agents pathogènes eucaryotes qui provoquent des maladies chez les insectes, ce type de champignons possèdent des noyaux, des

organites bien définis et une paroi chitineuse. Se présentent parfois sous forme de cellules individuelles, mais le plus souvent sous forme de filament constituant le mycélium et dans lesquels sont rangées les cellules. Leur reproduction se fait par formation de spores sexuées ou asexuées.

Ces champignons présentent un intérêt pour la lutte biologique surtout en raison du caractère épidémique de leur attaque (**Starnes et al.,1993**).

2. Taxonomie

Les champignons entomopathogène ne forment pas un groupe monophylétique, ils appartiennent à différents taxons rattachés à plusieurs des principaux groupes fongiques. On en connaît près de 700 espèces appartenant à une centaine d'ordres différents. Il existe deux ordres principaux de champignons entomopathogène : les Entomophthorales (Zygomycètes) et les Hypocreales (Ascomycètes) (**Goettel, 1992**).

- **Les Entomophthorales (Zygomycètes)**

Les Entomophthorales comprennent notamment les genres :*Entomophaga*, *Entomophthora*, *Pandora* et *Zoophthora* (**Botton et al.,1990**)

- **Les Hypocreales (Ascomycètes)** Dans cet ordre on peut classer les genres selon de mode de reproduction :

Mode de reproduction asexuée (anamorphe) : *Beauveria*, *Hirsutella*, *Lecanicillium*, *Metarhizium*,*Nomuraea* (**Bidochka et Small, 2005**).

Mode de reproduction sexuée (téléomorphes) : *Cordyceps*, *Nomuraea* (**Botton et al.,1990**).

3. Cycle biologique

D'après **Paine, 1983** ; Le cycle biologique des champignons entomopathogène diffère légèrement selon les groupes taxonomiques, mais il comprend toujours une phase parasitaire (de l'infection de l'hôte jusqu'à la mort de ce dernier) et une phase saprophyte (après la mort de l'insecte-hôte). La survie de ces champignons, et leur reproduction, est dépendante de l'infection d'insectes-hôtes et entraîne invariablement la mort de ceux-ci.

Ces champignons se fixent généralement à la surface externe du corps des insectes sous la forme de spores microscopiques (il s'agit généralement de spores mitosporiques asexuées également appelées conidies). Dans des conditions favorables de température et

d'humidité (généralement élevée), ces spores germent, se développent sous forme d'hyphes et colonisent la cuticule de l'insecte, finalement ils traversent la cuticule et atteignent la cavité du corps de l'insecte (hémocèle) (Clarkson et Charnley, 1996). Ensuite, les cellules fongiques prolifèrent dans la cavité du corps de l'hôte, généralement sous forme d'hyphes dotées de parois cellulaires ou sous la forme protoplastes sans parois (selon l'espèce de champignon impliquée). Au bout d'un certain temps, l'insecte est généralement tué (parfois par des toxines fongiques) et de nouvelles propagules (spores) se forment dans l'insecte si les conditions environnementales sont à nouveau favorables ; une forte humidité est généralement nécessaire pour la sporulation (St Leger, 1993). Le mode d'infection des champignons entomopathogène se divise en quatre étapes distinctes : l'adhésion, la germination, la pénétration et la dissémination et la production des toxines (Ferron *et al.*, 1993).

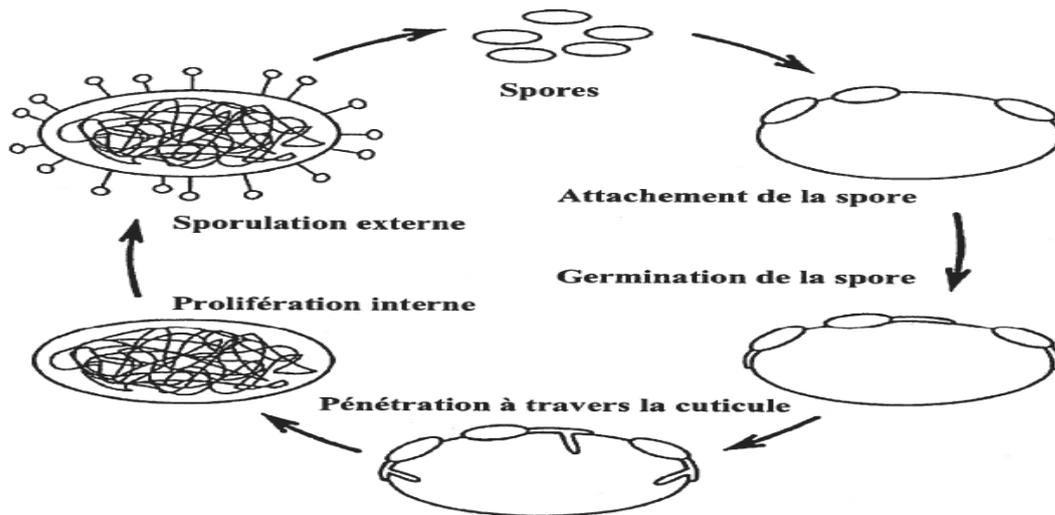


Figure 03 : Schéma du cycle biologique des champignons entomopathogène (Ferron *et al.*, 1993)

Phase d'adhésion : L'adhésion est la première étape du processus d'infection.

Les spores entrent en contact passivement avec les insectes à l'aide des agents naturels tels que le vent et l'eau. L'adhésion est déclenchée par un mécanisme de reconnaissance et de compatibilité des spores avec le tégument de l'insecte, une fois en contact avec la cuticule, la spore produit activement un mucilage hygroscopique qui permet la modification de l'épicuticule de l'insecte facilitant la germination des spores et peut aussi créer un environnement favorable aux enzymes exo- cellulaires libérées par ces dernières (Boucias *et al.*, 1991).

Phase de germination : La seconde phase d'infection est la germination. Celle-ci dépend de l'état physiologique de l'hôte et aussi des conditions environnementales, notamment la température et l'humidité (Butt et Becket, 1994 et Butt *et al.*, 1994). La germination aboutit à la production d'appressoria (structures terminales servant à l'ancrage de la cuticule et favorisant la pénétration). La valeur nutritive de la cuticule joue un rôle important pour la production d'appressoria. cependant, des études ont démontré qu'une cuticule nutritive favorise la croissance mycélienne plutôt que la pénétration (Magelhaes *et al.*, 1981 ; Ferron *et al.*,1993).

Phase de pénétration : La pénétration est réalisée par pression mécanique et hydrolyse enzymatique (Goettel *et al.*, 1989) (Figure 4) Précisément, l'hyphe fongique sécrète des enzymes extracellulaires telles que les protéases, les lipases et les chitinases, qui attaquent et dissolvent la cuticule, permettant aux spores de pénétrer à travers la cuticule et de se développer dans le corps de l'insecte (Hajek *et St Leger*, 1994). Ces enzymes correspondent aux différents polymères de la cuticule, des protéines, des chitines et des lipides de l'insecte (Charnley *et St Leger*, 1991). Les protéases sont les plus importantes enzymes extracellulaires et jouent un rôle primordial dans la pénétration (Campos *et al.*, 2005).

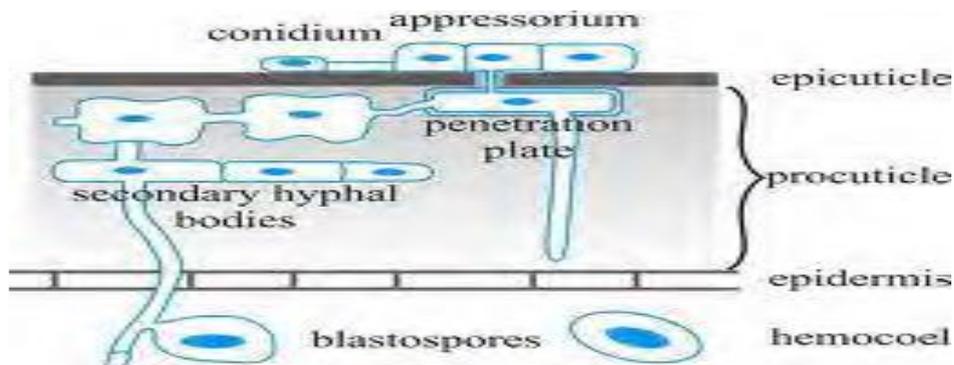


Figure 04 : Mode de pénétration des champignons entomopathogènes dans la cuticule des insectes (Clarkson et Charmley,1996).

Phase de dissémination : Une fois que le champignon a franchi avec succès la cuticule et aperçu l'épiderme adjacent de la cuticule, il entre dans le système circulatoire de l'insecte, Le champignon se multiplie par la suite a l'intérieur de tous les organes de l'insecte hôte et il

s'accroît sous forme de blastospores. Ceci peut faciliter la dispersion et la colonisation de l'hémocèle et optimise l'assimilation rapide des nutriments. Il semble qu'une utilisation efficace des sucres sanguins est nécessaire pour une croissance optimale du pathogène (**Campos et al., 2005**).

Production des toxines : une fois que le champignon atteint l'hémocèle, il entame la production d'hyphes qui circuleront à travers l'hémolymphe pour cela le champignon doit surmonter les mécanismes immunitaires de l'hôte (**Inglis et al., 2001**). Les toxine sont des effets divers sur différents tissus d'insectes, par exemple les composés toxiques non enzymatiques tels que les Destruxines (DTX) et les cytochalasmes qui lui permettent de surmonter les mécanismes de défense de l'hôte et de proliférer (**Inglis et al., 2001**) Les DTX dépolarisent la membrane du muscle de l'insecte en activant les canaux calcium. En outre la fonction des hémocytes d'insectes peut être empêchée par les DTX (**Bradfish ,1990**). Sous les conditions optimales la mort de l'insecte survient normalement entre 3 à 5 jours à partir du moment de l'infection. Une fois l'insecte meurt, produit un antibiotique qui s'appelle l'oosporine qui lui permet de surmonter la compétition des bactéries saprophytes dans le tube intestinal de l'insecte (**Inglis et al., 2001**). Le champignon entame alors une phase saprophytique .Les spores sont produites par les conidiophores qui émergent du cadavre, préférentiellement au niveau inter segmentaire si les conditions environnementales sont adéquates. Le cadavre est alors couvert par un feutrage constitué d'hyphes et de conidiophores portant des conidies. La phase saprophytique ne dépend pas de l'humidité relative par contre elle est influencée par la température (**Ferron, 1977**).

4. Interactions insectes –champignons

Les champignons peuvent engendrer des maladies sur divers insectes. L'infection est provoquée par la pénétration du mycélium à travers le tégument de l'insecte après développement du mycélium. La mort de l'insecte intervient en quelques jours ou quelques semaines selon la taille de l'hôte. Ce dernier se recouvre alors d'un duvet mycélien qui présente une couleur variable selon l'espèce (**Wraight et Roberts, 1987; Goettel, 1992**).

5. Mode d'action

Les champignons entomopathogènes doivent coloniser leur hôte pour l'utiliser comme source nutritive. Les champignons ectoparasites se développent superficiellement sur le corps des insectes sous forme de thalles. Ils obtiennent leur nourriture à la surface de leur

hôte ou en pénétrant légèrement dans le tégument (Kuno, 1973). Les champignons entomopathogènes possédant un mode d'action endoparasitique incluent toutes les espèces qui pénètrent dans le corps et tuent habituellement leur hôte, en envahissant et ou digérant les tissus. La sécrétion de toxine a généralement été identifiée comme activité complémentaire pour ces mycètes. Quelques espèces d'endoparasites, tel que *penicillium sp*, sont capable d'infecter leur hôte via une blessure au niveau de la cuticule (Vey et Riba, 1989). Les moyens par lesquels les champignons entomopathogènes pénètrent dans leur hôte sont les suivants :

5.1. Pénétration par cavité buccale et système digestif

L'infection via le système intestinal est peu courante. Parfois les mycètes vivants dans le tube digestif de l'insecte peuvent devenir pathogène quand l'insecte est en condition de stress suite à la famine, la chaleur excessive, l'humidité trop élevée, etc. D'autre part, les enzymes digestives ou les substances fongistatiques peuvent détruire les spores ou les hyphes de champignons qui ne font pas partie de la microflore habituelle du tube digestif. Dans certains cas, l'ingestion de structure fongique peut causer la mort par toxicose plutôt que par mycose (Dillon et Charnley, 1991).

5.2. Pénétration par invasion cuticulaire

La cuticule des insectes est la première barrière contre l'attaque des micro-organismes (Kramer *et al.*, 1988 ; St. Leger, 1993). La cuticule possède deux couches principales formées par les cellules épidermiques. La première couche est l'épicuticule, composée de protéine, lipoprotéines, phénols et de lipides. Elle comprend 4 couches différentes : la couche interne, la couche cuticuline, la couche de cire et la couche de ciment. Cette barrière empêche les micro-organismes d'entrer dans le corps de l'hôte, principalement les micro-organismes qui ne possèdent pas un mécanisme actif de pénétration de la cuticule (par exemple les bactéries et les virus). La deuxième couche de la cuticule est la procuticule, principalement composés de protéine, et de chitine, de lipides et de quinones incorporés dans trois couches : l'exocuticule, la mésocuticule et l'endocuticule. Les propriétés physiques et biochimiques de ces tissus offrent à la cuticule la rigidité et l'élasticité nécessaire pour résister aux dommages causés par certains mycopathogènes (Chamley et St. Leger, 1991).

6. Facteurs affectant l'efficacité des champignons entomopathogènes

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

6.1. Facteurs liés aux pathogènes

La virulence et la spécificité de l'hôte sont deux éléments essentiels dans le choix d'un bon candidat à la lutte biologique. À une échelle industrielle, les épreuves biologiques standardisées de laboratoire sont essentielles afin de vérifier le potentiel insecticide des préparations produites et de suivre leur stabilité de conservation (**Ferron *et al.*, 1991**).

6.2. Facteurs dépendant de l'hôte

Il est reconnu que tous les stades de développement de l'insecte, de l'œuf jusqu'à l'adulte peuvent être sensibles à l'infection fongique en provoquant la mort des insectes en quelque jour selon leur sensibilité. (**Braga *et al.*, 2001**).

6.3. Facteurs de l'environnement

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

6.3.1. Rayonnement solaire

L'effet des radiations solaires est l'un des paramètres environnementaux les plus importants pour la persistance des spores fongiques entomopathogène (**Braga *et al.*, 2001**). La lumière peut stimuler certaines étapes du cycle évolutif des champignons entomopathogènes cultivés *in vitro* ou *in vivo* (**Silvy et Riba, 1989**).

6.3.2. Température

La température est un autre facteur important qui peut affecter le taux de germination, la croissance, la sporulation et la survie des champignons entomopathogènes. Généralement, les températures au-dessus de 35°C empêchent la croissance et le développement des champignons entomopathogènes. Les variations de températures (élevées et basses) affectent la vitesse de l'infection des insectes par l'inhibition de la germination des spores, ce qui affecte à son tour la formation du tube germinatif et la pénétration à travers la cuticule de l'insecte. (**Soza-Gomez et Alves, 2000 ; Mitsuaki, 2004**).

6.3.3. Humidité

L'humidité environnementale est un paramètre très important pour la germination des conidies dans la nature. Elle affecte aussi la persistance et la survie des champignons

entomopathogènes. La plupart de ces champignons exigent au moins 95 % de l'humidité relative à la surface de l'insecte afin de germer (**Hallsworth et Magan, 1999**).

Un certain nombre d'études indiquent que les conditions sèches juste après l'application des champignons entomopathogènes sont moins pathogènes. L'humidité relativement élevée dans les endroits abrités fournit un micro-environnement favorable pour le développement des spores (**Liu et al., 2000**).

7. Utilisation des champignons entomopathogènes en lutte biologique

La lutte biologique, précisément par utilisation de micro-organismes entomopathogènes est une alternative très prometteuse pour assurer une protection de la santé et de l'environnement

Les microchampignons entomopathogènes sont des agents de lutte très intéressants du fait de leur aptitude à infecter l'hôte par ingestion ou par simple contact avec tous les stades, œuf, larve, adulte sensibles ainsi que les suceurs-piqueurs (**Carruthers et Soper, 1987**). Ils peuvent être produits en masse à moindre coût et peuvent être appliqués avec les méthodes conventionnelles (**Khachatourians, 1987**).

III. Données bibliographiques sur le moustique *Culex pipiens*

1. Généralités sur les moustiques

L'ensemble des moustiques constitue la famille des **Culicidae** classé dans l'ordre des **Diptères** et le sous ordre des **Nématocères** de 2800 à 3000 espèces répartis dans le monde entier (**Palmisano et al., 2005**).

Ils sont caractérisés par des antennes longues et fines, les moustiques à l'état adulte sont de petits insectes dont la taille varie entre 05 et 20 mm, le corps fusiforme composé de 03 parties distinctes : **la tête**, le **thorax** et **l'abdomen** avec une partie d'ailes antérieures fonctionnelles et le corps est supporté par 03 paires de pattes grêles (**Savage et Miller, 1995**)

La classification des moustiques a connu une évolution dans le temps avec Knight et Stone (1977), Rodhain et Perez (1985) enfin Mouchet et Carnevale (1991). On divise généralement la famille des Culicidae en trois sous famille en se basant sur différents critères morphologique des **œufs**, des **larves** et des **imagos**.

Les Culicidae dans l'ordre des Diptères sont caractérisés par deux paires d'ailes dont la deuxième est transformée en haltère (**Qutubudin, 1960 ; Stoll et al, 1961 ; Stone et al, 1959**). C'est au sous ordre de Nématocères les Culicidae se caractérisent par une pièce buccale modifiée pour piquer ou sucer.

Leur développement comme celui de tout insecte à métamorphose complète, se déroule en deux phases (**Roth, 1980**).

- **La phase aquatique** : regroupe l'œuf, les quatre stades larvaires et la nymphe.
- **La phase aérienne** : concerne l'insecte adulte imago

2. Biologie de *Culex pipiens*

2.1. Définition

Culex pipiens est un arthropode qui appartient à une variété dite commune de moustiques européens. Tout comme chez les autres espèces de moustiques, c'est la femelle qui pique pour produire ses œufs. Le sang consommé est donc indispensable à la reproduction de cette espèce. Pour lutter contre ce moustique on utilise des insecticides ou la réintroduction de prédateurs naturels. Dans ce complexe on peut distinguer plusieurs nominations : *Culex quinquefasciatus*, *Culex molestus*, *Culex pipiens* (**Pierrick, 2014**).



Figure 05 : *Culex pipiens*. (Montgomery, 2010)

2.2. La position systématique de *Culex pipiens* (Mcleod, 2005)

| | |
|-----------------------------|-------------------------------------|
| Règne : | Animalia |
| Embranchement : | Arthropoda |
| Sous embranchement : | Antennat |
| Classe : | Insecta |
| Sous-classe : | Pterygota |
| Ordre : | Diptera |
| Sous-ordre : | Nematocera |
| Famille : | Culcidae |
| Sous-famille : | Culicinae |
| Genre : | <i>Culex</i> |
| Espèce : | <i>Pipiens</i> |
| Nom binominal : | <i>Culex pipiens</i> (Linné, 1785). |

2.3. Nutrition des *Culex pipiens*

Mâle et femelles se nourrissent à la tombée du jour. Le mâle se nourrit exclusivement de sèves, sucs, qu'il pompe sur les arbres et les fleurs grâce à son stylet. Seule la femelle se nourrit de sang, celui des animaux à sang chaud qui lui est nécessaire pour pondre car riche en protéines, mais elle a le même régime alimentaire de base que le mâle. Elle dispose d'organes sensoriels puissants capables de détecter les odeurs corporelles, le gaz carbonique, la chaleur et la transpiration afin de localiser ses hôtes. A chaque succion elle aspire son propre poids de sang après avoir injecté dans la plaie un anticoagulant qui en préserve la fluidité. C'est dans ces conditions que le moustique est le vecteur de diverses pathologies (Savage *et al.*, 1995).

2.4. Morphologie de culex pipiens

Les *Culex* sont des insectes qui ont des ailes longues et fines, il diffèrent des autres diptères, comme les mouches par la présence de petites écailles sur la plupart des nervures des ailes. Le corps et les plates ont une coloration variant de brune pâle à noir, parfois marquée de taches et des bandes. Ce sont des insectes holométaboles dont l'œuf est fusiforme fait 01 mm de longueur avec un exo chorion granulé (Larvier et Abonnenc, 1956) qui se trouve généralement en agglomération réunis par 200 à 400 en nacelle dont l'arrangement leur permet d'être insubmersibles (Rioux, 1985). En formant un radeau flottant (Audonneau, 2010), grâce aux phénomènes de tension superficielle (figure 06). Comprend l'embryon, la membrane vitelline pellucide, l'endochorion épais, l'exochorion plus ou moins pigmenté, gaufré au aréolé (Grasse, 1958).

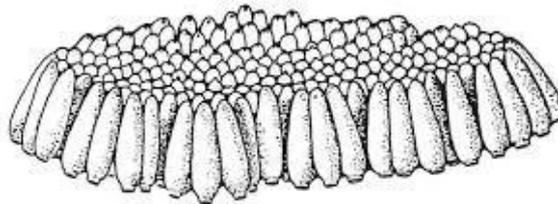


Figure 06 : œufs de *Culex pipiens* (Audonneau, 2010).

2.4.1. Morphologie des pièces buccales

L'appareil buccal des insectes est composé d'un ensemble d'éléments articulés, regroupés en 03 paires d'appendices céphaliques qui servent à la prise de la nourriture et à son ingestion :

1. Une paire de Mandibules.
2. Une paire de Maxilles (les mâchoires).
3. le Labium.

Les maxilles et le labium se terminent par une paire de palpes (appendices constitués d'éléments articulés), où sont présents des poils sensoriels, jouant ainsi le rôle d'organes sensoriels du toucher, du goût et de l'odorat. On retrouve également à l'avant des pièces buccales, deux éléments jouant rôle de lèvres antérieures : le **Labre** et le **Clypeus**, et à l'arrière l'**Hypopharynx** qui joue le rôle de langue (Brunhes *et al.*,1999).

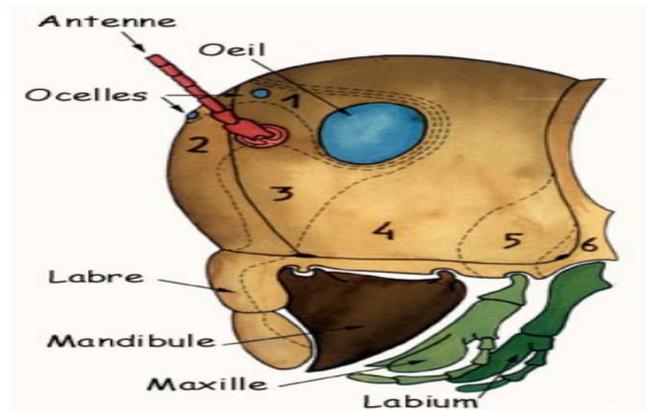


Figure 07 : Appendices buccaux d'un insecte, tête en vue latérale (**Brunhes et al.,1999**).

2.4.1.1. Pièce buccale chez la femelle *Culex pipiens*

Les pièces buccales de la femelle sont de type piqueur-suceur et se composent de :

- Un labre formant l'épipharynx et circonscrivant le canal alimentaire par lequel le sang est aspiré.
- Deux stylets mandibulaires.
- Deux maxillaires denticulés.
- Un hypopharynx qui abrite canal salivaire.
- Un labium terminé par des labelles et riche en sensilles thermoréceptrices, il est creusé en une gouttière qui engaine et protège les stylets (labre, maxillaires, mandibule et hypopharynx) en dehors de repas.

Les pièces buccales sont au final réunis en une trompe au moins 04 plus long que la tête (**Byrne et Nicholas, 1999**).

2.4.1.2. Pièce buccale chez le mâle

- Les palpes maxillaires sont plus longs que la trompe et légèrement recourbes vers le haut.
- Les antennes sont plus développées et très poilues que les femelle.

Ces deux éléments permettent de distinguer le male de la femelle à l'œil nu (**Brunhes et al.,1999**).

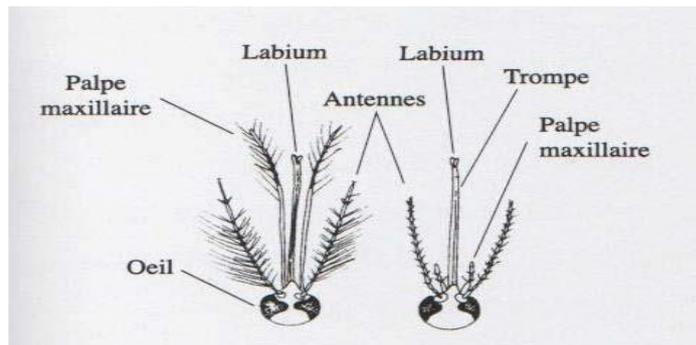


Figure 08 : Tête de moustique male à gauche et femelle à droite (Brunhes et al.,1999).

2.5. Cycle de développement

Le moustique sont des insectes holométaboles, passent par quatre stades de développement (l'œuf – la larve – la nymphe et l'imago ou stade adulte).

Le cycle est décomposé en deux phases, **Phase aquatique** pour les premiers stades et une **phase aérienne** pour le dernier stade (l'imago).

Dans le dernier stade la femelle adulte est hématophage, après son émergence d'une durée estimée à 24-72 heures piques les vertébrés pour sucer leur sang contenant des protéines nécessaire à la maturation des œufs (Klowden, 1990). Dans les conditions optimales, le cycle dure de 10 à 20 jours. (Adisso et Alia, 2005)

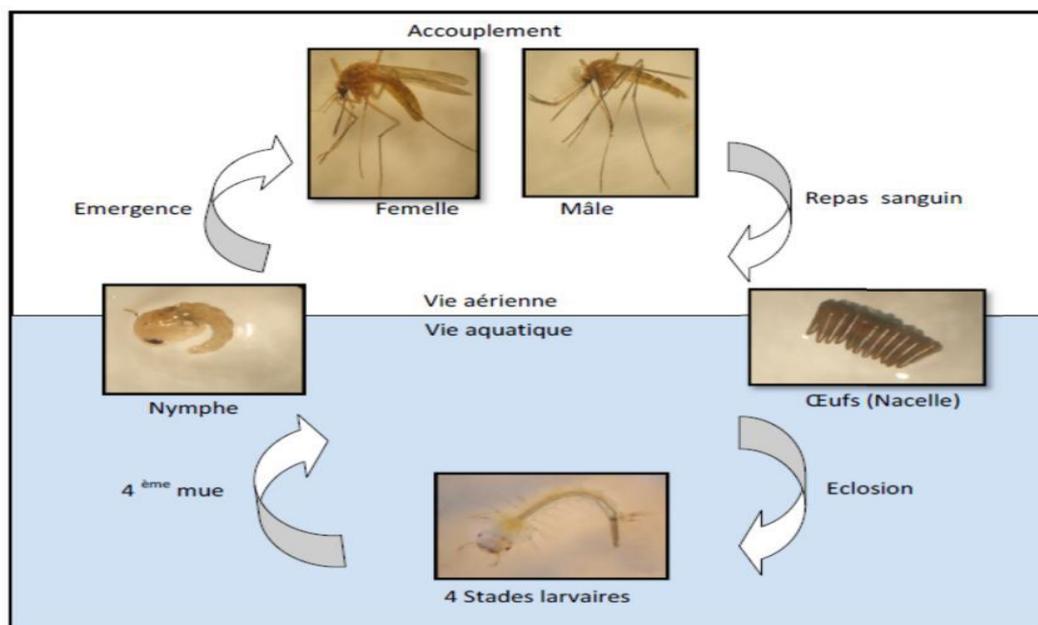


Figure 09 : Cycle de développement du moustique *Culex pipiens* (Klowden, 1990).

2.5.1. Œufs

Les lieux de ponte de la femelle sont variés, ce sont les petites collections d'eau proche des habitations comme les bassins, les citernes, les pots de fleurs, les vieux de pneus et même les boîtes de conserve (Faraj *et al.*,2006). La femelle dépose les œufs fusiforme mesurent environ 01 mm de long perpendiculairement à la surface de l'eau en amas groupés, elles peuvent pondre jusqu'à 300 œufs réunis en nacelle dont largement leur permet d'être insubmersible, les œufs éclosent en 24 à 48 heures lorsque la température de l'eau est suffisante (Séguy, 1955)



Figure 10 : œufs de culex pipiens (Starosta,2003)

2.5.2. La larve

Larve de *Cx pipiens* se développé indifféremment dans les eaux claires ou pollués, caractérisé par un aspect vermiforme, son corps se divise en 03 segments tête, thorax trapu et dépourvu d'appendices locomoteurs, et abdomen souple. Sa taille varie de 2 mm à 12 mm (figure 11).

Elle respire par un siphon considéré comme un tube respiratoire, long et étroit affleurant à la surface de l'eau, ce tube est muni de 05 clapets qui s'ouvrent sur 02 orifices, l'air pénétrer à l'intérieur quand la larve monte à la surface de l'eau et se rabattent quand elle gagne les profondeurs. Son régime saprophyte est constitué de planctation et des particules organiques ongerés grâce à ses pièces buccales de type broyeur (Kettle, 1995 et Andreo, 2003).

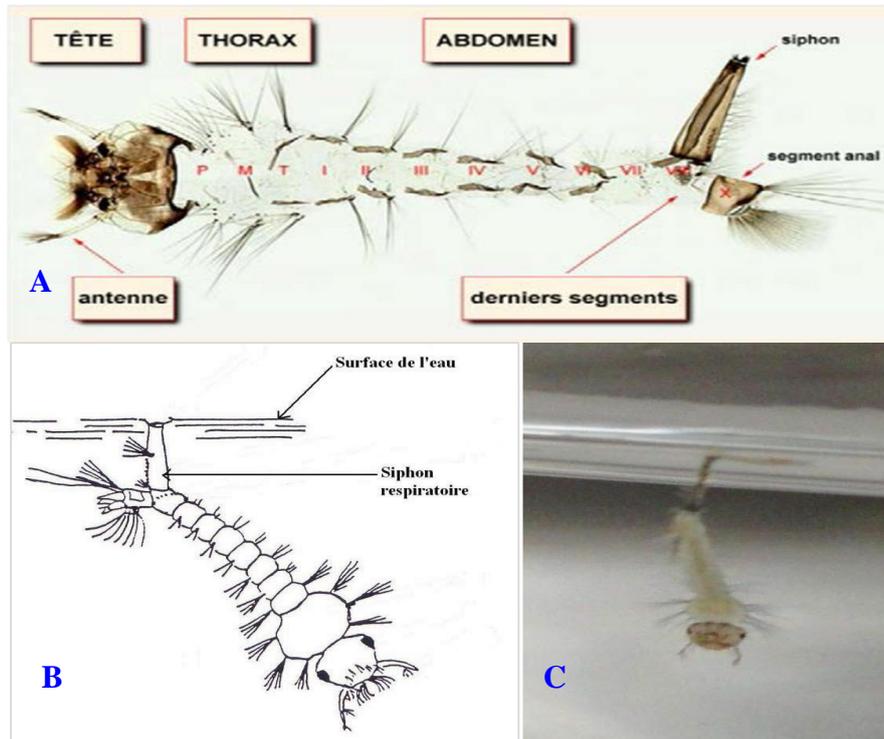


Figure 11 : larve du *culex pipiens*. **A)**- photo de la larve de *Cx pipiens* , **B)**-schéma d'une larve *Cx pipiens*. **C)**- photo d'une larve sous l'eau. (Kettle, 1995 et Andreo,2003).

2.5.3. La nymphe

Sa forme globale à une forme de point d'interrogation, la tête et thorax fusionnent pour donner un céphalothorax sur lequel on trouve 02 trompettes qui permettent à la nymphe de respirer (**figure 12**). Les orifices anal et buccal étant bouchés, la nymphe ne se nourrit pas. Ses pattes natatoire, ses situées sur l'abdomen lui permettent de se déplacer, elle est extrêmement sensible et plonger dans l'eau au moindre mouvement perçu. *Cx pipiens* reste sous cette forme pendant 2 à 4 jours, à la fin de cette période, la nymphe donne un adulte mâle ou femelle. (Achereul, 1997).

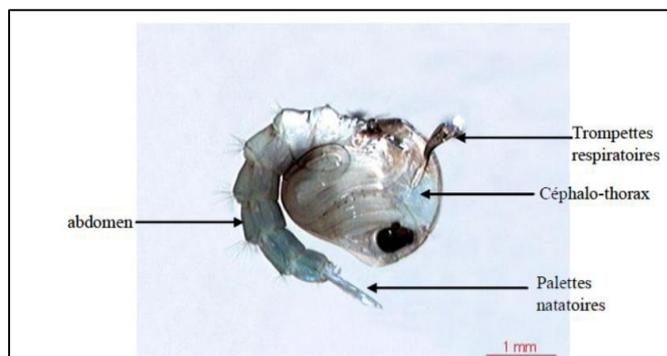


Figure 12 : aspect générale d'une nymphe de *Cx pipiens*. (Achereul, 1997).

2.5.4. Stade de l'adulte

L'adulte, une fois métamorphosé provoque une cassure au niveau de la tête nymphale et émerge à la surface de l'eau. Les males atteignent leur maturité sexuelle au bout d'un jour alors que les femelles l'atteignent au bout de 1 à 2 jours et elles sont plus grandes que les males issu d'une même émergence. (Clements, 1999). La femelle peut vivre de 03 semaines à trois mois selon la température et la qualité de gîte. Les moustiques, comme beaucoup d'insectes se nourrissent de nectar (source d'énergie), et en plus le sang (hématophage) de l'hôte qui est indispensable à la formation des œufs.

Les adultes s'éloignent peut de gîte larvaires après l'éclosion, ils ne dépassent pas 03 Km de distance, sauf lors de vent qui pousse les *Culex* beaucoup plus loin (Grant *et al*, 1990). L'accouplement se produit dans les 48heures suivant l'émergence des femelles et avant le premier repas sanguin, la femelle s'accouple en général une seule fois au cours du vol, c'est une espèce dit curygame (Rohain et perez, 1985). Aussi *Culex pipiens* est une espèce autogène, c'est-à-dire que la femelle est capable de pondre des œufs sans repas sanguin préalable. La fécondation des œufs s'effectue lors de la ponte grâce au stockage de sperme des males par les femelles dans une spermathèque. (Andreo, 2003).

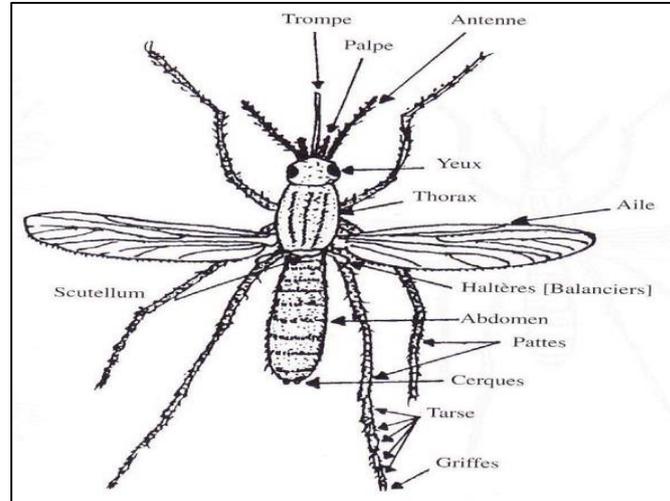


Figure 13 : *Cx pipiens* au stade adulte (imago) (Grant *et al.*,1990)

3. Ecologie de *Culex pipiens*

Culex pipiens est un moustique largement répandu sur le continent africain (Larivier et Abonnenc, 1953), l'est et le nord de l'Europe (Thomas *et al.*, 2011) et dans toutes les régions du globe, excepte celles où il règne un froid trop important comme l'Antarctique, Ces espèces occupe les zones les plus fraîches (Kittle D.S, 1995). Ce genre n'éclosant pas des œufs lorsque la température monte à plus de 30 °C (Romon, 1960).

Culex couvre les régions tempérées, la densité atteint son maximum au moins d'aout là où la production est favorable, surtout quand l'été est pluvieux et frais (Tardif *et al.*, 2003). Il pond dans des milieux obligatoirement contenant de l'eau, qui est nécessaire pour la vie des larves, ces milieux peuvent être naturel comme les marécages (Self *et al.*, 1973), les barrages et les fossés (figure 14) ou même artificiels présentés par des bassins, réservoirs, récipients, vieux pneus remplis d'eau de pluie à proximité des habitations, les barboteuses (figure 15). Ces milieux sont dites gites larvaires (Tardif *et al.*, 2003. Ouedraougou *et al.*, 2004)

Les adultes sont dits casaniers, c'est-à-dire qu'ils s'éloignent peu des gites larvaires. En moyenne, ils peuvent parcourir de 500 à 1000 mètres, avec une vitesse de vol de 500 à 800 mètres à l'heure (Moulinier C, 2003). On ne trouve en règle générale qu'une seule espèce de *Culex* par biotope, mais il peut arriver que plusieurs espèces cohabitent : *Culex pipiens* est fréquemment rencontre avec *Culisera annulata* et *Culiseta longearcolata* (Ripert C, 2007).



Figure 14 : gites larvaires naturels (Fontenillet *et al.*, 2006)



Figure 15 : gites artificiels (Moulinier C, 2003).

4. Aspect de nuisance chez *Culex pipiens*

D'abord la première nuisance que l'on peut reconnaître aux moustiques c'est de compromettre notre repos et notre bien-être. Plus précisément, ce qu'on leur reproche avant tout c'est d'être les vecteurs de nombreuses maladies, parfois très graves aussi bien pour les humains que pour les animaux. Il faut bien comprendre que les moustiques ne produisent pas de venin, mais sont des vecteurs de virus (Matile,1993).

Principalement les femelles, en période de reproduction ont besoin du sang pour la maturation des œufs, c'est de cette façon que les maladies sont transmises (Aouinty et al.,2006). En piquant la femelle injecte à son hôte un anticoagulant, cette nuisance qui résulte une spoliation du sang peut rendre la vie dans une région totalement malsaine (Schaffner, 2004). Comme est mentionné avant seules les femelles ont besoin du sang pour assurer le développement des œufs, contrairement le mâle est adapté uniquement à la consommation du nectar ou de sève ; une femelle peut prendre deux ou trois repas de sang et cette prise peut engendrer une démangeaison locale ou une petite bosse à l'endroit de la piqûre qu'on appelle érythème (Lacoursiere et al.,2004 ;Schaffner,2004).

Parmi les maladies les plus isolées du *Culex* c'est la fièvre du *Nil occidental* causée par le virus VNO que *Culex pipiens* et *Culex restuans* sont deux espèces vectrices qui interviennent dans l'amplification du cycle de transmission du virus aux oiseaux (Tardif et al.,2003). En Algérie, le virus West Nile a provoqué une épidémie importante dans la région de Timimoune en 1994, des cas isolés d'encéphalites chez l'homme avec des cas mortels (Guenno et al., 1996 ; Zientara et al.,2001). les moustiques sont des vecteurs d'autres plusieurs maladies tel que la

malaria, fièvre jaune, dengue, filariose (Hamon et Mouchet ,1967) et certains types d'encéphalites (EL Kady et al.,2008).

5. méthodes de lutte contre le *Culex pipiens*

5.1. Méthodes physique

La lutte physique contribue à rendre l'environnement hostile à la population des vecteurs par l'élimination des gîtes larvaires (drainage, colmatage des cavités naturelles, gestions des déchets, des plans d'eau et des eaux usées, etc). Notamment en zones urbaines (Torral et Caro, 2005).

5.2. Méthode chimique

Les insecticides les plus utilisés sont les pyrethroides sous forme de sprays à pulvériser dans l'air ambiant, sur des murs ou des moustiquaires. Ces molécules se révèlent efficaces jusqu'à plusieurs semaines si elles sont pulvérisées sur une moustiquaire. Concernant leur mode d'action, ils vont tout d'abord stimuler puis inhiber le système nerveux du *Culex*, pour finalement causer une paralysie musculaire généralisée (Goislard,2012).

5.3. Méthodes biologique

La méthode biologique est une alternative pour assurer une meilleure protection de la santé et de l'environnement. La lutte biologique précisément par utilisation de microorganismes entomopathogène. Des espèces animales et végétales ont été identifiées dans le monde comme ayant un potentiel de stopper une invasion de moustique (microchampignons, les bactéries, les virus, protozoaires, les nématodes) (Thiam et al.,2004).

L'objectif de notre travail c'est de faire l'isolement et l'identification des champignons à partir du sol des trois régions (Bouira, Alger et Blida). Après l'échantillonnage, nous avons analysé le sol de chaque échantillon pour estimer les paramètres chimiques et discuter leur influence sur le développement et l'abondance des champignons isolés. Ensuite nous avons fait le test de pathogénicité entre les champignons entomopathogènes et les larves de *Culex pipiens* (stade aquatique).

1. Matériel biologique

1-1. Matériel entomologique (*Culex pipiens*)

L'étude de l'activité biologique de nos souches identifiées a été conduite sur le stade aquatique (L3) du moustique domestique *Culex pipiens*.

1-2. le sol

Des échantillons de sol sont prélevés à partir de trois régions, la wilaya de Bouira, Alger, Blida dans un but d'isoler des souches fongiques entomopathogènes.

1-3. Matériel non biologique

L'ensemble des matériels est représenté dans l'annexe I. Qui comporte les équipements, de verreries de laboratoire et des produits chimiques ainsi que les milieux de culture. Pour de collecte et le traitement on a utilisé des seaux, seringues, gobelets et poudre de biscuit sec.

2. Echantillonnage et sites d'isolement

Les échantillons du sol utilisés pour la réalisation de notre travail proviennent de trois sols agricoles de différentes régions : M'chedallah (wilaya de Bouira), Bab Ezzouar (wilaya d'Alger) et Meftah (wilaya de Blida). Le choix des régions a été effectué en considérant les facteurs qui influencent la croissance des champignons, à savoir le type du sol et les conditions climatiques qui caractérisent chaque wilaya (végétation disponible, humidité, température...).

Les échantillons, ont été prélevés après avoir écarté légèrement les cinq premiers centimètres du sol, une quantité suffisante de terre est prélevée à l'horizon de 10 à 15 cm de profondeur puis déposée à l'aide d'une spatule sur une feuille d'aluminium stérile écartant les pierres et les débris végétaux, les échantillons ont été récupérés dans un sachet stérile, ensuite transportés immédiatement au réfrigérateur (4°C). Une quantité de 400 à 500 g du sol a été prélevé pour chaque échantillon (Tableau 3).

Tableau 03 : Caractéristiques des échantillons du sol utilisés. (Originale, 2018).

| Echantillons/ Date | Origine et localisation de l'échantillon | Couvert Végétal | Profondeur de prélèvement |
|-----------------------|---|--------------------------|------------------------------|
| E1/24/03/2018 | M'chedallah (w. Bouira) Latitude: 36°20'43.90"N Longitude: 4°17'26.17"E | Verger d'Olivier | 15-20 cm |
| E2/10/04/2018 | Bab Ezzouar (w. Bouira) Latitude: 36°42'44.76"N Longitude: 3°11'8.25"E | Champs de céréales | 15-20 cm |
| E3/12/04/2018 | Meftah (w. Blida) Latitude: 36°37'29.72"N Longitude: 3°12'40.37"E | Champs de pomme de terre | 15-20 cm |

3. Analyses chimique du sol

3.1. Détermination du pH des échantillons

Cette analyse fait partie des plus importantes caractéristiques physico-chimiques des sols qui consiste à déterminer la valeur du pH d'une suspension de sol tamisé en eau distillée (10g de sol pour 90 ml d'eau distillée) (Davet,1996).

On met 10 g de sol de chaque région étudié dans les béchers contenant 90ml d'eau distillé. Ensuite une agitation de trois suspensions sur une plaque d'agitation pendant 01 heure, après ce temps on les laisse reposer pendant 02 heures, puis on mesure le Ph à l'aide d'un Ph-mètre.

3.2. Humidité résiduelle (à 105°C) (Norme NF ISO 1146)

Cette analyse nécessite d'utilise le sol séché à l'air libre pendant 03 jours à raison de 10 à 20g. On fait peser la boîte à tare avant de l'utilisation, puis on le pesé avec le sol, et faire un deuxième séchage à l'étuve à 105 °C (figure16), on met la boîte dans l'étuve sans couvercle pendant 04 heures. Après ce temps on met le couvercle de boîte et les refroidir dans un dessiccateur pendant 01 heure. Après refroidissement la boîte est pesée avec précision, et la teneur en eau est calculée. Le taux d'humidité s'exprime en % selon la formule suivante :

$$H \text{ à } 105 \text{ °C} = P_1 - P_2 / P_2 - P$$

P : Poids de boîte

P1 : Poids de boîtes + sol séché à l'air libre

P2 : Poids de boîtes + sol séché à 105 °C

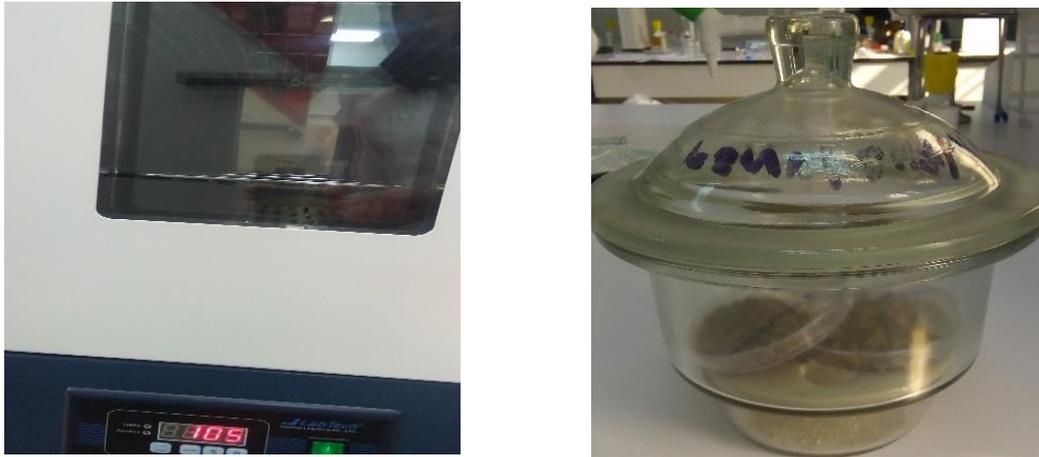


Figure 16 : séchage et refroidissement des échantillons du sol ; [A] séchage dans l'étuve à 105°C, [B] refroidissement dans un dessiccateur.

3.3. La salinité du sol

Dans un flacon d'agitation on met 20g de terre fine séchée à l'air libre pendant 03 jours dans 100 ml d'eau distillé bouillée. Agitation pendant 01 heure puis mesuré la conductivité électrique à l'aide d'un conductivimètre.

La salinité des sols mesurés en fonctions de la conductivité électrique comme représente le tableau 04.

Tableau 04 : la salinité des sols en fonction de la conductivité électrique (Moradi *et al.*, 2011)

| Conductivité électrique $\mu\text{s}/\text{cm}$ à 25°C | Désignation |
|--|---------------------|
| < 250 | Non salin |
| 250 < CE < 750 | Salinité moyenne |
| 750 < CE < 2250 | Salinité forte |
| 2250 < CE < 5000 | Salinité très forte |
| 5000 < CE < 20000 | Salinité excessive |

4. Isolement des champignons à partir du sol

Pour préparer les suspensions du sol, 10g de chaque échantillon a été bien tamisé et dilué dans 90 ml d'eau distillée stérile, et homogénéisé pendant 10 minutes à l'aide d'un agitateur magnétique (Clark *et al.*,1985 ; Ulacio *et al.*,1997). Cette dilution représente la solution mère à partir de laquelle d'autres dilutions sont préparées jusqu'à 10^{-3} . Chaque dilution d'un échantillon a été étalée à la surface des milieux gélosés (Sabouraud) à raison de 01ml, et attribué d'un code désignant son origine et son degré de dilution. Les boîtes ont été incubées à 28°C à l'obscurité et observées quotidiennement pendant 07 jours.

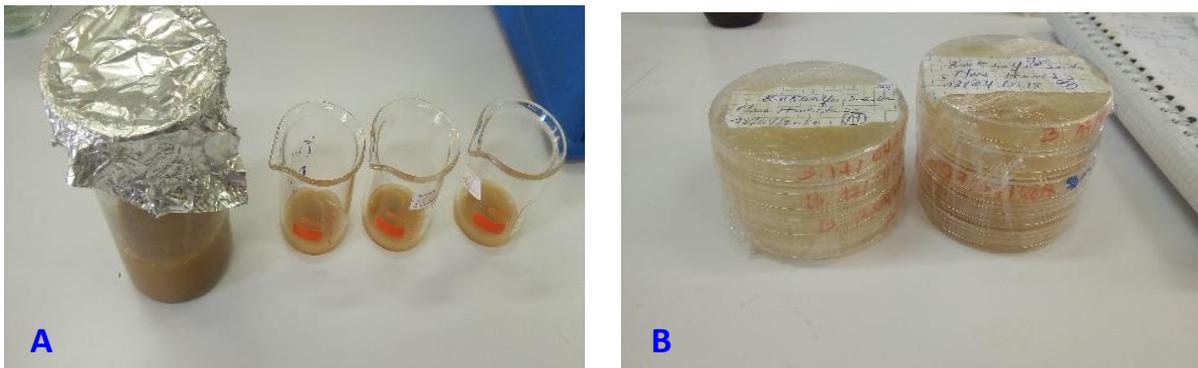


Figure 17 : Isolement des champignons ; (A) préparation des dilutions.(B) Ensemencement des boîtes (originale, 2018)

4.1. Purification et conservation des souches isolées

Les colonies fongiques obtenues ont subi une purification, en réalisant les repiquages sous forme des disques. En utilisant le milieu OGA (Oxytetracycline-Glucose-Yeast Extract Agar), Les boîtes ont été incubées à 28°C à l'obscurité et observées quotidiennement en réalisant des répétitions successifs et nécessaires jusqu'à obtention des souches pure, confirmée par l'observation macroscopique et microscopique. Les souches, ainsi obtenues, ont été conservées dans le réfrigérateur à (4°C).

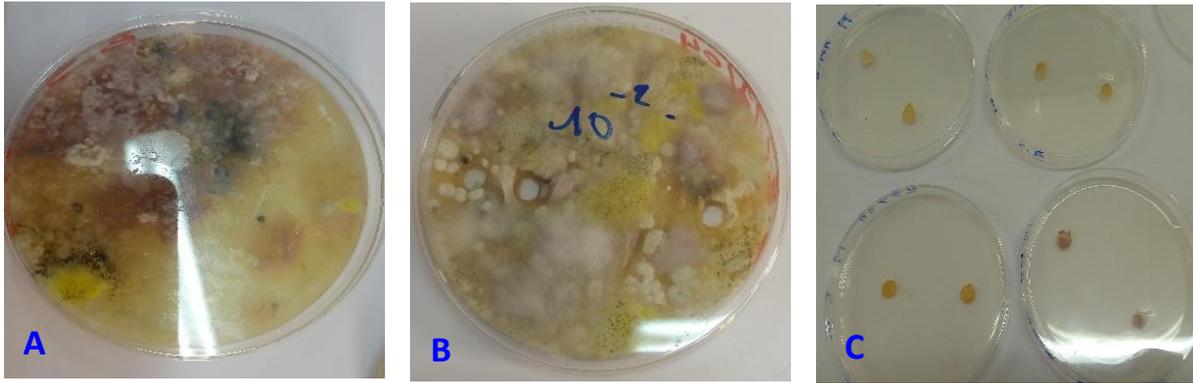


Figure 18 : Purification et conservation des souches isolées ; (A) colonies fongique âgées 8 jours, (B) réalisation des disques, (C) boîtes contenant des disques de souches fongique pure (originale,2018).

4.2. Méthodes d'identification

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

L'évaluation de la croissance et du développement a été observée après 7, 14 et 21 jours d'incubation à 28°C. Ce suivi réalisable à l'œil nu.

4.2.1. Observation macroscopique

Qui permet de déterminer la couleur de la colonie pendant le développement indices révélateurs sur l'identité de nos souches (couleur du mycélium aérien et sa variation au cours du temps couleur du revers de la boîte...).

4.2.2. Identification microscopique

L'observation de la morphologie des chaînes de spores et celle du mycélium s'est faite en utilisant le ruban adhésif, en appuyant légèrement avec un morceau de ruban sur la souche. La manipulation a été réalisé devant le bec bunsen afin d'éviter la contamination des souches pures. On collé le scotch contenant la souche sur une lame stérile et examiné au microscope optique à l'objectif *10 et * 40

4.2.3. 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 :

$$P (s) = \frac{N(s)}{N(t)} * 100$$

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

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

N (t) : Nombre totale des isolats fongiques isolés.

4.3. Sélection des souches fongiques entomopathogènes

Afin de démontrer la pathogénicité de nos souches isolées vis-à-vis le stade aquatique du moustique, des essais de toxicité des champignons ont été mis au point pour permettre une sélection primaire de souches entomopathogènes ; des suspensions fongiques sont préparées à base de champignon (à une dose de 10^7 spores/ml) afin de tester l'efficacité de ce dernier sur les larves du 3^{ème} stade de *Culex pipiens*.

5. Activité biologiques de souches fongiques entomopathogènes isolée vis-à-vis le stade aquatique du *C. pipiens*

5.1. Test de pathogénicité

Afin d'identifier la pathogénicité de notre isolats, nous avons adopté l'interaction entre deux souches fongique qui a été identifié avec l'un des stades larvaires de *Culex pipiens* pour mesurer la résistance des insectes et particulièrement mesurer la toxicité des champignons par contact et ingestion (**Butt & Goettel, 2000**).

5.2. Récolte des stades larvaires

La récolte des stades larvaires a été faites à l'aide des seaux et ont été mises dans une bouteille contenant de l'eau de gîte puis acheminer vers le laboratoire pour le traitement.

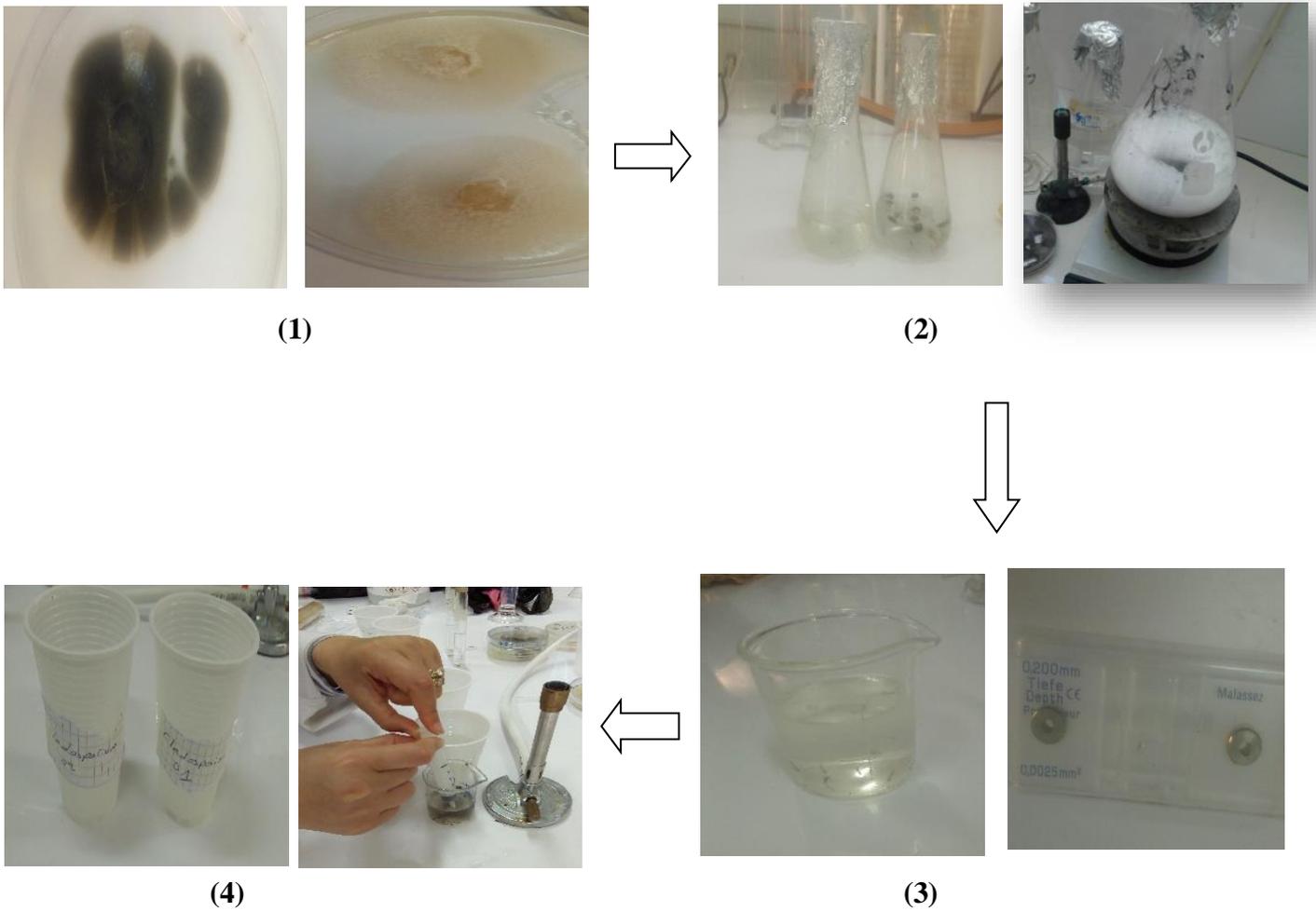


Figure 19 : La récolte des larves du culex pipiens (**originale, 2018**).

5.3. Préparation de la solution entomopathogène

A partir des colonies âgées plus de 10 jours, des petits fragments sont prélevés devant le bec bunsen et mises dans un Erlenmeyer contenant 40 ml d'eau distillé stérile (figure) qu'on ferme hermétiquement pour éviter toute contamination.

On fait agiter la solution sur une plaque d'agitation pendant 30 minutes en ajoutant 02 gouttes de réactif Tween 80, pour permettre une libération maximale des spores. Et la concentration de la solution entomopathogènes 10^7 spores / ml a été évaluée à l'aide d'une cellule hematométrique « Cellule de Malassez ». (**figure 20**) .



- 1 : les champignons entomopathogènes sélectionné
- 2 : l'agitation de solution fongique
- 3 : calcul de la concentration et préparation des individus
- 4 : l'interaction des spores fongique et les larves

Figure 20 : Les étapes de préparation de solution fongique (originale, 2018).

5.4. Mode de traitement

Pour administrer la solution fongique préparée à nos insectes, nous avons pris un bécher contenant l'eau de gîte à raison de 40 ml contenant 10 individus de stade L3 de longueur (3 à 4 mm). Puis on a ajouté 20 ml de la solution fongique. Les individus témoins du même stade, sont répartis de la même manière et comptent le même nombre que les individus traités, sauf qu'ils ont émergés dans 20 ml de l'eau distillé stérile et 40 ml de l'eau de gîte. Chaque matin, les larves se nourries avec la poudre du biscuit sec. Les mortalités et les symptomatologies apparus sont relevées quotidiennement.

6. Traitement des données

6.1. Calcul du pourcentage de mortalité

Le pourcentage de mortalité observée chez les individus traité et témoins sont calculé par la formule suivante :

$$\text{Mortalité observée} = \frac{\text{Nombre d'individu morts}}{\text{Nombre total des individus}} \times 100$$

La mortalité observée est ensuite corrigée par la formule **d'Abbot (1992)** :

$$MC = \frac{M2 - M1}{100 - M1} \times 100$$

M1 : Pourcentage de mortalité dans le témoin.

M2 : Pourcentage de mortalité dans le lot traité.

MC : Pourcentage de mortalité corrigé.

1. Résultats de la caractérisation chimique des échantillons du sol

Les caractéristiques des échantillons du sol prélevés des trois régions (Bouira, Alger, Blida) sont résumées dans le tableau ci-dessous

Tableau 05 : Propriétés chimique des échantillons du sol prélevés

| Echantillons | pH | Humidité (%) | Conductivité à 25°C | La salinité du sol |
|-----------------------|------|--------------|---------------------|--------------------|
| E1 (w. Bouira) | 8,31 | 2,13% | 420 µs/cm | Salinité moyenne |
| E2 (w. Alger) | 8,26 | 9,60% | 12,91 µs/cm | Non salé |
| E3 (w. Blida) | 7,98 | 5,52% | 6030 µs/cm | Salinité excessive |

- **Discussion**

Le pH de nos échantillons du sol prélevés est très basique avoisinant une valeur de 8, comme le montre le tableau ci-dessus, le pH basique considéré comme l'un des facteurs limitant la croissance et la diversité de la flore fongique dans le sol.

La plupart des champignons poussent entre un pH compris entre 4 et 7. La valeur du pH varie selon l'état hydrique du sol et les saisons, ainsi le pH a tendance à baisser au printemps et en automne et à augmenter en hiver. Ces variations qui s'expliquent notamment par la production d'acides organiques en période de forte activité biologique, favorisée par la chaleur et l'humidité du sol (**Anonyme, 2008**). D'après **Craaq, (2003)**, qui a déclaré qu'en sol organique, le pH est de 5.4 en raison de l'immobilisation de plusieurs oligo-éléments et de la minéralisation rapide de la matière organique du sol lorsque le pH se rapproche de 6. Donc le pH de nos échantillons considéré comme un facteur limitant la croissance des champignons

Les taux d'humidité du sol obtenues sont de 2,13%, 9,60% et 5,52% pour les trois wilayas ; Bouira, Alger et Blida respectivement comme le montre le tableau ci-dessus. L'humidité est l'un des facteurs important et nécessaire pour la prolifération et le développement des champignons du sol. D'après notre analyse la valeur la plus élevée est notée pour le sol de la wilaya d'Alger (9,60%) vu sa situation géographique. Et même on a constaté une présence d'un grand nombre et d'une diversité de souches fongiques au niveau de cette région par rapport aux autres.

Toutefois, il est à noter qu'un faible taux d'humidité peut avoir un effet négatif sur l'activité fongique et microbienne dans le sol (**Lecomte, 1995**).

La salinité de nos échantillons a été estimée en fonction des valeurs de la conductivité électrique à 25°C pour les sols de trois régions ; nous avons enregistré une salinité moyenne (420 $\mu\text{s/cm}$) dans l'échantillon de la wilaya de Bouira, l'échantillon de la wilaya d'Alger est un sol non salin (12.91 $\mu\text{s/cm}$), tandis que l'échantillon de la wilaya de Blida a une salinité excessive (6030 $\mu\text{s/c}$).

La salinité des sols est l'un des facteurs limitant la productivité végétale et le rendement agricole (**Baatour et al., 2004**). Chez les moisissures la présence de fortes teneurs en chlorure de sodium, de nombreux processus physiologiques sont sensiblement affectés la germination, la croissance, et la disponibilité en nutriments (**Ayala-Astorga et Alcaraz-Meléndez, 2010**). Selon **Moradi et al. (2011)**, la salinité du sol est considérée un facteur de stress réduisant la diversité des microbes en affectant leurs fonctions et leurs activités. Le NaCl affecte considérablement la croissance des microorganismes. Les populations fongiques, bactériennes diminuent significativement en présence de 5% de NaCl (**Omar et al., 1994**). Toutefois lorsque la salinité dépasse 100 $\mu\text{s/cm}$, la germination et les autres paramètres liés à la croissance sont considérablement inhibés (**Maghsoudi et Maghsoudi, 2008**). Donc le taux élevés de salinité dans le sol, joue un rôle néfaste pour le développement et la diversité des champignons.

2. Résultats d'isolement des souches fongiques

Les champignons sont des microorganismes très répandus dans l'univers (sol, eau, air), mais aussi l'écosystème riche de divers microorganismes. Dans notre travail nous avons essayé d'isoler les champignons en utilisant la méthode sélectives et de réaliser des dilutions décimales permettant d'éviter la condensation des microorganismes, diminuer leur nombre et de choisir des milieux à pH acide favorisant le développement des moisissures (**Botton et al., 1990**).

Malgré les précautions prises, nous avons remarqué la présence de quelques colonies de levures peu abondantes et moyennement développées. Ces petits inconvénients sont dus probablement à la résistance de ces microorganismes aux conditions imposées. Cependant leur disparition est observée suite aux repiquages consécutifs nécessaires à la purification des souches fongiques.

L'isolement des champignons à partir de trois régions a mis en évidence à 09 espèces fongiques qui sont : *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Cladosporium sp*, *Fusarium sp*, *Mucor sp*, *Bauveria bassiana*, *Penicillium sp*, *Verticillium lecanii*, *Rhizopus sp*.

2.1. Caractères microscopiques et macroscopiques des principaux champignons isolés

L'identification des agents fongiques isolés a été réalisée selon les caractéristiques macromorphologiques et micromorphologiques, en utilisant les critères de la clé de Barnett et son équipe basée sur le système Saccardo. Ce système s'illustre par une méthode de classification appliquée surtout aux champignons imparfaits. Les éléments de base de ce système sont la morphologie des structures de sporulation connues naturellement, telles que la morphologie et la couleur des conidies.

Aspergillus niger

- **caractère macroscopique :**
- Couleur : colonies d'abord blanches, puis jaunes et enfin granuleuses noires.
- Aspect : poudreux
- Forme : colonie arrondies régulière
- **caractère microscopique :**
- Mycélium : cloisonné.
- Conidies : nombreux en chaine divergente, dressés et non ramifiés, terminés en vésicule.
- Phialides : Des phialides formés directement sur la vésicule. Insérées sur la vésicule par des métules (bisériée) disposées sur tout le pourtour de la vésicule
- Tête aspergillaire : Bisériée radiée, noire à maturité
- Des cellules à paroi épaisse.
- Conidiophores : Lisse, hyalin ou brunâtre dans sa moitié supérieure, très long (1,5 à 3 mm)

Aspergillus flavus

- ✓ **caractère macroscopique :**
- Forme : colonie arrondies régulière.
- Couleur : d'abord blanches, puis jaunes, puis vert-jaune, Incolore, rosé ou brun-rouge foncé.

- Aspect : duveteuses à poudreuses.
- ✓ **Caractère microscopique :**
- Mycélium : cloisonné.
- Conidies : Globuleuses à subglobuleuses, vert pâle, échinulées (3,5 à 4,5 μm de diamètre)
- Phialides : Directement portées par la vésicule (unisériée) ou portées par des métules (bisériées)
- Tête aspergillaire : Unisériée ou bisériée, petite en colonne ou grande et radiée (300 à 400 μm de long)
- Conidiophores : Long (1 à 2,5 mm), hyalin, verruqueux avec des aspérités

Penicillium spp

- **Caractère macroscopique :**
- Forme : colonie arrondies
- Couleur : blanche à bleu-vert
- Aspect : Surface poudreuse
- **Caractère microscopique :**
- Mycélium : septé (eumycélium)
- Conidiophores : en pinceau
- Phialides : à l'extrémité des ramifications
- Conidies : rondes ou ovoïdes, lisses ou rugueuses, hyalines ou colorées, en longues chaînes

Beauveria bassiana

- **Caractères macroscopiques**
- Forme : arrondie et régulière
- Aspect : Floconneuse et poudreuse
- Couleur : blanc
- **Caractères microscopiques**
- Conidiophores : en zigzag.
- Conidies : unicellulaire disposées en grappes, de petite taille sur une cellule conidiogène à croissance sympodiale.

- L'apex de la cellule conidiogène est très étroit, et présente un aspect plus ou moins géciculé et denticulé.

Fusarium spp

- **Caractères macroscopiques**
- Couleur : blanche, jaune clair
- Aspect : cotonneux, ras, aérien
- Forme : régulière, colonie arrondies régulière
- **Caractères microscopiques**
- Conidies : sont hyalines et variables ; les macros conidies sont pluri cellulaire, légèrement courbées aux extrémités. Les micros conidies sont unicellulaires d'une forme ovoïde, la morphologie des micros conidies et leur position sont des critères importants pour la détermination de *Fusarium*.
- Conidiophores : simples ou ramifiés chaque ramification se termine par un phialide.
- Mycélium : cloisonné, ramifié

Verticillium lecanii

- **Caractères macroscopiques**
- Couleur : blanc puis jaune clair
- Aspect : cotonneux, ras.
- Forme : colonie arrondies régulière
- **Caractères microscopiques**
- Conidiophores : sont dressés, de teinte claire.
- Ils comprennent 3 à 4 groupes de verticilles.
- Les verticilles sont constitués de 3 à 4 phialides, d'où s'échappent de nombreuses conidies unicellulaires qui sont ovoïdes à ellipsoïdes.

Mucor spp

- **Caractères macroscopiques**
- Couleur : blanc beige à brun

- Aspect : surface cotonneuse
- Forme : Colonies duveteuses
- **Caractères microscopiques**
- Sporocystes : non ramifié, globuleux
- Columelle : ovoïde ou cylindrique
- Spores ovoïdes, lisses ou rugueuse
- Filaments : larges peu ou pas septés.

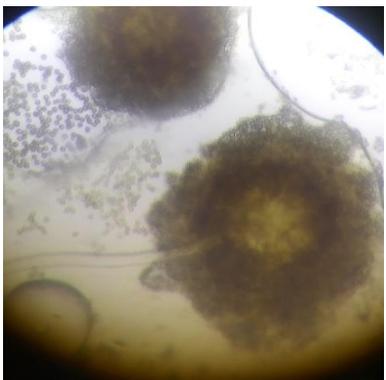
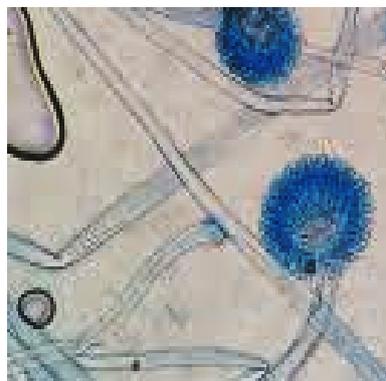
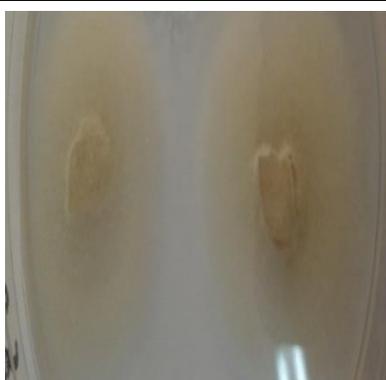
Cladosporium spp

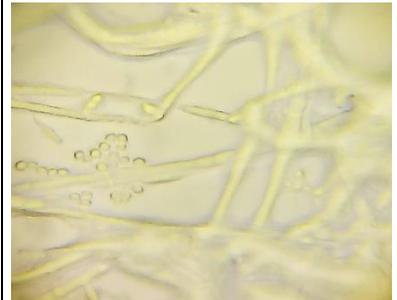
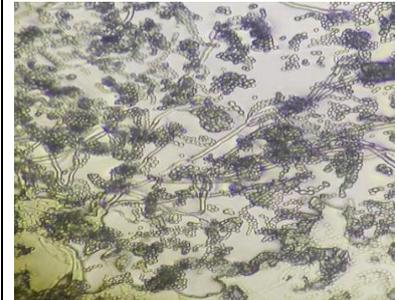
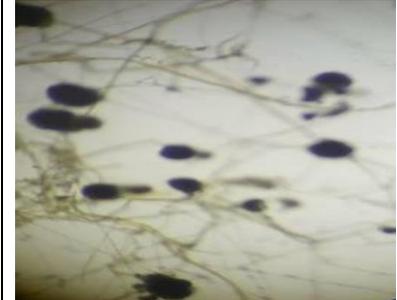
- **Caractères macroscopiques**
- Couleur : vert olivâtre
- Aspect : poudreux mamelonné
- Forme : irrégulière
- **Caractères microscopiques**
- Conidies : solitaires ou en chaînes, ramifiées ; uni ou pluricellulaires, elles sont sombres d'une forme et taille variées ; ovoïdes à cylindriques et irrégulières.
- Conidiophores : ne présentent pas de ramification, ils sont longs, sombres droits ; groupés ou solitaires.
- Mycélium : grimpant, cloisonné, moins coloré

Rhizopus spp

- ✓ **Caractères macroscopiques**
- Thalle : à croissance rapide
- Sporosystophores : généralement très grands, terminés en entonnoir, en bouquet de 2 à 6 présentant à la base de rhizoïdes.
- Couleur : ramification blanche avec des petits points noirs.
- ✓ **Caractères microscopiques**
- Columelles : brunes, globuleuses ou semi globuleuses
- la présence de stolons

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

| Champignons | Aspect macroscopique | Aspect microscopique X40 |
|-----------------------------|---|---|
| <i>Aspergillus niger</i> |  |  |
| <i>Aspergillus flavus</i> |  |  |
| <i>Mucor sp</i> |  |  |
| <i>Verticillium lecanii</i> |  |  |

| | | |
|----------------------------------|---|--|
| <p><i>Beauveria bassiana</i></p> |  |  |
| <p><i>Cladosporium sp</i></p> |  |  |
| <p><i>Penicillium sp</i></p> |  |  |
| <p><i>Rhizopus sp</i></p> |  |  |
| <p><i>Fusarium sp</i></p> |  |  |

L'identification des genres fongiques isolé cités précédemment a été basé et référé essentiellement d'après la clef d'identification (illustrated genera of imperfect fungi) de **Barnett et Hunter (2000)**; les moisissures d'intérêt médicale de **Chabasse et al (2002)**.

- ✓ L'identification macroscopique et microscopique du genre et espèce d'*Aspergillus niger* et *favus* correspondent parfaitement à ceux décrits par **Chabasse, (2002)**. Collier et son équipe, (1998).
- ✓ (**Koenraadt et al., 2004; Bukhari et al., (2011)** pour celle du genre *Mucor sp*. Les différents caractères présentés dans le genre *Cladosporium* se rapprochent énormément à ceux cité par **Pritchard** et ses collaborateurs, (1987); Sutton et son équipe,(1998).
- ✓ De **Hoog** et son équipe, (2000) pour celle du genre *Penicillium*. Aussi, les mêmes critères d'identification du genre *Verticillium* ont été cités par **Dufresne et al, 2013**

L'identification des autres genres est effectuée selon **Barnett et Hunter, (2000)** et le cahier de formation bioforma - les moisissures d'intérêt médicale de **Chabasse (2002)**.

2.2. Le relevé d'abondance des souches fongiques isolées

L'isolement des champignons à partir des trois sols agricoles a mis en évidence 14 isolats. Le relevé d'abondance des espèces a démontré que l'espèce la plus abondante est *Aspergillus niger* avec un taux de 21,42% suivi par *Penicillium sp*, puis *Rhizopus sp*, *Beauveria bassiana*, *Mucor sp* avec un taux de 14,28% pour chaque espèce, ensuite pour les 4 espèces *Verticillium lecanii*, *Cladosporium sp*, *Fusarium sp* et *Aspergillus flavus* avec 7,14% pour chacune (figure 21).

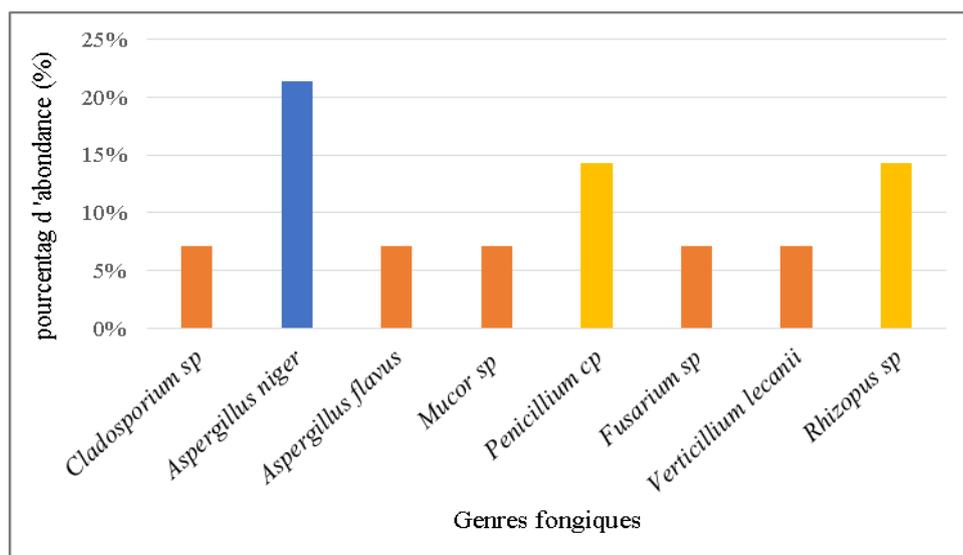


Figure 21 : Taux d'abondance des genres fongiques isolés.

L'abondance la plus importante a été enregistrée pour l'espèce *Aspergillus niger* avec un taux de 21,42%, contrairement aux autres genres qui se sont présentées en nombre très réduit. Des genres fongiques similaires ont été isolés par **Bensmira, (2006)** avec une forte abondance de l'espèce *Aspergillus sp*, dans son étude sur l'isolement et la caractérisation des souches fongiques productrices de cellulase thermostables à intérêt industriel à partir du sol de la région de Biskra.

On a enregistré une abondance de 14,28% pour *Beauveria bassiana*, *Penicillium sp* et *Rhizopus sp* qui est plus importante que celle de *Verticillium lecanii*, *Cladosporium sp*, *Fusarium sp* et *Aspergillus flavus* qui est de 7,14%. La forte prédominance des *Penicillium sp*, *Rhizopus sp* est due à leur pouvoir élevé de sporulation et à leur capacité de coloniser des milieux très différents même les plus complexes (**Bensmira, 2006**).

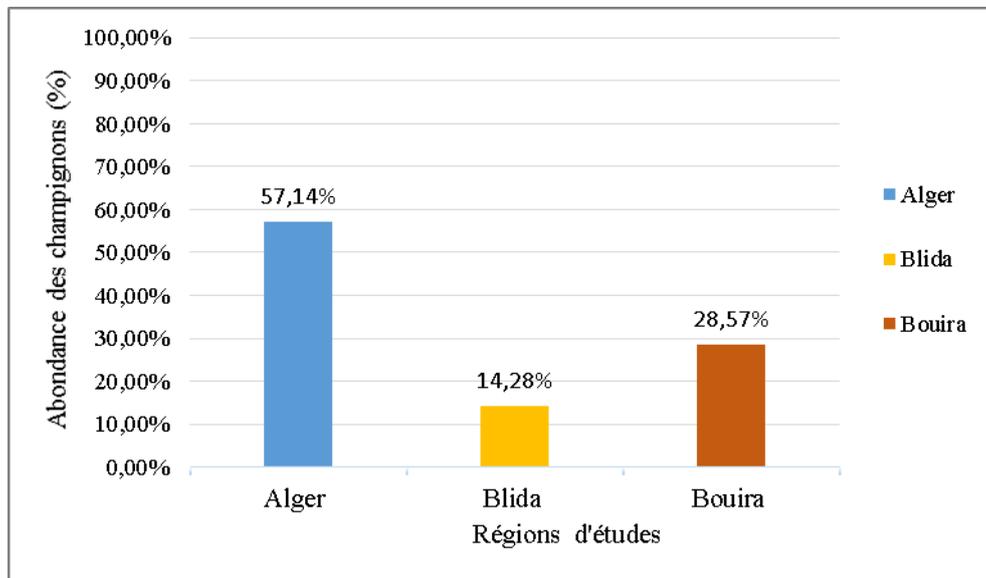


Figure 22 : Abondance des isolats fongiques par région d'échantillonnage.

Nous avons noté une variabilité dans le nombre de champignon isolé à partir des échantillons des trois régions d'études. 14 isolats fongiques ont été considérés dans le calcul d'abondance des 9 genres fongiques isolés (figure 22, Annexe II).

Le recensement montre que la région d'Alger présente le pourcentage d'abondance le plus élevé avec **57,14%** suivi par la région de Bouira avec **28,57%** puis la région de Blida avec **14,28%**.

Les analyses des échantillons du sol confirment les résultats d'abondance obtenus. Le pH basique est un facteur qui limite (pH=8) le développement des champignons, donc c'est pour cela on a enregistré des faibles pourcentages d'abondance des espèces fongiques dans toutes régions. Nos résultats corroborent avec celle de **Doucet, 2006** qui ont trouvé que l'augmentation du pH des substrats a un effet sur la croissance des champignons.

Même le taux d'humidité qu'on a enregistré au niveau de la wilaya d'Alger (9,6%) confirme le pourcentage d'abondance des champignons dans cette région par rapport aux autres régions. **Chabane et Harrache 2013**, ils ont signalé, en analysant un échantillon de sol de Boumerdes, un taux d'humidité de 41% duquel ils ont pu isoler 20 isolats de différents genres fongiques de nombre important par rapport aux autres régions de leur étude.

Par ailleurs, l'augmentation des concentrations externes en sel pose un problème sérieux pour toutes les cellules vivantes dû à la perméabilité des membranes provoquant ainsi une perte d'eau suite à l'augmentation des teneurs en sel et ceci, se terminera par la mort des cellules (**Saum et Müller, 2007**). De façon générale, les taux élevés de salinité inhibent la croissance de nombreuses souches fongique du sol (**Polonenko et al., 1986**). Ce qui explique le faible pourcentage d'abondance obtenue après l'analyse de l'échantillon du sol de Blida (6030 $\mu\text{s}/\text{cm}$).

Ces résultats confirment que les paramètres physicochimiques de sol (humidité, salinité et pH) ont un grand effet sur le développement et l'abondance des microorganismes particulièrement les champignons.

3. La sélection des souches fongiques entomopathogènes

Parmi les 09 souches fongiques isolées à partir de trois régions étudiées on a identifié 04 souches entomopathogène (*Beauveria bassiana*, *Verticilium lecanii*, *Aspergillus flavus*, *Cladosporium sp*). Pour la poursuite de notre étude on a sélectionnées 02 souches parmi ces derniers (*Verticilium lecanii*, *Cladosporium sp*), pour tester la toxicité vis-à-vis du moustique domestique *Culex pipiens* (stade L3)

On a choisi ces 02 souches entomopathogènes, d'une part selon la bibliographie consultées concernant l'activité biologique intéressante de ces dernières et d'autre part, l'absence de pathogénicité de ces souches vis-à-vis l'être humain.

La souche *Verticilium lecanii* possède à l'instar de *B bassiana* un spectre d'hôtes très large. Selon les souches, il peut contaminer différentes espèces d'arthropodes. Il peut aussi infecter d'autres ordres d'insectes tels que les coléoptères, les lépidoptères, des diptères ou les orthoptères (**Champion, 1997**).

Les résultats de **Heuchert et al, 2005** sur la souche *Cladosporium sp* montre que cette souche avait une excellente activité insecticide.

3.1. Toxicité des champignons entomopathogènes *Verticillium lecanii* et *Cladosporium sp* sur stade aquatique L3 du *Culex pipiens* :

Cette partie a été consacrée à l'étude de l'effet larvicide des champignons entomopathogènes sélectionnés contre les larves du 3^{ème} stade de *Culex pipiens*. Ce dernier est connu comme étant une espèce ayant développé une résistance aux insecticides notamment le Malathion et autres organophosphorés (**Berchi, 2000**).

3.2. Calcul de taux de mortalité

Pendant 10 jours de traitement, nous avons noté quotidiennement le nombre de larves mortes. Les résultats ont été constatés à partir du 1^{er} jour de traitement. En effet, après avoir isolé les larves mortes, nous avons pu remarquer qu'elles ont recouvert d'un mycélium témoignant l'infection fongique. Ce qui correspond très probablement aux hyphes du champignon parasite.

Après la correction des taux de mortalité par la formule **d'Abbott (1925)**, Les valeurs sont restées telles quelles, vue la mortalité nulle enregistrée pour les témoins. La moyenne des mortalités cumulées a été réalisée et illustrée dans le tableau.

Tableau 07 : Les mortalités enregistrées des larves traitées par *Verticillium lecanii* et *Cladosporium sp*

| Champignon/temp s (jours) | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | Tota l |
|---|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|-----------|
| <i>Verticillium lecanii</i> (0.416×10^7 spores/ ml) | 20 % | 20 % | 30 % | 30 % | 60 % | 60 % | 60 % | 60 % | 80 % | 90 % | 90% |
| <i>Cladosporium sp</i> (0.754×10^7 spores/ ml) | 0% | 10 % | 20 % | 20 % | 40 % | 50 % | 60 % | 60 % | 60 % | 60 % | 60% |
| Témoins | 0% | 0% | 0% | 0% | 0% | 0% | 0% | 0% | 0% | 0% | 0% |

Le tableau 04 montre que le taux de mortalité des larves est évolué en fonction du temps et varie selon la souche fongique appliquée. En effet la plus forte mortalité est enregistrée chez les larves traité au *Verticillium lecanii*, où on a signalé une mortalité de 90 % au 10^{ème} jour de traitement à la dose de 0.416×10^7 spores/ ml. L'application du champignon *Cladosporium sp* a donné un pourcentage de mortalité de 60% dès le 7^{ème} jour est reste fixe durant tout le traitement (10 jours). Les résultats obtenus ont été exprimés en courbes (Figure01) pour mieux suivre les niveaux de mortalité.

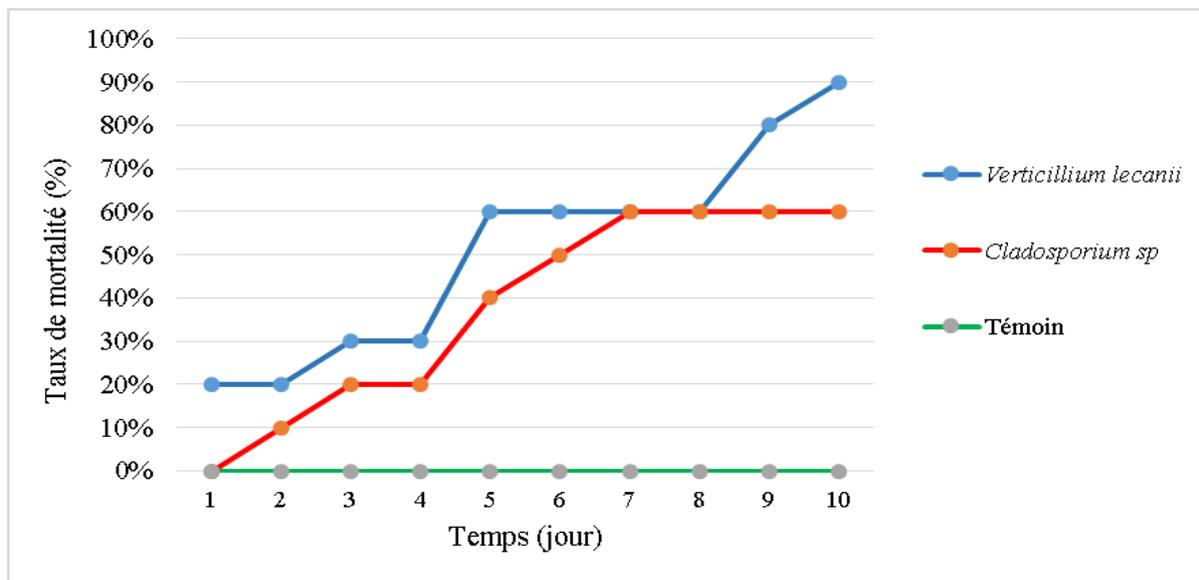


Figure 23 : Cinétiques de mortalité des larves traitées aux champignons *Verticillium lecanii* et *Cladosporium sp*.

• **Discussion :**

Cette courbe illustre l'allure de la progression des pourcentages de mortalité des larves de *Culex pipiens* traitées par *Verticillium lecanii* et *Cladosporium sp*. Nous remarquons une ascension du pourcentage de mortalité des larves traitées par le *Verticillium lecanii*, l'effet est fortuitement aperçu à partir du 1^{ier} jour de traitement avec 20% de mortalité, 60% de mortalité après le 5^{ème} jour, pour atteindre 90% le 9^{ème} et le 10^{ème} jour de traitement.

Comme l'on déjà confirmé **Chabane et Harrache 2013**, en traitant les larves *culex pipiens* de stade L1 avec une suspension fongique de *Verticillium lecanii* à une concentration de 0.29×10^7 spores/ml ils ont observé une mortalité de 75% au 8^{ème} jour de traitement.

Par ailleurs, nous avons observé 10% de mortalité chez les larves traitées par le *Cladosporium sp* après le 2^{ème} jour de traitement, et 60% de mortalité au bout du 6ème jour jusqu'au dernier jour de traitement.

Le taux de mortalité se diffère selon l'utilisation de différentes espèces fongiques entomopathogènes et d'insectes, la dose de la solution fongique, et les différents stades de l'insecte.

La majorité des insectes sont sensibles aux microorganismes dont les champignons, les bactéries et les virus (Scholte *et al.*, 2004). Approximativement, 750 espèces de champignons décrites sont des pathogènes obligatoires ou facultatifs sur un ou plusieurs stades de développement des insectes dans des habitats aquatiques, terrestres et souterrains (McCoy C. *et al.*, 1988).

En traitant les larves du *Culex pipiens* avec une suspension fongique de *Metathizium anisopliae* à une concentration de 10^5 spore/ml. Ces larves particulièrement sensibles aux mycoses dont plus de 70% des larves meurent au cours du 1^{er} jour avant que le champignon n'ait pu germer, par contre dans les mêmes conditions aucune mortalité n'a été enregistrée pour les deux autres espèces *Aedes aegypti*, *Anopheles stephensi*, ceci peut être dû à la sensibilité au traitement fongique qui peut se différencier d'une espèce de moustique à une autre (Riba *et al.*, 1989)

Les résultats des essais biologiques de Zhengzeng *et al.*, 1996 montrent que la réponse (mort) au stimulus (traitement) croît avec la croissance des doses utilisées. Ensuite les valeurs des taux de mortalité diminuent avec la baisse des concentrations de l'inoculum, pour atteindre un minimum de 10% en traitant les larves stade I de *Cx. pipiens* avec une suspension fongique d'*Alternaria sp* à la faible dose qui correspond à 10^4 spores/ml.

Rarement, on a signalé des taux de mortalité plus élevés en appliquant les faibles doses par rapport à la forte dose. Donc la non corrélation entre les doses peut être dû, aux populations traitées qui ne sont pas homogènes, car elles contiennent un mélange des deux sexes, et la sensibilité des mâles diffère de celles des femelles envers le produit testé, comme il a été rapporté par Glaser en 2004.

3.3. Symptomatologie

On a observé chez les larves de *Culex pipiens* traité par les deux champignons sélectionnés une diminution des mouvements puis la mort des larves

Les caractères extérieurs de l'infection de nos moustiques par les souches entomopathogènes sélectionnées sont dans une large mesure identiques à ceux décrits par **Seye et Ndiaye, (2012)** dans son étude sur l'isolement d'une souche de champignon entomopathogène virulente contre les larves de moustiques (*Anopheles gambiae*, *Aedes aegypti* et *Culex quinquefasciatus*) et sites d'action.

- **Effet de *Verticillium lecanii* sur les larves de stades III de *Culex pipiens***

Chez les larves du *Culex pipiens* traitées au *Verticillium lecanii*, 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 (figure24)



Figure 24 : Les larves traitées par *Verticillium lecanii*. (A) larve des témoins. (B,C, D) traitées vues sous loupe.

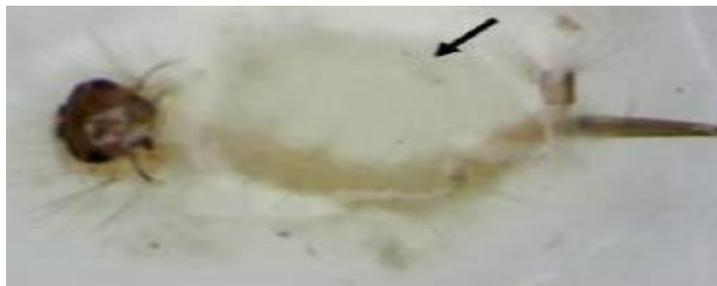


Figure 25 : développement du mycélium sur la larve de stade III de *Culex pipiens* traité au *Verticillium lecanii*.

En effet, après avoir isolé les larves mortes, nous avons pu remarquer qu'elles ont recouvert d'un mycélium témoignant l'infection fongique (figure25). Cependant le *Verticillium lecanii* agit par pénétration des hyphes dans le corps des larves et des donnant un aspect de piqures d'aiguilles, provoquant la destruction du corps de ces dernières Seye et Ndiaye, (2012).

- **Effet de *Cladosporium sp* sur les larves de stades III de *Culex pipiens***

Chez les larves du *Culex pipiens* traitées au *Cladosporium sp*, 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 (**Figure 26**).



Figure 26 : les larves de stade III de *Culex pipiens* traité au *Cladosporium sp*. (A) dégradation totale du corps de la larve. (C) développement du mycélium sur la larve.

Nous avons remarqué sur les larves de *Culex pipiens* morte un duvet verte du à la germination de *Cladosporium sp* sur le corps de la larve, et une dégradation totale du corps après 12H à 24H.

Discussion :

Les spores de *Verticillium lecanii* et *Cladosporium sp* germent sur la cuticule des larves et pénètrent au moyen d'enzymes et par pression mécanique. A l'intérieur de l'hémocèle, le

champignon se multiplie rapidement par bourgeonnement ou par fission des hyphes. Les cellules levuriformes qui en résultent (blastospores) se propagent dans le corps.

Par vaste colonisation du mycélium provoquant une asphyxie ou l'inanition, ou par des toxines libérées. Le cadavre se dessèche au fur et à mesure que les hyphes utilisant les nutriments et l'eau des larves pour se développer. Après la mort des individus, les hyphes sortent à travers la cuticule. Des spores peuvent être libérées pour poursuivre le cycle d'infection **Pelizza et al., (2007)**.

On comparant avec les observations de (**Hougard et al., 2003**) lors de son essai biologique avec la souche bactérienne *Bacillus sphaericus* sur les stades aquatiques de *Culex pipiens* qui a montré une grande toxicité sur les 4 stades larvaires et les nymphes du moustique.

Des résultats similaires sont signalés par **Bawin et al., 2014** dans son travail qui s'intitule sur l'évaluation de la toxicité fongique dans le contrôle des moustiques *Culex quinquefasciatus* en utilisant les spores d'*Aspergillus clavatus* (10^7 spores/ml) ou il a constaté la propagation des spores au niveau de la cuticule du corps des larves.

Les mêmes symptômes sont signalés par **Gayathri et al., 2010**, qui a détecté des malformations au niveau des individus de *Culex quinquefasciatus* traitées avec des suspensions fongiques de *Beauveria bassiana* et *Paecilomyces fumosoroseus* à des doses qui correspondent à 10^7 et 10^8 spores/ml, respectivement dans son travail de recherche sur le potentiel larvicide de *Beauveria bassiana* et *Paecilomyces fumosoroseus* vis-à-vis le moustique *Culex quinquefasciatus*.

Durant le traitement nous avons remarqué une différence significative dans les taux de mortalité et même dans la dégradation de corps du *Culex pipiens* qui se varie en fonction de l'espèce fongique utilisé et le temps.

Tableau 08 : Symptomatologies de l'entomopathogénicité des champignons sélectionnés sur les larves traité

| Symptomatologie Champignons | La mort de la larve | Dégradation du corps de la larve traité |
|--------------------------------|------------------------------|---|
| <i>Verticillium lecanii</i> | 01 jour après le traitement | 03 à 04 jours après la mort de la larve |
| <i>Cladosporium sp</i> | 02 jours après le traitement | 01 jour après la mort |

Le tableau ci- dessus montre que y a une différence dans l'entomopathogénicité de nos champignons appliqué, le *Verticillium lecanii* signalé une mortalité rapide, après un jour de l'interaction mais de 03 à 04 jours après la mort de la larve qu'on a observé une dégradation de cadavre. Par ailleurs, le *Cladosporium sp* a enregistré le début de mortalité après le deuxième jour de l'interaction et une dégradation rapide de cadavre (01 jour après la mort). Cette différence du au mode d'infection des champignons entomopathogènes qui s'exprime par le nombre et la nature des toxines secrétés par ces derniers.

Les toxines ont des effets divers sur différents tissus d'insectes selon les différentes espèces et sous espèces des champignons entomopathogènes. Les DTX dépolarisent la membrane du muscle de l'insecte en activant les canaux calcium. En outre la fonction des hémocytes d'insectes peut être empêchée par les DTX, sous les conditions optimales la mort de l'insecte survient normalement (**Hoster et al., 2005**).

Conclusion et perspectives

La protection de notre santé vis-à-vis les attaques des insectes est très importante, les méthodes de lutte traditionnelles (chimiques et physiques) sont généralement moins efficaces, très coûteuses et affectent négativement notre environnement. La lutte biologique représente l'alternative des méthodes conventionnelles. C'est dans ce cadre que notre travail est établi dans le but de contribuer à dégager l'activité biologique des entomopathogènes isolés à partir du sol (*Cladosporium sp*, *Verticillium lecanii* et *beauveria bssiana*) vis-à-vis le stade aquatique du moustique domestique *Culex pipiens* et d'apporter quelques notions sur la toxicité et la symptomatologie, chez les individus traités.

Les analyses physicochimiques des échantillons du sol prélevés à partir de trois régions agricoles (Bouira, Alger et Blida) révèlent des valeurs critiques ce qui influencent négativement le nombre et la diversité de la flore fongique au niveau du sol. L'étude des caractères macroscopiques et microscopiques des moisissures isolées nous a permis d'identifier 9 genres différents, parmi eux trois souches potentiellement entomopathogènes : *Beauveria bassiana*, *Verticillium lecanii* et *Cladosporium sp*).

- ✓ Wilaya de Bouira 28,57% d'abondance avec 04 genres (*Beauveria bassiana*, *Aspergillus niger*, *Penicillium sp*, *Rhizopus sp*).
- ✓ Wilaya d'Alger 57,14% d'abondance avec 08 genres (*Beauveria bassiana*, *Cladosporium sp*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Mucor sp*, *Fusarium sp*, *Verticillium lecanii*, *Rhizopus sp*).
- ✓ Wilaya de Blida 14,28% avec 02 genres (*Aspergillus niger*, *Penicillium sp*).

Les résultats obtenus montrent que la wilaya d'Alger présente le pourcentage le plus élevés avec 57,14%.

Les faibles pourcentages obtenus sont dus principalement au pH basique (8) qui a un grand effet sur la croissance des espèces fongiques. Bien que y a beaucoup de paramètres qui ont une influence sur le développement et l'abondance de différentes espèces fongiques, mais le pH basique du sol joue un rôle comme un limitant de croissance des champignons.

L'étude de l'activité biologique de deux champignons entomopathogènes *Verticillium lecanii* et *Cladosporium sp* vis-à-vis le stade aquatique L3 de *Culex pipiens* a révélé que les mortalités évoluent dans le temps et varie selon les différentes suspensions fongiques ainsi

que la dose choisie. D'après la cinétique de mortalité de notre essai biologique, on peut constater une différence significative entre les taux de mortalité enregistré pour les larves traité et les témoins de même stade.

Pour le *Verticillium lecanii* nous avons enregistré une mortalité dès le 1^{er} jour de traitement avec un pourcentage de 20%, et une mortalité de 90% à la fin de traitement (10 jours). L'application du champignon *Cladosporium sp* a donné un pourcentage de mortalité de 60% dès le 7^{ème} jour est reste fixe durant tout le traitement (10 jours).

Nous avons également déterminé les signes externes de l'infection des moustiques par les souches entomopathogènes qui sont en général la diminution des mouvements des individus traités puis une mortalité, l'envahissement des champignons est survenu juste après la mort. La dégradation de la larve était totale et rapide après l'application de *Cladosporium sp*, alors que le *Verticillium lecanii* a exercé son effet après 3 à 4 jours ou on a signalé la dégradation complète des larves. Cette différence dû à la nature de toxines produites et le mode d'infection des champignons entomopathogènes utilisés.

Ces résultats préliminaires mérite d'être poursuit. Une liste très exhaustive des champignons entomopathogènes qui peuvent être isolés à partir du sol, et l'étude des interactions entre les insectes et les champignons entomopathogènes et leur l'influence. Dans le but de mettre en place un moyen de lutte biologique efficace.

Nous tenons à signaler que les résultats fournis restent préliminaires, donc comme perspective :

- ✓ Etudes géographiques pour les régions d'échantillonnage.
- ✓ De faire un échantillonnage avec plusieurs points dans la même région.
- ✓ Utilisation des milieux de culture spécifique pour isoler les champignons entomopathogènes.
- ✓ Faire un élevage dans laboratoire pour bien suivis le cycle de développement de *Culex pipiens*
- ✓ Applications de tous les stades de *Culex pipiens* avec plusieurs espèces fongiques entomopathogènes
- ✓ Réalisation d'une étude histologique afin de cerner les différentes parties du corps qui sont touchées par le traitement fongique préparé.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

-**Abbott W. S., 1925.** A method of computing the effectiveness of insecticides. Journal of Economic Entomology, 18: 265-267.

-**Anaissie E. J., McGinnis M. R et Pfaller M. A., 2009.** Clinical mycology, 2 nd Edition. Churchill Livingstone, Philadelphia, PA., 688 pp.

-**Anonyme :** Ministère de l'intérieur et de collectivités locales, **2008.**

-**Ayala-Astorga, G. I. et L. Alcaraz-Meléndez, 2010.** Salinity effects on protein content, lipid peroxydation, pigments and proline in *Paulownia imperialis* (Siebols&zuccarini) and *Paulownia fortunei* (seemann & hemsley) grown in vitro. Electron. J. Biotechnol. 13 : 1-15.

B

-**Baatour, O., S. M'rah, N. Ben Brahim, F. Boulesnem et M. Lachaal. 2004.** Réponse physiologique de la gesse (*Lathyrus sativus*) à la salinité du milieu. Revue des régions arides, tome 1, N° Spécial : 346-358.

-**Barnet H.C. Nemeç, S., Patterson, M, A., (1982).** Review of Florida citrus blight and its association with soil edaphic factors, nutrition and *Fusarium solani*; Tropical Pest Management, 28:416-422.

-**Barnet H.C., Hunter Barry B., 2000.** Illustrated genera of imperfect fungi. 4th edition. Freedom Palestine.

-**Bawin T., Boukraa S., Seye F., Raharimalala F.N., Zimmer J.Y., Delvigne F et Francis F ., 2014.** L'utilisation de la technique de micro-injection pour l'évaluation de la toxicité fongique dans le contrôle des moustiques.

-**Bensmira S., 2006.** Isolement et caractérisation de souches fongiques de milieux extrêmes (Sol et Sebkhha de la région de Biskra) productrices de cellulase thermostable à intérêt industriel.

Mémoire Présenté pour obtenir le diplôme de Magistère En Biochimie- Microbiologie Appliquées. Faculté des sciences, département des sciences de la nature et de la vie. Université Mentouri- Constantine.

-Berchi S., 2000. Bioécologie de *Culex pipiens* L. (Diptera : Culicidae) dans la région de Constantine et perspectives de luttés. Thèse doc. Es – science, Université de Constantine, Algérie : 133p.

-Bidochka M.J et Small C. (2005). Phylogeography of *Metarhizium*, an insect pathogenic fungus. In: F.E. Vega & M. Blackwell (Eds.) *Insect-Fungal Associations*. 28-49. Oxford University Press Inc., New York.

-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.

-Bouchoux G et Sablier M. (1999). *Spectrométrie de masse* - Principes et appareillages. In Techniques de l'ingénieur. Paris: Editions T.I

-Boucias D.G et Pendland J.C.(1991). Attachment of mycopathogens to cuticle. In: *The Fungal Spore and Disease Initiation in Plants and Animals*. (Cole GT, Hoch HC (Editors). Plenum Press, New York.

-Bradfish G. A. et Harmer S. L. (1990). Omega-Conotoxin GVIA and nifedipine inhibit the depolarizing action of the fungal metabolite, destruxin B on muscle from the tobacco budworm (*Heliothis virescens*). *Toxicon*. **28** (11): 1249-1254.

-Braga G., Flint S., Miller C., Anderson A. et Roberts D. (2001). Variability in response to UV-B among species and strains of *Metarhizium* isolated from sites at latitudes from 61°N to 54°S. *J Invertebr Pathol* .**78** :98-108.

Bukhari 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.

-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

-Butt, T.M. and Goettel, M.S. (2000). Bioassays of Entomogenous Fungi. In: Navon, A. and Ascher, K.R.S., Eds., Bioassays of Entomopathogenic Microbes and Nematodes, CAB International, Wallingford, UK, 141-195.

C

-Champion Rémi., 1997- identification des champignons transmis par semences. Edition INRA.

-Campos R.A., Arruda W., Boldo J.T., da Silva M.V., de Barros N.M., de Azevedo J.L., Schrank A et Vainstein M.H.(2005) .Boophilus microplus infection by *Beauveria amorpha* and *Beauveria bassiana* :SEM analysis and regulation of subtilisin-like protease and chitinases .*Cur .Genet.***50**:257-261.8aaq.

-Carlile M.J. and Watkinson S.C. (1994). The fungi, Academic press, London, 1-8.

-Carruthers, R.I. and Soper, R.S. (1987). Fungal Diseases. In: Fuxa, J. and Tanada, Y., Eds., Epizootiology of Insect Diseases, John Wiley and Sons Inc., New York, 357-416.

-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 Bougara de Boumerdes.

-Chabasse D., Bouchara J.P., Centile L., Brun S., Cimon B et Penn P., 2002. Les moisissures d'intérêt médical. Cahier de formation biologie médicale n025, laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHU d' Angers, Cedex, 159p.

-Chamley A.K et St Leger. (1991).The role of cuticle degrading enzymes in fungal pathogenesis of insects.In :The fungal spore and disease initiation in plants an animals. Plenum Publishing Co.,New York, p 267-286.

-Chasseur C et Nolard N., 2003. Les champignon de l'habitat, introduction a la mycologie,risque pour la santé, expertises, Institut scientifique de la santé publique, 3-15p.

-Chauvet G. (1978). Lutte biologique contre les vecteurs d'affections humaines et tropicales. Moyens actuels et perspectives. *Méd .Trop.* 6 : 651- 657.

-Clark, D. A. ; Harris, P. S., 1985. Composition of the diet of sheep grazing swards of differing white clover content and spatial distribution. *New Zeal. J. Agric. Res.*, 28 (2): 233-240

-Clarkson J.M et Charnley A.K. (1996) .New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects,Trends *Microbiol.*4 :197-204.

-Craaq., 2003. Guide de référence en fertilisation .Ed. Centre de référence en agriculture et agroalimentaire du Québec. Sainte Foy. xx, 294 pp.

D

-Davet, P. 1996. Vie microbienne du sol et production végétale. INRA. (eds.), Paris.

-Dillon R. J et Charnley A. K., 1991. The fate fungal spores in the insect gut. Dans: Cole, G.T. et Hoch, H. C. (Éds.) : The Fungal Spore and Disease Initiation in Plants and Animaux. New York. Plenum Press, pp. 129- 156.

-Doucet R., 2006. Le climat et les sols agricoles. ed. Berger, Eastman, Québec. xv, 443 pp.

-Dufresne P., St-Germain G., 2013. Identification des champignons d'importance médicale. Institut national de santé publique. Laboratoire e santé publique de Québec.

F

-Ferron P. (1977). Influence of relative humidity on the development of fungal infection caused by *Beauveria bassiana* (Fungi Imperfecti Moniliales) in imagos of *Acanthoscelides obtectus* (Col.: Bruchidae). *Entomophaga* . **22** :393-396.

-Ferron P., Fargues J et Riba G. (1993). Les champignons agents de lutte microbiologique contre les ravageurs D5, 65-92. (*Handbook of applied mycology, vol. 2, Humans, Animals and Insects*, 1991).

G

-Gayathri G., Balasubramanian C., Vinayaga Moorthi P et Kubendran T., 2010. Larvicidal potential of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin and *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize,) Brown and Smith on *Culex quinquefasciatus* (Say), Entomopathogenic fungi on *Culex quinquefasciatus*. *Journal of Biopesticides* 3(1 Special Issue) 147 – 151.

-Glaser A., 2004. West Nile virus and North American unfolding story. *Revue Scientifique et Technique de l'Office International des Epizooties*, pp : 23- 557-568.

-Goettel M.S., St Leger R.J., Rizzo N.W., Staples R.C et Roberts D.W. (1989). Ultrastructural localization of a cuticle-degrading protease produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* during penetration of host (*Manduca sexta*) cuticle. *J. General. Microbiol.* **135** :2233-2239.

-Goettel M.S. (1992). Des champignons comme agents de lutte biologique. In *La lutte biologique contre les acridiens*, sous la direction de C.J. Lomer et C. Prior p.122-131. Ibadan, Nigeria: CAB International/IITA.

H

-Hajek A.E et St Leger.(1994). Interaction between fungal pathogens and insect host.*Ann.Rev.Entomol.***39** :293-322.

-Hallsworth J.F et Magan K.E. (1999). Hallsworth and N. Magan, Water and temperature relations of growth of three entomogenous fungi *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces farinosus*, *J. Invertebr. Pathol.* 261-266.

-Hamon J., Mouchet J., Coz J., Challier A., Subra R. et Adam J.P. (1972). Résistance aux insecticides et contrôle des vecteurs de maladies en Afrique Occidentale et Centrale. *Doc.Tech. OCCGE.* 5 : 217.

-Heuchert, B., Braun, u. & SchuBert, K. (2005) : Morphotaxonomic revision of fungus colour *Cladosporium species* (hyphomycetes). *Schlechtendalia* 13: 1–78.

-Hoog G.S., Guarro J., Gené J et Figueras M.J., 2011. Atlas of clinical fungi. Electronic version 3.1.

-Hougard J.M., Chandre F., Darriet F., Wouafo Ndayo M., Lohoué Petmy J., Pignon D., Chippaux J.P., Thiery I et Ghipponi P.M., 2003. Présentation du centre collaborateur de l'OMS sur la recherche, l'isolement et l'identification d'agents de lutte biologique entomopathogènes en Afrique centrale. *Bull. liais. Doc. OCEAC.*, 98 : 56-59.

-Hoster M. Cadore J.L., Bourdoiseau G.,(2005). Intérêt du fipronil en spray dans le traitement de la phtiriose à *Damalinia equi* (pou mallophage), *Pratique vétérinaire équine*, 31 (121), 65-68.

I

-Inglis G.D., Goettel M.S, Butt T.M et Strasser H. (2001). Use of hyphomycetous fungi for managing insect pests. In: Butt TM, Jackson CW, Magan N (eds) *Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential.* CABI Publishing, Wallingford, UK, 23–55.

J

-Jennings. D.H. and Lysek. G. (1996). *Fungal biology : understanding the fungal Life style,* BIOS Scientific Publishers, Guildford.

K

- Khachatourians G.G.(1991).**Physiology and genetic of entomopathogenic fungi. In : Handbook of applied mycology.Mukeji DK, Drouhet E (eds).Marcel Dekker Inc.,New York,USA. 613-663.
- Koenraad C.J., Majambere S., Hemerik L et Takken W., 2004.** The effects of food and space on the occurrence of cannibalism and predation among larvae of *Anopheles gambiae* s.l. *Entomol. Exp. Appl.* 112:125-134.
- Kramer K. J., Hopkins T. L et Schaefer J., 1988.** Insect cuticle structure and metabolism. dans Hedin, P. A., Menn, J. J. et Hollingworth, R. M. (Éds.): *Biotechnologie for Crop protection*. USA, American Chemical Society. ACS Symposium Series, pp. 160- 185.
- Kuno G., 1973.** Biological notes of *Amoebidiurn parasiticum* found in Puerto Rico. *Journal of Invertebrate Pathology* 21: 1-8.

L

- Lacey L. A et Undeen, A.H.(1986).** Microbial control of flies and mosquitoes. *Ann. Rev. Entomol.* **25** :265-296.
- Larpent J.P., 1997.**Microbiologie alimentaire. Technique de laboratoire. Ed. Lavoisier, paris.390 p
- Lecler, J.CH., Richard-Molard, J., Lamotte, M., Rougerie,G.& Portères, R.,1980.-** Recensement des végétaux vasculaires des Monts Loma (Sierra Léone) et des pays de piedmont. Première partie : Annonacées-Ombellifères. *Boissiera* 32,301 p.
- Lecompte P., 1995.** Les sites pollués, traitement des sols et des eaux souterraines. *ED Lavoisier.TEC et DOC*, p, 198.
- Liu B.L., Chen J.W et Tzeng Y.M . (2000).** Production of cyclodepsipeptides destruxin A and B from *Metarhizium anisopliae*. *Biotechnol Prog.* **16** :993–999.

-Lutzoni, F., Pagal, M. and Reelo, V. 2004. *Major fungal lineages are derived from Lichen Symbiotic ancestors.* Nature, 411,937-940.

M

-Magelhas B.P., Lord J.C., Wraight S.P., Daoust R.A et Roberts D.W. (1981). Pathogenicity of *Beauveria bassiana* and *Zoophthora radicans* to the coccinellid predators *Coleomegilla maculate* and *Eriopis connexa*. *J.Invertebr.Pathol.* **52**:471-473.

-Maghsoudi, A. M. et K. Maghsoudi, 2008. Salt stress effects on respiration and growth of germinated seeds of different wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. *W. J. Agric. Sc.* **04** (3): 351-358.

-Marouf A.; Reynaud J., 2007. La botanique de A à Z 1662 définitions. Edition dunod.

-Matthew B., Thomas & Andrew F. Read., 2007- *Nature Reviews Microbiology* 5, 377-383 (1) doi : 10.1038/nrmicro1638.

-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. 15 1-236.

-Mitsuaki S. (2004). Effect of temperature on growth of *Beauveria bassiana* F-263, a strain highly virulent to the Japanese pine sawyer, *Monochamus alternatus*, especially tolerance to high temperatures. *Appl Entomol Zool.* **39** : 469-475.

-Moradi, A., A. Tahmourespour, M. Hoodaji et F. Khorsandi. 2011. Effect of salinity on free living-diazotroph and total bacterial populations of two saline soils. *Afr. J. Microbiol. Res.* 05(2): 144-148.

N

-NASRAOUI B., 2006- Les champignons parasites des plantes cultivées. Biologie, systématique, pathologie, maladie. Centre de publication universitaire. Tunisie

-Nwe, N., and Stevens, W. F. 2008. Production of chitin and chitosan and their application in the medical and biological sector. In *Recent Research in Biomedical Aspects of chitin and chitosan*. ed H. Tamura, pp. 161-176, Research signpost, India.

O

-Omar, S. A., M. A. Abdel-Sater et M. H. Abd-Alla. 1994. Growth and enzyme activities of fungi and bacteria in soil salinized with sodium chloride. *Folia Microbiologica*. **39**: 23-28.

-O.M.S. (1970). Résistance aux insecticides et lutte anti vectorielle. *Sér.Rapp.Techn.*443

P

-PAINE L., 1983, Acquisition and maintenance of mycangial fungi by *Dendroctonus brevicornis*, le conte (coleoptera). *Entomol.Landan*. 150 p.

-Pelizza S.A., Lopez Lastra C.C., Becnel J.J., Bisaro V., Garcia A.J.J., 2007. Biotic and Abiotic Factors Affecting *Leptolegnia chapmanii* Infection in *Aedes aegypti*. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 23:177-181.

-Pichard E., 2008- Pathologie du voyageur- Maladies d'importations, France.

-Polonenko, D. R., C. I. Mayfield et E. B. Dumbroff. 1986. Microbial responses to salt-induced osmotic stress. Effects of salinity on growth and displacement of soil bacteria. *Plant Soil*. **92**: 417-425.

-Pritchard R. C et Muir D. B., 1987. Black fungi: a survey of dematiaceous hyphomycetes from clinical specimens identified over a five year period in a reference laboratory. Pathology. 19. p:281-4.

R

-Riba et Silvy., 1989- combattre les ravageurs des cultures- enjeux et perspective- paris, INRA. Station de recherches de lutte biologique, 2003p.

-Rodhain F. et Perez C., 1985 – Précis d'entomologie médicale et vétérinaire. ED. Malonie S. A., Paris, 458p.

S

-St Leger R.J.(1993). Biology and mechanisms of insect-cuticle invasion by deuteromycete fungal pathogens, In :Parasites and pathogens of insects .Beckage NE, Thompson SN,(eds),Federici BA (eds.).Academic Press Inc.,New York,USA .2 : 211-225.

-Scholte EJ, Knols BG, Samson RA, Takken W.J Insect Sci. (2004); Entomopathogenic fungi, Review- 4:19. Epub 2004 Jun 23.

-Saum, S. H. V. et Müller. 2007. Salinity-dependant switching of osmolyte strategies in a moderately halophilic bacterium: Glutamate induces proline biosynthesis in *Halobacillus halophilus*. J. Bacteriol. **189** (19): 6968-6975.

-Seye F et Ndiaye M., 2012. Isolement d'une souche de champignon entomopathogène virulente contre les larves de moustiques (*Anopheles gambiae*, *Aedes aegypti* et *Culex quinquefasciatus*) et sites d'action. Unité d'Entomologie, Rickettsiologie, Bactériologie et Virologie (UERBV), Laboratoire de Biologie de la Reproduction (LBR), Département de Biologie Animale, Faculté des Sciences et Techniques, Université Cheikh Anta Diop de Dakar.

-Silvy C et Riba G. (1989). Biopesticides contre maladies, insectes, mauvaise herbe.Dossier de l'environnement N° 9, 157-200.

-**Soza-Gómez D.R et Alves S. B. (2000).** Temperature and relative humidity requirements for conidiogenesis of *Beauveria bassiana* (Deuteromycetes: Monillicae). *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil* (english version) **29** :515-521

-**Starnes R.L; Liu C .L et Marone P.G .(1993).**History,use and future of *microbial* insecticides.*Amer.Entomol.*39 :83-91.

-**Sutton D. A., Fothergill A. W et Rinaldi M. G., 1998.** Guide to Clinically Significant Fungi, 1st ed. Williams & Wilkins, Baltimore.

-**Suty L., 2010.** La lutte biologique vers de nouveau équilibre biologique. Ed. Educari., 192p.

T

-**Thiam M., 2004** – Pesticides et Alternatives. Lutte antiacridienne : Guérir c'est bien, mais prévenir c'est mieux n23. Ed. Pesticides Action Network (PAN) Africa, Dakar, n 23, 23p.

-**Tortora J., Funk B.F et Case Ch.I. (2003).** *Introduction à la microbiologie*, (edn) ISBN. Canada.

- **Tran A ., Biteau ., Coroller F ., Guis H et François Roger. (2005).** Revu. Epidémiol et santé anim, pp :47,51

U

-**Ulacio D., Perez C et Pineda Y.J. (1997).** Mycoflora in tabacco plant roots (*Nicotiana tabacum*) in portuguesa state, Venezuela. *Bioagro.* **9** (1): 3-11.

V

-**Vey A., Ouiot J.M. (1989).** Effet cytotoxique .in vitro et chez l'insecte hôte des destruxines, toxines cyclodepsipeptidiques produites par le champignon entomopathogène *Metarhizium anisopliae*. *Can. J. Microbiol.* **35** :1000-1008 .

W

-Wraight R.J et Roberts D.W. (1987). Insect control effort with fungi. *Devel. Industr. Microbiol.* **28** :77-87.

Z

-Zhengzeng R. M., Jaronskis N., Delgado F et Swearingen W., 1996. Analysis and modeling of time. Dose mortality of *Melanoplus sanguinipes*, *Schistocerca gregaria* (*Orthoptera-Acrididae*) from *Beauveria*, *Metarhizium*, and *Poecilomyces* isolates from Madagascar. *Jour. Inv. Patho.* Vol. 67, pp. 236-252.

Annexe I

1-Matériels non biologique

1- Les verreries :

- ✓ Béchers (15ml, 25ml, 50ml, 100ml, 500ml)
- ✓ Fioles (100ml, 500ml, 1000ml)
- ✓ Pipettes pasteurs
- ✓ Boîtes de pétri
- ✓ Lames

2- Equipements

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

3- Milieux de culture

3.1. Milieux sabouraud

| | |
|-------------------------------------|--------|
| Peptone..... | 10 g |
| Glucose massé..... | 20 g |
| Agar-agar..... | 15 g |
| Eau distillée..... | 1000ml |
| vitamines et facteurs de croissance | |
| pH..... | 6,0 |

3.2. Milieux OGA

| | |
|------------------------------------|--------|
| Extrait autolytique de levure..... | 5 g |
| Glucose..... | 20 g |
| Agar bactériologique..... | 15 g |
| Eau distillé..... | 1000ml |
| pH..... | 6,6 |

Annexe II

Tableau 01 : Relevé d'abondance des souches fongiques isolées.

| Régions Champignons | Alger | Blida | Bouira | Total |
|---|--------|--------|--------|------------|
| <i>Beauveria bassiana</i> | 1 | 0 | 1 | 2 (14,28%) |
| <i>Cladosporium sp</i> | 1 | 0 | 0 | 1 (7,14%) |
| <i>Aspergillus niger</i> | 1 | 1 | 1 | 3 (21,42%) |
| <i>Aspergillus flavus</i> | 1 | 0 | 0 | 1 (7,14%) |
| <i>Mucor sp</i> | 1 | 0 | 0 | 1 (7,14%) |
| <i>Penicillium sp</i> | 0 | 1 | 1 | 2 (14,28%) |
| <i>Fusarium sp</i> | 1 | 0 | 0 | 1 (7,14%) |
| <i>Verticillium lecanii</i> | 1 | 0 | 0 | 1 (7,14%) |
| <i>Rhizopus sp</i> | 1 | 0 | 1 | 2 (14,28%) |
| Total | 8 | 2 | 4 | 14(100%) |
| Abondance des champignons par région | 57,14% | 14,28% | 28,57% | 100% |

1 : La présence de l'espèce dans la région. 0 : absence de l'espèce