

***Recherche fondamentale sur
l'entomathogène Beauveria
bassiana (Bals.-Criv.)Vuill.
(Ascomycota: Hypocreales) :***

**Bioécologie, production et application sur
Schistocerca gregaria(Forskål, 1775)et Locusta
migratoria(Linné ,1758)(Orthoptera, Acrididae).**

Présentée par :

Mlle HALOUANE Fatma.

Promoteur : Mme Doumandji-Mitiche B. Professeur (I.N.A d'El Harrach)
23-01-2008

Devant le jury Président : Mr. Doumandji S. Professeur (I.N.A d'El Harrach). Examineurs :Mr
Bouznad Z. Professeur (I.N.A d'El Harrach). Mr Soltani M. Professeur (Univ. Annaba) Mme Fazouane
F. Maître de conférences (Univ.Boumerdès) Mme Guendouz-Benrima A. Maître de conférences (Univ.
Blida).

Table des matières

Résumé . .	5
Abstract . .	6
صخلملا . .	7
Introduction . .	8
CHAPITRE I - SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE . .	11
I-1- Généralités sur le criquet pèlerin <i>Schistocerca gregaria</i> et le criquet migrateur <i>Locusta migratoria</i> . .	11
I-1-1- Position systématique . .	11
I-1-2- Morphologie . .	11
I-1-3- Biologie du criquet pèlerin et du criquet migrateur . .	13
I-1-4- Polymorphisme phasaire: . .	19
I-1-5- Aires de distribution . .	20
I-1-6- importance économique des acridiens . .	23
I-1-7- Facteurs de mortalité chez les acridiens . .	25
I-1-8- Lutte antiacridienne . .	28
I-2- Généralités sur l'entomopathogène <i>Beauveria bassiana</i> . .	30
I-2-1- Historique . .	30
I-2-2- Classification . .	31
I-2-3- Morphologie . .	31
I-2-4- Physiologie . .	32
I-2-5- Production en masse et formulation et application des entomopathogènes . .	33
I-2-6- Utilisation de <i>Beauveria bassiana</i> en lutte biologique . .	34
CHAPITRE II - MATERIEL ET METHODES . .	35
II-1- Matériel biologique . .	35
II-1-1- Souches microbiennes . .	35
II-1-2- Insectes . .	35
II-1-3- Matériel végétal . .	36
II-1-4- Animaux . .	37
II-2- Matériel non biologique . .	38
II-3- Méthodes . .	38
II-3-1- Aspect application de <i>B. bassiana</i> sur <i>S. gregaria</i> et <i>L. migratoria</i> . .	38
II-3-2- Aspect bioécologique de <i>B. bassiana</i> . .	42
II-3-3- Aspect biotechnologique de <i>B. bassiana</i> . .	47
II-3-4- Aspect toxicologique et biosécurité de <i>B. Bassiana</i> . .	57
II-5- Traitement des données . .	59
II-5-1- Calcul du pourcentage de mortalité . .	59
II-5-2- Analyse de probit . .	59
II-5-3- Analyse de la variance . .	60
CHAPITRE III - RESULTATS ET DISCUSSION . .	61
III-1- Application de <i>B. bassiana</i> sur <i>S. gregaria</i> et <i>L. migratoria</i> . .	61

III-1-1- Effet de <i>B.bassiana</i> sur la mortalité des imagos de <i>S.gregaria</i> et <i>L.migratoria</i> . .	61
III-1-2- Effet de <i>B. bassiana</i> sur la cuticule de <i>S. gregaria</i> . .	72
III-2- Aspect Bioécologie ; biotechnologie et biosécurité de <i>Beauveria bassiana</i> . .	97
III-2-1- Aspect bioécologique de <i>Beauveria bassiana</i> . .	97
III-2-2- Aspect biotechnologique de <i>Beauveria bassiana</i> . .	115
III-3- Activité toxique et inflammatoire de <i>B.bassiana</i> vis-à-vis des rats et souris . .	133
III-3-1- Effet toxique . .	133
III-3-2- Effet inflammatoire . .	134
III-3-3- Effet de <i>B.bassiana</i> sur la structure de foie des souris . .	138
CONCLUSION . .	141
Références bibliographiques . .	144
Annexe . .	159
Annexe I . .	159
ANNEXE II : ASPECT BIOECOLOGIQUE . .	160
Annexe III : ANALYSES DE LA VARIANCE . .	160
Annexe VI : cuticule . .	164

Résumé

Notre travail comporte plusieurs volets, le premier consiste à l'étude de l'activité acaricide du champignon *B. bassiana* sur les imagos de *Schistocerca gregaria*(Forskål, 1775) et *Locusta migratoria* (Linné, 1758), et de son effet sur la cuticule et l'hémogramme. Les résultats ont montré une bonne efficacité de cet hyphomycète, qui a significativement affecté la structure de la cuticule et son contenu en chitine et en protéines chez *S. gregaria* et a perturbé l'hémogramme de *L. migratoria*.

Dans un second volet nous avons déterminé l'influence de l'environnement sur le développement de *B. bassiana*. A travers le troisième volet on a évalué, le potentiel biotechnologique du notre champignon, outil inexploité à l'échelle industriel.

En effet, après une culture discontinue en fermenteur de 2L sur deux milieux naturels lactosérum et moût d'orge les résultats dégagent une excrétion des métabolites secondaires intéressante et on a mis en évidence une protéase extracellulaire à activité coagulante. De point de vue biosécurité *B. bassiana* ne possède aucune toxicité aux doses testées vis-à-vis des animaux expérimentés.

Mots clés : *Beauveria bassiana* , *Schistocerca gregaria* , activité acaricide, fermentation discontinue, lactosérum, moût d'orge, biosécurité, croissance et production.

Abstract

Our work has several components, the first in to study the effect of the fungus *B. bassiana* on adult *S. gregaria* and *L. migratoria*, and its effect on the cuticule and blood. The results showed strong activity acridicide this hyphomycete, which has affected the structure and chitin content and protein for *S. gregaria* and the hemogramme of *L. migratoria* in the second part we have determined the influence of environmental factors of the development *B. bassiana* through the third component is evaluated, the potential factors of our biotech fungus, unapped tool to industrial scale . indeed after a fermenter in discontinuous culture of 2L on two habitats whey barley malt and the results show excrete secondary matabolites were interesting and highlighted an extracellular protease to coagulant activity. From the perspective biosecurity *B. bassiana* has no toxicity at doses tested against animals experimented.

Keywords : *Beauveria bassiana* , *Schistocerca gregaria* , toxicity, fermentation discontinuous, whey, barley malt, biosecurity, growth production.

ص خ ل م ا

دراستنا شملت عدة جوانب، الجانب الأول من الدراسة تضمنت تأثير الفطر على الأفراد البالغة للجراد الصحراوي و الجراد المهاجر الإفريقي و كذلك مدى تأثيره على قشرة الجراد و الدم، أظهرت النتائج و جود نشاط سمي لهذا الفطر. حيث أنه أثر بصفة كبيرة على بنية القشرة و على محتوياتها من الجليد و البروتينات عند الجراد المهاجر الإفريقي في الجانب الثاني قمنا بدراسة تأثير العوامل البيئية على تطور الفطر الجانب الثالث من الدراسة تطرق إلى دراسة بيولوجية للفطر الغير مستخدم صناعيا بعد زرع مستمر في مخمر ل 2 لتر على وسطين مصل الحليب و مستحلب الشعير النتائج أظهرت وجود إفراز ثانوية للفطر جد مهمة قمنا باستخلاص أنزيم له تأثير على التخثر. من الناحية الحماية البيولوجية لم يظهر الفطر *Beauveria bassiana* أي سمية من خلال الجرعات المستخدمة على الحيوانات المخبر.

كلمات مفتاح : الفطر *Beauveria bassiana* , *Schistocerca gregaria* التخمر الغير المتمم، مصل الحليب مستحلب الشعير، الحماية البيولوجية، تطور ، إنتاج.

Introduction

Depuis l'avènement de l'agriculture il y a plus de 10 000 ans, l'humanité est confrontée à un ennemi redoutable et plein de ressources, le criquet gregariapte ou locuste . Normalement solitaires, ces insectes originaires des déserts d'Afrique de l'Ouest à l'Inde se transforment, quand certaines conditions sont réunies, en gigantesques essaims voraces qui laissent un sillage de désolation derrière eux.

De tous les temps, les agriculteurs et les services de protection des plantes se sont employés à repousser les bandes et les essaims de criquets en faisant du bruit ou de la fumée, et en ramassant, en enterrant et en brûlant les insectes, mais sans guère de succès tangible. Les essaims ont toujours réussi à imposer leur loi : celle du nombre. En effet, ils peuvent s'étendre sur des centaines de kilomètres et compter des milliards d'ailés (Popov, 1997).

L'homme s'est toujours demandé d'où venaient ces animaux et comment ils survivaient. Ce n'est qu'au milieu du XX^{ème} siècle qu'on a découvert que l'insecte solitaire marron clair vivant dans le désert était de la même espèce que le criquet de teinte rouge et jaune des invasions.

L'Algérie de tout temps est inscrite parmi les pays où les acridiens ont une grande importance économique. Les espèces acridiennes les plus nuisibles sur le territoire national demeurent le criquet pèlerin *Schistocerca gregaria* (Forskal, 1775); le criquet migrateur *Locusta migratoria* (Linné, 1758) et le criquet marocain *Dociostaurus maroccanus* (Thunberg, 1815).

En Algérie, comme dans le monde, depuis que la biologie de ces locustes a été comprise, seuls les pesticides chimiques et les pulvérisations aériennes ont été employés pour combattre ce fléau apocalyptique et pour réduire ses infestations. Cependant, l'utilisation des pesticides à grande échelle a également soulevé des préoccupations réelles pour la santé et l'environnement.

Les pesticides chimiques antiacridiens ne sont pas spécifiques aux seuls acridiens, ils ont souvent un effet néfaste sur leurs ennemis naturels, sur des oiseaux et sur des insectes d'utilité agronomique (Greathead, 1994). Ils sont également dangereux pour la santé humaine, en effet, une étude de 2001 conduite en Californie montre que la mort du fœtus due à une anomalie congénitale est plus fréquente chez les mères qui vivent pendant leur grossesse dans une aire de 9 milles mètres carrés autour d'un endroit où l'on a pulvérisé des pesticides.

De plus, plusieurs études montrent que 80 à 90% de la dose de pesticide appliquée n'atteint pas la cible, ils se volatilisent. **Une prise de conscience de tous ces problèmes a amené les instituts de recherches à proposer, les agents de lutte biologique pour** réduire le recours aux pesticides chimiques. Citons la dernière invasion du criquet pèlerin dans la région d'El-Oued où une grande quantité de biopesticide à base de spores de *Metarhizium anisopliae variété acridum* (Green –Muscle) a été épandu sous l'égide de la FAO et de l'Institut Nationale de la protection des végétaux d'Elharrach.

En effet la lutte biologique, précisément par utilisation de micro-organismes entomopathogènes est une alternative très prometteuse pour assurer une protection phytosanitaire performante de par l'ubiquité naturelle des agents microbiens dans les écosystèmes, leur grande variété, leur dissémination facile, leur spécificité d'action et aussi leur persistance dans l'environnement.

Les micro-organismes utilisés en lutte microbiologique appartiennent à plusieurs taxons à savoir les virus, les bactéries, les microchampignons, les nématodes et les protozoaires. L'utilisation des insecticides microbiens augmente rapidement, de 10 à 25 % par année (Kouassi, 2001). Selon le même auteur ; parmi les microorganismes utilisés, plus de 700 espèces de microchampignons sont entomopathogènes et jouent un rôle important dans la régulation naturelle des populations d'insectes.

Le plus grand nombre de pathogènes se trouvent dans la classe des Zygomycètes, mais les plus employés proviennent des Deuteromycètes (*Fungi imperfecti*), tels que les genres *Beauveria*, *Metharizium*, *Verticillium*, *Erwynia*, *Hirsutella*, *Entomophthora* et *Entomophaga*. Ils ont un intérêt agronomique considérable dans la combat contre les ravageurs des cultures et font donc l'objet d'études de plus en plus poussées (Jaronski et Goettel, 1997).

Dans ce sens plusieurs travaux ont été faits au niveau du département de Zoologie agricole et forestière de l'Institut National Agronomique d'El-Harrach. Parmi eux citons ceux de Halouane (1997) et Haddadj (2001), traitant l'activité biologique de *Metharizium anisopliae* envers *Schistocerca gregaria*. Bissaad (1998); Bensaad (1999); Kaidi (2004); Hemour (2005) et Ouattar (2006) travaillant sur l'influence de *Beauveria bassiana* sur le tube digestif, la cuticule et sur les œufs de *Schistocerca gregaria* et *Locusta migratoria*. Bouhaceine (1999) sur l'effet des deux entomopathogènes sur l'hémogramme et la cuticule de *Locusta migratoria*. (1999).

Dans l'optique d'apporter notre contribution, nous avons effectué une recherche sur un agent très prometteur de lutte biologique contre les ravageurs des cultures, l'ascomycète *Beauveria bassiana* (Bals.). Plusieurs aspects ont été développés à travers cette investigation. Le premier aspect traite l'étude de l'activité acridicide de l'entomopathogène vis-à-vis du criquet pèlerin et du criquet migrateur. Sur les individus de *S. gregaria* nous avons suivi son effet sur la cuticule de point de vue structure et biochimie. Et sur les individus de *Locusta migratoria* nous avons suivi son effet sur l'hémogramme.

Dans le deuxième aspect, nous avons dégagé l'influence des facteurs abiotiques: substrat alimentaire ; température ; pH et humidité sur les paramètres de croissance et de développement de notre souche fongique *B. bassiana*.

Le *B. bassiana* ainsi que tous les champignons représentent un ensemble extrêmement hétérogène, dont les individus sont distribués dans toutes sortes d'habitats. Cette caractéristique a pour conséquence une grande diversité métabolique et biochimique (Botton, 1985).

A ce jour, l'industrie n'exploite commercialement qu'un tout petit nombre de métabolites, produits par quelques espèces seulement. De nombreux champignons ne répondent pas spontanément aux critères qu'impose une exploitation industrielle : culture facile sur un milieu défini, peu cher.

La production des champignons s'effectue sur des substrats très variés issus et rejetés par diverses industries : le lactosérum; les mélasses de betterave et de cannes à sucre; les liqueurs sulfiteuses, résidus de la fabrication de la pâte à papier et enfin, les hydrocarbures,

essentiellement les paraffines normales, les gasoils paraffiniques, le méthane et le méthanol (produit d'oxydation du méthane) (Scriban, 1982).

En Algérie de grandes quantités de sous produits de l'industrie agroalimentaire sont rejetées dans la nature, constituant ainsi une source de pollution de notre environnement. Le lactosérum et le moût d'orge issus des industries laitières et de la bière, par la richesse de leur composition biochimique constituent une microniche appréciable où les microorganismes trouvent tous les éléments nutritifs répondant à leurs besoins de croissance (Agnes, 1986).

Il est impératif que pour atténuer ce problème, l'Algérie s'oriente vers une exploitation rationnelle de ces résidus agro-alimentaires et ceci en édifiant des programmes spéciaux visant à valoriser ces ressources. C'est vers cette optique que s'oriente le travail relatif au troisième aspect de notre recherche, qui vise l'emploi des deux sous produits suscités dans la fermentation discontinu pour la production de biomasse *Beauveria bassiana* qui va servir comme inoculum pour diverses applications et mettre en évidence tous les produits ou métabolites utiles excrétés par cette souche durant ce processus biologique. .

L'emploi des entomopathogènes dans la lutte biologique comme biopesticide contre les acridiens impose une prudence particulière quant à leur innocuité vis-à-vis de la faune auxiliaire et des mammifères. Ceci a été envisagé dans l'aspect biosécurité où nous avons étudié la toxicité de *B.bassiana* vis-à-vis d'un mammifère voisin de l'homme le rat ainsi que l'effet inflammatoire occasionné suite à l'application de ce champignon à la souris cobaye.

Notre travail est personnalisé sous forme de trois grands chapitres. Le premier chapitre est consacré aux données bibliographiques sur le criquet pèlerin *Schistocerca gregaria* et le criquet migrateur *Locusta migratoria* ainsi que l'entomopathogène *Beauveria bassiana* . Le second chapitre présente l'ensemble du matériel et les différentes méthodes utilisées.

Le troisième chapitre traitera les résultats et les discussions de chaque aspect étudié à savoir : Aspect application du champignon sur le criquet pèlerin et le criquet migrateur ; Aspect bioécologie, Aspect biotechnologie, et Aspect biosécurité de l'entomopathogène *B. bassiana* . Notre contribution est cloturée par une conclusion générale et des perspectives.

CHAPITRE I - SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

I-1- Généralités sur le criquet pèlerin *Schistocerca gregaria* et le criquet migrateur *Locusta migratoria*

I-1-1- Position systématique

Selon Louveaux et Benhalima (1987), le criquet pèlerin ou criquet du désert, *Schistocerca gregaria* et le criquet migrateur, *Locusta migratoria* présentent la position systématique suivante :

Ordre : Orthoptères.

Super famille : Acridiodae.

Famille : Acrididae.

- **Sous famille** : Cyrtacanthacridinae.

Genre : *Schistocerca*

Espèce : *S.gregaria* (Forskal, 1775).

- **Sous famille** : Oedipodinae.

Genre : *Locusta*.

Espèce : *Locusta migratoria* (Linné, 1758).

I-1-2- Morphologie

I-1-2-1- L'oeuf

a- Criquet pèlerin

Les oeufs de criquet pèlerin sont déposés dans le sol sous la forme d'une oothèque grande et sans paroi consolidée. D'une taille de 7 à 8mm et de couleur jaune beige, les oeufs ont dans l'oothèque une disposition de types radiale (Popov et al.1990).

Le nombre moyen d'oeufs à la première ponte varie de 80 à 140 chez les solitaires, alors qu'il est compris entre 40 et 70 chez les grégaires). Cependant les pontes des solitaires et des grégaires ont la même taille et la même forme générale (Launois-Luong et Lecoq, 1989).

b- Criquet migrateur

L'oeuf de *Locusta migratoria* présente une forme allongée et incurvée, à extrémité arrondie, d'une couleur brun clair et d'une taille variant de 5,5 à 7mm. Les oeufs sont déposés dans le sol à l'intérieur d'une oothèque suivant un arrangement particulier grâce à une pièce sclérifiée : le guide de l'oeuf. La disposition des oeufs dans l'oothèque diffère

selon les espèces. Chez le criquet migrateur, elle est bilatérale. La masse ovigère qui est constituée d'oeufs et de l'oothèque est surmontée d'un bouchon de matière spumeuse (Popov et *al.*, 1990).

I-1-2-2- Les larves

a- Criquet pèlerin

Les larves grégaires se distinguent des larves solitaires par la pigmentation. Ainsi la couleur verte caractérise les larves solitaires ; toute fois au stade plus avancé le vert évolue en brun (Duranton et Lecoq, 1990) (Figure n°1).

Concernant les larves grégaires, les deux premiers stades sont essentiellement noirs ,le troisième est un mélange de rouge ou d'orange et de noir. Le quatrième et le cinquième stade comportent un mélange de jaune et de noir. Les stades 3 à 5 possèdent une tache occipitale rouge (Duranton et Lecoq, 1990). Selon ces même auteurs, les larves de la phase transiens possèdent une teinte identique à celle des grégaires mais le développement de la maculature est plus ou moins accentué.



Solitaire



Grégaire

Figure n°1 - Etat larvaire de Schistocerca gregaria (Latchininsky et Launois–Luong, 1997).

b- Criquet migrateur

Les larves de la phase solitaire se distinguent de celles de la phase grégaire par la carène dorsale du pronotum en forme de crête, non déprimée ou droite.

La plupart des larves de locustes en phase solitaire ont une pigmentation uniforme, le plus souvent colorée en vert ou en brun selon l'humidité et la couleur générale de l'environnement (Duranton et *al.*, 1982).

I-1-2-3- Les Imagos

a- Criquet pèlerin

Imagos grégaires

Les femelles mesurent de 50 à 60 mm de long et les mâles de 45 à 50mm. Ils se distinguent par leur pronotum concave de profil ; la coloration est rose à rouge pour les imagos immatures, et elle est jaune chez les imagos matures. Les yeux sont obscurs, portant 6 stries souvent indistinctes.

Les imagos solitaires

Les individus solitaires sont plus grands ; les femelles mesurent de 60 à 90 mm, les mâles de 45 à 60mm d'aspect robuste, bruns ou noire. Au cours de la maturation sexuelle,

il y a un léger jaunissement des mâles. Les yeux portent 6 à 7 stries, selon le nombre des stades larvaires accomplis.

b- Criquet migrateur

Les ailés de la phase solitaire, présentent un pronotum saillant et non selliforme, une taille nettement plus grande chez les femelles que chez les mâles et un polychromisme vert brun selon les saisons. Chez les grégaires, mâles et femelles ont presque la même taille et sont très fortement mélanisés (Duranton et *al.*, 1982).

I-1-3- Biologie du criquet pèlerin et du criquet migrateur

I-1-3-1- Cycle biologique

a-Criquet pèlerin

Le criquet pèlerin, comme tous les autres acridiens, passe par trois états successifs : l'œuf, la larve et l'ailé (Figure n°2).

Les œufs sont pondus par les femelles. Lors de l'éclosion, naissent de jeunes criquets dépourvus d'ailes, appelés larves. Ces dernières se débarrassent de leur cuticule cinq à six fois pendant leur développement et leur taille s'accroît à chaque fois. Ce processus s'appelle la mue et la période qui sépare deux mues successives s'appelle un stade.

La dernière mue, du stade larvaire 5 (ou 6) dépourvu d'ailes à l'imago, ou ailé, s'appelle la mue imaginale. Le nouvel ailé, appelé «jeune ailé», doit attendre le séchage et le durcissement de ses ailes avant de pouvoir voler. Les ailés ne muent pas et leur taille ne s'accroît donc pas mais leur poids augmente progressivement. Les ailés qui peuvent voler sont, au départ, sexuellement immatures. Quand ils deviennent sexuellement matures, ils peuvent s'accoupler et pondre des œufs (Symmons et Cressman, 2001).

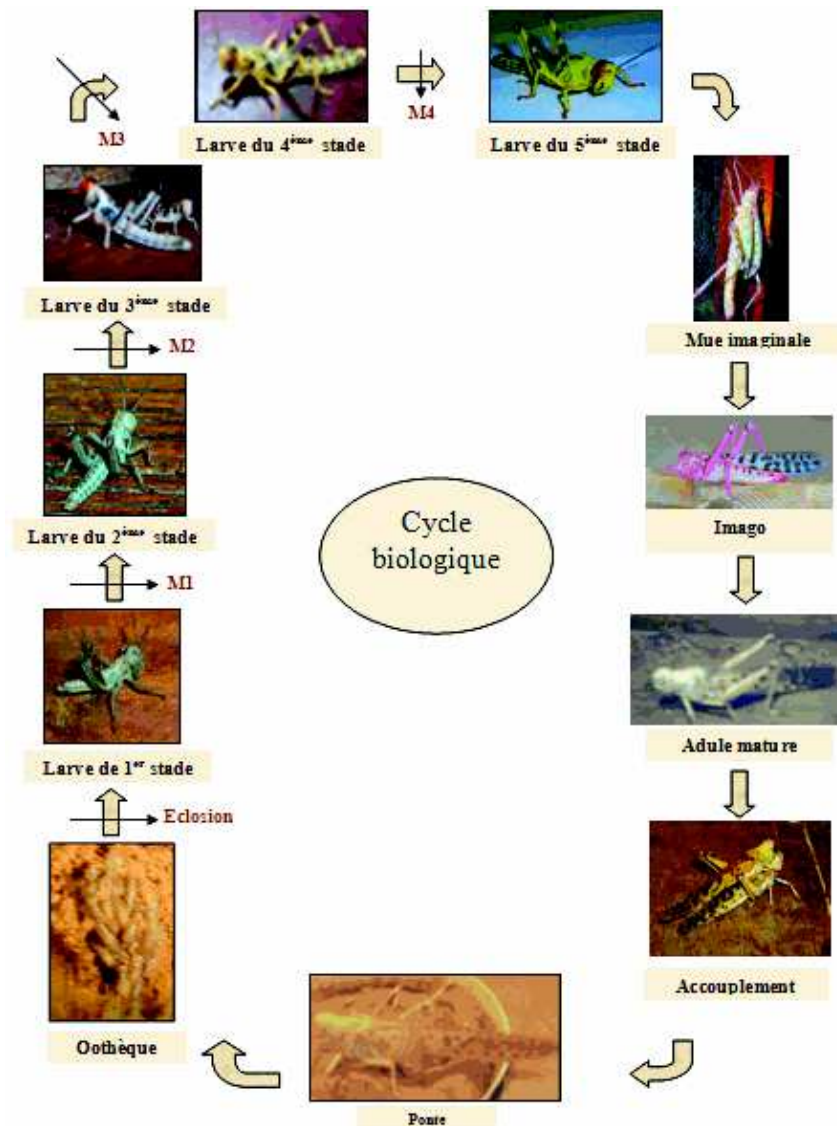


Figure n°2 – Les étapes du développement de *Schistocerca gregaria*.

Originale

- Accouplement

Avec le début de la maturité sexuelle, les premiers accouplements sont marqués et vont se poursuivre durant la vie reproductive. Le mâle pratique l'embuscade. Quand une femelle passe à proximité, il saute sur elle et s'y agrippe au moyen de ses pattes antérieures et médianes. Le mâle, qui chevauche la femelle, glisse son abdomen sous celui de sa partenaire et s'accouple avec elle. La copulation dure de 3 à 14 heures (Degregorio, 1996).

- Ponte

Après accouplement, la femelle cherche un endroit propice à la ponte et choisit en général un endroit sablonneux et frais. Elle creuse ensuite le sol avec son oviscapte qu'elle enfonce à la manière d'un taraud; son abdomen rendu turgescent et distendu peut s'enfoncer jusqu'à une profondeur de 7 cm environ, en moyenne, et quelquefois peut atteindre 15cm (Mallamaire et Roy, 1968).

La femelle pond les œufs sous forme d'une masse ovigère appelée oothèque. Les œufs ressemblent à des grains de riz et sont disposés comme dans un régime de bananes miniature. Lorsque la femelle a déterminé que l'humidité édaphique était suffisante, elle fore le sol avec les valves génitales situées à l'extrémité de son abdomen et dépose une masse ovigère.

Elle ferme ensuite l'orifice de ponte par un bouchon spumeux. L'oothèque a une longueur de 3 à 4 cm et son extrémité supérieure se trouve à une profondeur de 5 à 10 cm. Une telle profondeur nécessite une grande extension de l'abdomen de la femelle. Les oothèques de criquet pèlerin contiennent moins de 80 œufs en phase grégaire et entre 90 et 160 œufs en phase solitaire (Symmons et Cressman, 2001).

D'après Degregorio (1996), la durée de la ponte est entre 2h 45mn et 3h :

- 1h30mn pour le forage du site de ponte dans le sol
- 15 à 30mn pour le dépôt des œufs
- 1h pour le retrait de l'abdomen

Peu après la ponte, l'œuf s'hydrate et augmente de volume. Les œufs doivent absorber l'équivalent de leur propre poids d'eau dans les cinq premiers jours après la ponte ; cela est suffisant pour leur permettre de se développer correctement et d'assurer l'éclosion (Duranton et Lecoq, 1990).

Selon Launois-Luong et Lecoq (1993), la période d'incubation dure une dizaine de jours à 2 mois selon la température et l'humidité du sol.

- Ecllosion et développement larvaire

A l'éclosion, la première forme larvaire dite vermiforme ou néonate progresse vers la surface du sol par reptation. Très peu de temps après, cette larve se débarrasse de sa cuticule post-embryonnaire et devient larve de premier stade (Duranton et Lecoq, 1990).

A cause de la mortalité naturelle, les œufs pondus par une femelle n'éclosent pas tous et les larves qui éclosent n'atteignent pas toutes le stade adulte. Dans des conditions de température et d'habitat optimales, les taux de multiplication peuvent atteindre 16 à 20%. En d'autres termes, une seule femelle peut produire de 16 à 20 criquets viables en une seule génération (Symmons et Cressman, 2001).

De l'éclosion à l'état imaginal, les larves de criquet pèlerin (Figure n°1) passent par plusieurs stades, leur nombre est variable en fonction de la phase ; 5 stades pour les grégaires et 6 stades le plus fréquemment chez les solitaires. Le stade supplémentaire se situe entre le troisième et le quatrième stade (Duranton et Lecoq, 1990).

- Vie imaginale

Le développement imaginal se décompose en différentes étapes : durcissement cuticulaire, maturation sexuelle, accouplement et ponte suivie d'une brève période post reproductive précédant la mort (Latchininsky et Launois-Luong, 1997).

- Durcissement cuticulaire

Avec la mue imaginale s'achève l'état larvaire et commence l'état imaginal. Immédiatement après, les jeunes imagos étalent ses ailes et les laissent sécher en position droite, puis le replie selon le sens des nervures longitudinales. Ces jeunes imagos possèdent des téguments mous qui durcissent progressivement en une dizaine de jours au maximum.

Ils sont de couleur beige chez les solitaires, rose chez les grégaires. En quelques heures, ils sont capables de marcher. Le jour suivant, ils peuvent voler localement et sauter. Le durcissement des téguments est achevé au bout de 5 à 10 jours selon la saison (la température de l'air) (Duranton et Lecoq, 1990).

- Accumulation de réserves

Après le durcissement cuticulaire, le jeune imago se consacre surtout à la recherche d'un biotope favorable à l'alimentation. Il y a une augmentation progressive de poids par accumulation de corps gras. L'acridien constitue, sous forme de corps gras, des réserves qui vont lui permettre d'entreprendre éventuellement des vols sur de grandes distances.

L'appétit du criquet au vol migratoire passe par un maximum à la fin de cette première période de la vie imaginaire. Pendant toute cette phase, les ovaires des femelles restent en pré-vitellogénèse. C'est à ce niveau, si l'insecte ne rencontre pas de conditions favorables à la reproduction, que se situe la période de quiescence imaginaire.

Le Criquet pèlerin peut ainsi rester sexuellement immature durant plusieurs mois (6 mois au maximum), jusqu'à la rencontre de conditions écologiques propices (Duranton et Lecoq, 1990).

- Maturation sexuelle

Pour que l'imago devienne adulte, il doit subir une maturation sexuelle. Ce processus de maturation est généralement synchronisé avec la saison de pluies. Son accélération est liée à la présence d'une phéromone accélératrice excrétée par l'épiderme. Cette substance détermine la coloration safran des individus sexuellement mûrs (Albrecht, 1967).

b- criquet migrateur

Les acridiens en général et *L. migratoria* en particulier passent au cours de leur vie par trois états biologiques et qui sont: l'état embryonnaire, l'état larvaire et l'état imaginal (Figure n°3).

- L'accouplement

L'accouplement chez les acridiens est un acte toujours précédé par des parades sexuelles, résumés en des comportements préliminaires qui sont fréquents et qui consistent en : l'embuscade, la poursuite, les stridulations pour informer les femelles de leurs présences et de leurs intentions, le battement des ailes et des vols spéciaux.

Au moment de l'accouplement, le mâle se cramponne au dos de la femelle par ses deux premières paires de pattes, la troisième paire reste disponible pour chasser les mâles intrus ou pour striduler. L'abdomen du mâle est ensuite recourbé vers le bas, à droite ou à gauche. Les crochets de l'épiphalle s'accrochent à la plaque sous-génitale de la femelle.

Le pénis est introduit entre les valves de la femelle et son extrémité atteint le canal de la spermathèque. Les spermatozoïdes sont transmis du mâle à la femelle par l'intermédiaire d'un spermatophore. Il s'agit d'un réservoir en forme de sac allongé, à paroi mince, formé de sécrétion des glandes accessoires du mâle une à deux minutes après le début de la copulation. Il est introduit dans le tractus génital de la femelle (Duranton et al., 1982). L'accouplement dure plusieurs heures (Duranton et Lecoq, 1990).

Selon Zhu et Tanaka (2002), *Locusta migratoria*, montre non seulement une période de copulation longue, mais aussi une période pré-copulatoire prolongée. Ce comportement pré-copulatoire, rapporté comme un comportement des mâles de *L. migratoria* pour garder la femelle ou pour assurer l'accouplement au moment opportun.

Selon ces mêmes auteurs, ce comportement a une fonction autre que de garder la femelle ou juste une attente pour que la femelle devienne réceptive. Une pré-copulation prolongée augmente la durée de la copulation, qui à son tour augmente la proportion de la descendance.

- La ponte

La très grande majorité des acridiens pondent leurs oeufs dans le sol (ponte hypogée), à l'exception de quelques rares acridiens des milieux humides qui pondent sous les feuilles des plantes aquatiques ou d'espèces forestières qui forent les tiges des plantes pour y pondre.

Plusieurs tentatives de ponte ont lieu avant la ponte. La femelle choisit minutieusement le site de ponte en fonction de divers facteurs édaphiques, tels que l'humidité du sol, les sels minéraux, la compacité et la granulométrie du sol (Popov et al., 1990).

La ponte a lieu généralement le jour et dure une heure et plus (Figure n°3). La femelle de *L. migratoria migratorioides* produit 2 oothèques de 60 oeufs, soit 120 oeufs par femelle (Duranton et al., 1982).

- Développement embryonnaire

Le développement embryonnaire dure une dizaine de jours en saison chaude et peut dépasser un mois en saison fraîche (Launois-Luong et Lecoq, 1989). Il varie beaucoup en fonction des espèces et des conditions d'incubation. Il est de 18 jours à 27°C. et de 10 jours à 33°C. chez *L. migratoria*. Il peut dépasser 6 mois pour certaines espèces comme *Kraussaria angulifera* en saison sèche et pourrait même durer plus d'un an chez d'autres espèces en l'absence de pluie (Duranton et al., 1982).

- Développement larvaire

Au cours de leurs développements, les larves passent par plusieurs stades. Il est au nombre de cinq chez *Locusta migratoria* et dure environ trois semaines (Launois-Luong et Lecoq, 1989) (Figure n°3). Les larves néonates subissent une 'mue intermédiaire' qui a lieu juste après l'éclosion puis des mues larvaires et une imaginale pour atteindre le stade adulte.

Un évènement important caractérise le milieu du développement larvaire : le retournement des ébauches alaires. La pointe de celle-ci est d'abord dirigée vers le bas, puis ensuite vers le haut. Cette étape est un point de repère très utile de la mi-développement.

Elle intervient entre le 3^{ème} et le 4^{ème} stade dans le cas d'un développement à cinq stades. La durée totale de développement larvaire varie de 18 jours à plus de 8 mois, selon les espèces et les conditions d'environnement (Launois, 1978 cité par Duranton et al., 1982).

- Le stade adulte

L'imago consacre la première partie de sa vie imaginale à la recherche d'un biotope favorable et à l'alimentation. De ce fait, les imagos augmentent leurs poids dans des proportions notables. Le poids des mâles se stabilise, alors que celui des femelles continue d'augmenter. Cette deuxième prise de poids est en relation avec la maturation ovocytaire préparant la future première ponte (Duranton et al., 1982).

La maturation sexuelle dure environ une quinzaine de jours (Launois-Luong et Lecoq, 1989). Lorsque les ailés sont en période de reproduction, on parle d'adultes (Duranton et al., 1982).

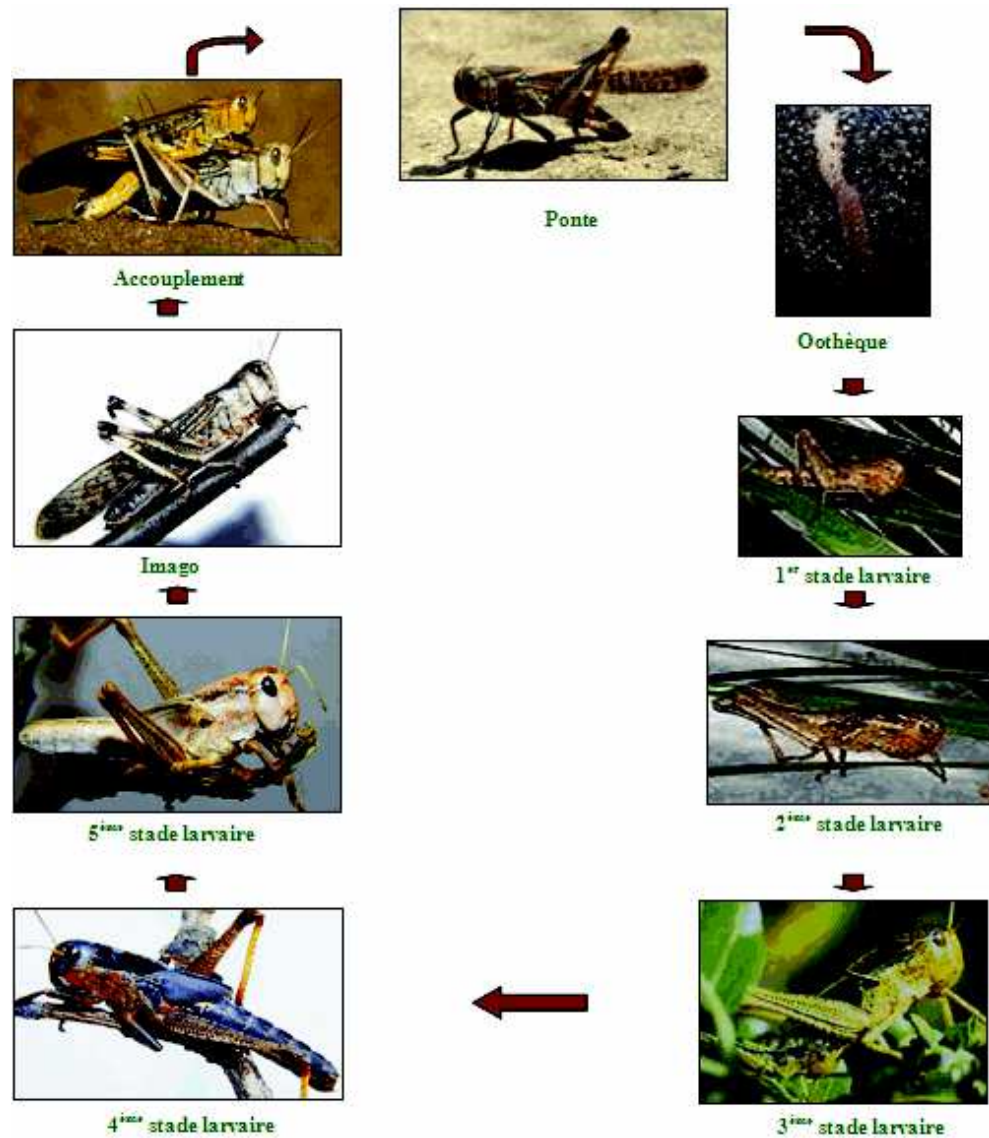


Figure n°3 - Cycle biologique de *Locusta migratoria*.

(original)

I-1-3-2- Nombre de générations

Une génération acridienne correspond à la succession des états qui relient un œuf de la génération parentale à un œuf de la génération fille (Duranton et al. 1987).

Dans les conditions écologiques favorables, le criquet pèlerin développe deux à trois générations par an et exceptionnellement quatre (Duranton et Lecoq, 1990; Popov et al., 1990; Launois-Luong et Lecoq, 1993). Appert et Deuse (1982) et Pastre et al. (1988), signalent chez cette espèce trois générations annuelles :

- Une génération estivale située dans la partie Sud de l'aire de distribution
- Deux générations hiverno-printanières auraient lieu dans la partie Nord de l'aire de distribution.

Selon Launois-Luong et Lecoq (1989), le criquet migrateur se reproduit en continu et effectue quatre à cinq générations par an dans sa phase solitaire et trois générations par an lorsqu'il est en phase grégaire.

I-1-4- Polymorphisme phasaire:

Les acridiens grégariques, encore appelés locustes ont la particularité de se présenter sous la forme solitaire ou sous la forme grégaire selon certaines circonstances. Le passage d'une forme à l'autre se fait par un processus de transformation phasaire. Cette transformation est réversible et se fait de manière progressive.

Le criquet pèlerin fait partie des espèces les plus sensibles à l'effet de la densité. Les caractères qui différencient les solitaires des grégaires sont extrêmement complexes et variés (Latchininsky et Launois-Luong, 1997).

Locusta migratoria et *Locusta danica* ont été considérées pendant longtemps comme deux espèces différentes jusqu'à 1921. A cette date, Uvarov a supposé qu'il s'agissait d'une seule et même espèce mais sous deux formes différentes. L'une caractérisant les populations grégaires et l'autre la population solitaire (Figure n°4).

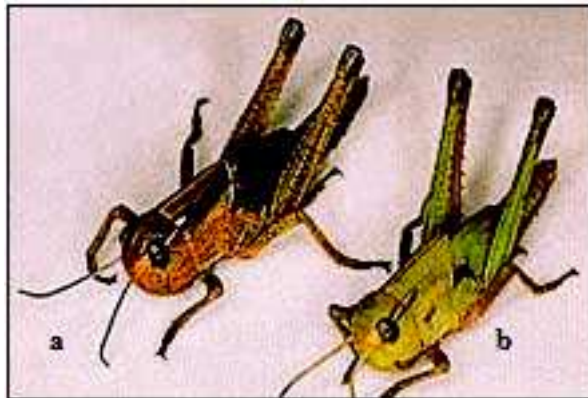


Figure n°4 - Larve grégaire (a) et solitaire (b) de *Locusta migratoria*.

La mise en évidence de ces deux pôles phasaires, a depuis été observée et prouvée chez d'autres acridiens comme : *Locustana pardalina* (Walker, 1870), *Schistocerca gregaria*, *Nomadacris septemfasciata* (Serville, 1838) et *Dociostaurus maroccanus* (Thunberg, 1815). Les formes intermédiaires sont appelées : transiens.

Selon les cas, ils sont appelés transiens congregans lorsque l'acridien évolue de la forme solitaire vers la forme grégaire et inversement lorsque l'évolution se fait dans l'autre sens, on parle dans ce cas de transiens dissocians (Duranton et al., 1982).

La différence phasaire chez les acridiens est profonde, elle affecte la morphologie, l'anatomie, la physiologie et le comportement des insectes (Fescemyer, 1993).

□ - Les solitaires

Généralement, les imagos de *L. migratoria* en phase solitaire sont verts ou bruns plus ou moins parsemés de taches noires, jaunes ou brunes. Le pourcentage respectif des deux formes vertes et brunes chez les populations naturelles est variable selon les saisons.

Les formes vertes étant prédominantes en saison humide et les formes brunes en saison sèche (Duranton et al., 1982).

Les yeux de *Locusta* et de *Schistocerca* montrent quelques différences externes. Les yeux des adultes de *Schistocerca* solitaires ont six stries brun foncé verticales avec des interstries beaucoup plus de coloration crème. Le nombre de stries augmente de un après chaque stade, dont le nombre total des stries indique généralement le nombre total des stades larvaires. Chez *Locusta* les yeux des solitaires sont plus pâles ou plus translucides, souvent tachetés avec de petites taches rondes de couleur claire (Nolte, 1978).

□ - Les grégaires

En phase grégaire, les imagos de *Locusta* présentent une coloration unique jaune avec une forte maculature noire (Pener, 1976). Les yeux des adultes de *Schistocerca* et de *Locusta* grégaires sont sombres (Nolte, 1978).

· Facteurs influençant les deux phases

Le principal facteur déclenchant vers l'un ou l'autre des deux pôles phasaires est la densité (Fescemyer, 1993). Ainsi selon Duranton et al. (1982), on peut obtenir des individus grégaires ou solitaires à partir d'une même ponte à condition d'élever les larves néonates en groupe ou isolément. Si les mêmes conditions sont imposées à la génération suivante, les premières modifications divergentes seront très renforcées.

L'humidité (Rowell et Cannis, 1971) et d'autres aspects non sociaux de leur environnement telles que la température et la photopériode peuvent aussi modifier le comportement, la couleur et la morphologie des imagos et des adultes de *Schistocerca* sp. élevés en groupe (Gillett, 1978).

Selon Duranton et Lecoq, (1990) il y a d'autres facteurs qui interviennent dans l'expression du polymorphisme phasaire en renforçant ou en réduisant les effets du choc densitaire subi, comme, la sécheresse, la pauvreté de l'alimentation, la teneur de l'air en gaz carbonique et la salinité du sol.

I-1-5- Aires de distribution

a- criquet pèlerin

· Aire d'invasion

L'ensemble de l'aire d'invasion du criquet pèlerin couvre environ 29 millions de Km² soit plus de 20% des terres émergées correspondant à une soixantaine de pays. Elle est limitée à l'Ouest par l'Océan atlantique, au Nord par la mer méditerranéenne, la mer caspienne, à l'Est par la chaîne himalayenne et le Pakistan Oriental et enfin au Sud par l'Océan indien sur la côte Est de l'Afrique (Popov, 1997).

Popov et al., (1990) mentionnent que plus de la moitié de cette aire n'est concernée que par l'invasion des insectes errants. Les zones de reproduction intéressent environ 13,6 millions de Km² (Figure n°5).

· Aire de rémission

Le criquet pèlerin se trouve réparti en phase solitaire à des faibles densités sur une ceinture de 16 millions de Km² de régions arides et semi arides s'étendant de l'Ouest Atlantique au Nord-Est de l'Inde (Figure n°5).

Les populations se réfugient dans les zones grégariennes suivantes :

- Frontière indo-pakistanaise où les systèmes de vents favorisent des concentrations importantes de populations;
- Bords de la mer rouge et du golfe d'Aden où le régime de pluie peut fournir des conditions compatibles à la reproduction tout au long de l'année;
- bordures de certains massifs montagneux où les phénomènes d'écoulement favorisent la création de sites favorables (massif du Sahara Central et méridional, bordure Sud de l'Atlas, bordure Ouest des montagnes de l'Oman, vallées du Mekrean au Pakistan et en Iran) (Duranton et Lecoq, 1990).

– **E n Algérie**

S. gregaria est signalé sous sa forme solitaire dans la région de Laghouat, au Hoggar et à Tamanrasset (Chopard, 1943). Selon Sitouh (1967), les zones d'épandage d'oueds constituent l'aire d'habitat permanent ou l'aire de distribution normale de l'espèce.

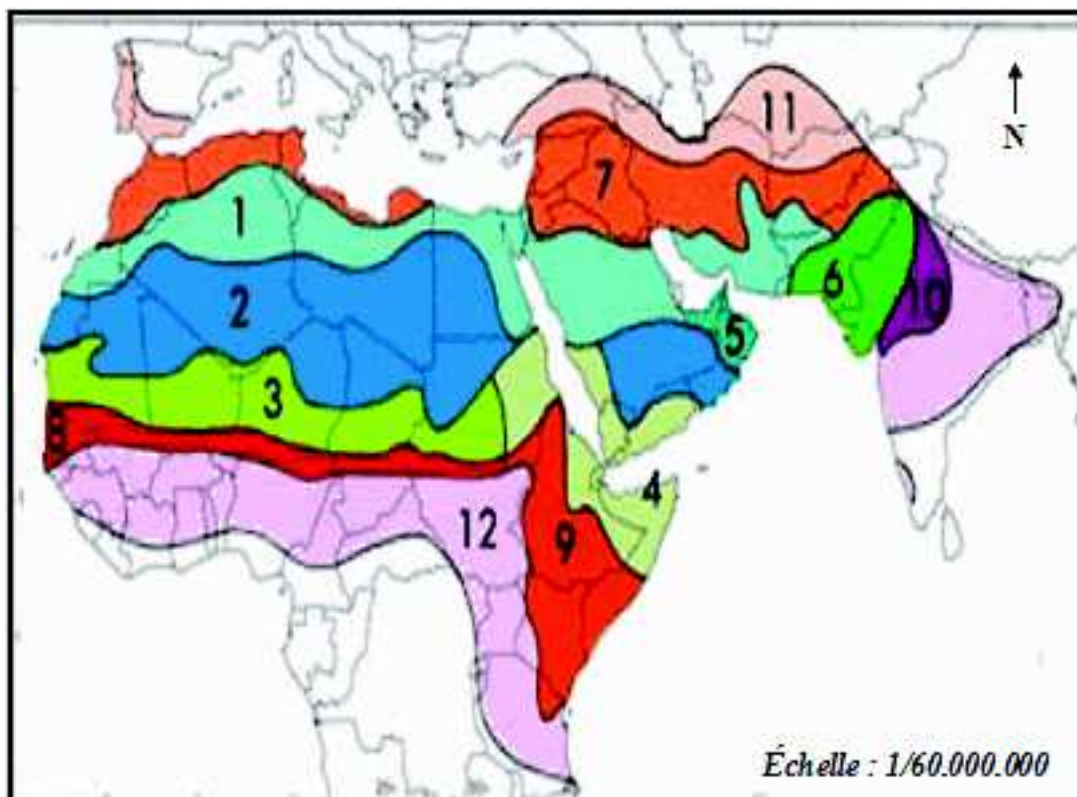


Figure n°5 - Les limites des aires d'invasion et de rémission du Criquet pèlerin et subdivision biogéographique de son aire d'habitat. (Duranton et Lecoq, 1990).

Zone de rémission

- 1° Zone saharo-méditerranéenne de dispersion et de reproduction en période de rémission
- 2° Zone saharienne désertique de dispersion et de reproduction en période de rémission
- 3° Zone saharo-sahélienne de dispersion et de reproduction en période de rémission
- 4° Zone semi-aride subissant l'influence du front de convergence de la mer Rouge et permettant dispersion et reproduction en période de rémission

5° Zone saharienne tempérée par effet de relief et permettant des reproductions plus fréquentes qu'en zone saharienne désertique

6° Zone désertique atténuée sous double influence méditerranéenne et moussonienne permettant dispersion et reproduction en période de rémission

Zone d'invasion

Les zones de dispersion et de reproduction de période de rémission sont utilisées en période d'invasion mais, de plus, les zones suivantes sont également colonisées.

7° Zone méditerranéenne de dispersion et de reproduction des grégaires

8° Zone tropicale (soudano-sahélienne) de dispersion et de reproduction des grégaires

9° Zone de dispersion et de reproduction des grégaires de l'Est africain

10° Zone orientale de dispersion et de reproduction des grégaires

11° Zone septentrionale de dispersion des grégaires

12° Zone méridionale de dispersion des grégaires.

b- Criquet migrateur

Le criquet migrateur est largement distribué dans l'ancien monde, en Afrique, au sud du Sahara, dans la péninsule Arabique et Indo-pakistanaise, en Europe et dans les régions du pourtour Méditerranéen, en Asie orientale et en Australie (Figure n°6).

Par contre on ne le retrouve pas en Amérique. Il existe au moins une douzaine de sous espèces de *Locusta*, chacune bio-écologiquement adaptée aux caractéristiques éco-climatiques spécifiques de leur environnement (Duranton et al., 1982).

La sous-espèce *L. migratoria migratorioides* (REICHE et FAIRMAIRE, 1850) vit à l'état solitaire dans tous les pays d'Afrique, au sud du Sahara à l'exception des régions équatoriales.

A Madagascar, une sous espèce proche du criquet migrateur africain, *L. m. capito* (SAUSSURE, 1884) occupe pratiquement tout le versant ouest de l'île (Duranton et al., 1982).

En Algérie, la sous-espèce *L. m. cinerascens* signalée par Chopard (1943) est présente sur le littoral et dans les oasis.

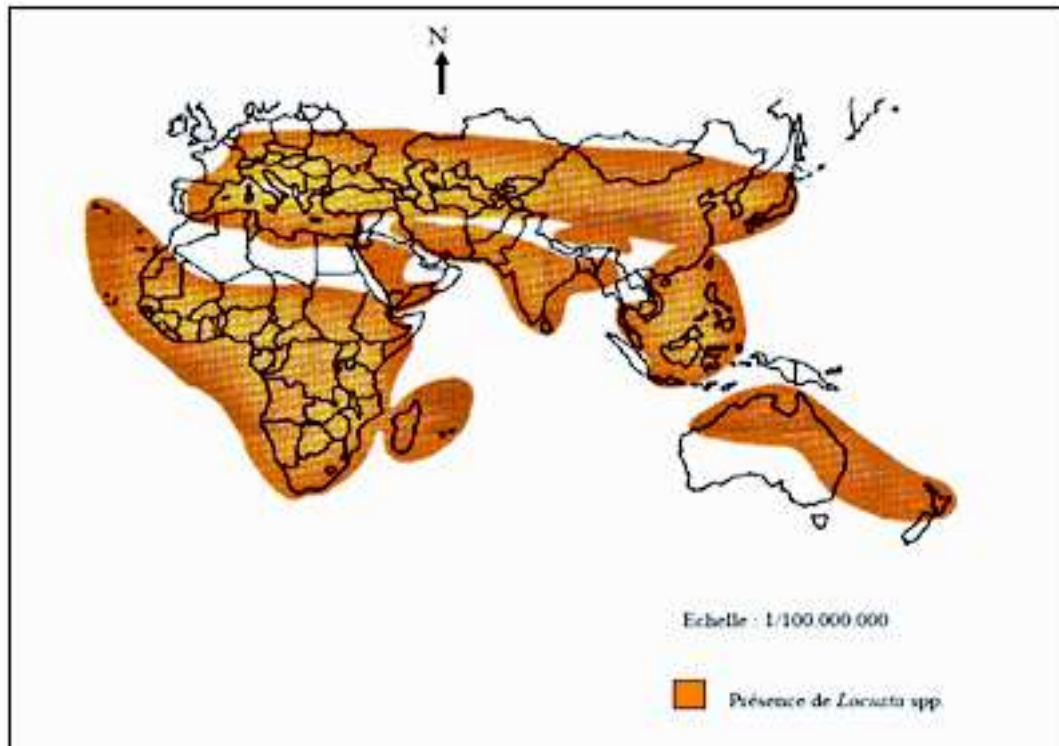


Figure n°6 - Distribution mondiale des différentes sous espèces de *Locusta migratoria* (Duranton et al., 1982).

I-1-6- importance économique des acridiens

a- Criquet pèlerin

Le criquet pèlerin occupe une importance particulière suite aux caractéristiques qu'il possède entre autre sa grande mobilité, sa voracité, la fréquence élevée de ses invasions ainsi que sa large distribution. Etant phytophage, les dommages imputables se manifestent à différents stades de développement. 8 % des dommages sont dus aux larves, 69 % aux insectes immatures et 23 % aux essaims d'insectes adultes (Nurein, 1989).

En Algérie, en 1866, les pertes ont été estimées à 19.652.981 de francs français (équivalent de 52 millions d'euros de 2003). En 1941 en Libye, les criquets ont totalement endommagé un million de pieds de vignes (Lecoq et al., 2003).

Les pertes au niveau mondial sont estimées à 15 millions de Livre Sterling en 1935, 30 millions en 1950, 45 millions en 1980, malgré les efforts de lutte (Zafack, 2004).

Schistocerca gregaria est considéré depuis l'antiquité comme l'un des principaux fléaux de l'humanité dans l'ancien monde. Son importance économique découle de:

- Sa grégariaptitude;
- Sa capacité de dispersion;
- Son grand potentiel reproducteur;
- Sa capacité à consommer chaque jour son propre poids de nourriture fraîche;
- Sa polyphagie le conduisant à s'attaquer à une très large gamme de cultures et à leur causer des dégâts très sévères (Duranton et Lecoq, 1990).

Les dégâts infligés par les criquets aux cultures et aux pâturages sont directs ou indirects (Appert et Deuse, 1982):

- dégâts directs : prélèvement alimentaire sur les feuilles, les fleurs, les fruits, les semences, les jeunes écorces, les repousses, parfois le collet et la partie supérieure des racines.
- Dégâts indirects:
 - Rupture mécanique des branches sous le poids des ailés posés en grand nombre;
 - blessures des plantes consécutives aux morsures. Elles ont deux conséquences : ouverture d'une voie d'infection aux maladies et de pénétration pour les parasites et création d'une lésion des vaisseaux conduisant la sève brute et la sève élaborée. Ceci entraîne une destruction végétative.

Des très nombreuses plantes, ligneuses ou herbacées sont susceptibles d'être attaquées. Au Sahel, les céréales occupent la première place : le mil, le maïs, le sorgho, le riz sont particulièrement sensibles nettement plus que le coton, le niébé et l'arachide (Launois-Luong et *al.*, 1988).

Les dégâts sur les pâturages sont moins spectaculaires mais suffisants pour déclencher une compétition alimentaire entre le bétail et les acridiens (Launois-Luong et *al.*, 1988). Selon les auteurs précités, les dégâts réels sont difficiles à quantifier; ils dépendent aussi du pouvoir de récupération de l'espèce végétale; mais il est sûr qu'un agriculteur qui a connu une invasion acridienne s'en souvient toute sa vie.

Les sauterelles ont toujours été considérées comme un fléau et une catastrophe naturelle. En effet les dégâts qu'elles causent, sont suivis de famine dans les pays pauvres. A titre indicatif, un essaim de criquet pèlerin de 10 Km² constitue environ 2 milliards d'individus, consommant chacun l'équivalent de son propre poids par jour, ce qui correspond à une perte de 4.000 tonnes de végétation par jour (Chara, 1995).

b- Criquet migrateur

Les dommages causés par les criquets sont souvent dévastateurs, mais ne sont jamais uniformément répartis, en raison de leur extrême mobilité, surtout en phase grégaire. Ils peuvent parcourir des centaines de kilomètres par jour (Krall et Herok, 1997).

Chaque criquet peut consommer l'équivalent de 30 à 70% de son poids (2g) en aliments frais chaque jour qui pourrait atteindre 100% en phase grégaire (Duranton et *al.*, 1982). Les criquets en phase grégaire, se déplacent en essaim et consomment une énorme quantité de végétation (Potter et Showler, 1991), 100 tonnes de matière végétale fraîche par jour par une population de plus de 50 millions d'individus au kilomètre carré (Duranton et *al.*, 1982). Presque toute la végétation verte est dévorée, avec une exception près pour le café (Potter et Showler, 1991).

Plusieurs spéculations sont vulnérables aux attaques des acridiens, ce sont pour la plupart des graminées, telles que : le mil, le sorgho, le maïs, le riz, la canne à sucre, le blé et l'orge, parmi elles il peut y avoir aussi des arbres fruitiers, le coton, des cultures maraîchères et une multitude de plantes sauvages.

Les dégâts dus aux acridiens sont difficiles à apprécier quantitativement avec exactitude, ils dépendent aussi du pouvoir de récupération du végétal, qui lui-même est

en relation avec l'état physiologique et phénologique de la plante au moment de l'attaque (Duranton et *al.*, 1982).

On a estimé les dégâts sur le plan financier au niveau mondial à 15 millions de livres anglaises en 1935, au double en 1950, au triple en 1980 et ceci en dépit des opérations de lutte. 368000 tonnes de céréales dans le Sahel aurait été perdues du fait des sautériaux en 1974 (Duranton et *al.*, 1982). En Ethiopie, on a évalué les pertes à 167000 tonnes de grains de céréales en 1958, une quantité suffisante pour nourrir un million de personnes pendant une année (Steedman, 1988 cité par Showler, 1995).

I-1-7- Facteurs de mortalité chez les acridiens

I-1-7-1- Facteurs abiotiques

a- La température

Les acridiens, comme tous les insectes, sont des poïkilothermes, c'est à dire des animaux à températures variables, donc très dépendant de la température ambiante. La possibilité de la régulariser est faible, encore que la température du corps puisse, par insolation directe, dépasser de 10 à 15°C la température externe.

La température module l'activité générale des acridiens, la vitesse de développement et influe aussi sur le taux de mortalité. Son action finale porte sur la distribution géographique des espèces (Duranton et *al.*, 1982). La température optimale varie d'une espèce à une autre et les seuils thermiques sont :

Selon les mêmes auteurs, le criquet à une activité normale à partir de 23 °C. Son excitation devient forte à 33°C, les sauts sont plus longs, la marche est plus rapide, les prises de nourriture sont plus fréquentes et de plus longue durée, le transit intestinal plus court au-dessus de 43 °C. La mort survient à 51 °C. A noter que l'optimum thermique varie de 30,5°C chez les larves à 39 °C chez les ailés, sauf en période de ponte où il n'est pas plus de 29,5°C.

b- La lumière

En général, les acridiens sont attirés par les sources lumineuses, mais des différences importantes sont observées en fonction des espèces, du sexe et de l'état physiologique des individus (Duranton et *al.*, 1982). Selon les mêmes auteurs, au dessus du seuil de sensibilité qui est de 0,1 lux, la stimulation ou l'inhibition de l'activité des acridiens dépend de l'intensité de la lumière et de la sensibilité des individus.

c- L'eau

En zone tropicale sèche, le facteur hydrique est souvent le principal facteur limitant l'évolution des populations acridiennes, revêtant différentes formes : pluie, rosée, brouillard... etc. L'eau exerce une influence directe ou indirecte :

1. L'influence directe est particulièrement visible sur les œufs qui ont besoin d'absorber de l'eau juste après la ponte. Quant aux larves et aux ailés, ils recherchent une ambiance hydrique leur permettant de satisfaire leur équilibre interne en eau.
2. L'effet indirect influe sur la végétation qui constitue la quasi totalité de l'alimentation des Acridiens. Selon que les plantes sont turgescentes ou non, les criquets équilibrent avec plus ou moins de facilité leur balance hydrique interne (Duranton et *al.*, 1982). Selon les mêmes auteurs, la présence de certains prédateurs et parasites,

ou les déclenchements des épidémies, sont aussi en rapport avec l'ambiance hydrique.

d- Le sol

Le sol, en tant que facteur édaphique, est un élément permanent dans l'environnement de l'acridien. Il joue un rôle sur l'ensemble des états biologiques, comme site de ponte, d'éclosion et de dispersion. Il est aussi le support des plantes dont les larves et les ailés se nourrissent (Duranton et *al.*, 1982 ; Lecoq et *al.*, 2003).

Selon Dajoz (1974), *S. gregaria* recherche pour pondre en général des sols sableux meubles : en absence de ce dernier, des sols allant des argiles aux graviers fins peuvent être acceptés si l'oviscapte de la femelle peut pénétrer. Le facteur limitant est l'humidité du sol car si elle fait défaut, la ponte n'a pas lieu ou bien les oeufs périssent dans une terre trop sèche.

e. le vent

Le vent joue un rôle très important pour la migration des acridiens. Il arrive souvent que les grands acridiens migrants prennent la vitesse du vent. Par ailleurs, quand il est violent, il peut exposer les oeufs qui seront soumis aux différents prédateurs. Ce phénomène est visible dans les régions sahéliennes (Duranton et *al.*, 1982).

f. La végétation

Les acridiens trouvent dans la végétation l'abri, le perchoir et la nourriture. La végétation constitue une sorte d'écran entre l'insecte et les conditions physico-chimiques et son environnement. Trois facteurs de différenciation interviennent dans la perception du tapis végétal: sa composition floristique, sa structure et son état phénologique.

Les conditions d'environnement propres à chaque groupement végétal exercent un rôle dans la distribution des acridiens. Chaque espèce de criquet manifeste un choix dans ses biotopes pour satisfaire ses besoins relationnels, nutritionnels et reproducteurs (Duranton et *al.*, 1982).

I-1-7-2- Facteurs biotiques ou ennemis naturels

a- Prédateurs

· Prédateurs des oothèques

Selon Chopard (1943), l'espèce *Stomorhina lunata* (diptère, calliphoridae) est connue par ses dégâts sur les oothèques des populations grégaires du criquet pèlerin. Parmi les coléoptères Méliodes, les genres *Mylabris* et *Zonabris* possèdent des spécificités vis-à-vis de telle ou de telle espèce de caelifères.

· Prédateurs des larves et des ailés

Les acridiens, en particulier les locustes grégaires, constituent une source attrayante de nourriture pour les prédateurs non spécialisés, vertébrés et invertébrés. À la longue, ces prédateurs peuvent devenir des causes importantes de mortalité et même éliminer des bandes de jeunes larves (Greathead et *al.*, 1994).

Les oiseaux représentent le plus d'exemples d'espèces prédatrices de criquets (Doumandji et Doumandji-Mitiche, 1994). D'après Duranton et *al.* (1982), parmi les oiseaux prédateurs des acridiens on peut citer : la Cigogne, le Milan, le Faucon et l'Aigle. Parmi les insectes prédateurs on peut mentionner les hyménoptères tel que le *Sphex* et les Asilides.

b- Parasites :

· Parasites des oothèques

Parmi les parasitoïdes d'œufs d'acridiens, les hyménoptères scélionides sont les seuls connus, parasitoïdes vrais d'embryons de locustes et de sauteriaux. Le genre *Scelio* (*Hymenoptera Scelionidae*) comprend de nombreuses espèces. Toutes sont des parasitoïdes d'œufs d'acridiens. Vingt-trois espèces d'Afrique ont été décrites et huit ont pu être élevées avec succès.

· Parasites des larves et des adultes

Les larves et les imagos des acridiens sont parasités par des mouches des familles suivantes : *Nemestrinidae*, *Sarcophagidae* et *Tachinidae*. Ils sont curieusement épargnés par les hyménoptères parasitoïdes. En Asie comme en Amérique du Nord, ils sont aussi parasités par des *Muscidae* (*Acridomyia spp.*), ce qui n'est pas le cas dans les régions tropicales.

Tout comme ces véritables parasitoïdes, d'autres diptères peuvent se rencontrer sur des criquets morts ou qui viennent de mourir. Ces nécrophages sont des *Sarcophagidae* (*Sarcophaga* ou *Wohlfartia*) ou des *Phoridae* (Greathead et al., 1994).

Duranton et al. (1982), affirme que ce taux de parasitisme par les larves de diptères *Blaesoxipha* peut atteindre 20 à 30% des effectifs des bandes larvaires de *S.gregaria*. Les nématodes sont représentés surtout par les *Mermis* à un certain stade de leur développement, ils bondonnent leur hôte et gagnent la terre humide. Ces parasites exercent une action frénatrice contre l'invasion de la sauterelle pèlerin (Pasquier, 1952).

c- Maladie

· Champignons

Selon Veen (1968) cité par Doumandji et Doumandji-Mitiche (1994), les champignons qui peuvent infecter les acridiens sont : *Metarhizium anisopliae*, *Metarhizium flavoviride* et *Beauveria bassiana*.

· Bactéries

Les infections bactériennes jouent un rôle très important dans la régulation des populations acridiennes, parmi lesquelles nous citons : *Bacillus acridiorum*, *Bacillus thuringiensis*, *Coccobacillus acridiorum*, *Micrococcus*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Flavobacterium devorans* (Julio et al., 1970 cité par Keith et Kevan, 1992 ; Kleespies et al., 2000). Ces bactéries entomopathogènes appartiennent surtout à trois grandes familles qui sont les *Enterobacteriaceae* et *Pseudomonaceae* (Greathead et al., 1994).

· Virus

La plupart des virus isolés à partir de criquets malades appartiennent à la famille des *Poxviridae*, plus particulièrement des virus entomopox (*Entomopoxvirinae*). D'autres familles de virus ont été trouvées chez les orthoptères. Elles appartiennent aux *Baculoviridae*, aux *Iridoviridae*, aux *Parvoviridae* et aux *Picornaviridae* (Greathead et al., 1994).

· Les protozoaires

Selon Kleespies et al (2000), les protozoaires pathogènes de locustes les plus importants sont les amibes, les grégarines (eugrégarines et néogrégarines) et les microsporidies.

I-1-8- Lutte antiacridienne

L'homme, face aux intermittentes attaques et invasions des acridiens, a eu l'ingéniosité à recourir à toute une batterie de moyens de luttés: préventive, écologique, physique, chimique et biologique. La lutte antiacridienne s'effectue essentiellement à l'aide de pesticides chimiques. Cependant depuis quelques années, la tendance vise à développer beaucoup plus les méthodes biologiques pour des raisons essentiellement environnementales (Vincent et Clarke, 1985 ; Prior *et al.*, 1992).

I-1-8-1- Lutte préventive

La prévention est la seule stratégie de lutte contre le criquet pèlerin économiquement et écologiquement acceptable. De ce fait tous les moyens doivent être mis en oeuvre pour empêcher que les effectifs du criquet pèlerin n'atteignent la masse critique de transiens au-delà de laquelle le processus de grégarisation généralisée devient irréversible (Popov *et al.*, 1990).

De même Duranton et Lecoq (1990) mentionnent que l'objectif est de prévenir tout départ d'invasion car une fois déclenchée, elle est très difficile à arrêter, même avec des opérations intensives de lutte curative, et qu'alors les risques secondaires de traitement acridicide pour l'environnement sont considérables compte tenu des surfaces concernées.

La stratégie de lutte préventive contre le criquet pèlerin se résume en trois étapes

- La surveillance des conditions écologiques dans les aires potentielles de reproduction et de grégarisation;
- L'organisation des prospections, aériennes et terrestres, dans les aires devenues potentiellement favorables à la suite des précipitations abondantes;
- La lutte contre toutes les populations de criquet pèlerin dépassant un certain seuil, principalement dans les biotopes réputés constituer des foyers grégarigènes (Duranton et Lecoq, 1990).

I-1-8-2- Lutte écologique

La lutte écologique consiste à modifier l'environnement au désavantage de l'acridien. Parmi les méthodes utilisées, Duranton *et al.* (1987) citent:

- L'inondation temporaire de certains sites de reproduction;
- Le labourage des sols indurés;
- La reforestation des clairières;
- Les semis des plantes répulsives;
- La suppression des jachères.

L'inconvénient de cette forme de lutte réside dans la difficulté de son application à grande échelle.

I-1-8-3- Lutte physique

Les procédés de lutte physique contre les acridiens sont plus anciens et visent à éliminer physiquement les oeufs, les larves ou les ailés (Vayssière, 1929). Selon Launois-Luong *et al.* (1988), la lutte physique comprend deux méthodes:

- la lutte mécanique qui vise à la destruction des oeufs par labourage, des larves et ailés par battage, ramassage et écrasement à l'aube quand les insectes sont encore peu actifs
- La lutte thermique qui s'effectue à trois niveaux:
 - Rabattre les larves vers des cordons d'herbes sèches enflammées;
 - Utiliser des lances-flammes sur des terrains pierreux, dépourvus de végétation;
 - Brûler à l'aube, avant la reprise d'activité de criquets, les touffes d'herbes.

I-1-8-4- Lutte chimique

La lutte chimique consiste à atteindre les criquets ravageurs directement ou indirectement (par empoisonnement de la végétation), au moyen de substances actives, naturelles ou de synthèse, pour les tuer ou les faire fuir (Duranton *et al.*, 1987).

La lutte chimique est actuellement la seule arme disponible pour traiter les fléaux acridiens de grande ampleur à l'échelon local, national et international. Néanmoins elle doit être employée à bon escient et les traitements doivent être réalisés dans le respect des règles de bon usage (Launois-Luong *et al.*, 1988).

Pour tuer les criquets, il faudrait utiliser les produits les plus spécifiques des organismes-cibles, tout en choisissant ceux qui sont aussi peu dangereux que possible pour l'homme et le milieu. Malheureusement, les insecticides ne sont jamais strictement acridicides (qui ne tuent que les acridiens) et l'on prend toujours le risque de détruire les pollinisateurs (auxiliaires indispensables à la fécondation de nombreuses plantes), les coprophages (reminéralisation du sol par enfouissement et transformation de la matière organique contenue dans les excréments du bétail) et bien d'autres insectes dont le rôle est si essentiel aux agrosystèmes.

Dans notre pays les pesticides utilisés dans la lutte antiacridienne appartiennent principalement à trois classes chimiques : composés organiques, carbamates et pyréthrinoides (Anonyme, 1994 cité par Khider, 1999).

Deux formulations sont utilisées dans la lutte antiacridienne, la formulation ULV (ultra bas volume) et la formulation EC (conventionnel emulsionnable). La formulation ULV est utilisée en dehors des zones cultivées, dans les oueds et les hamadas en plein désert, vue sa grande phytotoxicité.

Tandis que dans les zones cultivées il est préconisé d'utiliser la formulation EC, qui nécessite son mélange avec l'eau ce qui est disponible dans les exploitations agricoles, contrairement dans les zones désertiques en plus de sa faible phytotoxicité.

I-1-8-5- Lutte biologique

L'idée d'utiliser les ennemis naturels pour lutter contre les criquets est très ancienne car, en conditions naturelles, les acridiens sont la proie de quantités de prédateurs et hôte de parasites et de maladies. Bien que l'action des agents biologiques soit discrète et ponctuelle comparée aux effets des facteurs climatiques, il arrive que localement, les acridiens puissent être totalement éliminés par leurs ennemis naturels (Latchininsky et Launois-Luong, 1997).

La lutte biologique consiste généralement à l'utilisation contrôlée d'ennemis naturels contre un organisme pour le détruire entièrement ou au moins limiter son expansion démographique (Duranton et al., 1987).

La lutte biologique est l'utilisation d'organismes vivants ou de leurs produits pour empêcher ou réduire les pertes ou dommages causés par les organismes nuisibles. L'avantage essentiel de ces techniques est qu'elles sont habituellement spécifiques aux espèces concernées et inoffensives.

L'application de cette tactique aux acridiens qui sont endémiques dans des zones étendues présentent des difficultés évidentes en raison de leur distribution éparse et de leur grande mobilité sur de longues distances et dans la mesure où leurs ennemis ne se déplacent pas avec la même aisance d'une région à l'autre (Rowley, 1994). Cependant des essais sur le terrain par pulvérisation des spores de champignon ont été effectués dans le but de renforcer la lutte biologique contre les criquets (Lomer, 1992; Swaringen, 1993).

Les agents pathogènes semblent offrir les meilleures perspectives en lutte biologique en particulier ceux qui peuvent être multipliés et formulés pour être épanchés comme bio pesticides. Les agents entomopathogènes sont des organismes qui provoquent des maladies aux insectes.

Les groupes les plus importants sont les virus, les bactéries, les protozoaires et les champignons. Presque tous les champignons infectent leur hôte en pénétrant par la cuticule grâce à divers enzymes libérés pendant la germination des spores. L'hôte est tué par asphyxie ou par inanition.

L'insecte se déshydrate et se momifie. Les espèces qui infectent les criquets font partie des sous divisions : Zygomycotina; Ascomycotina et Deuteromycotina. Cependant, ce sont des espèces appartenant aux hyphomycètes qui peuvent être retenus comme agents entomopathogènes efficaces. On peut citer les genres : *Beauveria* ; *Metarhizium* et *Paecilomyces* (Greathed et al., 1994).

I-2- Généralités sur l'entomopathogène *Beauveria bassiana*

I-2-1- Historique

Beauveria bassiana est un microchampignon pathogène pour de nombreux insectes (Prior et al., 1992), sa pathogénicité a été démontrée pour la première fois par Agostino Bassi en 1835, Montagne est le premier qui a signalé *bassiana* sous le nom de *Stachilidium bassianum* en 1849.

La première contribution taxinomique concernant ce champignon a été réalisée par Balsamo-Crivelli (1835a et 1835b) qui a nommé le champignon *Botrytis bassiana* Bals.-Criv en reconnaissance à Agostino Bassi qui a montré, en 1835, que ce champignon était l'agent causal d'une maladie des laves du ver à soie.

Cette dernière a été désignée sous les noms de mal del segno, calcinaccio, cannellino par les italiens et de "muscardine blanche" par les français a provoqué au 18ème et au

19^{ème} siècle une épizootie qui a causé des pertes économiques dans les élevages de vers à soie des pays du sud de l'Europe.

Le genre *Beauveria* n'a été formellement créé que vers le 20^{ème} siècle par Vuillemin (1912) qui a désigné *Botrytis bassiana* Bals.-Criv. comme étant un spécimen type de l'espèce et qu'il a transféré dans le genre *Beauveria*.

I-2-2- Classification

D'après Taylor (1995) *Beauveria bassiana* est classée comme suit :

- **Règne** : *Fungi*.
- **Phylum** : *Ascomycota*.
- **Classe** : Sordariomycetes.
- **Ordre** : Hypocreales
- **Famille** : Clavicipitaceae.
- **Genre** : *Beauveria*.
- **Espèce** : *B.bassiana* (Bals.-Criv.) (Vuil., 1912).

I-2-3- Morphologie

Les espèces de *Beauveria* produisent des conidies cotonneuses blanches à jaunâtres (Figure n°7). Les conidies ou spores (Figure n°8) sont soutenues par de longs filaments en zigzag qui sont des hyphes transparents et septueux (Figure n°9), avec un diamètre de 2,5 à 25 µm (Weiser, 1972 ; Lipa, 1975 ; Halouane, 1997 ; Barnett et Hunter, 1998).

Les conidies sont produites sur des épis courts, donnant aux cellules conidiogènes un aspect épineux (Weiser, 1972 ; Lipa, 1975).

En présence d'air le champignon produit des conidiospores de forme sphérique (1 à 4 µm de diamètre) ou ovales (1,55 à 5,5 x 1 à 3 µm d'envergure) mais en milieu anaérobie, il produit des blastospores de forme ovale (2 à 3 µm de diamètre et 7 µm de longueur) (Figure n°10).

Les blastospores sont aussi infectieux que les conidies (Weiser, 1972 ; Lipa, 1975).



Figure n°7 - Aspect macroscopique de *B.bassiana*.

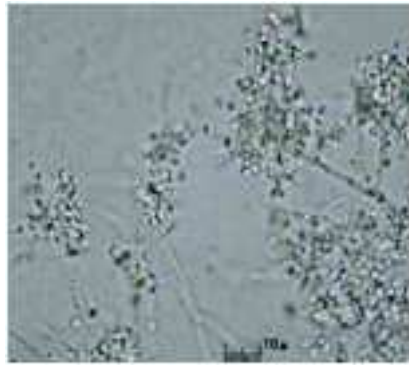


Figure n°8 - Spores de B.bassiana.

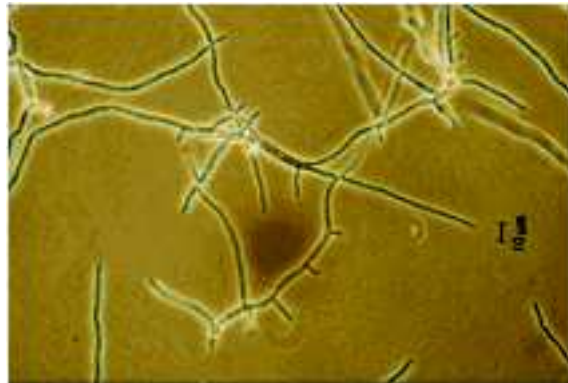


Figure n°9 - Hyphes de B.bassiana (x 400).

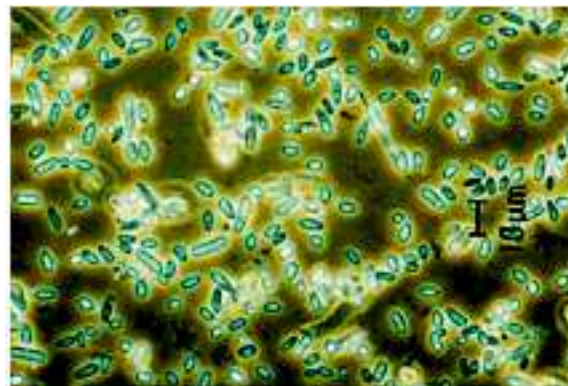


Figure n°10 - Blastospores de B.bassiana (x400).

I-2-4- Physiologie

I-2-4-1- Les voies de pénétration

La voie de pénétration la plus connue est représentée par le tégument. Selon Paillot (1933), cette espèce infecte le système respiratoire et digestif.

I-2-4-2- Mode d'action

Rajncpel-Massi (1990) affirme que les spores de *B. bassiana* germent sur les organes d'insecte. Les hyphes mycéliens pénètrent ensuite dans l'organe. Après digestion

enzymatique et une fois à l'intérieur de l'hôte, ils secrètent des toxines (la beauvericine et la bassiomolide). Ainsi, le corps de l'insecte se déshydrate, la viscosité du sang augmente et l'insecte meurt (Bidochka *et al.*, 1997).

I-2-4-3- Effet des différents facteurs sur l'efficacité de *B. bassiana*

- Les facteurs extrinsèques

De nombreuses contraintes écologiques, notamment la température, les radiations ultra violettes (UV) et l'humidité peuvent nuire à l'efficacité de l'organisme pathogène sur terrain. Lors de ces dernières années, de nombreuses études se sont réalisées pour surmonter ces problèmes (Jaronski et Goettel, 1997).

- Les facteurs intrinsèques

La virulence et la spécificité de l'hôte sont deux facteurs essentiels dans le choix d'un agent de lutte microbiologique. Il faut signaler aussi que la capacité de survie des spores a également une influence (Jaronski et Goettel, 1997).

I-2-5- Production en masse et formulation et application des entomopathogènes

L'utilisation réussie des champignons entomopathogènes dépend en fin de compte de l'emploi de l'unité infectieuse dans une préparation optimale au moment propice. Pour cela, il faut mettre au point une méthode de production de masse, de formulation et d'application en plein champ (Goettel et Roberts, 1991).

- Production en masse

Il existe plusieurs méthodes qui permettent la production en masse des champignons. Parmi lesquelles, on peut citer la culture *in vivo* et la culture *in vitro*. La culture *in vitro* est la plus utilisée, elle s'effectue en surface sur gélose ou en culture immergée.

La fermentation liquide est la méthode ordinairement utilisée dans la production des pathogènes. Les conidies des champignons hyphomycètes peuvent aussi être produites à la surface des milieux, sur des substrats solides (Jankins et Goettel, 1997).

- Formulation

Selon Auld (1991), la formulation vise deux objectifs principaux, fournir une matière active qui soit économique, facile à utiliser et d'une longue durée de conservation et, si possible augmenter l'efficacité de la matière active.

Les formulations huileuses à base d'argile ont donné aux spores de *B. bassiana* une efficacité satisfaisante sur les acridiens traités (Prior *et al.*, 1992; Swearingen, 1993).

- Application

Vu leurs petites tailles, les spores peuvent être normalement appliquées en suspension avec le matériel classique. De toute évidence, le matériel devra être exempt de résidus de fongicides et de toute autre substance nocive. On peut néanmoins ajouter de faibles concentrations d'insecticides ou d'herbicides classiques afin d'accroître l'efficacité du champignon.

I-2-6- Utilisation de *Beauveria bassiana* en lutte biologique

Le large spectre d'action et la virulence de *B.bassiana* ont permis de l'utiliser avec succès en milieu agricole en Ex-URSS et en Europe de l'Est (Lipa, 1985).

Les premiers résultats positifs dans la répression des ravageurs avec *B.bassiana* en Amérique ont été obtenus aux USA (Magalhaes et al., 1981).

La pathogénicité de l'inoculum sporal et la spécificité de l'hôte sont deux paramètres importants dans le choix de l'isolat fongique. Le microchampignon entomopathogène *B.bassiana* est un agent de lutte très intéressant du fait qu'il peut infecter l'hôte par ingestion ou par simple contact contrairement aux autres agents de lutte microbiologique.

Ce mode d'action particulier rend tous les stades (œuf, larve, adulte) sensibles. *B.bassiana* peut être produite en masse à moindre coût et peut être appliquée avec les méthodes conventionnelles (Barson et al., 1994 ; Greathead et al., 1994 ; Regnault, 2002).

CHAPITRE II - MATERIEL ET METHODES

II-1- Matériel biologique

II-1-1- Souches microbiennes

Les différents essais biologiques ont été menés principalement sur le champignon *Beauveria bassiana* souche isolée à partir d'individus morts de criquet pèlerin en décembre 1996 (Doumandji-Mitiche et al., 1997). Cette souche est nommée isolat du sud (Figure n°11a) par opposition à celle isolée d'abeille au marais de Reghaia en 2003 appelée isolat du nord (Figure n°11b).

D'autres microorganismes *Pseudomonas aeruginosa* ; *Escherichia coli* ; *Klebsiella pneumoniae* et *Candida albicans* ont également fait l'objet de notre étude dans la partie production d'agents antimicrobiens. Ces derniers proviennent de l'Institut Pasteur d'Algérie.

Afin de maintenir la viabilité de nos souches, elles ont été ensemencées régulièrement sur milieux de culture adéquats en boîtes de Pétri et en tubes inclinés.

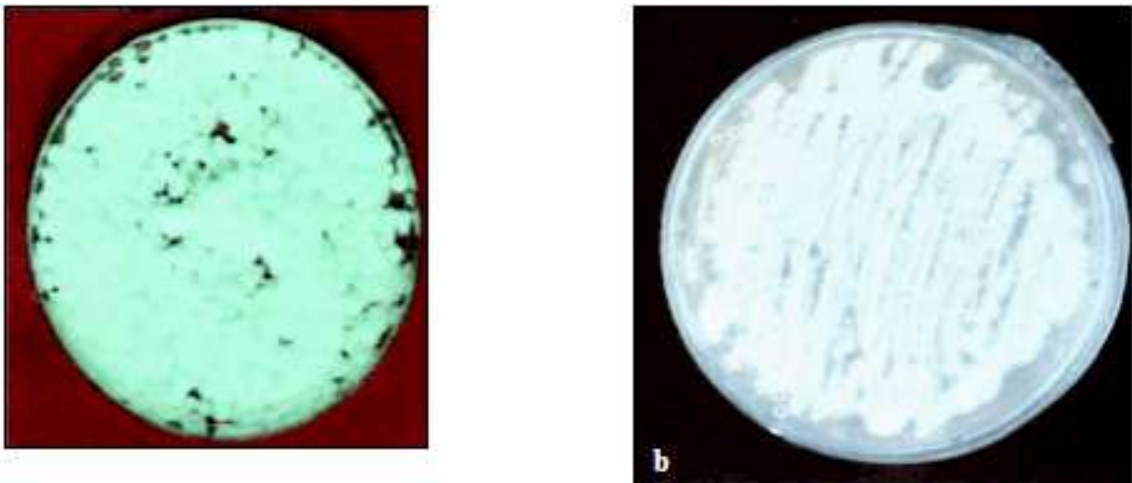


Figure n°11 – Isolat du sud (a) et du nord (b) de *Beauveria bassiana*.

II-1-2- Insectes

L'étude de l'activité biologique de *B. bassiana* est conduite sur les deux espèces acridiennes *Schistocerca gregaria* et *Locusta migratoria*. Les individus utilisés proviennent de la région d'Ain Zegumir, commune de Zaouit Kounta située à la wilaya d'Adrar.

· Elevage des insectes

L'élevage est reproduit au laboratoire du département de zoologie agricole et forestière de l'Institut National d'Agronomie d'El Harrach (INA), dans des cages parallépipédiques fabriquées en bois et recouvertes par un grillage métallique en mailles très fines. De volume

de 56cm×43cm×24cm, les cages sont munies de portes coulissantes en verre pour faciliter le nettoyage et le renouvellement de la nourriture.

Le fond des cages est doté de pondoires contenant du sable humidifié .L'élevage est conduit sous une température moyenne de $30\pm 2^{\circ}\text{C}$ et une humidité relative de 75%, l'aliment est un mélange du chou ; du blé et du son de blé (Figure n°12).



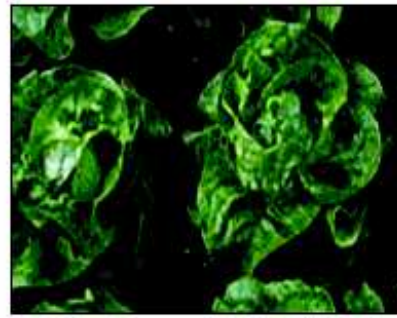
Figure n°12 - Cage d'élevage des acridiens.

II-1-3- Matériel végétal

Pour l'étude de la persistance des spores sur le feuillage végétal nous avons choisi deux cultivars appartenant à la famille des graminées (poacées) : le blé *Triticum sp.* et l'orge : *Hordeum sp.*; une composée la laitue : *Lactuca sativa*, une solanacée la tomate *Lycopersicum esculuntum* et une fabacée *Vicia fabae* (Figure n°13). Ces espèces sont largement cultivées et consommées au sud de l'Algérie. Elles constituent des cibles principales du criquet ravageur dans son biotope.



Tomate



Laitue



Fève



Blé



Orge

Figure n°13 - Plantes utilisées dans l'étude de la persistance des spores de B. bassiana.

II-1- 4- Animaux

Pour l'évaluation de la toxicité et de l'activité inflammatoire du *B. bassiana* envers les mammifères nous avons utilisé respectivement des rats albinos de souche Wistar (Figure n°14) âgés de 8 semaines d'un poids moyen de 200 ± 20 g et des souris cobayes d'un poids moyen de 23 ± 13 g.



Figure n°14 – Elevage des souris.

· Condition d'élevage

Les animaux sont répartis dans des cages en polypropylène de volume de 30cm ×20cm×13cm, placées dans un local à ambiance contrôlée à savoir : Une température de $24 \pm 4^{\circ}\text{C}$, un éclairage de 10heures par jour et une humidité de 50%. Les animaux sont nourris par une alimentation de granulés fournie par L'ONAB d'Alger d'une valeur énergétique de 310k cal/100g, ils reçoivent de l'eau ad libitum.

II-2- Matériel non biologique

Le matériel non biologique comporte des équipements, de la verrerie, des produits chimiques et des réactifs (tableau n°1 en annexe I).

II-3- Méthodes

II-3-1- Aspect application de *B. bassiana* sur *S. gregaria* et *L. migratoria*

II-3-1-1- Effet sur la mortalité

II-3-1-1-1- Doses utilisées

Pour l'étude de l'activité biologique de *B.bassiana* envers les imagos de *S.gregaria* et de *L. migratoria*, nous avons retenu trois doses : D1= $1,64 \times 10^7$ spores/ml; D2= $1,64 \times 10^6$ spores/ml et D3= $1,64 \times 10^5$ spores/ml.

Le choix des doses est en fonction des résultats des travaux sur l'efficacité de l'hyphomycète *M.anisopliae* sur les différents stades larvaires et les imagos de *S.gregaria* (Halouane, 1997) et les travaux de Delgado et *al.*, 1997 sur l'évaluation de l'efficacité de *B.bassiana* vis à vis des locustes.

II-3-1-1-2- Traitement des criquets

Pour administrer la solution fongique contenant *B.bassiana*, nous avons choisi le mode contact, recommandé par divers chercheurs et constitue une voie d'entrée préférentielle et habituelle des champignons entomopathogènes (Lepesme, 1938).

Pour cet essai biologique nous avons utilisé 16 imagos âgés de 4 jours après la mue imaginale d'un poids moyen de $1,96 \pm 0,33\text{g}$ pour *Schistocerca gregaria* et $1,46 \pm 0,1$ pour *Locusta migratoria* pour chacune des doses choisies. Le témoin compte 16 individus ayant reçue de l'eau distillée stérilisée.

Les individus sont placés ensuite dans des boites parallélépipédiques de 80cm^3 de volume pour recevoir la solution entomopathogène par pulvérisation directe sur le corps. Après une durée de contact de quatre minutes les individus sont remis dans leurs cages respectives en présence d'aliments frais et varié ou règne une température de 26°C et une humidité relative de 60% .

La mortalité; l'hygiène; la symptomatologie; le comportement et le renouvellement de la nourriture sont vérifiés quotidiennement.

II-3-1-2- Effet sur la biochimie de la cuticule

II-3-1-2-1- Traitement

Pour cette étude nous avons utilisés des individus de *S.gregaria*. Des larves de 5^{ème} stade (L5) âgées de 8 jours et des adultes âgés de 10 jours qui proviennent de l'élevage décrit précédemment. A l'aide d'une micro seringue, une solution de $2\mu\text{l}$ de *B.bassiana* est déposée au dessus du pronotum de tous les individus des criquets expérimentés. Les témoins ont reçu de l'eau distillée stérilisée.

II-3-1-2-2- Détermination de la chitine- protéine cuticulaire

Les individus distribués en deux lots, témoins et traités sont sacrifiés au 3^{ème} jour après le traitement. L'abdomen est sectionné du reste du corps, ainsi que son extrémité postérieure. A l'aide de pinces fines, on enlève tout ce qui est viscères, muscles et tissus adipeux. Les sternites abdominaux sont ensuite déposés entre deux feuilles de papier filtre pour enlever le reste des tissus pouvant adhérer à la cuticule.

La technique selon laquelle on s'est basé pour déterminer la chitine- protéine est celle de Bordereau et Anderson (1978) citée par Abbasi et Hamza (1995). Elle consiste à prélever la paroi abdominale, puis la mettre dans un mélange éther- chloroforme (Volume/Volume : 1/1) à température ambiante pendant 24h, afin d'éliminer toutes traces lipidiques.

Ensuite, après rinçage à l'alcool 96° , elle est séchée dans l'étuve à 60°C pendant une heure jusqu'à l'obtention d'un poids sec P1, constant. Après le traitement par le NaOH (2N) à 100°C ., pendant une durée de 2 heures, qui provoque une hydrolyse des protéines, on obtient un résidu correspondant à la chitine. Celui-ci est récupéré et lavé à l'éthanol absolu, puis séché une 2^{ème} fois à 60°C jusqu'à l'obtention d'un second poids sec P2, constant. Les pesés sont réalisées grâce à une balance de précision à 0,1mg.

- P1 - P2 : correspond à la teneur en protéines totales cuticulaires.
- P1 : Poids sec de la cuticule (mg) sans les lipides.
- P2 : Quantité de la chitine (mg).

II-3-1-3- Effet sur l'histologie de la cuticule

La technique histologique est réalisée selon la méthode de Martoja et Martoja- Pierson (1967) et Gabe (1968).

Notre étude est effectuée sur des L5 de *S. gregaria* appartenant à deux lots, un lot témoin (non traité) et un lot traité avec la DL50 juste après la mue.

L'abdomen des individus traités et témoins est prélevé par le même procédé que pour la détermination de la chitine- protéine. Les cuticules récoltées sont mises dans le liquide fixateur (le Bouin).

- La fixation

Elle représente le temps essentiel de la technique histologique et a pour but l'immobilisation de la structure des échantillons étudiés en respectant dans la mesure du possible leur morphologie. La fixation se fait par immersion des pièces dans du liquide de Bouin alcoolique. Le délai de fixation est de 8 jours. Aucun lavage particulier n'est obligatoire après la fixation. Les pièces passent directement du fixateur dans l'alcool de déshydratation.

- La déshydratation des pièces

Pour l'élimination totale de l'eau, des passages des pièces dans des bains d'alcool successive à 70°, 95° puis 100° sont nécessaires.

- Deux bains d'alcool 70° de 30 mn chacun pour mettre fin à l'action du liquide fixateur.
- Deux bains d'alcool 95° de 30 mn chacun.
- Deux bains d'alcool 100° de 30 mn chacun.
- L'inclusion et mise en blocs des pièces

L'imprégnation complète des pièces par un solvant à la paraffine permet d'éliminer complètement les traces d'alcool. Comme l'alcool n'est pas miscible à la paraffine (c'est à dire il ne forme pas un mélange homogène avec la paraffine), il risquerait de ne pas pénétrer dans les parties de la pièce contenant encore des traces d'alcool. Le solvant le plus couramment utilisé est le butanol. Les pièces passent par 3 bains de butanol de 24 h.

L'imprégnation des pièces se fait à chaud dans un bain mélange homogène de butanol-paraffine en fusion en étuve réglée à 60°C. Les pièces provenant du dernier bain de solvant sont mises directement dans le bain-mélange pendant 2 h. Les pièces passent ensuite dans un 1er bain de paraffine pure pendant 3 jours, puis un 2ème bain de même durée.

L'inclusion ou la mise en blocs de l'ensemble pièce et paraffine, consiste à sortir la pièce du dernier bain de paraffine pure et à la transporter dans un moule (barre de Leuckart) contenant la paraffine fondue pure. La pièce est orientée selon les coupes qu'on veut obtenir. Les blocs obtenus par inclusion à la paraffine permettent une conservation illimitée des échantillons à la température du laboratoire.

- Exécution et collage des coupes

Les coupes sont confectionnées grâce à un appareil ; le microtome (Bright 5040).

L'épaisseur des coupes est de 7µm. Les coupes réalisées sont déposées par ordre chronologique sur des lames bien propres. Leur collage se fait avec de l'eau gélatinée sur une platine chauffante à une température inférieure de celle de fusion de la paraffine. Lorsque les rubans sont bien étalés, l'eau en surplus est éliminée à l'aide d'un papier filtre.

Le séchage des coupes s'effectue dans une étuve à 40°C. pendant au moins une nuit avant d'être colorées.

- La coloration des coupes

Selon le but recherché de la coloration, plusieurs techniques peuvent être utilisées. Dans notre cas, il s'agit d'une coloration topographique, mettant en évidence la structure de la cuticule. Plusieurs manipulations intermédiaires sont à effectuer pour passer de la coupe sèche collée sur la lame à l'observation au microscope.

- Le déparaffinage et la réhydratation

L'inclusion à la paraffine est un moyen permettant d'obtenir à l'aide du microtome des coupes très fines et homogènes. Afin de ne colorer que le matériel biologique à observer, il faut débarrasser les coupes de leur inclusion. Le déparaffinage ainsi que les différents bains de colorants qui vont suivre sont réalisés dans les batteries de tube de Borrel, mais avant, il faut chauffer les lames sur platine chauffante 1 à 2mn afin de faire fondre la paraffine.

Le déparaffinage et la réhydratation est réalisé grâce au passage des pièces par 2 bains de 15mn chacun de toluène, 2 bains d'alcool absolu de 30mn, deux bains d'alcool à 95° de 30mn, et deux bains d'alcool à 70° de 30mn, ensuite deux bains d'eau distillée de 5mn chacun pour la réhydratation des pièces.

- La coloration proprement dite

Plusieurs techniques de coloration sont utilisées selon le but recherché. Dans notre cas nous avons choisi, la coloration topographique polychrome à l'azan de Heidenhain.

Elle permet une coloration différentielle des différentes couches cuticulaires. Le mode opératoire suivi pour la coloration des coupes est selon Martoja et Martoja- Pierson (1967), elle est comme suit :

- L'acide picrique est éliminé par un séjour de 30mn des lames dans l'alcool aniliné puis elles sont lavées à l'eau distillée.
- Colorer pendant 1 heure à 60°C. dans la solution d'azocarmin préalablement portée à 60°C.
- Sans laisser refroidir, laver à l'eau distillée.
- Différencier par l'alcool aniliné pendant 1mn à 30mn.
- Faire séjourner les lames 30s. à 1mn. dans l'alcool acétique.
- Laver à l'eau distillée.
- Traiter par l'acide phosphotungstique pendant ¼ heure à 1 heure.
- Laver à l'eau distillée.
- Colorer par le bleu de Heidenhain pendant ½ heure à 2 heures
- Le montage
 - Déshydratation

Les coupes doivent être totalement déshydratées puis placées dans un solvant du milieu de montage (toluène).

- Deux bains d'alcool 100° de 3mn, chacun.
- Deux bains de toluène de 3mn, chacun.
- Montage au Baume de Canada

On dépose une goutte de Baume de Canada près des coupes, puis on dépose la lamelle sans faire de bulles. Les lames encore très fragiles à ce stade sont placées dans l'étuve à 37°C. durant au moins 48h. Les lames peuvent être conservées indéfiniment après séchage.

· Observation

Les observations des coupes, ainsi que les mesures des différentes couches cuticulaires sont réalisées à l'aide du microscope photonique munis d'un objectif micrométrique.

II-3-1-4- Effet sur l'hémogramme

Cette étude a été menée sur les individus de *L.migratoria*. Le frottis a été fait selon la méthode de Guzo et Stolz (1987). Le frottis sanguin est réalisé comme suit :

4µl d'hémolymphe fraîche sont prélevés des larves L5 et des adultes témoins et traités au 3^{ème} jour de traitement. Au préalable, les individus sont placés à une basse température (congélateur) pendant 3 à 5 minutes, dans le but d'éviter la coagulation du sang (Brehelin et Hoggman, 1972 ; Mhenni et Aiouaz, 1981).

Le volume d'hémolymphe prélevé est étalé en couche mince sur lame qu'on sèche à l'air libre. On dépose ensuite 20 gouttes de May-Grunwald non dilué (bleu de méthylène-éosine) pendant 3 minutes. Puis, on rajoute quelques gouttes d'eau distillée. Après 1 minute, la lame est rincée pour enlever l'excès du colorant. On rajoute 40 gouttes du Giemsa, après 10mn on rince la lame à l'eau courante, une fois la lame séchée, on fait le montage et on passe à l'observation sous microscope optique.

II-3-2- Aspect bioécologique de *B. bassiana*

A travers cet aspect nous avons essayé de réaliser dans un premier temps une étude comparée de l'influence de plusieurs milieux de culture usuels (synthétique et semi synthétique) avec les deux milieux naturels (lactosérum et Moût d'orge) sur la croissance mycélienne de *B. bassiana*. Et dans un second temps étudier l'influence des facteurs abiotiques sur le développement (croissance et sporulation) de *B.bassiana* .

Les facteurs choisis sont assez transposables à ceux régnants les biotopes des locustes. Il s'agit de : l'activité de l'eau (humidité) ; la température et le pH.

De même, sous cet aspect nous nous sommes intéressés à l'étude de l'influence de la végétation (feuillage) sur la persistance et la viabilité des spores de *B.bassiana*.

II-3-2-1- Effet du milieu de culture

Afin de dégager l'influence du substrat cultural sur la multiplication de notre souche, nous avons testé plusieurs milieux de culture de composition différente (tableau n°.2).

Milieux de culture utilisés	Composition	
PDA	Extrait de pomme de terre.....	20g
	Glucose.....	20g
	Eau distillée.....	1000ml
	Agar.....	20g
Gelose extrait de malt	Extrait de malt.....	20g
	Glucose.....	20g
	Agar.....	20g
	Eau distillée.....	1000ml
Mathure	Peptone.....	1,5g
	Extrait de levure.....	0,5g
	Glucose.....	2,5g
	Agar.....	20g
	MgSO ₄ .7H ₂ O.....	1,25g
	KH ₂ PO ₄	1g
	Eau distillée.....	1000ml
Czapeck	Saccharose.....	30g
	Agar.....	15g
	NaNO ₂	2g
	KH ₂ PO ₄	1g
	KCl.....	0,5g
	MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0,5g
	FeSO ₄ .7H ₂ O.....	0,01g
	Eau distillée.....	1000ml
	Fargues	Extrait de levure.....
HPO ₄ .12H ₂ O.....		1,4g
NH ₄ HO ₂		0,7g
KH ₂ PO ₄		0,39g
CaCO ₃		1g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....		0,60g
Eau distillée.....		1000ml
Agar.....		15g
LD (lactosérum déprotéiné)	LD.....	1000ml
Mout d'orge	Agar.....	15g
	Mout d'orge.....	1000ml
LB (lactosérum brut)	LB.....	1000 ml
	Agar.....	15g
OGA	Extrait de levure.....	2g
	Glucose.....	20g
	Agar.....	16g
	Eau distillée.....	1000ml
Sabouraud	Peptone Chapoteaut.....	10g
	Glucose massé.....	20g
	Agar.....	15g
	Eau distillée.....	1000ml
Farine de fève	Extrait de grams de fève.....	200g
	Glucose.....	20g
	Agar.....	18g

Tableau n°2 : Composition des milieux de culture utilisés dans le préférendum cultural de *B.bassiana* (Cartoux et al . 1970 ; Fargues et al. 1997).

Pour chaque milieu, on évalue la croissance radiale du mycélium et la sporulation de *B.bassiana*.

II-3-2-2- Effet de l'activité de l'eau

L'activité de l'eau est un facteur critique déterminant la durée de vie des microorganismes. C'est l'activité de l'eau, et non la teneur en eau, qui détermine la limite minimale d'eau disponible pour la croissance microbienne. Pour étudier l'effet de l'activité de l'eau sur notre champignon nous avons utilisé la méthode au glycérol préconisée par Mugnier et Jung (1985). Pour ce faire, on a procédé comme suit :

Nous avons pesé au préalable différentes quantités de glycérol à l'aide d'une balance de précision à savoir : 60,6g, 55,36g, 46,9g, 35,21g, 20,29g et 6,04g que nous avons additionné aux milieux PDA(3,9g) préalablement préparé dans des erlens Mayer contenant

100ml de l'eau distillée stérilisé. Les quantités de glycérol rajoutées donnent les activités de l'eau suivantes selon les auteurs précités : 0,75, 0,80, 0,85, 0,90, 0,95 et 0,99.

Les six solutions préparées sont mises dans des flacons et autoclaver pendant 20mn à 120°C. Ces derniers sont ensuiteensemencés d'un millilitre d'une solution de notre souche âgée de 15jours puis mis à incuber à 28°C .La concentration en spores est évaluée après 15 jours à l'aide de la cellule hématimétrique de Malassez.

II-3-2-3- Effet de la température

Les Deutéromycètes ou fungi imperfecti sont caractérisés par une structure nettement filamenteuse de leurs organes de fructification. Ils sont mésophiles mais résistants au froid et sont sous la dépendance du complexe température_humidité relative qui régit l'établissement des infections et leur propagation (Zimmermann, 1993).

Selon Fargues (1997) et Vey et *al.* (1996) les quelques espèces de certains genres de champignons entomopathogènes : *Beauveria sp.* ; *Métarhizium sp.* *Paecilomyces sp.* présentent un large éventail thermique. Elles peuvent germer et croître à des hautes et à des basses températures (limite inférieure 4°C et limite supérieure 45°C).

Pour faire ressortir le préferendum thermique de notre souche, nous avons choisi 7 températures d'incubation : 5°C; 10°C; 15°C ; 20°C; 25°C; 30°C, 35°C et 40°C sur lesquelles nous avons évalué la croissance mycélienne et la sporulation .Les températures retenues pour le taux de germination des spores sont 20°C ; 25°C ; 30°C et 35°C. Le cycle biologique a été estiméà 25°C et 35°C et sous une humidité relative de 65% et à l'obscurité.

II-3-2-4- Effet du pH

Relatif au travaux de Zimmerman (1993), pour l'étude de l'influence du pH, nous avons choisi des pH acides : 3 ; 4 et 5, neutres : 6 et 7 et basiques : 8 et 9. Chaque pH est obtenu après addition au milieu de culture (extrait de malt) en surfusion soit du NaOH(1N) pour alcalinisation soit du HCl (1N) pour l'acidification. La lecture se fait au niveau d'un pH mètre. Le milieu ainsi obtenu est réparti en boîte de Pétri à raison de 5 boîtes par pH, puis mises à incuber à 25°C et 65% d'humidité relative et à l'obscurité durant 15 jours.

II-3-2-5- Influence du feuillage sur la persistance des spores

- Traitement des plants

Les traitements de la surface des plants retenus ou couvert végétal ont été réalisés par pulvérisation sur le feuillage jusqu'au ruissellement d'une suspension aqueuse de spores de *B .bassiana* d'une concentration de $4,3 \times 10^8$ spores /ml, dose évaluée par la cellule de Mallassez. Après traitement, les prélèvements des feuilles contaminées sont réalisés chaque 3 jours durant 9 jours (Fargues et *al.*, 1988).

- Contrôle microbiologique

Le contrôle microbiologique consiste à prélever au hasard à la surface des plants de chaque culture, 4 feuilles .Des portions calibrées ont été ensuite découpés à l'aide d'une lame fine. Les surfaces mesurées sont les suivantes : 28cm² pour la tomates ; 45cm² pour la laitue ; 9,9cm² pour la fève ; 0,9cm² pour le blé et 0,98cm² pour l'orge.

Chaque portion est ensuite placée dans un pilulier garni de bille en verre, contenant 10ml d'eau distillée stérile. Après agitation de la solution pendant 10mn à 700 oscillations par minute, on prélève de celle-là 1ml qu'on ensemence sur milieu nutritif OGA à raison de deux boites par culture. Après 5 jours d'incubation à 25°C, le dénombrement des colonies a permis d'estimer le nombre d'unités formant une colonie (UFC) viables par unité de surface foliaire (Fargues et *al.*, 1988).

II-3-2-6- Mesure de la croissance mycélienne

Pour évaluer l'effet des différents paramètres extrinsèques retenus sur la multiplication de *B. bassiana* nous avons fait appel à la mesure de la croissance mycélienne ou radiale. Le milieu de culture est réparti dans des boites de Pétri à raison de 0,5cm d'épaisseur qu'on laisse solidifier.

Des explantats mycéliens calibrés (diamètre de 10cm) sont prélevés à l'aide d'un emporte pièce à partir d'une culture âgée de 15jours et déposés au centre des boites nouvellementensemencées (Figure n°15). Tout le travail est réalisé dans une ambiance stérile à proximité d'un bec Bunsen. Les boites une fois préparées sont incubées à 25°C durant 15jours.

L'estimation de la croissance mycélienne se fait en mesurant l'évolution de diamètre de la pastille ou explantat à l'aide d'un papier millimétré, chaque 72h jusqu'à ce que le mycélium occupe la surface totale de la boite de Pétri (Rappily, 1967).

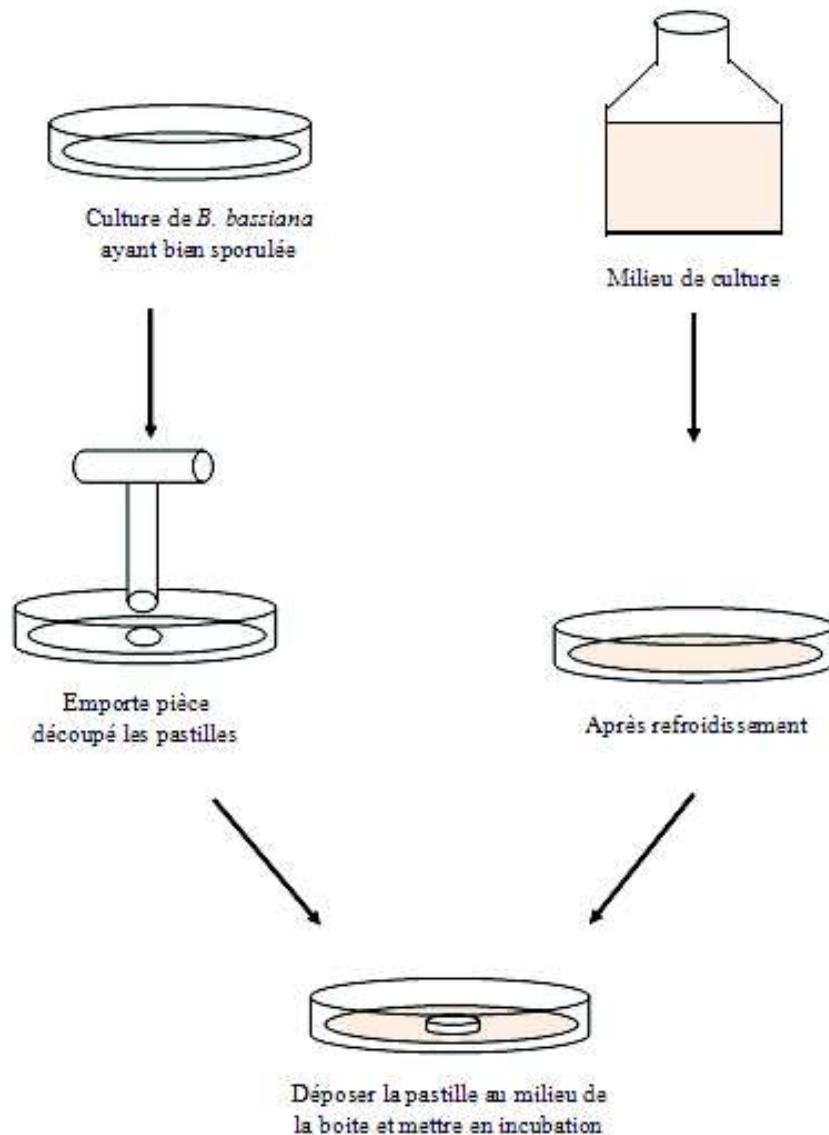


Figure n°15 – Technique de mesure de la croissance mycélienne.

II-3-2-7- Mesure de la sporulation

Pour quantifier le nombre des spores produites, nous avons introduit l'ensemble d'une culture de champignon âgé de 15 jours, obtenue sur milieu malt dans des flacons de 50ml de volume, fermés hermétiquement afin d'éviter les contaminations, puis mises en agitation pendant 10 à 15 minutes pour permettre la libération maximale des spores. Après filtration sur gaze le comptage des spores se fait à la cellule de Mallasez (Vidal et al 1997).

II-3-2-8- Mesure de taux de germination et la durée du cycle biologique

Pour évaluer le taux de germination et identifier les phases de cycle de vie de *B.bassiana* nous nous sommes appuyés sur les travaux de Inglis et al., (1997) et Hassani (2000). Afin de déterminer l'influence de la température sur la germination des spores, trois boîtes de Pétri contenant le milieu sabouraud chlorophénicolé sont utilisées.

Ces boîtes sont inoculées par 100µl d'une solution de *B.bassiana* à une concentration de 1×10^6 conidies, puis incubées sous les températures retenues. Après 8h ; 16h et 24h les spores sont fixés sur lames en verre avec le lactophenol-cottonblue. Sous microscope photonique (grossissement 10×40), nous avons compté 100 spores. Quant au cycle biologique nous avons suivi le développement des spores depuis la germination jusqu'à l'émission de la nouvelle spore. Chaque état biologique a été notée et la durée en été calculée.

II-3-3- Aspect biotechnologique de *B. bassiana*

La lutte biologique qui fait usage des champignons hyphomycètes entomopathogènes est fondée sur l'introduction massive d'une forte quantité de propagule infectieuse capable d'induire un effet brutal et immédiat qui décimera la population des ravageurs.

Pour réaliser ces essais biologiques, une production de masse de l'entomopathogène est nécessaire. La sélection de ce type de germes est liée aux critères suivants:

- la croissance rapide sur des substrats organiques bon marché.
- culture facile et abondante.

Afin de contribuer à réduire l'action polluante sur le milieu terrestre et marin de lactosérum, nous avons essayé de le revaloriser avec le moût d'orge en les utilisant comme milieux de culture ou substrats dans la fermentation discontinue (en batch) de *Beauveria bassiana*.

D'autre part nous avons essayé de mettre en évidence les performances de cette souche fongique non encore exploitée et ses aptitudes à produire des métabolites utiles pour l'industrie au même titre qu'*Aspergillus niger* (Vandamme, 1985). Le principal point développé dans cette étude est la mise en œuvre d'un procédé de fermentation pour produire en masse notre souche et identifier les composés excrétés.

II-3-3-1- Conduite de la fermentation

Nous avons réalisé pour cette étude la fermentation discontinue, dans des fermenteurs de deux litres remplis à 1,2 litres de leurs volumes par les milieux retenus.

Les milieux utilisés sont deux milieux naturels , le lactosérum et le moût d'orge et un milieu témoin le PDA

- Le lactosérum

C'est un lactosérum doux, d'un pH de 5,25, d'acidité égale à 5°D, provenant de l'unité Laiterie Fromagerie de Boudouaou (LFB), qui produit 6000 litres de lactosérum par jour. Il est issu de la fabrication du fromage à pâte pressée non cuite de type E.D.A.M. Sa composition biochimique moyenne est donnée dans le tableau n°3.

Le temps de transport est relativement court (30minutes) pour éviter la modification du lactosérum qui est stocké dans des flacons à +4°C.

Tableau n° 3 : Composition biochimique du lactosérum (Brachemi et Halimi, 2005).

**Recherche fondamentale sur l'entomothogène *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.)Vuill.
(Ascomycota: Hypocreales) :**

Paramètres	Valeurs mesurées
Matière minérale	0,9%
Matière sèche	0,2%
Matière grasse	7,9%
Lactose	6,4%
Pour 100g de matière sèche (mg)	
Phosphore	784,81
Calcium	1268
Azote protéique (x 6,25)	11 %
Azote non protéique	0,24 %

Nous avons procédé à une déprotéinisation du lactosérum vu que le procédé de fermentation n'est pas accéléré par la présence des protéines, elles seraient plutôt gênantes en augmentant le moussage (Apria, 1977).

Le lactosérum déprotéiné, est obtenu comme suit :

- Répartir la quantité de lactosérum dans des flacons.
- Autoclaver à 120°C pendant 20mn.
- Filtrer à l'aide du papier filtre dans des Erlen Meyer.
- Ajuster le pH à 4,6 par addition de l'acide chlorhydrique (HCl) à 1N.
- Autoclaver à 115°C pendant 5mn, après répartition dans des flacons.
- Après l'autoclavage, filtrer une deuxième fois à l'aide du papier filtre.
- Ajuster le pH à 5 par l'addition de soude à 1N puis autoclaver à 120°C pendant 20 mn.
- Le moût d'orge :

Le moût d'orge (brassin) utilisé est issu de la brasserie de Rouiba (TANGO). Le transport est réalisé dans des flacons à 4°C pour éviter toutes modifications. La composition du moût est représentée dans le tableau n° 4.

Tableau n°4 : Composition du moût d'orge (Comm. pers., TANGO, 2007).

Paramètres	Valeur
Calcium (mg/l)	52
Azote α -aminé (mg/l)	176,6
Polyphénols (mg/l)	178
Azote thiobarbiturique (mg/l)	39
Sucres réducteurs (g/l)	130,28
Amidon	+++

+++ : Très riche en amidon.

Le moût d'orge est utilisé tel qu'il a été récupéré de la brasserie sans aucune modification. Une fois autoclavé à 120°C pendant 20 mn, le pH a été ajusté à 5 par l'addition d'acide chlorhydrique 1 N dans la zone stérile du bec Bunsen.

- Le milieu PDA

C'est un milieu à base de pomme de terre et dont la composition a été donnée dans le tableau n°2, le milieu est maintenu liquide pour la réalisation des cultures.

Pour la préparation du milieu PDA, il faut :

- Faire bouillir 250g de pomme de terre dans un litre d'eau distillée puis filtrer le bouillant à l'aide d'un papier filtre dans un Erlen Meyer.
- Ajouter 20g de Glucose au filtrat obtenu.
- Agiter puis ajuster le pH à 5 par l'addition de l'acide chlorhydrique à 1N.
- Enfin, autoclaver à 120°C pendant 20 minutes.

I-3-3-2- Préparation du fermenteur de deux litres

La fermentation est réalisée dans un bio réacteur d'une capacité totale de 2000ml, ce fermenteur est composé de :

- D'une cuve en verre de 2 litres
- D'une platine supérieure
- La température est réglée grâce à une plaque chauffante, balayant une gamme de température de 0-150°C, le pH du milieu est contrôlé par une électrode à pH reliée à un pH mètre.

l'aération du bioréacteur, est assurée par un diffuseur d'air (une pompe à air) (Figure n°16 et n°17 en annexe I).

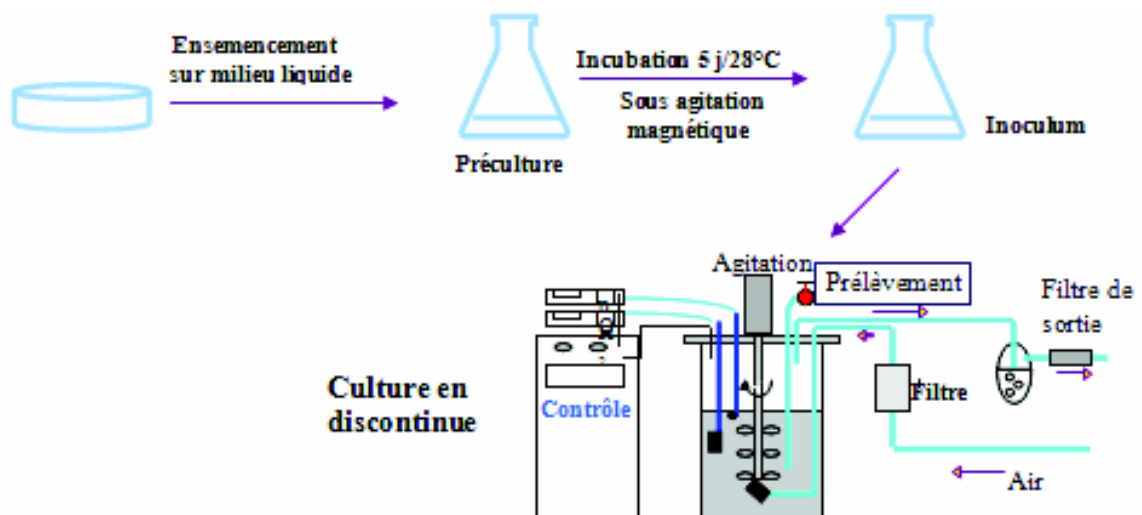


Figure n°16 - Principe et étapes de la fermentation discontinue.

- Préparation de l'inoculum

Les précultures sont conduites dans des erlens Meyer d'une capacité de 500ml, contenant 50 ml des milieux spécifiques liquides LD (lactosérum déprotéiné), MO (moût d'orge) et PDA (Figure n°18 en annexe I).

Ces milieux sont ensemencés aseptiquement avec une anse de platine d'une culture jeune de *Beauveria bassiana*. Les précultures sont incubées à 25°C sous agitation magnétique pendant 9 jours et serviront d'inoculum pour l'essai de la fermentation en discontinue.

- Ensemencement des fermenteurs

Après vérification de la pureté de la préculture par observation au microscope optique, on introduit stérilement 10 ml de la préculture dans 1000 ml de milieu de culture frais, refroidi

et stérilisé à l'autoclave. La concentration de l'inoculum évaluée à la cellule de Malassez est de 10^6 spores/l.

L'inoculation se fait par un simple transfert de volume de la préculture dans un milieu frais.

- Conditions de la fermentation

Les conditions opératoires des cultures discontinues sont mentionnées dans le tableau n°5.

La formation de la mousse est contrôlée par l'ajout synchronisé d'antimousse chimique stérile (polyéthylène glycol).

II-3-3-3- Suivi de la fermentation

II-3-3-3-1- Mesure du pH

- Principe

La différence de potentiel existant entre une électrode et une électrode de référence (calomel – KCl saturé) plongeant dans une même solution est une fonction linéaire du pH de cette solution (Gavrilovic et *al.*, 1996).

- Mode opératoire

On prélève à l'aide d'une pipette une prise d'essai de 10 ml du moût de fermentation et on l'introduit dans un bêcher propre. L'électrode du pH mètre est rincée avec de l'eau distillée puis on le place sous agitation magnétique ; ce dernier est introduit dans l'échantillon, la valeur sera affichée par l'appareil après stabilisation. Le pH est mesuré, tous les trois jours.

II-3-3-3-2- Evaluation de la biomasse

La biomasse est évaluée en centrifugeant 10ml de la culture à 3200trs/min, pendant 15mn. Après un lavage à l'eau distillée, le culot est récupéré dans une capsule en acier inoxydable préalablement tarée, puis séchée à 105°C pendant 24 heures(Vidal et *al.*, 1998). Le surnageant servira au dosage des sucres résiduels, acide citrique, protéines et éthanol.

II-3-3-3-3- Dosage de l'acide citrique

- Principe

Il s'agit d'une méthode colorimétrique qui se base sur la complexion de l'échantillon avec la pyridine et l'anhydride acétique qui donne un complexe jaune qui absorbe à 420 nm.(Marie et Boulet, 1958).

- Mode opératoire

Dans un bain de glace pilée, nous introduisons un tube à essai contenant 1ml du surnageant du moût de fermentation, auquel nous ajoutons 1,3 ml de pyridine et 5,7 ml de l'anhydride acétique.

Après agitation, le tube est transféré dans un bain marie maintenu à 30°C. Le développement de la coloration jaune est complet au début de 30mn. L'absorption de l'échantillon est alors mesurée au spectrophotomètre à 420nm.

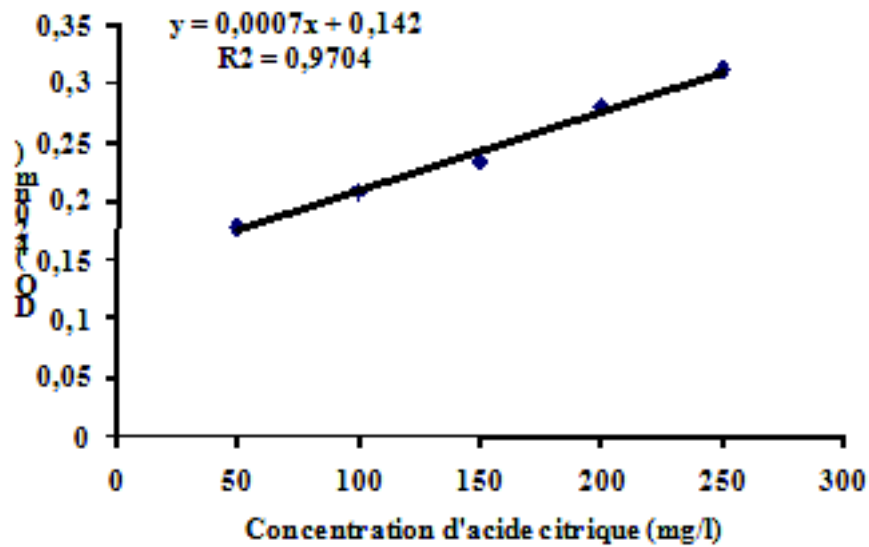


Figure n°19 - Courbe étalon pour le dosage de l'acide citrique.

II-3-3-3-4- Dosage des sucres résiduels

Principe

Nous avons utilisé la méthode à l'Anthrone préconisée par Gavrilovic et al. (1996). L'Anthrone réagit avec de nombreuses substances organiques, en donnant des colorations variées. En présence des sucres et en milieu acide, il donne une coloration bleu-vert dont l'absorbance à 625 nm est proportionnelle à la concentration des sucres présents.

Mode opératoire

- Dans un tube à essai, nous introduisons 1ml d'échantillon à doser (moût de fermentation), le tube est placé dans un bain de glace fondante.
- Après refroidissement, nous ajoutons 5ml de réactif de l'anthrone, et traitons à nouveau la solution pendant quelques minutes à 0°C, ensuite le tube est immergé pendant 10 minutes dans un bain d'eau bouillante.
- L'absorbance de la solution est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à 625nm en utilisant un blanc dont nous avons remplacé la solution sucrée par 1 ml d'eau distillée
- La courbe étalon déterminée dans les mêmes conditions avec des concentrations connues en glucose est présentée dans la Figure n°20.

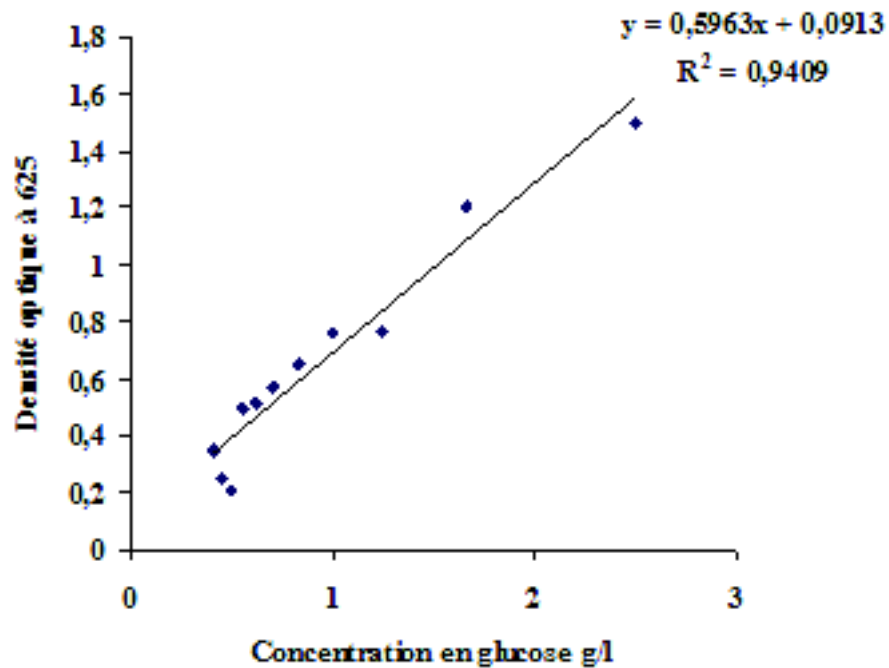


Figure n°20 - Courbe étalon pour le dosage des sucres résiduels.

II-3-3-3-5- Dosage des protéines

Pour le dosage des protéines nous avons utilisés la méthode colorimétrique de Biuret cité par Chevillon *et al.* (1998).

- Principe du dosage

C'est une méthode colorimétrique dans laquelle en milieu alcalin, les composés contenant au moins deux groupements azotés $-C-NH-$ ou $-C-NH_2$ voisins forment avec les ions cuivrique Cu^{+2} un complexe bleu-violet. Cette coloration se développe en particulier avec le réactif de Biuret. Les liaisons péptidiques étant de la forme $-C-NH$, cette coloration est caractéristique des peptides et des protéines.

- Mode opératoire

A partir d'une solution mère d'ovalbumine (étalon), on réalise des solutions à différentes concentrations (tableau n°6 et Figure n°21).

Tableau n° 6 : Préparation des solutions d'ovalbumine pour le traçage de la courbe étalon.

Solution étalon à 1%	1ml	2ml	5ml	10ml
H ₂ O	9ml	8ml	5ml	0ml
Différentes concentrations de la solution d'ovalbumine	0,1%	0,2%	0,5%	1%

L'absorbance des solutions préparées est réalisée à une longueur d'onde de 540 nm.

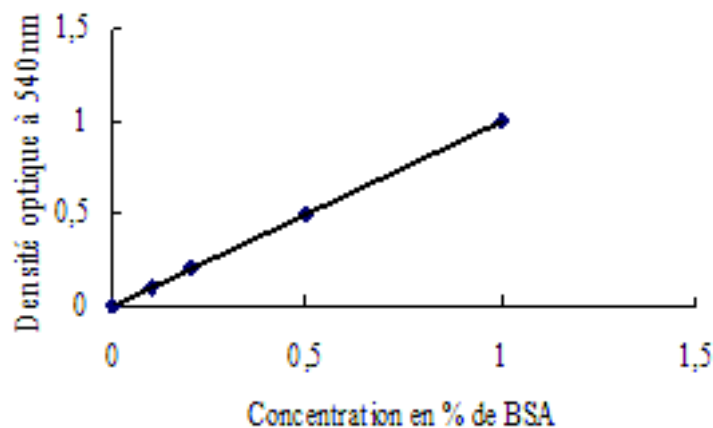


Figure n°21 - Courbe étalon pour le dosage des protéines résiduelles.

On introduit dans un tube à essai 1 ml de l'échantillon (moût de fermentation), auquel on ajoute 4ml de NaOH 0,1N. De la solution obtenue, on prend 1ml qu'on introduit dans un tube à essai, on ajoute 5ml NaOH 0,1 N et 3,5ml de réactif de Biuret. L'absorption de la solution est mesurée à 540nm par rapport à un blanc contenant 6,5 ml de NaOH 0,1N et 3,5ml du réactif de Biuret.

II-3-3-3-6- Production d'agents antimicrobiens

Cette étude vise à évaluer l'activité antimicrobienne de *Beauveria bassiana* en utilisant des souches tests tels que *Escherichia coli*; *Klebsiella pneumoniae* ; *Pseudomonas aeruginosa* et *Candida albicans*

Nous avons utilisé la technique de disques préconisée par Larpent et Sanglier (1989) et Boquet (1993).

L'échantillon d'une culture pure et jeune de chacune des souches citées ci dessus est porté par une anse de platine stérile dans un tube à essai contenant du bouillon nutritif, ensuite incubé à 37°C pendant 24h.

La concentration microbienne des bouillons obtenus est effectuée, en procédant à des dilutions dans de l'eau physiologique stérile ensuite lire la DO au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 625 nm.

On note une densité optique comprise entre 0,08 et 0,1 ce qui correspondrait selon la norme Afnor, d'après Anonym(1988) à environ une quantité de cellules égale à 10^8 cellules/ml. La suspension ainsi obtenue servira à l'évaluation de l'activité antimicrobienne de *Beauveria bassiana*.

- Les disques de papier buvard (de 6mm de diamètre) imprégnés du moût de fermentation sont placés à la surface des boîtes de Pétri, contenant le milieu solide Muller Hinton pour les bactéries et le milieu Sabouraud pour le champignon et préalablementensemencées par inondation avec la suspension microbienne à tester. Les boîtes sont ensuite placées au réfrigérateur à 4°C pendant 4h pour permettre à la solution antimicrobienne de bien diffuser.
- On incube à 37°C pendant 24h pour les bactéries et jusqu'à 72h à 28°C pour *Candida albicans*.
- L'effet antimicrobien se traduit par la zone d'inhibition qui se forme autour de disque et qu'on mesure à l'aide d'une règle graduée.

II-3-3-3-7- Analyse des solvants produits

Le couplage de la chromatographie phase gazeuse à la spectroscopie de masse est un des plus puissants outils d'identification de l'instrumentation analytique. Grâce à sa sélectivité et à sa sensibilité, cette technique connaît un développement croissant dans la recherche biologique (Gavrilovic et al.1996).

· Mode opératoire

Dans un CPG/SM, la première étape correspond à l'injection de nos échantillons(moût de fermentation) issus des milieux : LD, MO et PDA prélevés à différents temps T_0 , T_3 (après trois jours)et T_5 (après cinq jours), dans la colonne. La seconde étape consiste à la séparation après migration des molécules du mélange.

La séparation de ces composés se déroule tout au du temps, les molécules étant éluées de manière séquentielle selon les critères de polarité et de solubilité dans la phase stationnaire de la colonne. La molécule séparée des autres constituants de mélange est ensuite ionisée dans la source d'ionisation de spectromètre de masse. La dernière étape d'identification est réalisée par un analyseur de masse.

II-3-3-3-8- Récupération de la biomasse

La récupération de la biomasse est faite par lyophilisation qui utilise un principe physique se basant sur la sublimation ou passage d'un élément de l'état solide à l'état gazeux. Une pression est causée par le retrait de l'air du lyophilisateur pour créer le vide nécessaire à la sublimation (Bains, 1996). L'opération de lyophilisation consiste à :

- Congeler l'échantillon, dans notre cas il s'agit de la biomasse mycélienne, pour que l'eau qu'elle contient soit sous forme de glace.
- Ensuite sous l'effet du vide, sublimer la glace directement en vapeur d'eau.
- Une fois que toute la glace est sublimée, l'échantillon est séché à froid et on peut le retirer de l'appareil.

II-3-3-3-9- Recherche de la coagulase

· Principe

L'enzyme produite par la souche fongique *Beauveria bassiana* est une protéase extracellulaire qui a un effet coagulant sur le lait. Pour favoriser sa sécrétion, un milieu solide qui est le son de blé additionné d'une source d'azote est utilisé (Levadoux et al., 1989).

· Préparation de l'inoculum

Après 5 jours d'incubation de la souche *B.bassiana*, les spores ont recouvert la surface de la gélose (PDA). Cette dernière est alors submergée d'une solution stérile de Tween 80 (une goutte de Tween 80 dans 200 ml d'eau distillée stérile), solution qui permet la libération des spores.

A l'aide d'une pipette à boule, on gratte légèrement la surface de la gélose afin de mettre en suspension la culture sporulée. La suspension de spores est filtrée sur de la laine de verre entreposée sur un entonnoir. Le filtrat recueilli servira d'inoculum (Levadoux et al., 1989).

· Préparation et inoculation du milieu de fermentation

Le milieu de fermentation composé de 30 g de son de blé et de 15 ml d'une solution à 0,01% de sulfate d'ammonium, est réparti dans 8Erlens Meyer. Le milieu est stérilisé à l'autoclave à 121°C pendant 20 mn.

L'inoculation des milieux est réalisée par introduction de 10 ml de l'inoculum dans chaque Erlen Meyer (Levadoux et *al.*, 1989). L'incubation des milieux se fait à 30°C pendant 5 jours.

□ - Extraction de l'enzyme

L'extraction de l'enzyme est réalisée par addition de 200 ml d'eau distillée dans chaque erlen Meyer.

Cette étape est suivie d'une agitation lente pendant 45 mn. Le mélange est alors filtré sur une bande à gaze entreposée sur un entonnoir, ensuite sur papier filtre.

Pour terminer, le filtrat est soumis à une centrifugation à 10000 tr/mn à 4°C pendant 20 mn. Le surnageant est appelé extrait enzymatique brut comme l'ont mentionné Levadoux et *al.* en 1989.

□ - Dosage des protéines

Le dosage des protéines totales de l'extrait enzymatique a été réalisé selon la méthode de Bradford (1976). C'est une méthode colorimétrique qui permet la détermination des concentrations d'une solution protéique.

· Principe

La méthode de Bradford est basée sur la variation de la coloration du bleu de Coomassie G250, lorsqu'il se fixe aux protéines. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de protéines dans le milieu. La densité optique est déterminée par spectrophotométrie à 595 nm (Bradford, 1976).

· Mode opératoire

- Elaboration de la courbe étalon

A partir d'une solution mère de BSA (Bovin Serum Albumin) à 0,1% (0,1 g de BSA dans 100 ml d'eau distillée) on prépare des dilutions de concentrations croissantes (Tableau n°7) pour tracer la courbe étalon représentée dans la Figure n°22.

RB : Réactif de Bradford.

- Les six tubes sont incubés à température ambiante et à l'abri de la lumière pendant 10mn.
- Les densités optiques sont déterminées à 595 nm (pour les tubes numérotés de 2 à 6 contre l'essai à blanc du tube n°1).
- Etablir le tracé de la courbe d'étalonnage (la densité optique en fonction de la concentration en BSA.) (Figure n°22).

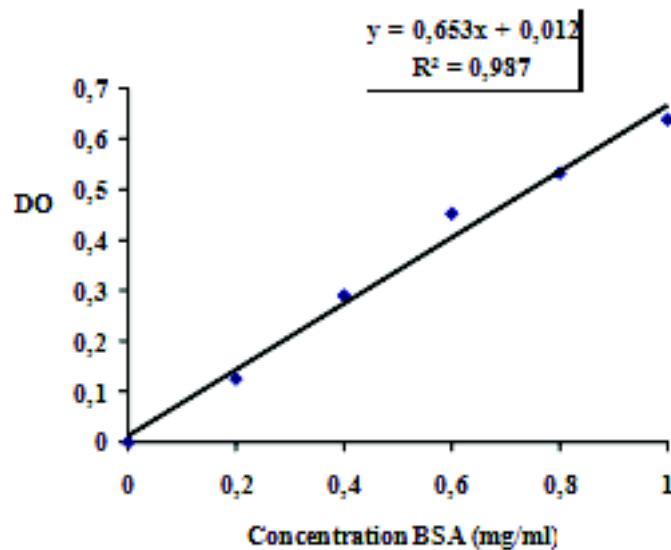


Figure n°22 – Courbe étalon des protéines.

La solution à doser est préparée selon la composition représentée dans le tableau n°8.

Tableau n°8 : Composition de la solution protéique à doser.

Volume de l'extrait enzymatique (μ l)	10
Volume du tampon (μ l)	90
Réactif de Bradford (ml)	5

□ - Détermination de l'activité coagulante

· Principe

L'activité coagulante est évaluée selon la méthode de Berridge (1945), cette méthode permet d'exprimer l'activité de l'extrait enzymatique en unité présure. Les tests d'activité ont été réalisés sur le substrat de Berridge (lait écrémé en poudre dilué dans une solution de chlorure de calcium CaCl_2).

· Mode opératoire

– Préparation du substrat de Berridge

Peser 12g de lait écrémé en poudre et le faire dissoudre dans 100 ml de solution de CaCl_2 à 0,01M et le soumettre à une agitation lente pendant 20 mn.

Ajuster le pH à 6,4 puis répartir le mélange dans des tubes à essai à raison de 10 ml. Maintenir 30mn au bain Marie à 35°C.

□ - Mesure du temps de coagulation

Cette méthode consiste à déterminer visuellement, à partir du moment de l'addition de la solution enzymatique (1ml d'extrait enzymatique dans 10 ml de lait), le temps d'apparition des premiers flocons de micelles qui est le temps de prise et le temps de coagulation (Berridge, 1945).

□ - Calcul de l'activité coagulante (Ac)

L'activité coagulante est déterminée à l'aide de la formule suivante :

$$Ac(UP) = \frac{10 \times V_1}{T \times V_2}$$

Avec : V1 : volume du lait utilisé (10 ml).

V2 : volume de l'extrait enzymatique utilisé (1 ml).

T : temps de coagulation (s).

L'activité coagulante peut être également exprimée en "force coagulante de SOXHLET" (F), selon la relation suivante :

$$F = \frac{UP}{0,0045}$$

II-3-4- Aspect toxicologique et biosécurité de *B. Bassiana*

En vue de protéger l'utilisateur, agriculteurs et personnels manipulateurs vis-à-vis d'un quelconque effet toxique et allergique induit par *B. bassiana*, il nous est donc paru intéressant de réaliser un test de toxicité du *B.bassiana*; de son activité inflammatoire et de son effet sur l'histologie du foie d'un mammifère rongeur (Le rat Wistar et la souris Cobaye). Cette partie de travail est réalisée au niveau du centre de recherche et de développement Sidal d'El-Harrach.

II-3-4-1- Evaluation de la toxicité

Le principe consiste en une administration intra-gastrique d'une solution d'acridopathogène *B.bassiana* et le suivi des animaux quotidiennement pendant 20 jours afin de signaler des cas de mortalité. Une prise de poids des rats témoins et traités est faite le premier jour et le dernier jour d'expérimentation.

- Doses appliquées

A partir des colonies de *B .bassiana* âgées de 9jours, on a prélevé des explantâts qu'on a mis dans un bécher contenant de l'eau distillée stérilisée. La solution est ensuite agitée et filtrée sur une gaze. La concentration en spores est évaluée par la cellule de Mallasez. Les dilutions sont effectuées successivement pour atteindre les concentrations voulues : DL50 évaluée efficace contre les adultes de *S .gregaria* comptant $6,9 \times 10^5$ spores /ml et deux doses supérieures : 10^8 spores /ml et 10^{10} spores /ml.

- Traitement

Pour réaliser ce test, nous avons utilisé deux lots de rats constitués respectivement de 40 individus sexe confondu (10 individus par dose). Pour ce faire nous avons procédé comme suit :

- Mise à jeun des animaux la veille du test
- Administration intra gastrique (gavage) de 0,5ml d'une solution de *B .bassiana* à chaque rat traité. les rats témoins reçoivent 0,5ml d'eau distillée stérilisée (Figure n °23).

- Suivi des animaux quotidiennement durant 20 jours pour signaler les mortalités.



Figure n°23 - Gavage gastrique pour rats.

II-3-4-2- Effet sur l'histologie du foie des rats

Cette étude histologique, a été menée sur les rats au 20^{ème} jour après traitement à la forte dose 10^{10} spores /ml et sur les rats témoins. Les rats témoins et traités sont sacrifiés et rapidement disséqués, les foies sont prélevés puis plongés dans des boîtes de Pétri remplies d'eau.

La technique histologique est celle de Martoja et Martoja- Pierson (1967) et compte les mêmes étapes que la technique histologique retenue pour l'étude de l'effet de *B.bassiana* sur la structure de la cuticule de *Schistocerca gregaria*. La seule différence réside dans la coloration, celle-ci est à l'hématoxyline-éosine (annexe) qui fait apparaître le cytoplasme en rose rouge et le noyau en noir.

II-3-4-3- Evaluation de l'activité inflammatoire

On a appliqué le test de Levy cité par Berkan et al. (1991) :

Nous avons retenu deux lots de souris : un lot traité avec les trois doses : $6,9 \times 10^5$ spores /ml ; 10^8 spores /ml et 10^{10} spores /ml) et un lot témoin traité par l'eau physiologique stérilisée. On a retenu 10 souris par dose.

- Au temps T0, une injection d'un volume de 0,025ml d'une solution de *B. bassiana* pour les animaux traités est faite. Les animaux témoins ont reçu le même volume d'eau physiologique stérile. Les solutions ont été administrées à tous les animaux expérimentés par injection sous l'aponévrose plantaire de la patte arrière gauche (Figure n°24).
- Au temps T0+ 4h, les animaux sont sacrifiés par rupture de la nuque, les pattes postérieures sont coupées à hauteur de l'articulation et pesées sur une balance analytique. L'augmentation du poids de la patte gauche traitée au *B.bassiana* par rapport à la patte droite correspond à l'intensité de l'inflammation ou l'œdème.



Figure n°24 – Injection de B. bassiana dans la patte arrière gauche d'une souris.

II-5- Traitement des données

II-5-1- Calcul du pourcentage de mortalité

Le pourcentage de mortalité observée chez les imagos témoins et traités est estimé par la formule suivante.

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

La mortalité observée est ensuite corrigée par la formule d'Abbot (1925):

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

M1: Pourcentage de mortalité dans le témoin.

M2: Pourcentage de mortalité dans le lot traité.

MC: Pourcentage de mortalité corrigé.

II-5-2- Analyse de probit

Pour calculer la DL50 (dose nécessaire pour tuer la moitié d'une population) et le TL50 (temps léthal au bout duquel on a 50% de mortalité) pour chaque dose, nous avons transformé en probits les pourcentages de mortalité corrigés et le temps en logarithme décimal du temps. Ces transformations nous ont permis d'établir des équations des droites de régressions "probit-logarithmes" de type:

$$y = a x + b$$

y: probit des mortalités corrigées.

x : logarithme de la dose ou du temps.

a : La pente.

A partir des équations des droites de régressions, nous avons calculé la dose létale 50 et les temps létaux 50 en remplaçant y par le probit de 50. Les doses létales peuvent être déterminées également graphiquement en recherchant l'abscisse du point correspondant au probit 5, ainsi la DL50 ou le TL50 sera égal :

Anti \log_{10} x spores/ml avec x = \log_{10} de temps ou de dose correspondant au probit 5 sur le graphe (Cavelier, 1976).

II-5-3- Analyse de la variance

Pour confirmer l'efficacité des traitements nous avons fait appel à une analyse de la variance à un seul critère de classification sur le logiciel ExelStat. Cette même analyse est également employée pour donner une signification statistique à tous les tests des différentes parties de notre étude.

CHAPITRE III - RESULTATS ET DISCUSSION

III-1- Application de *B. bassiana* sur *S. gregaria* et *L. migratoria*

III-1-1- Effet de *B.bassiana* sur la mortalité des imagos de *S.gregaria* et *L. migratoria*

III-1-1-1- Mortalité

a- Résultats

Chez les individus de criquet pèlerin traités au *B. bassiana*, on assiste à une diminution des mouvements des criquets et à une baisse d'appétit des insectes. On observe aussi des taches rougeâtres sur le thorax et quelques heures après, l'insecte est paralysé puis meurt.

Les taux de mortalités journalières obtenues chez les imagos de *S.gragaria* et de *Locusta migratoria* traités au *B.bassiana* sont portés sur les tableau n°9 et n°10 et les Figures n°25 et n°26.

Tableau n°9 : Pourcentage de mortalité journalière chez les imagos de *S.gregaria* traités au *B.bassiana*.

Temps Dose		1 ^{er} jour	2 ^{ème} jour	3 ^{ème} jour	4 ^{ème} jour	5 ^{ème} jour	6 ^{ème} jour	7 ^{ème} jour	8 ^{ème} jour	9 ^{ème} jour
D1	R1	0	12,5	25	75	87,5	100	100	100	100
	R2	0	12,5	25	87,5	100	100	100	100	100
	M±E	0±0	12,5 ±0	25±0	81,25±8,83	83,75±8,83	100 ±0	100±0	100±0	100 ±0
D2	R1	0	0	62,5	75	87,5	100	100	100	100
	R2	0	0	35,5	45,5	75	87,5	100	100	100
	M±E	0±0	0±0	37,5± 19,09	49,75±20,81	85,25±8,83	83,75±8,83	100 ±0	100 ±0	100 ±0
D3	R1	0	0	0	0	25	50	75	87,5	100
	R2	0	0	0	0	12	25	50	100	100
	M±E	0±0	0±0	0±0	0±0	12,5 ±9,13	19,75±10,60	62,5± 17,67	93,75 ±8,83	100 ±0
Tém	R1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	R2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	M±E	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0

Tableau n°10 : Pourcentage de mortalité journalière chez les imagos de *L.migratoria* traités au *B.bassiana*.

Recherche fondamentale sur l'entomopathogène *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.)Vuill.
(Ascomycota: Hypocreales) :

Temps (jours)	Dose	1 ^{er} jour	2 ^{ème} jour	3 ^{ème} jour	4 ^{ème} jour	5 ^{ème} jour	6 ^{ème} jour	7 ^{ème} jour	8 ^{ème} jour	9 ^{ème} jour	10 ^{ème} jour	11 ^{ème} jour	12 ^{ème} jour	13 ^{ème} jour
D1	R1	0	0	0	20	20	20	20	40	60	80	80	100	100
	R2	0	0	0	20	20	40	40	40	80	80	100	100	100
	R3	0	0	0	0	20	20	40	40	60	80	80	100	100
	M±E	0±0	0±0	0±0	13,33±	20,56	26,6±	33,33±	40,56	66,66±	80,56	93,33±	100,56	100±
D2	R1	0	0	0	0	20	20	40	40	80	80	100	100	100
	R2	0	0	0	0	20	20	40	40	60	80	80	100	100
	R3	0	0	0	0	0	40	40	40	60	80	80	80	100
	M±E	0±0	0±0	0±0	0±0	13,33±	26,55±	44,0±	40±0	66,67±	80,50	86,67±	89,33±	100,54
D3	R1	0	0	0	0	20	20	20	40	40	40	60	80	100
	R2	0	0	0	0	0	0	20	20	20	40	80	100	100
	R3	0	0	0	0	0	0	0	20	40	40	60	80	100
	M±E	0±0	0±0	0±0	0±0	6,67±	16,67±	11,53±	26,57±	33,53±	40,56	66,67±	86,57±	100,54
Tém	R1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	R2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	R3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	M±E	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0

Tem. : Témoin M : moyenne E : écart type

D1, D2, D3 : doses expérimentées R1, R2 : répétitions

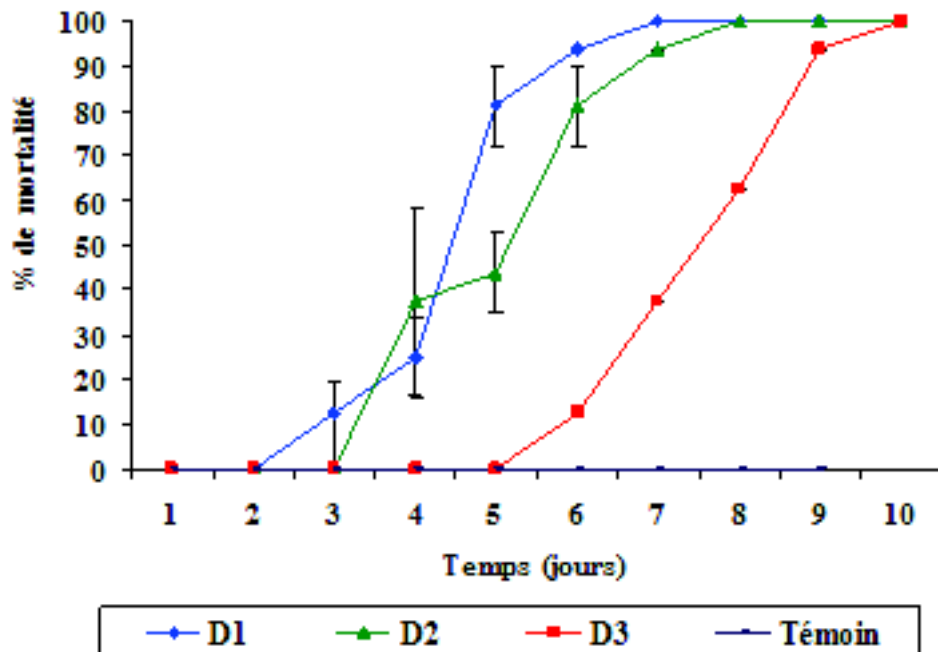


Figure n°25 – Taux de mortalité chez les individus de *S.gregaria* témoins et traités à différentes doses de *B. bassiana*.

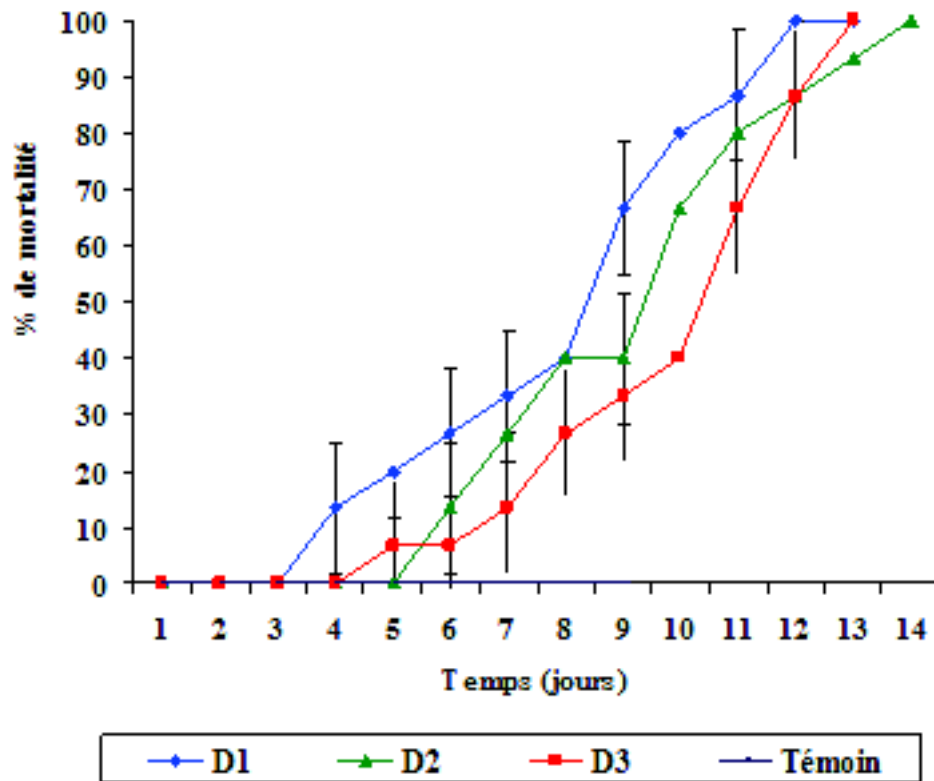


Figure n°26 – Taux de mortalité chez les individus de *L.migratoria* témoins et traités à différentes doses de *B. bassiana*.

D'après les tableaux n°9 et n°10 et les Figures n°25 et n°26, on remarque que la mortalité des imagos évolue dans le temps parallèlement avec les doses testés, en effet la plus forte mortalité est enregistrée à la forte dose D1 suivi de la moyenne dose D2 et finalement de la faible dose D3.

La mortalité totale diffère avec l'espèce, pour *S.gregariales* 100% de mortalité sont obtenu au bout du 9^{ème} jour de traitement alors que pour *L.migratoriatus* les individus ont succombés au 13^{ème} jour de traitement .Parallèlement durant la même période tous les individus témoins ont survécus. Afin de préciser l'efficacité de notre traitement, on a fait appel à une analyse de la variance à deux critères de classification (tableau n°11 et n°12).

- Facteur 1 : est le facteur dose avec 4 niveau : (3 doses de traitement et le témoin).
- Facteur 2 : est le facteur temps avec 9 niveaux du temps d'observation.

Tableau n°11 : Analyse de la variance sur l'efficacité de *B. bassiana* appliqué sur les imagos de *S. gregaria*.

Source de variation	DDL	CM	F.obs	F.théo	Proba	E.T.	C.V
Var. totale	71	1999,22					
Var Fact.1	3	17366,9	137,98	2,87	0,000		
Var. fact2	8	6986,22	55,5	2,22	0,000		
Var inter F1*2	24	1225,95	9,74	1,85	0,000		
Var. résid.	36	125,87				11,22	27,4

Tableau n°12 : Analyse de la variance : Efficacité de *B.bassiana* sur les adultes de *L.migratoria*.

**Recherche fondamentale sur l'entomopathogène *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.)Vuill.
(Ascomycota: Hypocreales) :**

Source de variation	DDL	CM	F.obs	F.théo	Proba	E.T.	C.V
Var. totale	71	173615,88					
Var Fact.1	3	3524,20	33,17	2,62	0,000		
Var. fact2	8	15611,72	88,16	2,23	0,000		
Var inter F1*2	24	1996,64	3,76	1,69	0,000		
Var. résid.	36	13600,00				5,95	83,6%

Les résultats de l'analyse statistique mettent en évidence des différences très hautement significatives entre le lot témoin et le lot traité chez les deux acridiens ($p=0$ et $F_{théorique} < F_{observé}$).

b- Discussion

Les résultats des essais biologiques montrent que la réponse (mort) au stimulus (traitement) croît avec la croissance des doses utilisées et selon l'espèce traitée comme l'ont déjà confirmé Zhengzen *et al.* (1996). C'est ainsi qu'à la forte dose D1 ($1,64 \times 10^7$ spores/ml) les mortalités ont commencées au 2^{ème} jour de traitement pour *S.gregaria* et au 4^{ème} jour pour *L.migratoria* et ce sont achevées au 6^{ème} jour pour la première espèce et au 11^{ème} jour pour la deuxième espèce.

Pour ceux traités à la dose D2 ($1,64 \times 10^6$ spores/ml) on a commencé à enregistrer les mortalités chez *S.gregaria* au 3^{ème} jour qui suit le traitement pour atteindre les 100% au 7^{ème} jour et chez *L.migratoria*, les mortalités ont commencées au 5^{ème} et ce sont terminées au 13^{ème} jour. Beaucoup plus tard et ce n'est qu'au bout de 5^{ème} jour que la mortalité s'est initiée chez les imagos traités à la faible D3 ($1,64 \times 10^5$ spores/ml) des deux espèces acridiennes.

Et elle s'est échelonnée jusqu'au 9^{ème} jour pour le criquet pèlerin et au 13^{ème} jour pour le criquet migrateur. Parallèlement aucune mortalité n'est enregistrée pour les témoins durant toute la période de l'expérimentation. Les résultats de la mortalité ont également montré que dans le temps et vis-à-vis du traitement les imagos de *S.gregaria* plus sensibles que les imagos de *L.migratoria*.

Divers chercheurs se sont intéressés à l'étude de l'activité biologique des entomopathogènes vis-à-vis de divers ordres d'insectes et dont les résultats sont assez comparables aux nôtres.

Doumandji-Mitiche *et al.* (1999) ont noté des taux de mortalité de 100% entre le 6^{ème} et 8^{ème} jour chez les différents stades de *S. gregaria* traités par *B. bassiana* et entre le 6^{ème} et le 12^{ème} jour sur les différents stades de *Locusta migratoria*. Contre le criquet migrateur une formulation huileuse de *B. bassiana* dosée à $2,64 \times 10^9$ spores/ml a entraîné après 10 jours de traitement une mortalité de 72,7% (Brinkman *et al.*, 1997).

C'est au 7^{ème} jour que cette espèce appliquée à la même dose a provoqué une mortalité de 100% chez l'orthoptère *Oedaleus senegalensis* (Swearingen, 1993). Une mortalité de 60% est notée au 4^{ème} jour qui suit le traitement des adultes de *L. migratoria capito* avec l'entomopathogène *Soroprella sp.*

Avec l'entomopathogène *M.anisopliae*, des résultats similaires ont été trouvés par Haddadj (2001) sur les L5 et les adultes de *Schistocerca gregaria* sur lesquelles sont pulvérisés les mêmes doses que les nôtres.

Contre l'orthoptère *Locusta migratoria*, *M. anisopliae* a engendré une mortalité de 100% dans un délai de 14 jours chez les larves du 3^{ème} et du 4^{ème} stade (Welling et al., 1994). Une autre espèce du genre *Metarhizium* : *M. flavoviride* spécifique aux locustes du désert a manifesté une efficacité intéressante vis-à-vis des acridiens.

En effet, Stephan et al. (1997) signalent une mortalité de 100% au sein de la population de 3^{ème} stade larvaire de *Locusta migratoria* au 14^{ème} jours après traitement au *M. flavoviride* à la dose 10^7 blastospores/ml. Appliqué à la dose 2×10^7 spores/ml, cet entomopathogène occasionne une mortalité de 90% chez les adultes de *L. migratoria* après deux semaines de traitement (Stephan et al., 1997).

Selon Lomer (1997), l'épandage de 5×10^{12} spores/ha de *M. flavoviride* au Sud du Bénin a provoqué après 10 jours seulement une mortalité de 90% des L5 et des adultes de *Zonocerus variegatus*.

Au plein champs, avec *Metarhizium flavoviride*, Langewald et al. (1997) ont observé 99% de mortalité au 15^{ème} jour après traitements sur des bandes larvaires de *S. gregaria* en Mauritanie. Par contre, le taux de mortalité chez *Locusta migratoria* souligné par Swearingen (1997) à Madagascar était de 89% après 10 jours.

Les champignons entomopathogènes présentent une vulnérabilité presque similaire pour les autres ordres d'insectes. Citons comme exemple les coléoptères, où le traitement au *B.bassiana* contre le Doryphore *Leptinotorsa decemlineata* (Coleoptera, Chrysomelidae) a engendré une mortalité de 100% au bout de 10 jours soulignent Todorova et al. (1994). Contre *Popilla japonica* (Coleoptera, Scarabeidae), *B. bassiana* a manifesté une mortalité de 79% au bout de 96 heures seulement (Lawrence et al., 1994).

L'action des autres champignons entomopathogènes semble être plus différée que cellule des champignons. Tel est le cas de microsporidés *Nosema acridophagus*, lequel a entraîné une mortalité de 96,1% chez l'acridien *Melanoplus sanguinipes* au 20^{ème} jour de traitement comme l'ont souligné Henry et al. (1979).

III-1-1-2- DL50 et TL50

a- Résultats

Les doses létales et les temps létaux au bout desquelles 50% des individus de *S.gregaria* et de *L. migratoria* sont morts sont obtenues à partir des droites de régression (Figures n°27 et n°28) des logarithmes décimaux des doses (tableau n°13 et n°14) et des temps (tableau n°15 et n°16) en fonction des taux de mortalité corrigés chez les imagos traités eu *B. bassiana* (Figure n°29).

Tableau n°13 : les logarithmes décimaux des doses et les probits des taux de mortalité (au 5^{ème} jours) chez les imagos de *S. gregaria* traités au *B. bassiana*.

Recherche fondamentale sur l'entomothogène *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.)Vuill.
(Ascomycota: Hypocreales) :

Doses		% de mortalité	
Doses	Log doses	MC%	Probits
D1	7,16	93,75	6,63
D2	6,16	81,25	6,89
D3	5,16	12,5	3,87

Tableau n°14 : les logarithmes décimaux des doses et les probits des taux de mortalité (au 5^{ème} jours) chez les imagos de *L. migratoria* traités au *B. bassiana*.

Doses		% de mortalité	
Doses	Log doses	MC%	Probits
D1	7,16	13,33	3,87
D2	6,16	0	0
D3	5,16	0	0

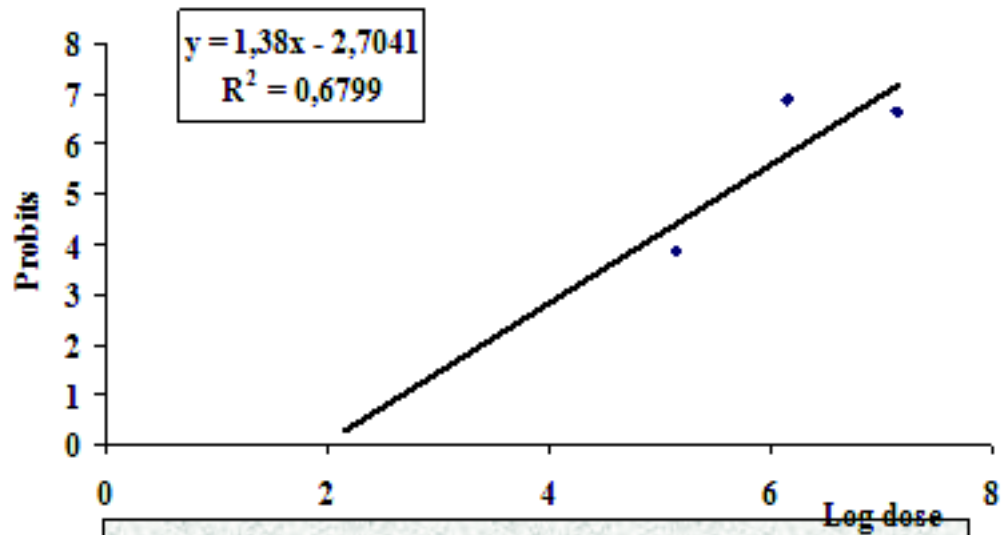


Figure n°27 - Droite de régression exprimant le taux de mortalité des imagos de *S. gregaria* traités aux trois doses de *B. bassiana*.

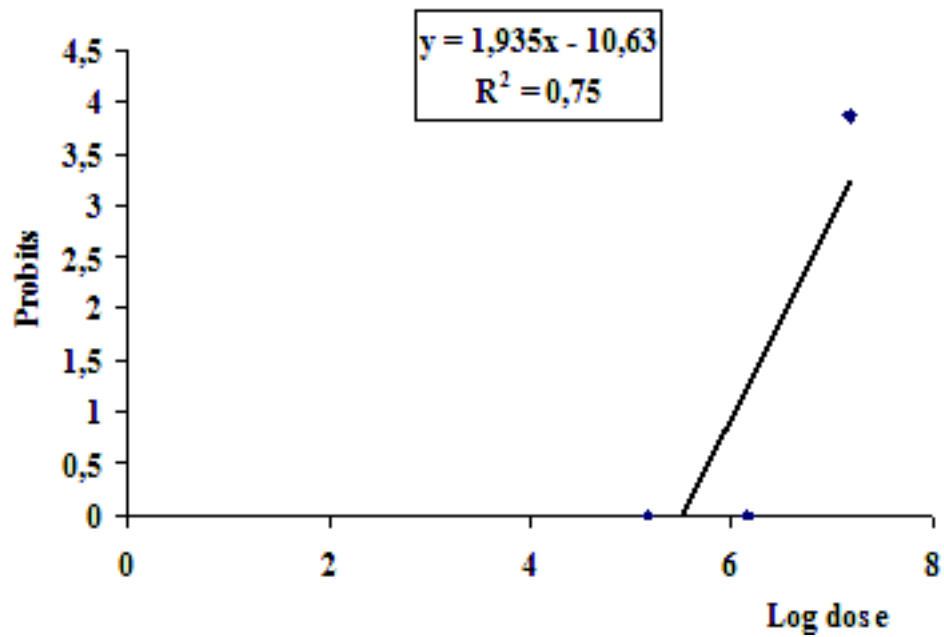


Figure n°28 – Efficacité de *B. bassiana* vis à vis de imagos de *L.migratoria*.

Tableau n°15 : Probits des pourcentages de mortalité corrigée et les logarithmes décimaux des temps chez les imagos de *S. gregaria* traités au *B.bassiana*.

Doses Temps (jours)		D1		D2		D3	
Temps	Log temps	MC%	Probits	MC%	Probits	MC%	Probits
1	0	0	0	0	0	0	0
2	0,30	12,5	3,87	0	0	0	0
3	0,47	25	4,33	37,5	4,68	0	0
4	0,60	81,25	5,89	43,75	4,84	0	0
5	0,69	93,75	6,53	81,25	5,89	12,5	3,87
6	0,78	100	8,09	93,75	6,53	37,5	4,68
7	0,84	-	-	100	8,09	62,5	5,32
8	0,90	-	-	-	-	93,75	6,53
9	0,95	-	-	-	-	100	8,09

Tableau n°16 : Probits des pourcentages de mortalité corrigée et les logarithmes décimaux des temps chez les imagos de *L.migratoria* traités au *B.bassiana*.

Recherche fondamentale sur l'entomothogène *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.)Vuill. (Ascomycota: Hypocreales) :

Doses Temps (jours)		D1		D2		D3	
Temps	Log temps	MC%	Probits	MC%	Probits	MC%	Probits
1	0,00	0	0	0	0	0	0
2	0,30	0	0	0	0	0	0
3	0,48	0	0	0	0	0	0
4	0,60	13,33	3,87	0	0	0	0
5	0,70	20	4,16	13,33	3,87	6,66	3,52
6	0,78	26,66	4,39	26,66	4,39	6,66	3,52
7	0,84	33,33	4,56	40	4,75	13,33	3,87
8	0,90	40	4,75	40	4,75	26,66	4,39
9	0,95	66,66	5,44	66,66	5,44	33,33	4,56
10	1,00	80	5,84	80	5,84	40	4,75
11	1,04	93,33	6,48	86,66	6,13	66,66	5,44
12	1,07	100	8,09	93,33	6,48	86,66	6,13
13	1,11			100	8,09	100	8,09

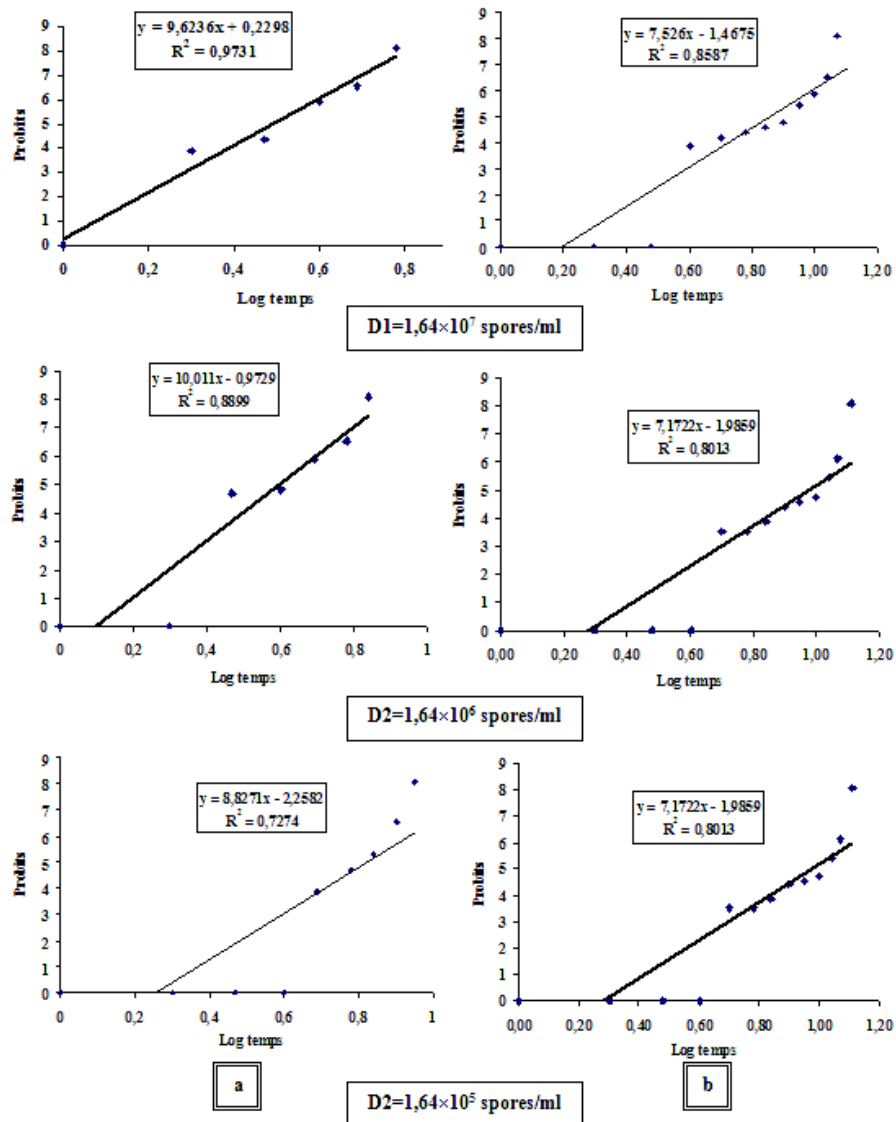


Figure n°29 - Droites de régression expriment le taux de mortalité des imagos de *S.gregaria* (a) et *L.migratoria* (b) traités au trois doses de *B. bassiana* en fonction du temps.

A partir des droites de régressions si dessus nous avons pu dégagé la dose létale 50 et les temps létaux 50 (tableaux n°17 et n°18).

Tableau n°17 : Equations des droites de régression, coefficient de régression et les valeurs de la DL50 et TL50 pour les imagos de *S. gregaria* traités au *B. bassiana*.

Doses	TL50		DL50	
Doses	Droites de régression et coefficients de régression	Valeur	Droites de régression et coefficients de régression	Valeur
D1	$y = 9,6236 x + 0,2298 R^2 = 0,9864$	3 j et 3 h	$y = 1,38x - 2,7041 .R2 = 0,6799$	$1,69 \times 10^5$ sp/ml
D2	$y = 10,011x + 0,9729 R^2 = 0,9433$	3 j et 22 h		
D3	$y = 8,8271x + 2,2582 R^2 = 0,8529$	6 j et 15 h		

Tableau n°18 : Equations des droites de régression, coefficient de régression et les valeurs de la DL50 et TL50 pour les imagos de *L. migratoria* traités au *B. bassiana*.

Doses	TL50		DL50	
Doses	Droites de régression et coefficients de régression	Valeur	Droites de régression et coefficients de régression	Valeur
D1	$y = 7,523 x + 1,4641 R^2 = 0,8583$	7j 5h	$y = 1,935x - 10,63 R2 = 0,75$	$11,75 \times 10^7$ spores/ml
D2	$y = 7,855x + 2,0772 R^2 = 0,8285$	7j 22h		
D3	$y = 7,1741 x + 1,9862 R^2 = 0,8021$	9j 9h		

Il y a lieu de noter, en ce qui concerne le tracé de la droite de régression exprimant les probits des pourcentages de mortalité en fonction des logarithmes décimaux des doses (Figure n°27 et n°28) l'existence d'une liaison étroite entre les différentes doses et les taux de mortalité.

Ce qui est approuvé par le coefficient de corrélation compris entre 0 et 1 ($0 < R < 1$) (tableaux n°17 et n°18) donc la corrélation est dite positif, les taux de mortalité et les doses varient dans le même sens (Combes et Saada, 1968).

Le calcul des TL50 (temps létaux occasionnant 50% de mortalité) de *B.bassiana* testé par rapport aux doses nous renseigne sur l'importance de l'effet du champignon dans le temps, provoqué par une variation de dose .Les valeurs des TL50 relative à chaque dose sont tirées directement à partir des équations de régressions.En effet Les temps létaux calculés , varient d'une dose à une autre.

Les temps les plus élevés :6 j et 15 h pour *Schistocerca gregaria* et 9j 9h pour *Locusta migratoria* sont obtenus pour la plus faible dose $1,65 \times 10^5$ spores/ml ,alors que les temps les plus courts sont enregistrés pour les plus fortes doses : $1,65 \times 10^7$ spores/ml et $1,65 \times 10^6$ spores/ml montrant une efficacité presque similaire, s'évaluant de 3 j et 3 h à 3 j 22 h pour *S.gregaria* et de 7j 22h à 7j 5h pour *L.migratoria* respectivement.

b- Discussion

DL50

La dose létale enregistrée pour les imagos de *S.gregaria* et *L.migratoria* traité au *B.bassiana* s'évalue à $1,69 \times 10^5$ spores/ml et $11,75 \times 10^7$ spores/ml respectivement.

Halouane (1997) a trouvé une valeur de DL50 qui concorde avec la nôtre est s'évalue à $2,81 \times 10^5$ spores/ml sur les individus de *S.gregaria* traités au champignon *Metarhizium anisopliae*. Avec *M. flavoviride* sur une bande larvaire de 5^{ème} stade de *S. gregaria*, Caudewell et Gatherhouse (1996) ont trouvé une DL50 de l'ordre de $1,5 \times 10^8$ spores/ml.

Sur d'autres ordres d'insectes, Belayel (1992) a obtenu une DL50 de $5,4 \times 10^4$ spores/ml lorsqu' il a traité les larves de *Geotrogus deserticola* (Coleoptera : Melolonthina) par *M. anisopliae*, et une DL50 de $1,3 \times 10^6$ spores/ml lorsqu' il a traité par *Trichoderma sp.*

Avec *B. bassiana*, Lawrence et al. (1994) ont mentionnée une DL50 de 0,026mg de conidies et 0,7mg de conidies avec *M. anisopliae* appliqués sur des adultes de *Popillia japonica* au 7^{ème} jour qui suit le traitement.

Fargues et al. (1992) notent au bout du 6^{ème} jour une DL50 et une DL90 de $0,7 \times 10^4$ spores/cm² et $0,4 \times 10^5$ spores/cm² respectivement chez les adultes de *Spodoptera littoralis*, traités par le champignon *Nomuraea rileyi*. Contre les œufs de *Trialeurodes vaporarium*; *B. bassiana* manifeste une DL50 de $9,5 \times 10^8$ spores/ml d'après Bouhous (1995).

TL50

Les TL50 sont étroitement liés à la dose utilisée et suivent une progression géométrique. Le temps le plus court où on enregistre les plus fortes mortalité est relatif à la plus forte dose, suivi de la dose moyenne et finalement la plus basse dose ou le temps s'évalue à 6 j et 15 h pour *S.gregaria* et 9j 9h pour *L. migratoria*.

Nos résultats se rapprochent de ceux de Halouane (1997) testant l'efficacité de *M.anisopliae* sur les larves et les adultes de *S.gregaria* et qui a obtenu des TL50 variant entre 2,78j (10^6 sp/ml) et 4,85j ($1,3 \times 10^3$ sp/ml). Tandis que Betman et al. (1996) ont trouvé des TL50 moyens pour 105 isolats de *M. anisopliae* de l'ordre de 4,4 jours et sur 50 isolats de *B.bassiana* une moyenne des TL50 égale à 5 jours.

Travaillant sur d'autres ordres d'insectes, Fargues et al. (1992), mentionnent lors de traitement de *Spodoptera littoralis* par l'entomopathogène *Nomuruea rileyi* une TL50 de 5,1 jours et une TL90 de 6,2 jours et ceci pour une dose de 3×10^4 spores/ml. Le TL50 relevé

par Bidochka et Khachatorians (1991) lors de traitement de *Melanoplus sanguinipes* par *B. bassiana* s'évalue à 7,33 jours.

Les résultats relatifs à la mortalité, les DL50 et TL50, nous ont fait remarquer que notre champignon *B. bassiana* administré par voie tégumentaire s'est montré efficace contre les imagos de *S. gregaria* et *L. migratoria* et viennent confirmés que le criquet pèlerin s'est montré plus sensible à l'infection que le criquet migrateur.

La voie tégumentaire reste le meilleur mode d'application des champignons entomopathogènes envers les insectes contrairement à la voie orale que malgré son efficacité elle se heurte à des contraintes liées au végétal comme il a été rapporté dans la bibliographie.

Pour Halouane (1997) la crucifère : *Brassica oleracea*, a constitué un support favorable pour l'infektivité de *M. anisopliae* envers *S. gregaria*. Par contraste le Sorgho a inhibé le développement de *B. bassiana* comme l'ont fait souligné Ramoska et Todd, 1985 cité par Fargues et al. (1992). Ces auteurs rajoutent que le blé stimule au contraire le développement de *B. bassiana*.

Il est arrivé que même pour des espèces végétales du même genre, les insectes présentent une sensibilité différente. comme il a été rapporté par Hare et Andreali (1983) cité par Fargues et al. (1992), à propos des fréquences des mycoses à *B. bassiana* qui sur *Solanum dulcamara* sont égaux à 21% et sont de 13% chez ceux récoltés sur *Solanum tuberosum*.

En plus du végétal, la germination d'un champignon peut être diminuer ou arrêter une fois qu'il est ingéré par l'insecte. Ce cas est très fréquenté chez les insectes, pour certaines souches d'entomopathogènes. A ce propos Dillon et Charnly (1988) ont isolé des substances douées de propriétés antifongiques inhibant la germination de 4 souches s de *M. anisopliae* Au niveau de liquide gastrique et les extraits aqueux de matières fécales de *S. gregaria*.

Cette même contrainte de mode de traitement par ingestion s'est également observée pour certains insecticides chimiques.

Pour les insecticides ingérés, la rétention dans le tube digestif varie d'une espèce à une autre. C'est ainsi que l'arsénite de sodium est vomie par *Agrotis segetum* et il est ingéré par *Pieris brassicae*. Le pH de l'intestin joue un rôle prépondérant dans le maintien de la solubilité et la stabilité du toxique (Cavelier, 1976). Toutes ces considérations confortent notre choix de mode d'application par contact pour dégager l'activité acridicide de notre souche fongique *B. bassiana* vis-à-vis des imagos du criquet pèlerin.

Sur le terrain, il paraît que le seul responsable de l'inefficacité des traitements d'entomopathogènes, dans la lutte contre les sauterelles, sont les conditions climatiques et non la virulence de pathogène ou la sensibilité de l'hôte visé, comme l'ont signalé Inglis et al. (1997).

Symptomatologie

Les caractères extérieurs de l'infection de nos criquets par *B. bassiana* sont dans une large mesure identiques à ceux décrits par Lepesme (1938) chez les orthoptères infectés par *Aspergillus flavus*.

Les individus traités présentent des taches brunâtres sur les sternites et les pleurites thoraciques qui correspondent à la présence du mycélium à l'intérieur du thorax et sont dus

au dépôt de mélanine sécrétée par le système immunitaire de l'insecte autour de l'infection (Charnley, 1989).

L'apparition de ces taches est vite accompagnée par une baisse du mouvements des criquets et une diminution de la fréquence de la prise de nourriture. A mesure que le mycélium s'étend dans toute la cavité interne de l'insecte, l'immobilité devient presque totale. De tels symptômes sont relevés surtout chez les criquets traités à la faible dose car à la forte dose la mort était brutale, sans que rien ne la fasse prévoir.

Donc 2 jours après la mort, le mycélium et les conidiophores de couleur blanchâtre ont fait leur apparition au niveau des membres inter-segmentaires en premier lieu, ensuite un duvet blanchâtre recouvre peu à peu tout le corps du criquet, jusqu'à la momification. Cette couleur est caractéristique de la mycose à *B.bassiana* appelée communément chez les insectes la muscardine blanche (Figure n°30).

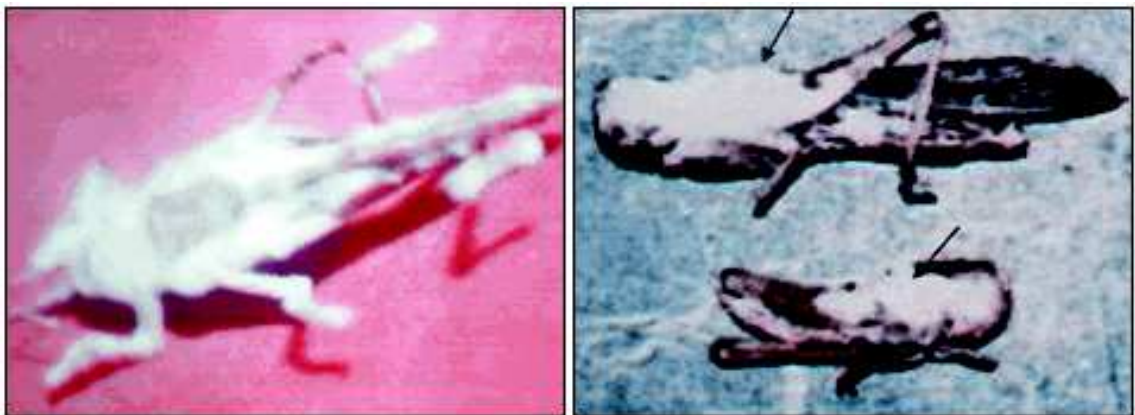


Figure n°30 - criquet pèlerin (a) et criquets migrants (b) infectés par *B.bassiana*.

III-1-2- Effet de *B. bassiana* sur la cuticule de *S. gregaria*

III-1-2-1- Effet sur le poids sec de la cuticule

a- Résultat

Le poids sec de la cuticule sternale abdominale des larves du 5^{ème} stade et des adultes de *S. gregaria* relevé le 3^{ème} jour de traitement à la DL50 enregistré par *B.bassiana* sont mentionnés sur le tableau n°19 et le graphique de la Figure n°31.

Tableau n° 19 : Poids sec en milligramme de la cuticule sternale abdominale des L5 de *S.gregaria* et adultes traités par *B. bassiana*.

Stades Répétition	L5		Adulte	
	Témoins	traités	Témoins	Traités
R1	35,84	34,28	47,29	43,5
R2	36,03	33,2	46,87	42,13
R3	36,4	31,06	45,31	42,46
R4	37	33,14	47,04	41,03
R5	37,4	32,28	46,02	41,65
R6	36,3	33,6	46,39	43,09
M±E	36,50±0,59	32,93±1,12	46,49±0,74	42,31±0,91

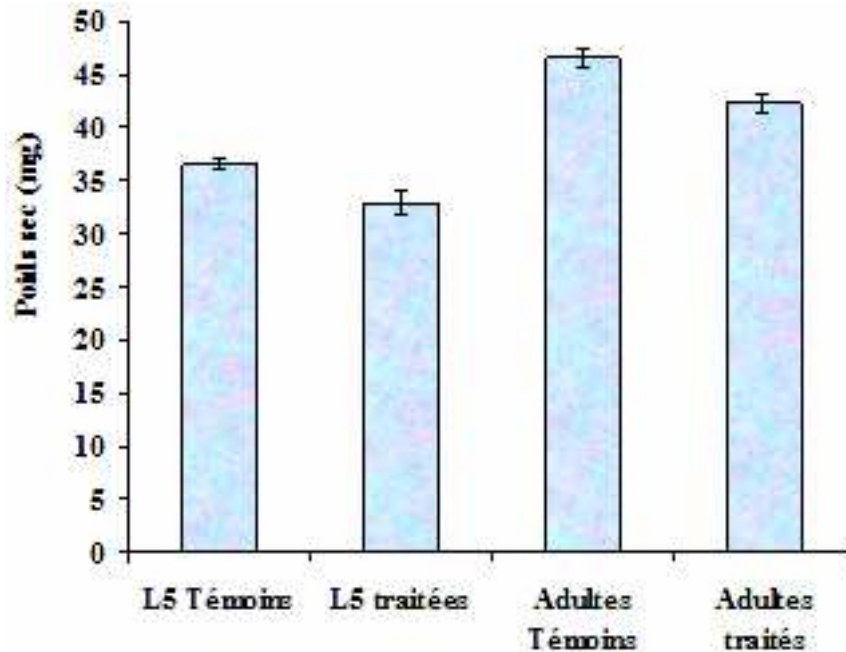


Figure n°31 – Poids sec de la cuticule sternale abdominale des L.5 et adultes de *S. gregaria*.

Le traitement des résultats du tableau n°19 est effectué par l'analyse de la variance à un critère de classification (tableau n°20).

Tableau n° 20 : Analyse de la variance sur le poids sec de la cuticule sternale abdominale des L5 de *S. gregaria* et adultes traités par *B. bassiana*.

Source de variation	DDL	Somme des carrés	Carrés moyens	F de Fisher	Pr > F
Modèle	3	653,619	217,873	291,710	< 0,0001
Résidus	20	14,938	0,747		
Total	23	668,556			

Au 3^{ème} jour de traitement, le poids sec de la cuticule a significativement baissé chez les individus traités comparativement aux individus témoins aussi bien pour les L5, de 32,93±1,12mg à 36,50±0,59mg, que pour les adultes de 42,31±0,91mg à 46,49±0,74mg respectivement (P<0,01). Le traitement a maintenu la différence de poids sec de la cuticule entre le stade L5 et adultes comme l'a été confirmé par le test de Newman et Keuls (annexell).

b- Discussion

Au moment de l'exuviation, le poids de la cuticule des insectes correspond à celui de l'exocuticule. Cependant, l'augmentation du poids qui se produit au cours du stade correspond au dépôt des nouvelles couches endocuticulaires. Vers la fin du stade larvaire le poids de la cuticule diminue, dû à une dégradation graduelle des protéines et de la chitine pour préparer la mue suivante (Nohr et Andersen, 1993).

L'interférence des substances inhibitrices comme les enzymes microbiennes telles que les protéases et chitinases fongiques et les benzoyles phényles urées (BPU) dans la formation normale de la cuticule ayant pour résultat une exuviation anormale et mortelle (Smaghe et al., 1997).

Chez les individus de *S.gregaria* expérimentés, le poids sec de la cuticule sternale abdominale est élevé chez les adultes que chez les larves du 5^{ème} stade, cette différence de poids sec cuticulaire est maintenue après le traitement au *B.bassiana*. Ce même traitement a engendré au 3^{ème} jour une diminution significative ($p < 0,05$) de poids sec de la cuticule des individus larves de $32,93 \pm 1,12$ mg à $36,50 \pm 0,59$ mg et des adultes de $42,31 \pm 0,91$ mg à $46,49 \pm 0,74$ mg de l'acridien. Cette diminution de poids résulte de l'interférence de notre traitement avec les sécrétions cuticulaires de l'insecte.

Des résultats similaires ont été rapportés par plusieurs auteurs chez divers insectes et crustacés : Chez *Cedia pomonella* traité au diflubenzuron (DFB) (Soltani-Mazouni et Soltani, 1992) ; Chez les adultes de *S.gregaria* et *Locusta migratoria* traités par *Azadirachta indica* (Nasiruddin et Mordue, 1993) ; Chez *Panaeus kerthurus* (crustacés) soumis au DFB (Sotani et al., 1995) ; Chez larves de *Locusta migratoria* traitées à l'hexaflumuron (Allache 2005) ; Chez les larves de *Spodoptera littoralis* et *S. exigua* intoxiquées au diflubenzuron (DFB) (Smaghe et al., 1997).

III-1-2-2- Effet de *B. bassiana* sur la biochimie de la cuticule de *S.gregaria*

III-1-2-2-1- Effet sur la quantité des protéines

a- Résultat

La quantité en protéines totales de la cuticule sternale abdominale chez les larves L5 et les adultes de *S.gregaria* sont portées sur le tableau n°21 et le graphique de la Figure n°32.

Tableau n° 21 : Quantité en protéines totales (mg) dans la cuticule sternale abdominale des L5 et adultes de *S. gregaria* traités par *B. bassiana*.

Stade Répétition	L5		Adulte	
	Témoins	traités	Témoins	Traités
R1	29,20	26,43	38,16	37,27
R2	28,65	26,00	39,12	38,21
R3	29,97	26,34	39,71	37,75
R4	27,42	26,10	38,34	37,50
R5	30,07	27,31	39,7	38,49
R6	29,40	26,71	39,42	38,07
M±E	29,12±0,98	26,48±0,48	39,08±0,68	37,88±0,46

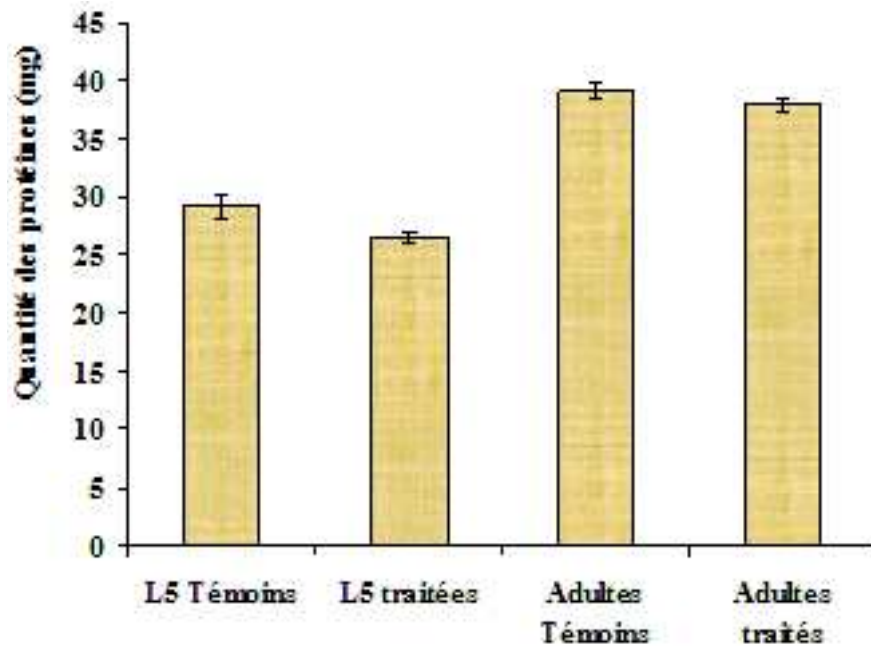


Figure n°32 - La quantité des protéines dans la cuticule sternale abdominales des L5 et des adultes de *S. gregaria* témoins et traités à la DL.50 de *B. bassiana*.

Pour confirmer statistiquement l'effet de *B. bassiana* sur la quantité en protéines dans la cuticule sternale abdominale des L5 et des adultes de *S. gregaria* au 3^{ème} jour de traitement nous avons fait appel à l'analyse de la variance à un seul critère de classification (Tableau n°22).

Tableau n°22 : Analyse de la variance sur la quantité des protéines dans la cuticule sternale abdominale des L5 et des adultes de *S. gregaria* témoins et traités à la DL50 de *B. bassiana*.

Source de variation	DDL	Somme des carrés	Carrés moyens	F de Fisher	Pr > F
Modèle	3	709,289	236,430	508,331	< 0,0001
Résidus	20	9,302	0,465		
Total	23	718,591			

A travers les résultats affichés sur les tableaux n°21 et n°22, ressort que le traitement au *B. bassiana* a significativement diminué ($P < 0,05$) la quantité des protéines contenues dans la cuticule sternale abdominale des L5 (de $29,12 \pm 0,98$ à $26,48 \pm 0,48$) et des adultes (de $39,08 \pm 0,68$ à $37,88 \pm 0,46$) de *S. gregaria* chez la série traité par rapport à la série témoins.

La quantité des protéines de la cuticule des adultes est significativement plus élevée que celle des larves avant et après traitement, révélé par le test de Newman et Keuls (annexe II).

b- Discussion

La cuticule des acridiens contient surtout de la chitine (polymère de N .acétyl glucosamine) et des protéine qui sont liées fortement à celle-ci, l'ensemble forme la microfibre qui est elle aussi emballée dans une enveloppe protéique plus ou moins compacte (Rudall, 1963).

La cuticule se compose également de glycoprotéine, de phénol poly hydrique, d'enzymes, de lipides, de pigments et de constituants inorganiques (Wigglesworth, 1972). Les éléments fibreux de polysaccharide (chitine) inclus dans une matrice protéinique de cet composé biphasé forme la structure de support externe d'un insecte.

Les propriétés mécaniques de la cuticule dépendent des teneurs relatives, de la distribution et de la composition de chaque phase (Reynolds, 1987). Les protéines contribuent de manière significative dans la solidité et la rigidité de la cuticule (Hillerton et Vincent, 1979).

Sous forme de complexe glycoprotéique plus au moins stable, les protéines représentent de 25% à 37% du poids sec de la cuticule des orthoptères (Raccaud Schoeller, 1980).

Chez les autres ordres d'insectes le pourcentage en protéines dans la cuticule est soit beaucoup plus élevée, soit il avoisine celui des orthoptères. Il s'élève à : 63,3% chez les larves 'pharates' de *Tenebrio molitor* (Andersen, 2002); 72,0% Chez *Rhodnius prolixus*; 71,4% chez *Triatoman phyllosoma pallidipenis*; et 35,28% chez *Calliphora vomitoria* (Hillerton et Vincent, 1979 et Hillerton et Purslow 1981).

D'après les résultats obtenus, les protéines représentent les constituants majeurs de la cuticule sternale abdominale du criquet pèlerin durant le 5^{ème} stade larvaire et le stade adulte (tableau n°21 et Figure n°32). La sécrétion protéinique suit une allure décroissant au cours des stades de développement du criquet pèlerin (Dhouib, 1994).

Cet auteur a mentionné une teneur en protéines dans la cuticule des L5 (84%) supérieure celle noté chez les adultes (78%) valeurs qui se rapprochent de ceux obtenues dans notre expérimentation.

Au 3^{ème} jour de traitement par *B.bassiana*, on note une réduction significative ($p < 0,05$) de la quantité des protéines dans la cuticule des individus témoins par rapport au individus traités de $29,12 \pm 0,98$ mg à $26,48 \pm 0,48$ mg chez les larves L5 et de $39,08 \pm 0,68$ mg à $37,88 \pm 0,46$ mg chez les adultes.

Cette diminution est tributaire de la dégradation protéinique sous l'action de la protéinase extracellulaire (trypsine) secrété par l'appressoria au moment de la pénétration de l'hyphe comme l'ont montré les travaux de Raymond et al. (1995) sur l'infection de *Manduca sexta* par *M. anisopliae*.

De même, Halouane (1997) avait noté une réduction significative de taux de protéines cuticulaires chez les larves et adultes de *S.gregaria* traités au *M.anisopliae*. Certains dérégulateurs de croissance des insectes comme le chlorfluazuron, la cyromazine ont un effet inhibiteur de synthèse de toutes les protéines cuticulaires (Kotze et Reynolds, 1991 et Retnakaran et al., 1996).

Alors que d'autres comme le flucycloxon et le triflumuron n'ont aucun effet comme l'a souligné Morsli (1994) cité par Abbasi et Hamza (1995) sur respectivement *Panaeus kerathurus* et *Tenebrio molitor*.

III-1-2-2-2- Effet sur la quantité de chitine

a- Résultat

Les quantités de chitine de la cuticule sternale abdominale chez les larves L5 et les adultes de *S.gregaria* témoins et traités par *B.bassiana* sont portés sur le tableau n°23 et le graphique de la Figure n°33.

Tableau n° 23 : Quantité de chitine (mg) dans les cuticules sternales abdominales des L5 et adultes de *S. gregaria* traités par *B. bassiana*.

Stade Répétition	L5		Adulte	
	Témoins	Traités	Témoins	Traités
R1	6,64	7,85	9,13	4,88
R2	7,37	7,20	7,75	3,92
R3	6,43	4,72	7,60	4,71
R4	7,58	7,02	8,71	3,53
R5	7,33	4,97	6,32	3,16
R6	6,90	6,89	7,97	5,02
M±E	7,38±1,14	6,44±1,28	7,41±1,37	4,20±0,77

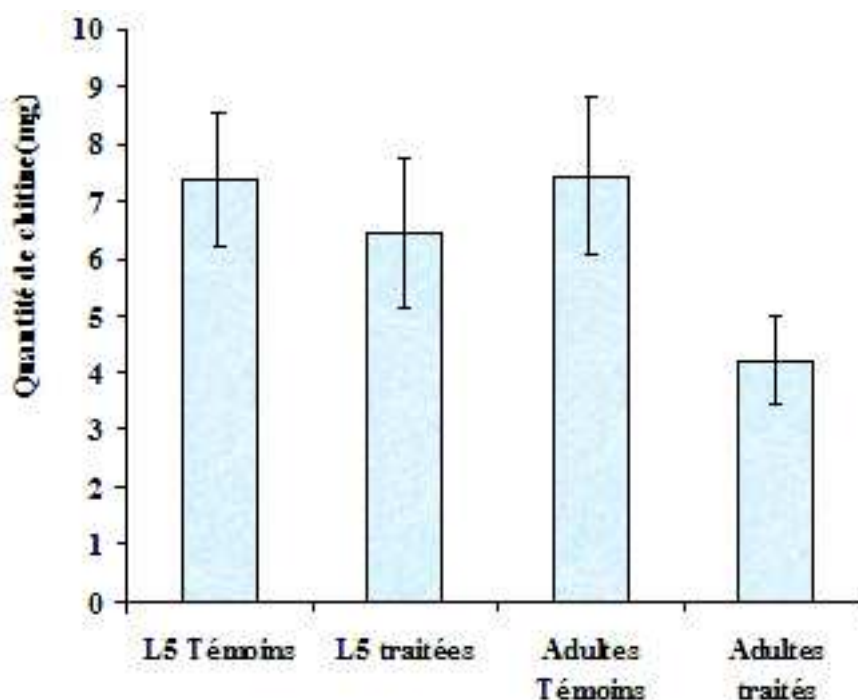


Figure n°33 - quantité des chitines dans la cuticule sternale abdominales des L.5 et des adultes de *S. gregaria* témoins et traités à la DL.50 de *B. bassiana*.

Les résultats relatifs à la quantité de chitine dans la cuticule sternale abdominale des L5 et des adultes de *S.gregaria* au 3^{ème} jour de traitement par *B. bassiana* ont été traités statistiquement par l'analyse de la variance à un seul critère de classification dont les résultats sont portés sur le tableau n°24.

Tableau n°24 : Analyse de la variance sur la quantité de chitine dans la cuticule sternale abdominale des L5 et des adultes de *S. gregaria* témoins et traitée à la DL50 de *B.bassiana*.

Source de variation	DDL	Somme des carrés	Carrés moyens	F de Fisher	Pr > F
Modèle	3	45,174	15,058	17,668	< 0,0001
Résidus	20	17,046	0,852		
Total	23	62,220			

A travers les résultats affichés sur les tableaux n°23 et n°24, ressort que le traitement au *B.bassiana* a significativement diminué ($P < 0,01$) la quantité en chitine contenue dans la cuticule sternale abdominale des L5 (de $7,38 \pm 1,14$ à $6,44 \pm 1,28$) et des adultes de ($7,41 \pm 1,37$ à $4,20 \pm 0,77$) de *S.gregaria* chez la série traitée par rapport à la série témoins.

La quantité de chitine de la cuticule des adultes est significativement plus élevée que celle des larves avant et après traitement, révélé par le test de Newman et Keuls (cité en annexe).

a- Discussion

La chitine est un constituant important dans la cuticule des insectes. L'excès ou la carence de chitine au cours de n'importe quel cycle morphogénétique peut produire des effets néfastes et mortels aux insectes (Kramer et al., 1986).

Puisque la chitine est une caractéristique des arthropodes, une cible particulièrement potentielle et prometteuse pour un insecticide spécifique du tégument semblerait être en relation avec certains aspects du métabolisme de la chitine. Ceci pourrait inclure la biosynthèse ou la dégradation de cette dernière (Reynolds, 1989).

La teneur en chitine cuticulaire diffère d'une espèce à une autre et d'un stade à un autre, les larves de *Tenebrio molitor* contiennent 21,7% de chitine par poids sec de la cuticule, 22,0% sont extraites de la cuticule des fémurs d'imagos de *Locusta migratoria* (Vincent et Clarke, 1985 ; Andersen, 2002), 11,5% et 11,6% du poids sec de la cuticule chez *Rhodnius prolixus* et *Triatoma phyllosoma pallidipenis* (Hillerton et Purslow, 1981) et 48,4% du poids sec de la cuticule des larves de *Calliphora vomitoria* (Hillerton et Vincent, 1979).

Notre étude a également montrée que les quantités de chitine contenues dans la cuticule abdominale des adultes sont nettement plus élevées que celles contenues dans la cuticule des larves L5.

Nos résultats concordent avec ceux trouvés par Dhoub (1994), lequel a enregistré une teneur en chitine cuticulaire de 13,08% chez les L5 et 16,80 % chez les adultes du criquet pèlerin.

La chitine peut être dissoute et hydrolysée par plusieurs corps chimiques tels que les acides dilués, les acides minéraux concentrés, l'acide formique, l'hypochlorite de sodium, l'alcool, l'éther et les solvants des corps gras etc...

On a rapporté que beaucoup de composés perturbent la synthèse de chitine. Il a été notifié aussi que plusieurs composés rapportés comme inhibiteurs de la synthèse de chitine sont plutôt inefficaces et agissent seulement à des concentrations élevées telle est le cas des acyles urées et le composé buprofezin qui est un produit spécifique des homoptères (Reynolds, 1989).

Dans la nature plusieurs organismes par le biais de leur équipement enzymatique peuvent dégrader la chitine, comme la bactérie *Bacillus chitinovor* et les champignons hyphomycète *Metarhizium anisopliae* et *Beauveria bassiana* (Ferron et al., 1991).

En effet, Raymond *et al.* (1995) et Sun Chul *et al.*, (1998) ont pu mettre en évidence la présence des chitinases extracellulaires de type acétyl-b-D-glucosaminidases facteurs de virulence dans l'entomopathogénicité fongique élaborés par trois entomopathogènes *M.anisopliae* ; *M. flavoviride* et *B bassiana*, ces enzymes chitinolytique sont induites lors de la pénétration primaire de l'hyphe dans la cuticule de *Manduca sexta*.

Nos résultats mettent en évidence une réduction significative ($p < 0,05$) du contenu en chitine dans la cuticule sternale abdominale des larves de 5^{ème} stade et des adultes de *S.gregaria* au 3^{ème} jour de traitement par *B.bassiana* de $7,38 \pm 1,14$ à $6,44 \pm 1,28$ et de $7,41 \pm 1,37$ à $4,20 \pm 0,77$ respectivement.

Dans le même sens les résultats des les travaux de Raymond *et al.* (1995) ont révélé une réduction significative du contenu en chitine de la cuticule de scarabé *Blaberus giganteus* traité par *M .anisopliae*. Ce même champignon a produit le même effet vis-à-vis des larves et des adultes de *S.gregaria* et de *Locusta migratoria* comme l'ont souligné respectivement Halouane (1997) et Bouhacein (1999).

Pour les produits dérégulateurs de croissance l'étude réalisée par Vincent et Clarke (1985) sur l'effet du diflubenzuron sur les cuticules de fémur, de tergite et de la membrane intersegmentaire des adultes de *Locusta migratoria migratorioides* cause une réduction significative de la teneur en chitine. Cette réduction est complète dans la membrane intersegmentaire.

Le dérivé SIR8514 de benzoyle phényle urée a empêché la synthèse de chitine dans les cellules de *Chironomus tentans* (Spindler-barth *et al.*, 1989) et chez les larves L3 de *Lucilia cuprina* (Londershausen *et al.*, 1988). Dahoun (2000) et Allache (2001) ont enregistré une diminution de la quantité de chitine chez les larves de *L.migratoria* traité respectivement par le teflubenzuron et l'hexaflumuron.

De même les facteurs externes telle que les températures trop basses ou trop élevés inhibe sévèrement la synthèse de la chitine chez les insectes (Chandler *et al.*, 1991).

III-1-2-3- Effet de *B. bassiana* sur la structure de la cuticule de *S. gregaria*

a- Résultat

La cuticule des larves de 5^{ème} stade de *S.gregaria* mise en évidence grâce à la coloration différentielle à l'azan de Heidenhain, montre la présence de l'épicuticule, d'exocuticule et de l'endocuticule.

L'épicuticule colorée en rouge se présente comme une mince couche à la surface de la cuticule des L5 de *S.gregaria* et l'exocuticulaire colorée en orange moins mince que la première et une partie incolore d'une épaisseur plus grande correspond à l'endocuticule (Figure n°34a).

L'application de *B.bassiana* sur le tégument des larves de 5^{ème} stade de *S.gregaria* a été tributaire d'une perturbation apparente au niveau de la structure de la cuticule.

En effet au troisième jour de traitement on a pu observé une disparition complète de l'épicuticule et une nette régression dans l'épaisseur de l'exo et l'endocuticule (Figure n°34b) et ce comparativement à la cuticule des larves témoins ou les trois couches sont bien distinctes et apparentes avec une épaisseur visiblement plus grande (Figure n°34a).

La déstructuration des couches cuticulaires chez les larves traitées est probablement due à leur dégradation par les enzymes protéolytiques et chitinolytiques de l'unité infectieuse de notre souche fongique, la spore dont on a repéré quelques cellules au niveau des parties de la cuticule digérées (Figure n°35).

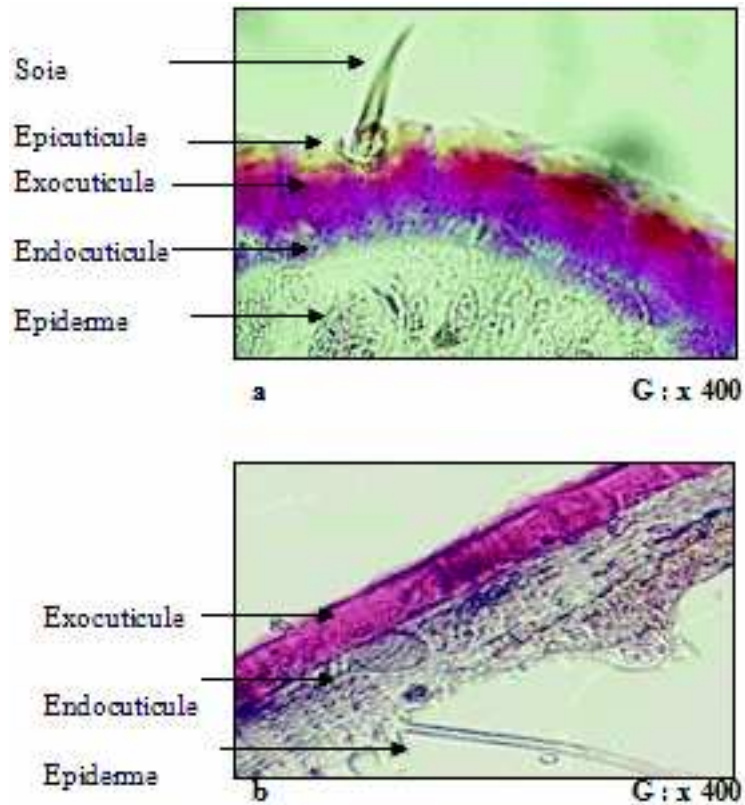


Figure n°34 – Structure de la cuticule des L5 de *S. gregaria* témoins (a) et traités (b) au *B. bassiana*.

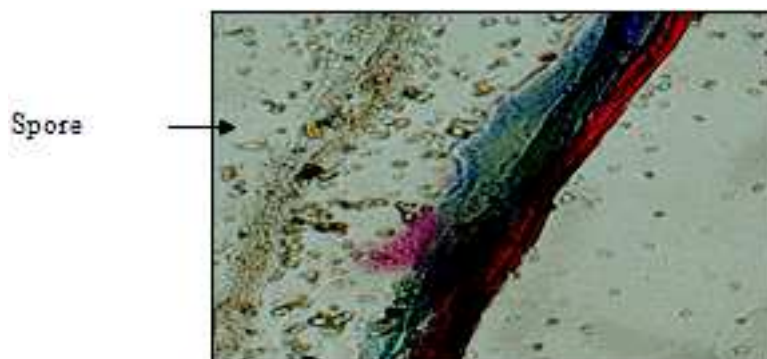


Figure n°35 - Spores de *B. bassiana* entourant la cuticule des L5 de *S. gregaria* traitée au *B. bassiana*.

b- Discussion

La cuticule des arthropodes avec son épiderme sous-jacent forme le tégument. Elle joue à la fois le rôle d'exosquelette et de barrière entre l'environnement et l'animal, elle tapisse toute la surface du corps s'invagine au niveau du tube digestif et du système respiratoire.

La croissance de l'insecte ne peut s'effectuer sans un rejet périodique de la cuticule, c'est le phénomène de mue. Elle en subit également au cours du cycle de développement lorsque l'insecte chez les hétérométaboles passe du stade larvaire à adulte et chez les holométaboles du stade larvaire à nymphale puis à adulte.

De point de vue structure on y reconnaît selon la composition chimique deux principales couches l'épicuticule externe, mince, non chitineuse et la procuticule interne (exocuticule et endocuticule), plus épaisse et chitineuse (Grasse, 1949 ; Wigglesworth, 1972 et Raccaud Schoeller, 1980, Retnakaran et *al.*, 1996).

Les particularités de la cuticule donnent à l'insecte son aspect. Outre les soies articulées et autres sensilles, qui hérissent la surface, tout un relief caractéristique peut être décelé: crêtes, granulation, spinules ou micro triches. La présence de pigments dans les cellules épidermiques ou dans la cuticule donne à l'insecte sa coloration.

Mais, de nombreux insectes présentent des couleurs structurales ; certaines sont iridescentes, changeant selon l'angle de vision et elles sont dues à des effets d'interférence causée par de fines structures périodiques présentes sur les écailles ou sur le revêtement cuticulaire du corps. (Raccaud Schoeller, 1980) (Figure n°36).

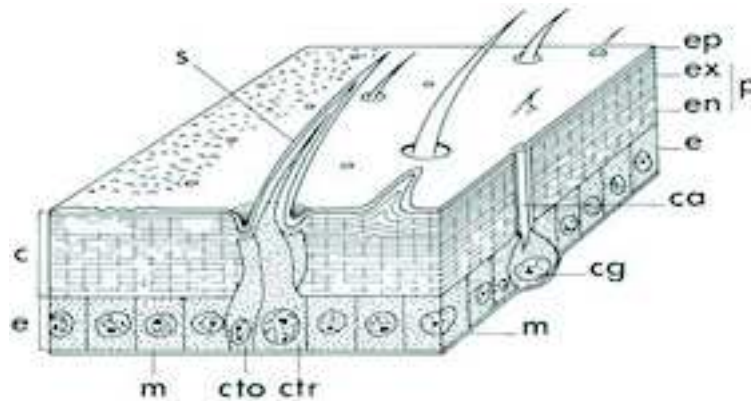


Figure n°36 - Reconstitution schématique du tégument en trois dimensions (Raccaud-Schoeller, 1980).

c : cuticule, **ca** : canal glandulaire, **cg** : cellule glandulaire, **cto** : cellule tormogène, **ctr** : cellule trichogène, **e** : épiderme, **en** : endocuticule, **ép** : épicuticule, **ex** : exocuticule, **m** : membrane basale, **p** : procuticule, **s** : soie.

Chez les L5 témoins grâce à la coloration différentielle à l'azan de Heidenhain on arrive à reconnaître la structure habituelle de la cuticule avec ces différentes couches: l'épicuticule, d'exocuticule et de l'endocuticule. De pareilles structures avec de pareils aspects ont été observées chez *Locusta migratoria* par Povolny et Weyda, (1981) et Allache (2005) utilisant la coloration différentielle à l'azan de Heidenhain.

L'application de *B.bassiana* a fortement perturbé cette structure, on observe la dégénérescence de ces différentes parties (Figure n°34b). Cette déstructuration a engendré comme signes externes une mue perturbée et bloquée révélant un aspect froissé ; onduleux et desséchées.

Ces signes sont similaires à ceux observés avec d'autres inhibiteurs chez divers insectes exposés à différents traitements par Percy-Cunningham et *al.* (1987) évaluant l'effet de chlorfluazuron, un inhibiteur de synthèse de chitine, sur *Choristoneura fumiferana* et

également par Salama *et al.* (2002) étudiant l'effet de l'hématoporphyrin (a photo-activated insecticide) sur *Culex pipiens* rendant l'endocuticule et l'exocuticule non distinguable.

Chez les larves de *Schistocerca gregaria* traitées au *M.anisopliae* (Halouane, 1997) et à l'analogue d'hormone juvénile (JH III) (Injeyan *et al.*, 1979).

Toutefois, les processus biochimiques impliqués et les structures perturbées dans le mode d'action diffèrent entre les inhibiteurs. Beaucoup d'inhibiteurs de croissance des insectes compromettent la synthèse et le dépôt de chitine dans la cuticule (Retnakaran *et al.*, 1996). Cependant, c'est le manque de chitine dû à l'inhibition de sa biosynthèse qui est la cause de la forme amorphe de cette région de la cuticule.

Les inhibiteurs de synthèse tel que les benzoyles phényles urées inhibent la jonction entre le glucide aminé et la protéine qui forment les microfibrilles (Percy-Cunningham *et al.*, 1987). Les microfibrilles rencontrées communément dans cette région se composent de protéines et de chitine et requièrent de la chitine pour son élaboration (Reynolds, 1987).

Son architecture principale vient des composants de chitine déposés et probablement orientés à la surface des cellules (Locke, 2001). Chez les inhibiteurs biologique tel que les champignons entomopathogènes et précisément au cours de processus d'infection de *B.bassiana* au niveau du tégument des insectes, quatre étapes sont à distinguer : l'adhésion, la germination, la différenciation et la pénétration.

L'adhésion est caractérisée par un mécanisme de reconnaissance et de compatibilité des conidies avec des cellules tégumentaires de l'insecte (Vey *et al.*, 1996). Cette phase se scinde en deux étapes distinctes, la première passive ou l'attachement à la cuticule est réalisé grâce à des forces hydrophobiques et électrostatiques (Fargues et Rodriguer-Rueda D., 1980) et la seconde active caractérisée par la production d'un mucilage qui va engendrer une modification épicuticulaire aboutissant à la germination (Ferron *et al.*, 1991).

Après la phase d'adhésion, la germination va être dépendante des conditions environnantes et aussi de la physiologie de l'hôte (composition biochimique de la cuticule) qui peut favoriser ou inhiber la germination (Amouriq, 1973 ; Ferron *et al.*, 1991).

L'avant dernière phase est la différenciation caractérisée par la production d'appressorium structures terminales qui vont servir de point d'encrage, de ramollissement de la cuticule et favoriser la pénétration. La production des appressoria est très dépendante de la valeur nutritive de la cuticule qui va stimuler la croissance mycélienne plutôt que la pénétration.

La dernière phase est la pénétration de l'hôte qui se fait par la combinaison de pression mécanique et enzymatique telles que les lipases, les protéases et les chitinases (Ferron *et al.*, 1991). Pour accélérer le processus d'infection certaines souches produisent des toxines non enzymatiques telles que la beauvericine, les beauverolides, les bassianolides et les isarolides.

La colonisation de l'hôte se fait lorsque le champignon parvient à surmonter les mécanismes immunitaires de défense de l'insecte et envahit l'hémolymphe (Mazet et Boucias, 1995) (Figure n°37).

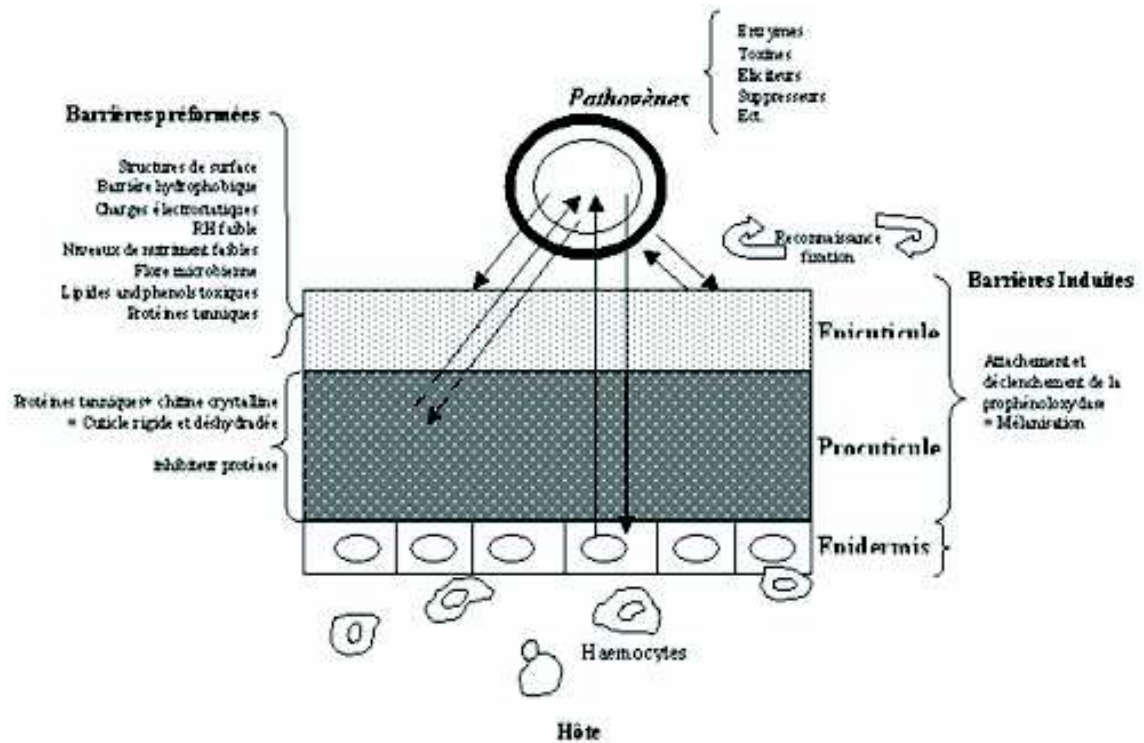


Figure n°37 - Schéma du mode d'infection illustrant les composantes majeures des interactions entre les insectes et les pathogènes durant la pénétration cuticule (St-Leger, 1993).

A la mort de l'insecte, le champignon produit un antibiotique : oosporine qui va lui permettre de surmonter la compétition bactérienne. La phase saprophyte va être caractérisé par la momification du cadavre transformé en sclérote. Les hyphes traversent le tégument préférentiellement au niveau inter segmentaire puis le recouvre d'un feutrage mycélien blanc cotonneux qui va amorcer la formation des conidiospores (Keith et Kevan, 1992) (Figure n°38).

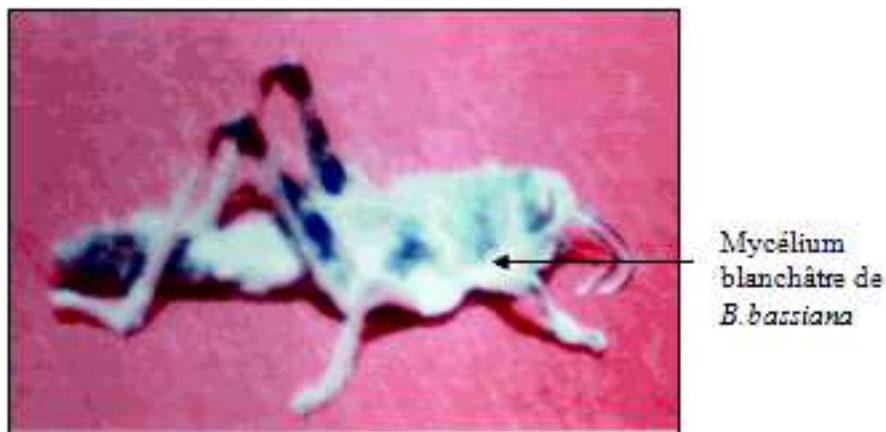


Figure n°38 - Phase saprophytique de l'infection des larves de *S.gregaria* par *B.bassiana*.

III-1-2-4- Effet de *B. bassiana* sur l'hémogramme de *L. migratoria*

a- Résultats

1. Identification des hémocytes

A travers les observations effectuées nous avons pu déterminer chez les L5 et les adultes de *L. migratoria* trois catégories cellulaires sanguines. En se basant sur la forme et la taille d'hémocytes, nous avons identifié :

- **Les prohéocytes** : Ils sont de petite taille avec un grand noyan. De forme sphérique, ils présentent un diamètre de taille moyenne de $8,73 \pm 0,70 \mu\text{m}$.
- **Les prohéocytes** : Ils sont caractérisés par un noyau rond ou ovoïde basophile et une forme le plus souvent fusiforme. Leur taille est de $11,83 \pm 1,32 \mu\text{m}$.
- **Les granulocytes** : Ces éléments sont très proches des précédents du point de vue forme, pourvus d'une granulations abondante d'une taille avoisinant $13,16 \pm 1,32 \mu\text{m}$.

1. Effet de *B. bassiana* sur l'hémogramme

L'hémogramme est un état des hémocytes des insectes à un moment bien déterminé de leur âge. Il nous renseigne sur le nombre total d'hémocytes par unité de volume d'hémolymphe ou T.H.C, sur le nombre d'hémocytes relatifs aux catégories hémocytaires étudiées par unité de volume d'hémolymphe ou P.H.C et sur le nombre d'hémocytes relatifs à chaque catégorie par unité de volume d'hémolymphe ou D.H.C (Anold, 1974).

III-1-2-4-1- Effet de *B. bassiana* sur le P.H.C

Nous Avons compté le nombre d'hémocytes confondus des catégories déterminées dans la quantité prélevée ($4 \mu\text{l}$) chez les L5 et les adultes de *L. migratoria* témoins et traités au 3^{ème} jour après traitement (tableau n°25 et n°26 et Figure n°39 et n°40).

Tableau n°25 : Nombre total d'hémocyte chez les adultes de *L. migratoria* témoins et traités au *B. bassiana* au 3^{ème} jour après traitement.

Répétitions	Témoins	Traités
R1	81	84
R2	109	66
R3	71	41
R4	54	57
R5	95	31
M \pm E	$82 \pm 21,24$	$55,8 \pm 20,82$

Tableau n°26 : Nombre total d'hémocyte chez les adultes de *L. migratoria* témoins et traités au *B. bassiana* au 3^{ème} jour après traitement.

Répétitions	Témoins	Traités
R1	105	105
R2	135	80
R3	141	99
R4	159	112
R5	167	98
M \pm E	$150,4 \pm 12,92$	$98,8 \pm 11,90$

L'analyse de la variance à deux critères de classification fait ressortir les résultats mentionnés sur le tableau suivant.

Tableau n°27 : Analyse de la variance : Effet de *B.bassiana* sur le nombre total d'hémocytes chez les L5 et adultes de *L. migratoria*.

Source de variation	DDL	Somme des carrés	Carrés moyens	F de Fisher	Pr > F
Modèle	29	43775,46	1509,50	69,60	0,0000
Résidus	1	21226,80	21226,80		
Total	24	7319,60	304,98		

L'analyse de la variance (tableau n°27) montre une différence très hautement significative chez la série témoin par rapport à la série traitée. Le traitement a donc significativement réduit le nombre total d'hémocytes chez les L5 et adultes traités comparativement aux témoins.

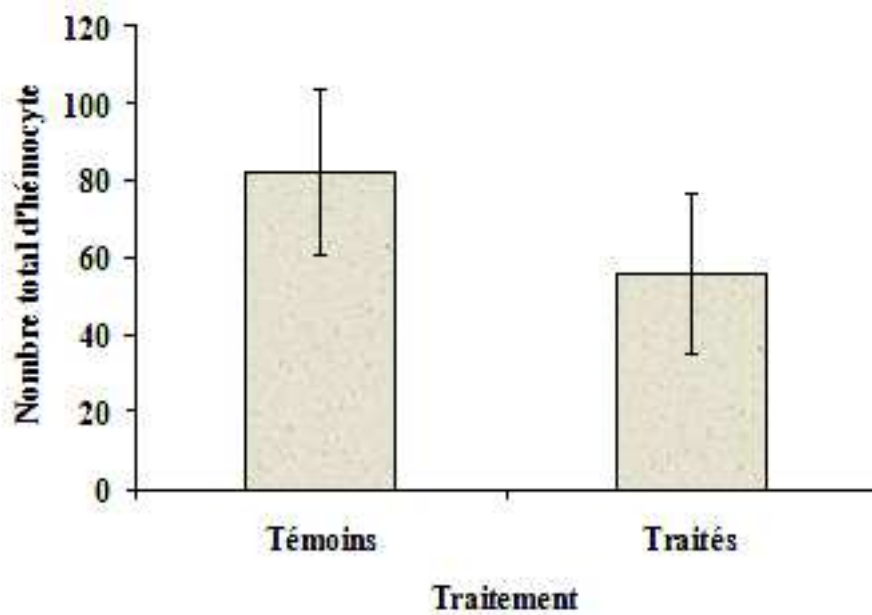


Figure n°39 – Nombre total d'hémocyte chez les L.5 de *L. migratoria* témoins et traités au *B.bassiana*.

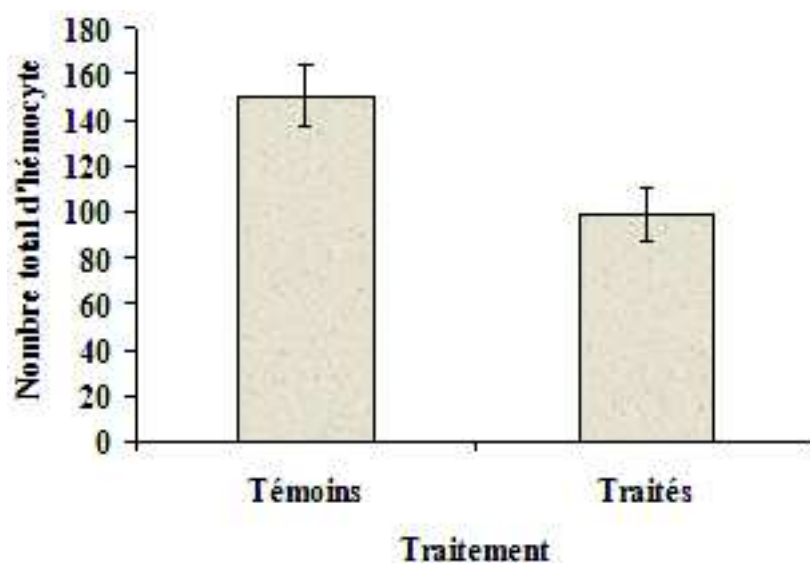


Figure n°40 – Nombre total d'hémocyte chez les adultes de *L. migratoria* témoins et traités au *B. bassiana*.

III-1-2-4-2- Effet de *B. bassiana* sur le D.H.C

III-1-2-4-2-1- Effet sur les prohémyocytes

A partir du volume d'hémolymphe prélevé (4 μ l) nous avons compté le nombre total de prohémyocytes relatif à chaque individu. Les résultats sont portés sur les tableaux n°28 et n°29 et illustrés par les Figures n°41 et n°42.

Tableau n°28 : Nombre total de prohémyocyte chez L5 de *L. migratoria* témoins et traités au *B. bassiana* au 3^{ème} jour après traitement.

Répétitions	Témoins	Traités
R1	37	51
R2	64	24
R3	21	13
R4	35	26
R5	41	17
M \pm E	39,6 \pm 15,58	26,2 \pm 14,82

Tableau n°29 : Nombre total de prohémyocyte chez les adultes de *L. migratoria* témoins et traités au *B. bassiana* au 3^{ème} jour après traitement.

Répétitions	Témoins	Traités
R1	53	46
R2	49	37
R3	57	50
R4	61	48
R5	58	43
M \pm E	55,6 \pm 4,66	44,8 \pm 5,06

Le résultat du test statistique à deux critères de classification est mentionné sur le tableau suivant.

Tableau n°30 : Analyse de la variance : Effet de *B.bassiana* sur le nombre total de prohémoctes chez les L5 et adultes de *L. migratoria*.

Source de variation	DDL	Somme des carrés	Carrés moyens	F de Fisher	Pr > F
Modèle	29	7247,37	249,91	18,80	0,0003
Résidus	1	2167,50	2167,43		
Total	24	2767,20	115,30		

L'analyse statistique (tableau n°30) montre une différence entre le nombre de prohémoctes des séries traitées par rapport aux témoins. Le traitement a significativement réduit le nombre de prohémoctes chez les L5 et les adultes traités comparativement aux témoins.

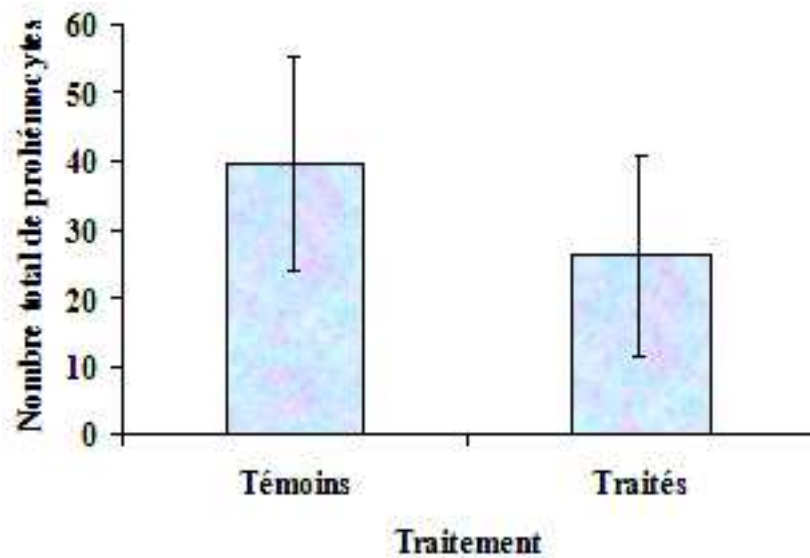


Figure n°41 – Nombre total de prohémoctes chez les L5 de *L. migratoria* témoins et traités au *B.bassiana*.

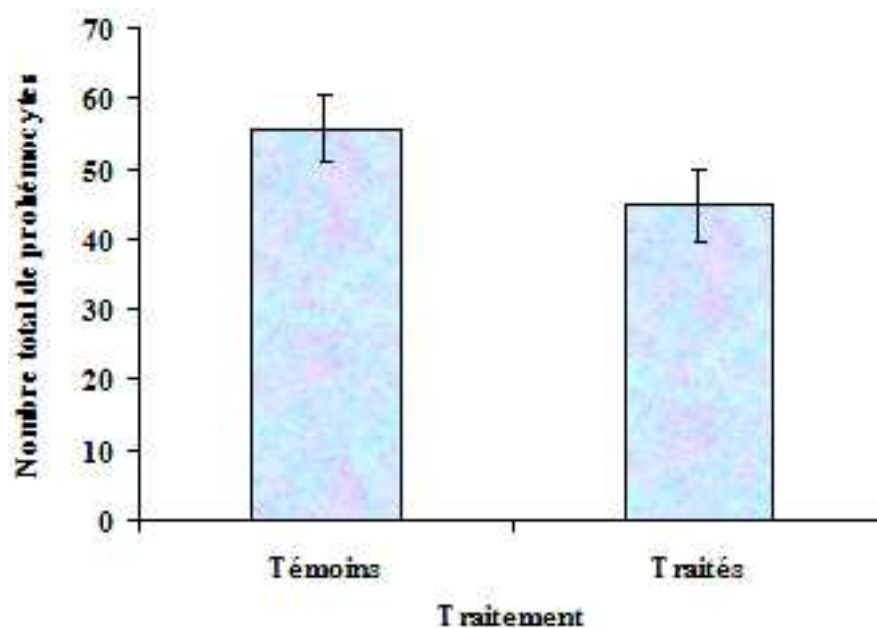


Figure n°42 – Nombre total de prohémoocytes chez les adultes de *L. migratoria* témoins et traités au *B.bassiana*.

III-1-2-4-2-2- Effet sur les plasmatoctes

Le nombre des plasmatoctes chez les L5 et les adultes témoins et traités sont consignés sur les tableaux n°31 et n°32 et les Figures n°43 et n°44.

Tableau n°31 : Nombre total de plasmatoctes chez les L5 de *L. migratoria* témoins et traités au *B. bassiana* au 3^{ème} jour après traitement.

Répétitions	Témoins	Traités
R1	14	22
R2	39	16
R3	27	20
R4	15	18
R5	31	7
M ± E	25,2± 10,68	16,6±5,81

Tableau n°32 : Nombre total de plasmatoctes chez les adultes de *L. migratoria* témoins et traités au *B. bassiana* au 3^{ème} jour après traitement.

Répétitions	Témoins	Traités
R1	59	40
R2	62	31
R3	55	26
R4	67	37
R5	66	34
M ± E	61,8± 4,97	33,6±5,41

Les données des tableaux précédents ont été traités statistiquement par l'analyse de la variance à deux critères de classification (tableau n°33).

Tableau n°33 : Analyse de la variance : Effet de *B.bassiana* sur le nombre total des plasmatocytes chez les L5 et les adultes de *L. migratoria*.

Source de variation	DDL	Somme des carrés	Carrés moyens	F de Fisher	Pr > F
Modèle	29	9425,87	325,03	58,56	0,0000
Résidus	1	4662,54	4662,54		
Total	24	1910,80	79,62		

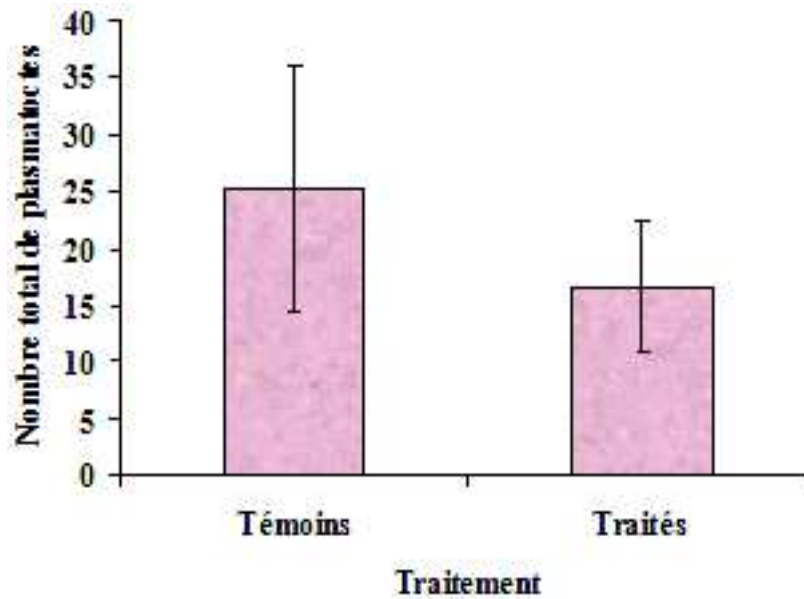


Figure n°43 – Nombre total de plasmatocytes chez les L.5 de *L. migratoria* témoins et traités au *B.bassiana*.

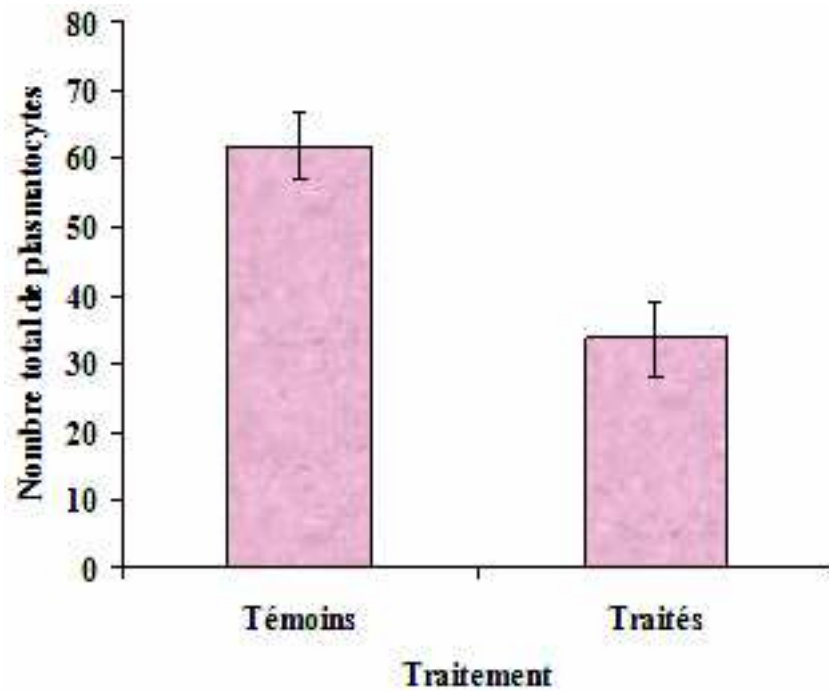


Figure n°44 – Nombre total de plasmatocytes chez les adultes de *L. migratoria* témoins et traités au *B. bassiana*.

III-1-2-4-2-3- Effet sur la quantité des granulocytes

Le nombre et le taux de granulocytes chez les L5 et les adultes témoins et traités sont consignés sur les tableaux n°34 et n°35 et les Figures n°45 et n°46.

Tableau n°34 : Nombre total des granulocytes chez les L5 de *L. migratoria* témoins et traités au *B. bassiana* au 3^{ème} jour après traitement.

Répétitions	Témoins	Traités
R1	38	19
R2	24	22
R3	29	23
R4	31	27
R5	43	21
M ± E	33± 7,52	22,4±2,97

Tableau n°35 : Nombre total des granulocytes chez les adultes de *L. migratoria* témoins et traités au *B. bassiana* au 3^{ème} jour après traitement.

Répétitions	Témoins	Traités
R1	30	11
R2	16	26
R3	23	8
R4	4	13
R5	23	7
M ± E	19,2± 9,83	13±7,64

L'analyse de la variance à deux critères de différentiation nous donne les résultats consignés sur le tableau n°36.

Tableau n°36 : Analyse de la variance : Effet de *B.bassiana* sur le nombre total des granulocytes chez les L5 et les adultes de *L. migratoria*.

Source de variation	DDL	Somme des carrés	Carrés moyens	F de Fisher	Pr > F
Modèle	29	2768,30	95,46	22,14	0,00001
Résidus	1	952,03	952,03		
Total	24	1032,00	43,00		

L'étude statistique (tableau n°36) nous amènent à constater que le traitement provoque une diminution significative du nombre de granulocytes ($p < 0,05$) des L5 et adultes de *L.migratoria* chez la série traitée par rapport aux témoins.

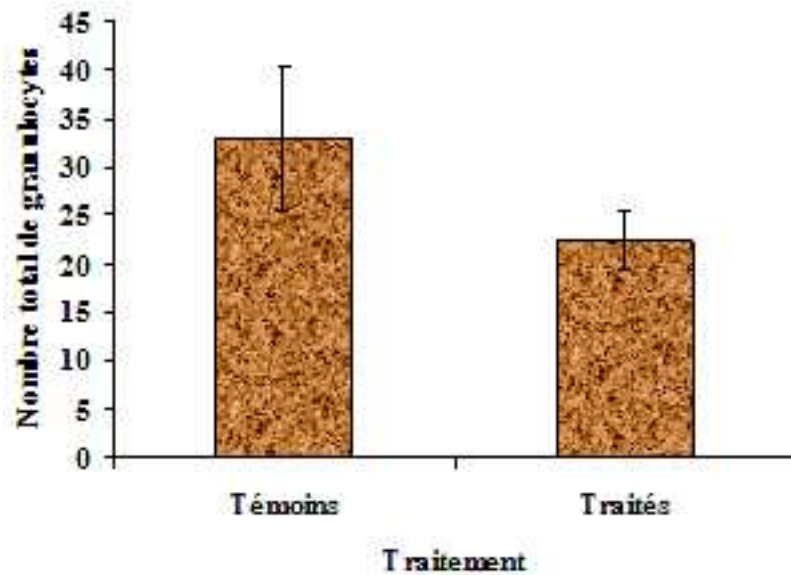


Figure n°45 – Nombre total de granulocytes chez les L.5 de *L. mgratoria* témoins et traités au *B.bassiana*.

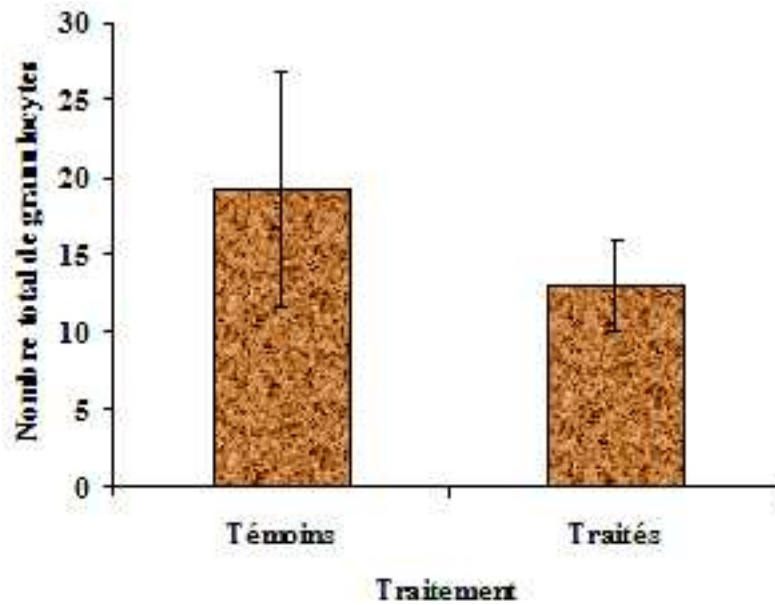


Figure n°46 – Nombre total de granulocytes chez les adultes de *L. migratoria* témoins et traités au *B.bassiana*.

b- Discussion

L'infection de l'hémolymphe des L5 et des adultes de *L.migratoria* par l'entomopathogène *B.bassiana* s'est traduite par une réaction cellulaire, que nous avons apprécié sur le plan quantitatif (formule hémocytaires) et sur le plan qualitatif (numération).

1. Cytologie quantitative

Plusieurs types d'hémocytes ont été décrits, mais leur classification est rendue problématique à cause des apparences qu'ils prennent et qui changent selon les conditions et les techniques empruntées pour leur étude.

Pour notre part, l'examen microscopique après coloration par le May-Grunwald - Giemsa nous a permis d'observer trois types cellulaires chez les L5 et les adultes du criquet migrateur aussi bien chez les individus sains que chez les traités :

- les prohéocytes ou cellules germinatives
- les plasmatocytes ou cellules phagocytaires
- les granulocytes ou cellules granulaires.

Le sang des acridiens a déjà fait l'objet de nombreux travaux. Dans ses études sur la cytologie du sang des acridiens, Lepesme (1938) distingue chez les adultes du criquet pèlerin deux catégories hémocytaires, les prohéocytes et les phagocytes qui correspondent respectivement aux amibocytes de petite taille et de grande taille donnés par Guenot cité par Lepesme (1938).

L'examen du frottis de sang de *Locusta migratoria*, d'*Anacridium aegyptium* et de *Pamphagus elephas* a montré une profonde similitude avec le criquet pèlerin rajoute l'auteur précité.

Selon les travaux plus récents de Wigglesworth (1972), Arnold (1974) et Raccaud-Scholler (1980), le sang des orthoptères renferme 4 catégories d'hémocytes rencontrés également chez les autres ordres d'insectes à savoir :les prohéocytes, les plasmatocytes, les granulocytes et les coagulocytes.

En Algérie, les travaux sur cet aspect physiologique sont trop fragmentaires et restreints. En effet, les seuls travaux touchant la cytologie de l'hémolymphe des insectes sont ceux de Soltani et Habes (1995) sur le sang du lépidoptères *Thaumetopoea pityocampa* chez lequel ces auteurs ont mis en évidence, 5 catégories cellulaires : prohémyocytes, plasmocytes, granulocytes, coagulocytes et adipocytes et ceux de Halouane (1997) qui en étudiant le sang de *S. gregaria* aux stades L5 et adultes a mis en évidence la présence des prohémyocytes et des plasmocytes.

Par ailleurs, nous avons pu noter une forte activité toxigène de cytoparasite *B. bassiana* dans le sang de l'acridien qui s'est traduite essentiellement par des altérations structurales marquées, totalement absentes chez les individus témoins (Figure n°47 et n°48).

Les hémocytes atteints sont généralement retracts. Un aspect dense diffus caractérise les cellules lésées qui ont tendance à former des agrégats, leur contenu cytoplasmique est déversé dans le milieu extracellulaire (Figure n°49).

En parallèle des amas de spores de champignons ont été observés, leur nombre assez élevé peut être à l'origine de la mort des criquets par septicémie (Figure n°50).

Une mise en culture de l'hémolymphe des individus traités sur milieu nutritif (PDA) a fait ressortir une forte prolifération de champignon, ceci dit on peut considérer l'hémolymphe comme un bon milieu de culture de l'acridipathogène. La mort des individus peut être également tributaire à une libération des toxines par les spores des champignons.

Les signes cytologiques engendrés par les micro-organismes ont beaucoup intéressés les physiologistes. Gunot (1895) et Hallande cités par Lapesme (1938) ont souligné lors de l'infection de l'hémolymphe du criquet pèlerin par les bacilles, des formes de dégénérescence cellulaires très poussées.

De même Vey et al. (1986) ont souligné de fortes altérations structurales conséquentes à l'infection de *Lymantria dispar* et *Bombyx mori* par *Metarhizium anisopliae*. Selon, Halouane (1997) ce même entomophyte a été responsable des fortes lésions morphologiques des cellules sanguines des L5 et des adultes de *S. gregaria*.

1. Cytologie quantitative

Les différences du nombre globale des hémocytes selon les espèces sont considérables, 300 hémocytes par mm³ d'hémolymphe chez certaines larves d'odonates, 250.000/mm³ chez les blatoptères adultes, 220/mm³ chez *Gryllus assimilis* et 47,64/mm³ chez *Tenebrio molitor* (Munson, 1953; Raccaud-Schoeller, 1980).

L'hémogramme change de façon très significative au cours du développement postembryonnaire de nombreux insectes. Des fluctuations sont associées au cycle de mue. Chez *locusta migratoria*, la densité d'hémocytes est la même chez les deux sexes de même âge. Elle montre une légère régression du second au cinquième stade. Elle augmente brusquement après la mue imaginale pour atteindre un niveau double à triple de celui des larves, ce niveau est plus élevé chez les mâles que chez les femelles (Webly, 1951 cité par Duranton et al., 1982).

Pour ce qui nous concerne nous avons également enregistré une différence significative (p<0,05) du nombre d'hémocytes entre les L5 et les adultes de *L. migratoria*.

En effet, nous avons compté 150,4 hémocytes chez les adultes contre uniquement 82 chez les L5 (Figure n°39 et 40).

De même Halouane (1997) a noté un nombre d'hémocytes plus élevé chez les adultes (213,5) par rapport aux L5 (124,5) de *S. gregaria*.

Le contrôle endocrine des fluctuations de l'hémogramme a été démontré chez *L. migratoria*. La différenciation hémocytaire est stimulée par les glandes prothoraciques pendant les intermues et également par les corpora allata. L'activité de ces derniers est sous le contrôle modérateur des cellules neurosecrétrices de la pars intercérébrale (Wigglesworth, 1972; Raccaud Scholler, 1980).

Comme les hémocytes jouent un rôle très important dans les réactions de défense de l'organisme, l'hémogramme sera de ce fait modifié lors des blessures qui entraînent des hémorragies ou bien lors de l'introduction d'éléments étrangers comme les molécules toxiques ou les parasites (Chapman, 1969).

B. bassiana provoque chez les L5 et les adultes de *L. migratoria* une diminution significative ($p < 0,05$, F.obs. > F.théo) du nombre d'hémocytes considérés (P.H.C). Le même phénomène est observé chez *S. gregaria* traité au *M. anisopliae* (Halouane, 1997), chez *Thametopoea pityocampa* et *Ephestia khuinella* traités par *Bacillus thuringiensis* (Arnold, 1974; Habes, 1989).

Si on considère les catégories cellulaires, on constate que le traitement a sévèrement diminué le nombre des pro-hémocytes chez les L5 et chez les adultes. Certains auteurs ont signalé chez ce type de catégorie une augmentation de leur taux dans l'hémolymphe en début d'infection puis ils diminuent au fur et à mesure.

Cette augmentation est déclenchée suite aux divisions mitotiques de ces cellules germinales pour pallier le déficit hémocytaire entraîné par l'infection expérimentale. Cette situation a déjà été mentionnée par Habes (1989) chez *T. pityocampa* traité par *B. thuringiensis*, par Halouane (1997) chez *S. gregaria* traité par *M. anisopliae* et par Guzo et Soltz (1987).

Lors des examens microscopiques nous avons pu détecter des cellules germinales en pleine activité mitotique laquelle était plus marquée chez la série traitée comparativement à la série témoin (Figure n°51).

Quant aux plasmocytes, cellules phagocytaires de premier degré ont significativement chuté de nombre aussi bien chez les L5 que chez les adultes traités comparativement aux témoins. Cette chute est conséquente à l'épuisement de ces cellules suite à l'activité phagocytaire induite contre les spores et les toxines de l'entomopathogène.

Pour ce qui concerne les granulocytes, on constate que le traitement a provoqué un effet similaire de celui observé chez les pro-hémocytes. En effet, une diminution significative du nombre est observée chez les L5 et chez les adultes. Cette diminution est due à la contribution de ce type d'hémocyte pour renforcer la défense contre le cryptogame menée essentiellement par les phagocytes qui une fois absents ou affaiblis sont aussitôt remplacés par les granulocytes (Chapman, 1969).

D'autres auteurs tels que Arnold (1974) et Raccaud Scholler (1980) affirment que les granulocytes ne peuvent phagocyter mais leur rôle se situe au niveau du métabolisme intermédiaire.



Figure n°47 - Structure d'un hémocyte issu d'un individu témoin.

Gr : 40 x 3,5

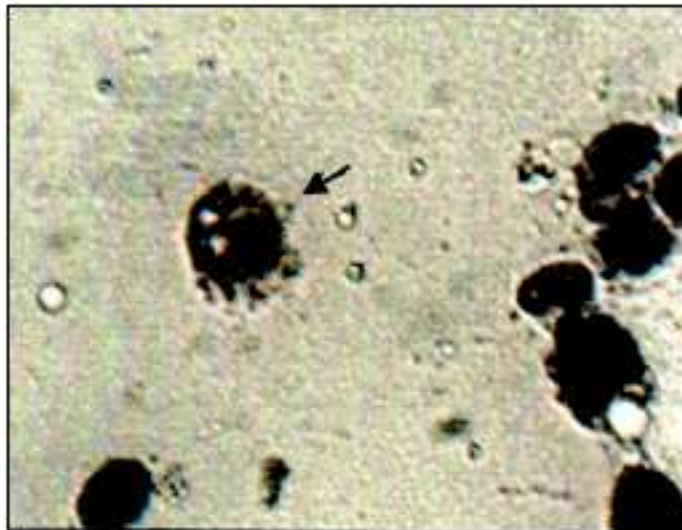


Figure n°48 - Structure d'un hémocyte issu d'un individu traité.

Gr : 40 x 3,5

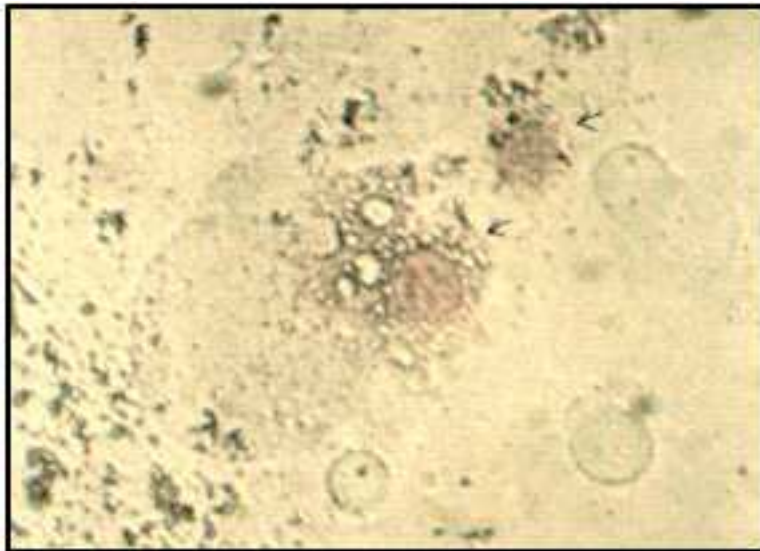


Figure n°49 - Hémocyte à contenu déversé.

Gr : 40 x 3,5

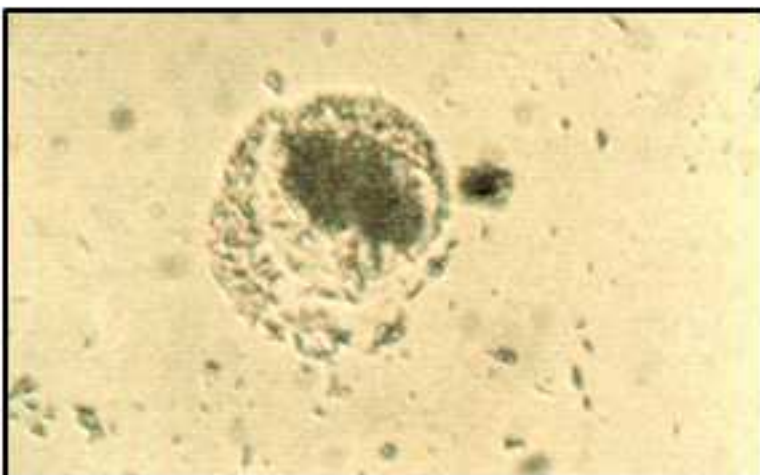


Figure n°50 - Amas des spores dans l'hémolymphe.

Gr : 10 x 3,5

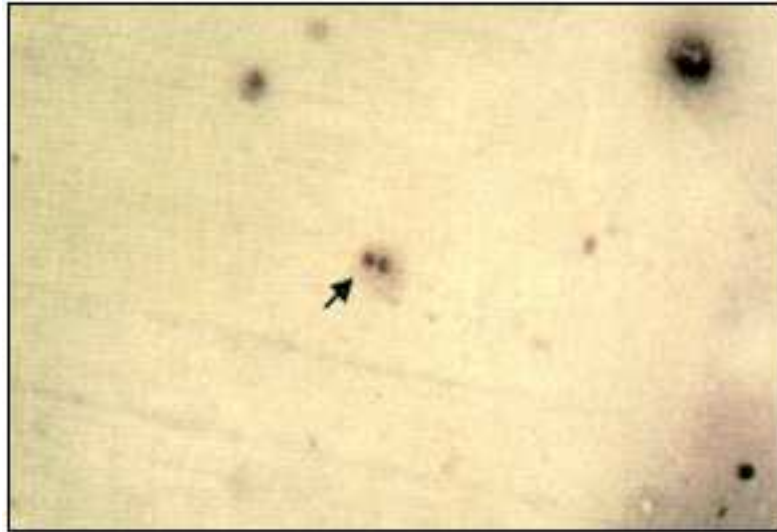


Figure n° 51 – Activité mitotique d'un prohémocyte.

Gr. : 3,5 x 10

III-2- Aspect Bioécologie ; biotechnologie et biosécurité de *Beauveria bassiana*

III-2-1- Aspect bioécologique de *Beauveria bassiana*

A l'instar des champignons, *B.bassiana* bien qu'elle soit relativement peu exigeante, un certain nombre de facteurs, nutritifs et environnementaux, doivent être réunis pour qu'elle puisse se développer.

III-2-1-1- Effet de milieu de culture sur la croissance de *B.bassiana*

a- Résultats

Les résultats relatifs à la mesure de la croissance radiale de la souche *Beauveria bassiana* cultivée sur les milieux retenus pour l'étude de préférendum cultural sont mentionnés dans le tableau n°37 et la Figure n°52.

Tableau n° 37 : Evolution de la croissance radiale en cm de *B.bassiana* sur différents milieux de culture.

Recherche fondamentale sur l'entomothogène *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.)Vuill. (Ascomycota: Hypocreales) :

Milieux	Temp	PDA	Fargues	Cartoux	OGA	Sabouraud	Mathure	Malt	Czapeck	Môût d'orge	Farine de fève	Lactosérum déprotéiné	Cartosérum brut (LD)
1 ^{er}		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3 ^{ème}		1,05	0,8	0,07	0,85	0,42	0,72	0,55	0,52	1,00	0,47	1,47	0,8
6 ^{ème}		2,47	2,22	0,7	2,57	1,82	2,00	1,75	1,97	1,95	2,57	2,1	1,87
9 ^{ème}		3,45	3,45	1,05	3,45	3,12	2,61	2,75	2,95	3,05	3,45	3,15	1,87
12 ^{ème}				2,8		3,45	3,45	3,45	3,45	3,45		3,45	2,97
15 ^{ème}				3,45									3,45

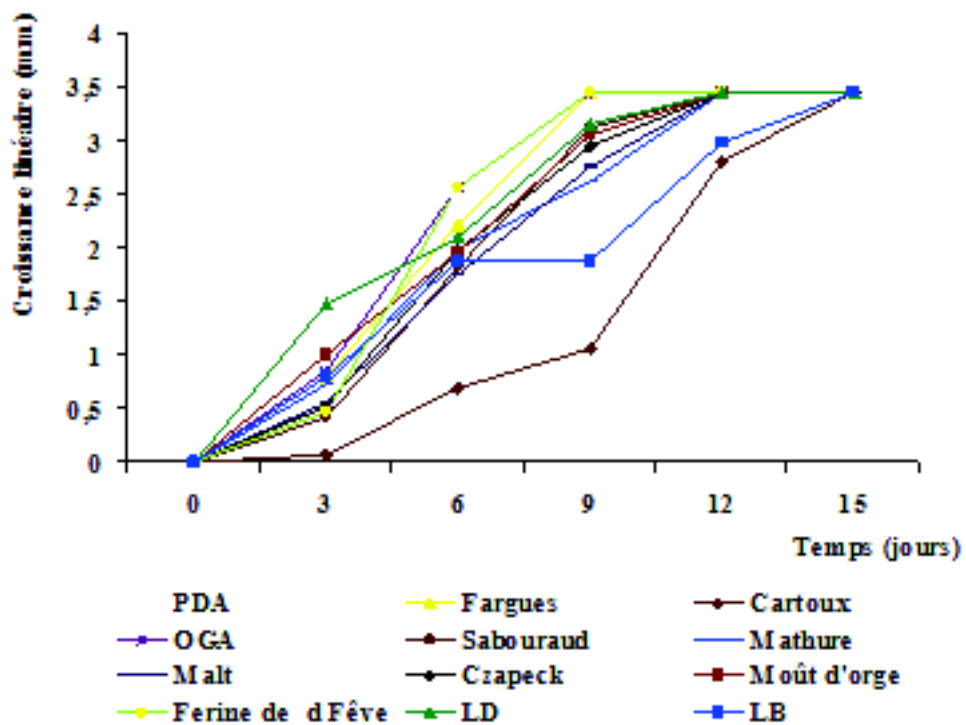


Figure n°52 – Evolution de la croissance linéaire de *Beauveria bassiana* en fonction du milieu de culture.

A travers les résultats affichés sur le tableau n°37 et la Figure n°52, on constate que sur l'ensemble des milieux testés *B.bassiana* s'est très bien développée néanmoins la vitesse de croissance varie d'un milieu à un autre.

Le développement a été plus rapide et s'est achevé au 9^{ème} jour sur milieux PDA; OGA; Fargues et farine de fève et au bout de 12^{ème} jour sur milieux, Czapeck; môût d'orge; Sabouraud; Mathure; Malt et lactosérum déprotéiné et finalement au 15^{ème} jour sur milieux lactosérum brut et Cartoux.

b- Discussion

Les microorganismes sont divisés en deux grandes catégories sur la base de leurs exigences nutritionnelles : les autotrophes et les hétérotrophes .Les premiers ont des besoins les plus simples ils possèdent un équipement enzymatique extrêmement élaboré et

puissant et peuvent synthétiser tous leurs composants à partir de substances élémentaires (Guiraud, 1991).

Les seconds au contraire exigent pour leur croissance des substances qu'ils ne peuvent synthétiser. Les milieux de culture devront donc fournir les éléments essentiels à la croissance et souvent les facteurs de croissance indispensables (Vananuvat et Insella, 1975). Les plus importants sont le Carbone et l'Azote, utilisés sous forme de composés organiques, et des ions minéraux (Potassium, Phosphore, Magnésium ...) en quantités très faibles.

On distingue trois milieux de culture : les premiers sont naturels ou empiriques à composition non définie dans notre cas il s'agit des milieux lactosérum et moût d'orge. Les seconds sont synthétiques ou milieux chimiquement définis tels que les milieux Cartoux ; Czapeck ; OGA; Fargues ; Mathure; Malt et Sabouraud et enfin les milieux farine de fève et PDA (semi synthétiques).

Un milieu de culture doit fournir au microorganisme une source de carbone comme les substances hydrocarbonés, simples comme le glucose dans le milieu PDA ; OGA...., et complexe comme le lactose et le saccharose dans les milieux lactosérum et Czapeck; une source d'azote ; de phosphore et des éléments minéraux tel que le Fer ;le Magnésium, le Calcium qui jouent le rôle de cofacteurs ou d'activateurs enzymatiques présents dans les milieux Czapeck ;Cartoux Mathure et Fargues.

Certains produits, les acides aminés par exemple, peuvent pénétrer dans la cellule sans transformation tandis que d'autres tels que l'amidon, la cellulose, les protéines... doivent être transformés préalablement par le champignon avant d'être absorbés. Cette transformation nécessite, de la part de la moisissure, un équipement enzymatique adapté, souvent caractéristique des espèces. Un *Trichoderma* par exemple dégradera la cellulose tandis qu'un *Scopulariopsis* sera plus actif sur un support de nature protéique.

A travers les milieux de cultures de composition extrêmement diversifiée où nous avons cultivé notre souche fongique durant 15jours, nous avons obtenu un très bon développement de champignon qui s'est adaptée à tous les milieux testés.

En effet quelque soit la source de carbone, sucre (malt; PDA ...) ou protéine (Fargues) et que le milieu soit minérale ou organique, notre souche s'est très bien développée. Ils avait suffisamment de bagage enzymatique : protéases, amylase, glucose isomérase ; hydrolases ; oxydoréductases, transférases et maltase pour dégrader le substrat culturel (Raymond et al., 1995 ; Scriban ,1982).

Nous avons également pu mettre en évidence l'enzyme β galactosidase chez *B.bassiana* pour dégrader le lactose par le test de l'ONPG (annexe III). De se fait on peut qualifier notre souche selon le type nutritionnel ou énergétique comme étant un microorganisme Chimioolithoorganotrophe.

Par ailleurs à la vue de la Figure n°52 on constate que sur les 12 milieux retenus, le démarrage de la culture a débuté le 3^{ème} jour et a été le meilleur sur LD avec une croissance de 1,47cm suivi de PDA et de moût d'orge avec respectivement 1,05cm et 1cm ensuite viennent les milieux OGA et LB.

A la même date (3^{ème} jour), la plus faible croissance est enregistré sur le milieu Cartoux avec 0,07cm et offre ainsi la plus longue période de latence pour notre souche. Par contre, c'est sur milieu Cartoux que Vidal et al., (1998) et Hassani (2000) ont relevé le meilleur développement de *Paecilomyces fumosoroseus*.

L'achèvement de la croissance a par contre été plus rapide sur les milieux farine de fève ; OGA ; Fargues et PDA. Sur les milieux restants la croissance s'est terminée au 12^{ème} jour, mis à part les milieux Cartoux et LB dont la croissance linéaire a atteint le 15^{ème} jour pour s'achever.

A travers ces résultats on conclut que tous les milieux conviennent pour le développement de la souche *B. bassiana* du sud avec une légère différence notamment pour les milieux naturels (lactosérum et moût d'orge) ou la croissance était appréciable comparativement aux autres milieux conventionnels déjà testés.

Nos résultats sont assez comparables avec ceux trouvés par divers auteurs tels que Halouane (1997) qui a démontré que *B. bassiana* se comporte d'une manière similaire sur milieux organiques et minéraux. Parallèlement Rombach et al. (1989) ont mentionné une croissance maximale de *B. bassiana* sur milieu ayant comme source de carbone le CaCO₃ D'autres espèces fongiques telles que les différentes espèces du genre *Ascochyta* montrent une préférence pour les milieux organiques que les milieux minéraux (Bouznad, 1978 et Merabti, 1993).

Rombach (1989) a enregistré une meilleure croissance de *B. bassiana* sur un milieu contenant 3,5% de maltose et 0,75% d'extrait de levure. Par ailleurs, Stephan et Zimmerman (1997) ont mentionné un meilleur développement de *M. flavoviride* sur un milieu ayant comme source d'énergie uniquement l'azote. Quant à Vezina et al. (1998) cité par Rombach (1989) c'est sur un milieu riche en extrait de blé et de phosphate d'ammonium qu'ils ont noté la meilleure évolution d'*Aspergillus ochraceus*.

L'étude de la croissance et la sporulation de *Basidiobolus ranarum*, de *Conidiobolus osmodes*, de *Entomophthora* sp. aff. *obscura*, de *E. destruens* et de *E. virulentadans* un milieu synthétique contenant une variété de source de carbone (monosaccharides, oligosaccharides, polysaccharides, alcool) a montré l'incapacité de ces espèces fongiques de métaboliser toutes les sources de carbone testées à l'exception de *B. ranarum* qui s'est très bien développé et a pu métaboliser tous les éléments du milieu comme l'a rapporté Latgé (1975).

Les travaux de Attrassi et al. (2005) sur les espèces fongiques, *Rhizopus stolonifer*, *Penicillium expansum*, *Aspergillus niger*, *A. fumigatus*, *Alternaria alternata*, *Cladosporium herbarum*, *Fusarium oxysporum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Monilia fructigena*, *Cryptosporiopsis malicorticis*, *Spilocaea pomi* et *Trichothecium roseum* isolées des pommes en conservation ont montré que les milieux PDA ; Pomme et Czapek permettent une bonne croissance et une bonne sporulation pour toutes les espèces contrairement au milieu à base de fève qui a les entravé.

III-2-1-2- Effet des facteurs de l'environnement sur la croissance de *B. bassiana*

À la différence des substances nutritives qui sont toujours beaucoup plus abondantes que ne le nécessite le développement des moisissures, les facteurs physiques de l'environnement (activité de l'eau ou humidité, température, pH...) constitue un élément déterminant pour son initiation.

III-2-1-2-1- Effet de l'activité de l'eau sur la sporulation de *B. bassiana*

a- Résultat

Les résultats concernant l'influence de l'activité de l'eau sur la concentration en spores de *B.bassiana* au 15^{ème} jour de culture sur milieu PDA, sont mentionnés sur le tableau n°38 et le graphique de la Figure n°53.

Tableau n° 38 : Influence de l'activité de l'eau sur la sporulation de *B. bassiana*

	a _w (activité de l'eau)					
	0,75	0,80	0,85	0,90	0,95	0,99
Concentration en spores/ml	1,5x10 ⁵	2,7x10 ⁵	3x10 ⁵	4,6x10 ⁵	6,8x10 ⁵	17x10 ⁵

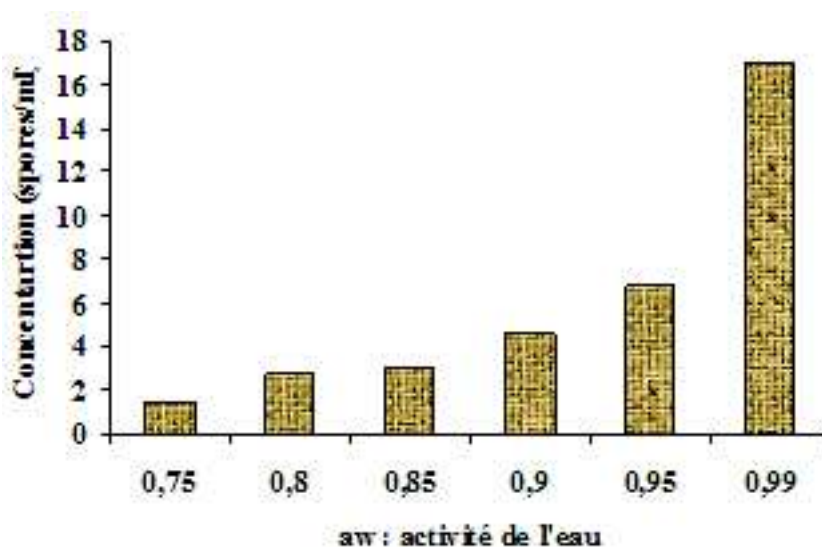


Figure n°53 – Effet de l'activité de l'eau (aw) sur la sporulation de *B. bassiana*.

Selon les résultats relatifs à la sporulation de *B.bassiana* ensemencé sur milieux à différentes activités d'eau (aw), on constate que la production des spores évolue parallèlement avec l'évolution de l'aw. En effet pour une aw de 0,99 on a obtenu la meilleure concentration en spore qui s'évalue à 17x10⁵ spores/ml puis diminue progressivement pour atteindre à la plus faible aw une concentration de 1,5x10⁵ spores/ml.

C'est ainsi qu'une meilleure concentration en spores est obtenue pour une aw de 0,99 (17x10⁵ spores/ml) tandis que la plus faible est notée pour la plus basse aw 0,75 donnant une concentration en spores de 1,5x10⁵ spores/ml.

b- Discussion

Tout le monde sait que les moisissures apparaissent après un accroissement accidentel de l'humidité. En effet, la quantité d'eau disponible dans le substrat et l'ambiance environnante est très importante pour initier leur développement. Il y a échange permanent entre l'environnement et le support jusqu'à atteindre un point d'équilibre à la surface de ce dernier où pourra se développer la moisissure (l'activité de l'eau ou aw; est approximativement inverse de l'humidité relative).

L'humidité relative minimum pour que commencent à se développer certaines moisissures peu nombreuses, dites xérophiles, est de 65-70 % (*Eurotium -Aspergillus* du groupe *glaucus*). Au fur et à mesure que l'humidité augmente s'installent ensuite des

moisissures différentes, de plus en plus nombreux vers 80-90% (Samson et Reenen-Hoekstra 1988).

A partir des résultats de la sporulation de *B.bassiana* (tableau n°38 et Figure n°53), on constate que l'activité de l'eau influence significativement le développement du champignon qui évolue parallèlement avec l'évolution des valeurs de aw. L'optimum est enregistré à une activité de l'eau au dessous de 0,99 et le minimum de spores produites est observé pour une activité d'eau de 0,75.

L'activité de l'eau est un facteur critique déterminant la durée de vie des produits. C'est l'activité de l'eau, et non la teneur en eau, qui détermine la limite minimale d'eau disponible pour la croissance microbienne. La température, le pH et plusieurs autres facteurs influencent le développement des micro-organismes mais l'activité de l'eau constitue souvent le facteur le plus déterminant.

C'est à partir de 0,90 aw que la plupart des bactéries contaminantes se développent. Les moisissures et les levures se développent à 0,61 aw, la limite la plus faible pour les moisissures productrices de mycotoxines étant de 0,78 (Michel, 2005).

Torocco et al. (2005), ont également montré que l'activité de l'eau optimale pour la croissance de *B.bassiana* est de 0,99. De même, Hallsworth et Magan (1999), par leurs études sur trois entomopathogènes *B.bassiana*, *Metarhizium anisopliae* et *Paecilomyces fumosoroseus* ont trouvé que chacune des trois espèces présente une gamme semblable d'activité de l'eau (0,90-0,99) et un optimum de croissance à 0,99 pour *Metarhizium* et *Paecilomyces fumosoroseus* et de 0,998 pour *B.bassiana*. De même, sur *Aspergillus ochraceus* Pardo et al. (2003), ont montré que l'activité optimale pour cette espèce est comprise pour une activité d'eau entre 0,95 et 0,99.

III-2-1-2-2- Influence de la température sur la croissance radiale mycélienne et la sporulation de *B.bassiana*

a- Résultat

□ - Effet sur la croissance mycélienne

Sur le tableau n°39 et la Figure n°54, sont mentionnées les valeurs des mensurations des diamètres des colonies de *B.bassiana* en fonction des températures d'incubations.

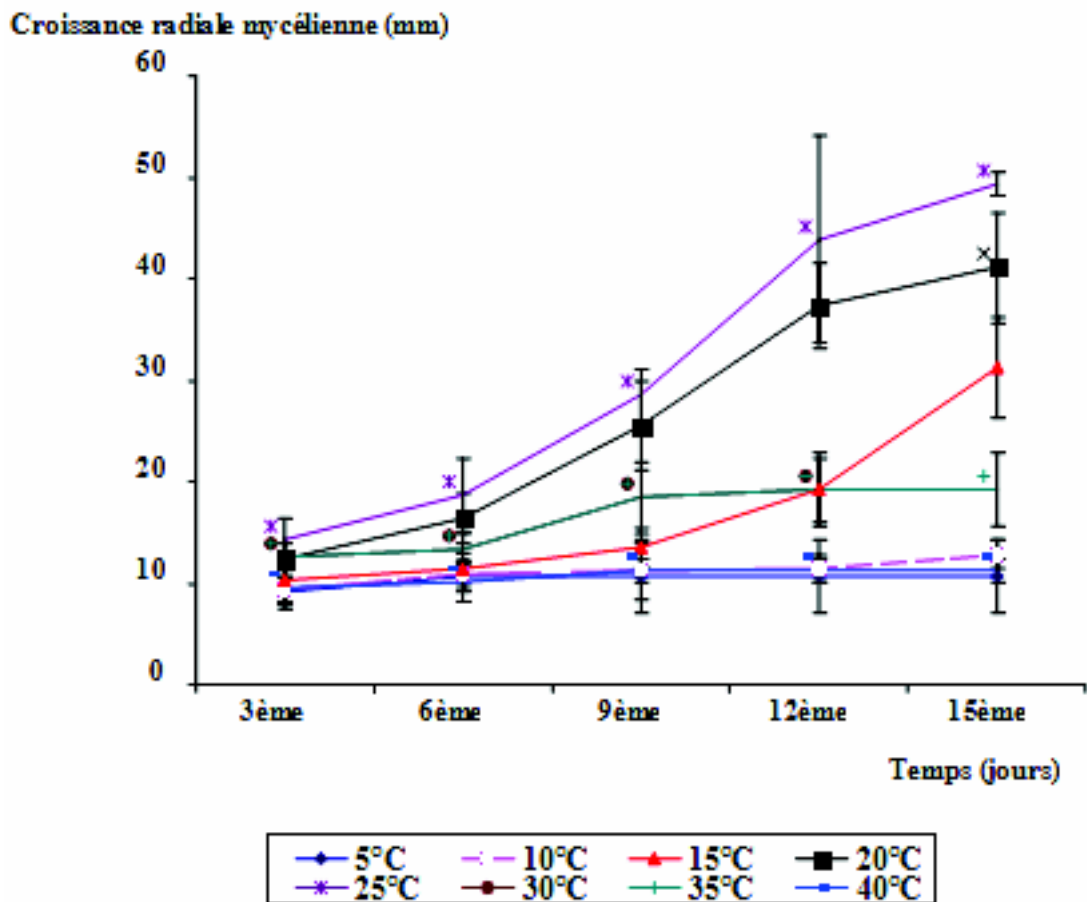


Figure n°54 – Croissance radiale de *B. bassiana* à différentes températures.

Pour appuyer l'interprétation des résultats nous avons fait appel à l'analyse de la variance à un critère de classification, soit le facteur température à 7 niveaux de classification (Tableau n°40).

Tableau n° 40 : Analyse de la variance de l'effet de la température sur la croissance mycélienne de *B. bassiana*.

Source de variation	DDL	Carrés moyens	F. obs.	F. théo.	Proba.	E.T.	C.V.
V. totale	27	225,69					
facteur 1 <i>B.bassiana</i>	6	976,77	88,06	2,57	0,0000		
V. résiduelle 1	21	11,09				3,33	13,3%

L'analyse de la variance effectuée sur les résultats de tableau n°40 montre que la température influence significativement la croissance radiale de *B. bassiana*.

Le suivi de la croissance mycélienne de *B.bassiana* durant les 15 jours d'incubation à plusieurs températures (Figure n°54), montre que le développement de ce deutéromycète est significativement influencé par la température ($P < 0,05$). En effet, qu'il s'agisse de faibles ou de fortes températures le comportement du champignon diffère. Il manifeste un développement maximum entre 15°C et 30°C, le pic est obtenu à 25°C et commence à diminuer pour les températures inférieures à 10°C et supérieures à 35°C.

□ - Effet sur la sporulation

Les différentes concentrations en spores par millilitre de *B.bassiana* après 15 jours d'incubation à différentes températures ainsi que leurs transformation logarithmique pour simplifier le calcul de l'analyse de la variance sont consignés sur le tableau n°41 et Figure n°55.

Tableau n° 41 : Effet de la température sur la sporulation de *B. bassiana*.

répétition	10°C		15°C		20°C		25°C		30°C		40°C			
	[C] sp/ml	L10	[C] Sp/ml	L10	[C] sp/ml	L10	[C] sp/ml	L10	[C] sp/ml	L10	[C] sp/ml	L10		
R2	1,1x 10 ⁶	6,04	2,1x 10 ⁶	6,32	10,98x10 ⁶	6,04	23x 10 ⁶	7,53	34 x 10 ⁶	7,53	15x 10 ⁶	7,18	3,5x 10 ⁶	6,54
R3	0,9x 10 ⁶	6,95	3,3x 10 ⁶	6,751	9,2x 10 ⁶	6,96	12x 10 ⁶	7,59	39 x 10 ⁶	7,6	19x 10 ⁶	7,28	5,3x 10 ⁶	6,72
R4	1,3x 10 ⁶	6,11	1,7x 10 ⁶	6,23	8,3x 10 ⁶	6,91	17x 10 ⁶	7,49	31x 10 ⁶	7,5	20x 10 ⁶	7,3	3,3x 10 ⁶	6,52
M	1,13x10 ⁶	6,03	2,38x 10 ⁶	6,68	8,95x 10 ⁶	6,63	17,5x 10 ⁶	6,53	32,25 x10 ⁶	7,54	19x 10 ⁶	7,25	3,6x 10 ⁶	6,59
E	0,17x10 ⁶	6,08	0,68x 10 ⁶	6,71	1,49x 10 ⁶	6,51	4,51x 10 ⁶	6,05	5,85x 10 ⁶	6,05	2,94x 10 ⁶	6,06	1,25x 10 ⁶	6,11

R : Répétition M: moyenne E : Ecart type

[C]: concentration L10 : logarithme décimal

Analyse de la variance opérée sur les données de tableau n°41 est à un seul critère de classification : température avec 7 niveaux.

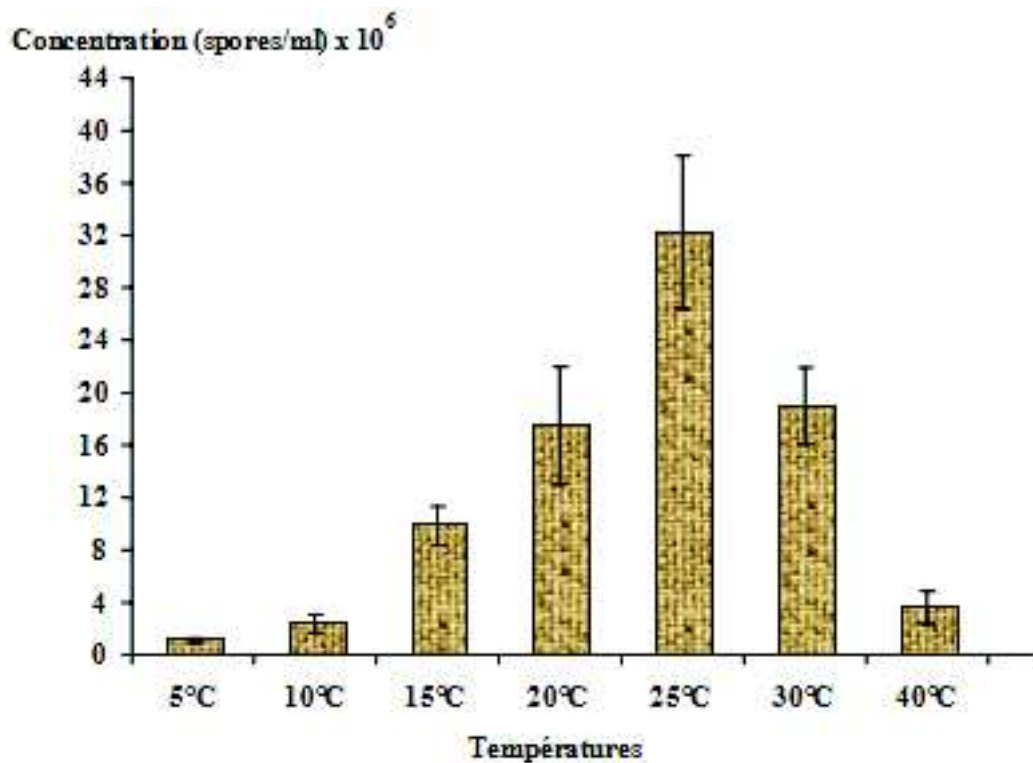


Figure n°55 – Concentration (en spores) de *B. bassiana* à différentes températures.

Tbleau n° 41 : Analyse de la variance sur l'influence de la température sur la sporulation de *B.bassiana*.

Source de variation	S.C.E	DDL	Carrés moy	Én	ébs.	F. théo.	Proba.	E.T.	C.V.
V. totale	10,21	27	0,38						
facteur 1	7,99	6	1,33	12,64	2,3	0,0000			
V. résiduelle 1	2,21	21	0,11					0,32	4,7%

A la vue des résultats du test statistique, la température influence très significativement la quantité des spores produites par la souche fongique ($p \leq 0,05$).

Les résultats affichés sur le tableau n°25 montrent que la sporulation est maximale à 25°C avec un nombre de spores de $32,2 \times 10^6$ spores /ml. En dessous de 25°C on assiste à une diminution importante de la sporulation qui est de $8,97 \times 10^6$ spores /ml à 15°C, $2,3 \times 10^6$ à 10°C et de $1,12 \times 10^6$ spores/ml à 5°C.

Pour les températures au dessus de 25°C, on remarque que les productions des spores aux températures 30°C et 40°C atteignent respectivement 19×10^6 spores /ml et $3,6 \times 10^6$ spores /ml. On constate que pour les températures élevées l'acridopathogène *B.bassiana* présente une meilleure production de spores qu'aux basses températures.

b- Discussion :

La plupart des champignons, surtout les moisissures, sont mésophiles c'est à dire qu'ils se développent autour de 20-25°C, températures moyennes habituelles de leur aires d'installation. Cependant il peut y avoir des particularités pour certaines espèces et c'est ainsi que l'on définit des températures cardinales qui sont les températures minimales, optimales et maximales de croissance (Samson et Reenen-Hoekstra 1988).

Des travaux antérieurs ont montré le rôle de la température dans le développement des hyphomycètes en général et de *B.bassiana* en particulier. Parmi eux ceux de Bissaad (1998) en Algérie qui a enregistré une augmentation régulière de la croissance mycélienne de *Beauveria bassiana* de 5°C à 10°C avec un optimum de croissance à 20°C.

Inglis et al. (1993) situent les optimums de développement de *B.bassiana* entre 25°C et 30°C suivies de 40°C. Par contre Inglis et al. (1997) ont montré des meilleures croissances mycéliennes entre 15°C et 20°C.

Par ailleurs, Fargues et al. (1997) travaillant sur l'effet de la température sur la croissance mycélienne de plusieurs souches de *B.bassiana* ont souligné une meilleure croissance à 25°C pour l'isolat de l'Afrique de sud. Hassani (2000) ; Hallsworth et Magan (1999) et Vidal et al. (1997) ont obtenu un meilleur développement de l'hyphomycète *Paecilomyces fumosoroseus* entre 25°C et 28°C. Welling et al (1994), ont souligné que les souches de *Metarhizium anisopliae* et *M. flavoviride* ont pu croître à des températures atteignant les 40°C. Dans le climat tropical de l'Est de l'Asie la croissance de mycélium des champignons hyphomycètes est optimale entre 25°C et 30°C comme l'ont rapporté Fargues et al. (1992).

Nos résultats sont assez comparables à ceux obtenus par Bissaad (1998) qui a enregistré une sporulation maximale à 20°C avec 11×10^6 spores/ml durant 15 jours d'incubation.

Lan et al. (1991) ont noté une sporulation de 5×10^5 spores/ml de *B.bassiana* durant 12 jours d'incubation à 25°C. Morley-Davies et al. (1995) précisent que pour cette espèce le début de la croissance n'a eu lieu qu'à partir de 10°C et à 50°C il tend à s'annuler.

Selon Attrassi et al. (2005), *Penicillium expansum* ne se développe pas à 32°C et *Cryptosporiopsis malicortisis* présente une sporulation faible à 5 et 32°C. Par contre, elle est maximale à 18 et 25°C pour *Alternaria alternata* et *Trichothecium*. Les espèces, *Rhizopus stolonifer*, *Alternaria alternata*, *Spilocaea pomi* et *Trichothecium roseum* sporulent faiblement à 5 et 32°C. La sporulation est maximale à 25 °C et moyenne à 18°C pour toutes les espèces étudiées poursuivent les auteurs précités.

III-2-1-2-3- Influence de la température sur le cycle biologique et le taux de germination de *B.bassiana*

a- Résultats

D'après nos observations on a pu constater que le cycle biologique de *B.bassiana* compte six phases qui sont successivement : Gonflement des spores ; Germination ; Distinction d'hyphes et Ramification; Fructification et la dernière phase concerne la libération des spores (Figure n°56).

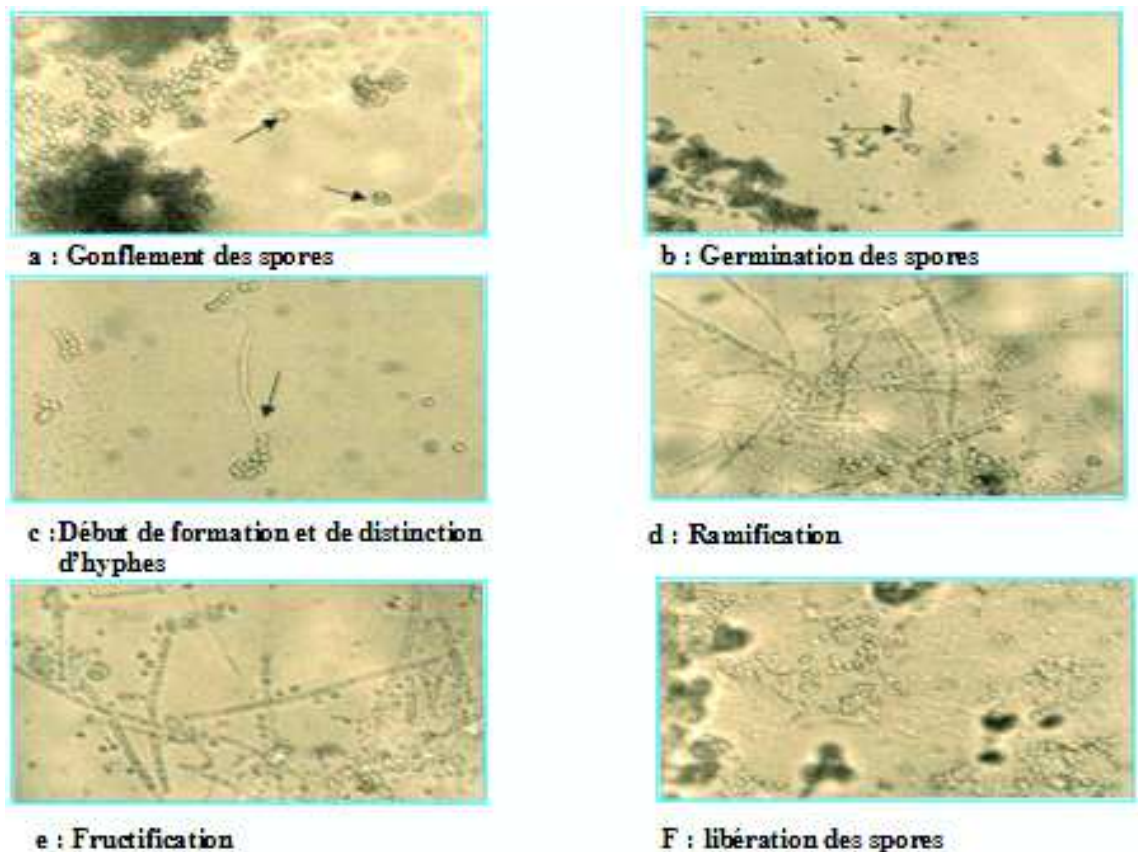


Figure n°56 - Les différentes étapes du cycle biologique de *B. bassiana*.

Gr : 3,6 x 10

La durée de chaque phase de cycle biologique de *B.bassiana* ainsi que les taux de germination de cette espèce en fonction des températures testées sont consignés respectivement sur les tableaux n°42 et n°43 et les Figures n°57 et n°58.

Tableau n° 42 : Influence de la température sur la durée du cycle biologique de *B.bassiana*.

Phases	25°C	35°C
Gonflement des spores	24h	24h
Germination	28h	48h
Formation d'hyphes et ramification	30h	72h
Fructification	38h	96h
Libération des spores	48h	144h

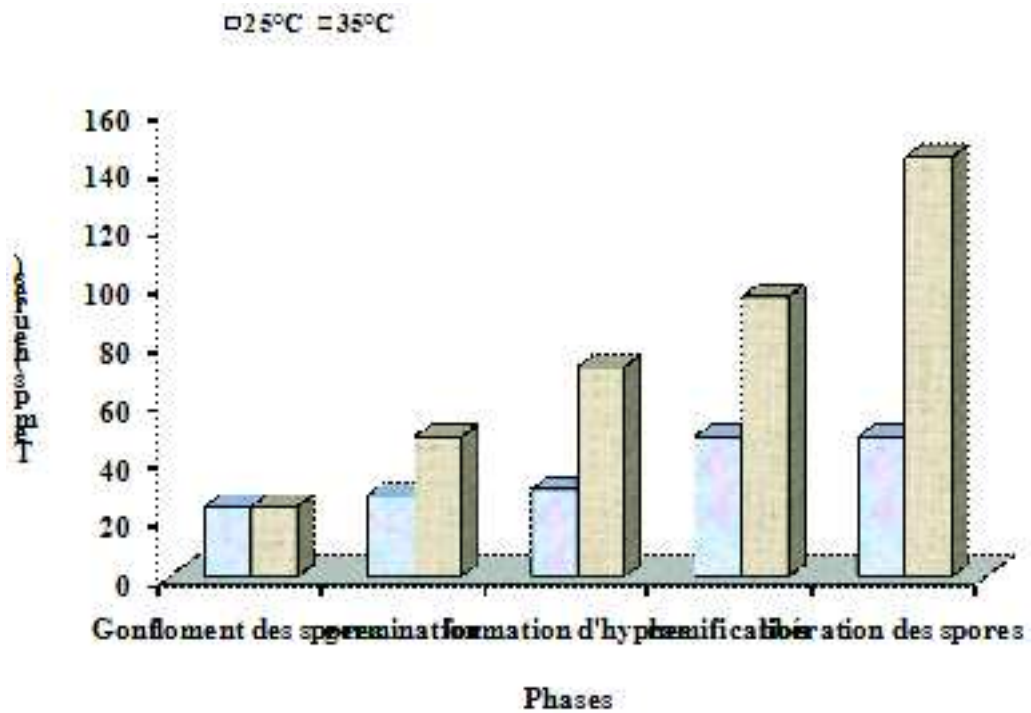


Figure n°57 – Influence de la température sur la durée de chaque phase de cycle biologique de *B. bassiana*.

Tableau n° 43 : Influence de la température sur le taux de germination de *B. bassiana*.

Recherche fondamentale sur l'entomothogène *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.)Vuill.
(Ascomycota: Hypocreales) :

Température	Répétition	8h	16h	24h
20°C	R1	6	98	100
	R2	7	95	100
	R3	5	97	100
	M±E	6±1	96,67±1,53	100±0
25°C	R1	8	98	100
	R2	9	97	100
	R3	11	98	100
	M±E	9,33±1,53	97,67±0,58	100±0
30°C	R1	4	54	99
	R2	2	43	97
	R3	6	41	100
	M±E	4±2	46±7	98,67±1,53
35°C	R1	2	22	46
	R2	0	17	38
	R3	3	11	31
	M±E	1,67±1,53	16,67±5,5	38,33±7,5

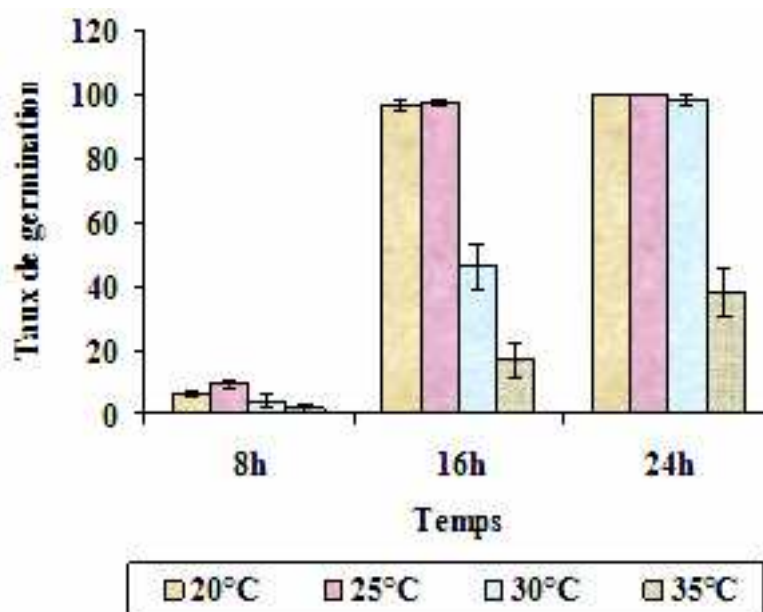


Figure n°58 – Influence de la température sur taux de germination de *B. bassiana*.

L'analyse de la variance effectuée sur les données des taux de germination est portée sur le tableau suivant.

Tableau n° 44 : Analyse de la variance le l'effet de la température sur la germination des conidies de *B.bassiana*.

Source	DDL	Somme des carrés	Carrés moyens	F de Fisher	Pr. > F
Modèle	11	63314,083	5755,826	459,445	< 0,0001
Résidus	24	300,667	12,528		
Total	35	63614,750			

Les résultats de l'analyse de la variance font ressortir que les température influence significativement le pourcentage de germination des spores de *B. bassiana* ($p < 0,05$).

Les résultats de tableau n°42 et le graphique de la Figure n°57 indiquent que les deux températures testés 25°C et 35°C ont permis à notre souche d'accomplir son cycle dans un temps qui n'excède pas une semaine.

Le cycle le plus court est enregistré à 25°C ou il ne dépasse pas les 48h comparativement à 35°C où il est bouclé au bout de 144h .

Si on considère les phases séparément, on constate que le gonflement des spores est réalisé en 24h pour les deux températures, la différence commence à s'installer à partir de la germination pour évoluer avec un écart significatif à travers les phases restantes (20h ; 42h ; 58h et 96h) comme le montre le test statistique KHI2 à un seul critère de classification (température avec 2 niveaux : 25°C et 35°C ; $X_{2obs.} = 12,76 > X_{2théo.} = 13,3$ pour une DDL=4 et une probabilité =1,26).

Par ailleurs, l'effet de la température est plus exprimé sur le taux de germination de cette souche ($p < 0,05$ et Classification des moyennes annexe IV).

En effet, après 8h le maximum de germination est obtenu à 25°C suivi de 20°C, 30°C et enfin 35°C. Au bout de 24h toutes les spores ont germés pour les températures 20 et 25°C. A la même heure, la germination commence à diminuer pour les températures 30°C et 35°C où nous n'avons obtenu que $98,67 \pm 1,53$ % et $38,33 \pm 7,5$ % respectivement.

b- Discussion

Nos résultats concernant l'effet de la température sur la croissance de *B. bassiana* ont montré que ce paramètre physique couronne et régule la durée de cycle biologique et le taux de germination de *B. bassiana*. Nos résultats sont soutenus par les travaux de Hajek *et al.* (1990), Hywel-Jones et Gillespies (1990), Fargues *et al.* (1997), Rodman et Rath (1997). Ces auteurs ont avancé que la germination des hyphomycètes commence à se ralentir à partir de 32°C.

Aussi, nous avons constaté que l'optimum de taux de germination de champignon se situe à 25°C, température qui offre également la plus courte durée de cycle. Toutefois, à 35°C enregistre une germination intéressante, ceci conforte son application sur les acridiens grégariaptés localisés dans les zones sahariennes où les températures de jour sont élevées.

Dans certains cas les températures élevées jouent favorablement sur le développement des entomopathogènes comme l'ont souligné Scanlan *et al.* (2001) à propos de l'infection et le développement de *Metarhizium anisopliae* sur les larves de *Locusta migratoria* qui a duré 6jours à 35°C et 21jours à 20°C.

Nos résultats, vont dans le même sens que ceux trouvés par Morley-Davies *et al.*, (1995) où *B. bassiana* acheva son cycle au bout de 45h à 25°C et au bout de 196h à 40°C. Selon Pursegrove (1968), la température nécessaire pour la germination des derniers infectant le coton est comprise entre 24 et 34°C.

Une croissance à 38°C de ces champignons a été observée par Oerke *et al.* (1994). Hassani 2000 a enregistré le maximum de germination (65%) de *P. fumoroseus* après 24h à 25°C. Cette même durée est enregistrée par Hall *et al.* (1994) sur la même espèce fongique à 24°C. A 25°C, 98% des conidies ont germé après uniquement 16h poursuivent les auteurs près cités.

La germination des champignons entomopathogènes est dans l'ensemble réalisée après 14 jours d'expérimentation selon les travaux de Inglis *et al.* (1993).

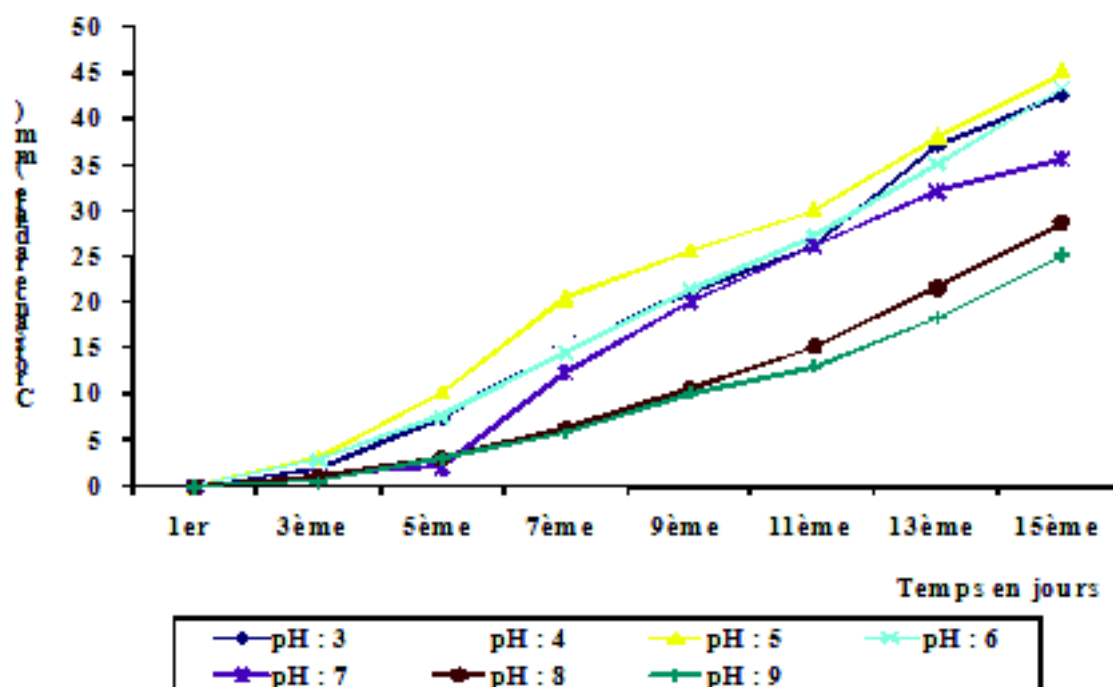
III-2-1-2-4- Influence du pH sur la croissance mycélienne et la sporulation de *B.bassiana*

a- Résultat

Les résultats concernant l'effet du pH sur la croissance radiale du mycélium et la sporulation de *B. bassiana* sont illustrés dans les tableaux n°45 et n°46 et les Figures n°59 et n°60.

Tableau n° 45 : Evolution radiale (mm) du mycélium de *B. bassiana* à différents pH.

pH temps (jours)	pH : 3	pH : 4	pH : 5	pH : 6	pH : 7	pH : 8	pH : 9
1 ^{er} «	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
3 ^{ème}	2,00	2,25	3,05	2,80	1,20	1,00	0,50
5 ^{ème}	7,40	8,60	10,20	7,60	2,1	3,05	3,00
7 ^{ème}	15,60	15,40	20,40	14,50	12,40	6,40	5,80
9 ^{ème}	21,00	22,15	25,60	21,40	20,05	10,60	10,00
11 ^{ème}	26,25	31,20	30,15	27,20	26,20	15,25	13,05
13 ^{ème}	37,05	39,60	38,05	35,25	32,15	21,60	18,40
15 ^{ème}	42,60	45,40	45,20	43,40	35,80	28,80	25,15



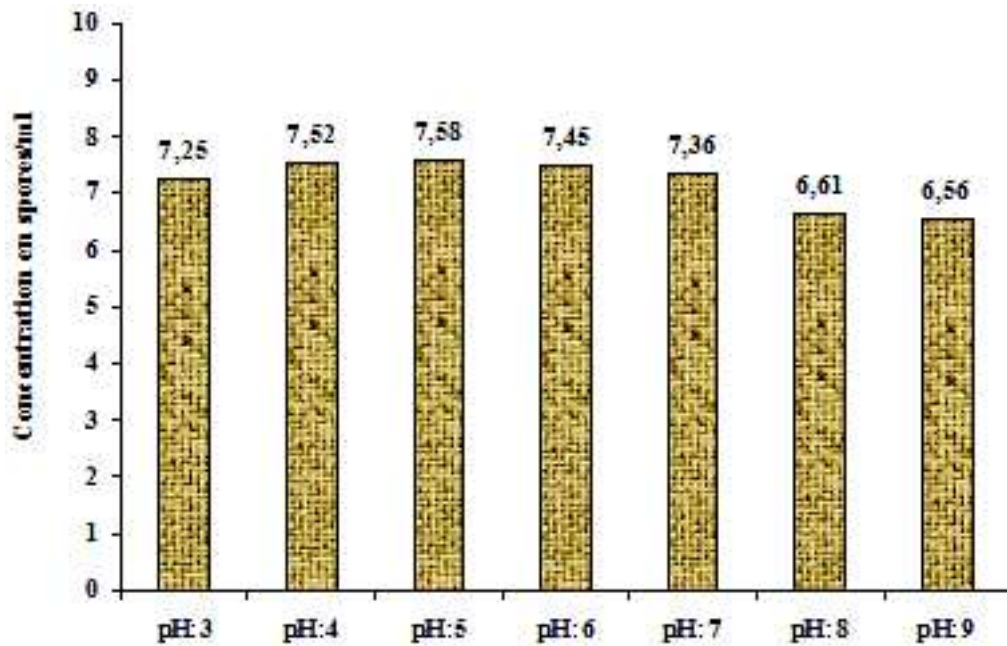


Figure n°60 – Concentration en spores/ml de *B. bassiana* à différents PH.

Pour faire ressortir l'influence du pH sur la croissance radiale du mycélium et la sporulation de *B.bassiana* nous avons fait appel à l'analyse de la variance à deux critères de classification (Le facteur 1 est le pH avec 7niveaux : pH3, pH4, pH5, pH6, pH7, pH8 et pH9 et le facteur 2 est le temps avec 8 niveaux ou temps d'observations) pour la croissance radiale (tableau n°46) et à un seul critère de classification le facteur pH avec 7 niveaux (pH3, pH4, pH5, pH6, pH7, pH8 et pH9) pour la sporulation (tableau n°47).

Les analyses de la variance effectuées sur les données relatives à l'effet du pH sur la croissance mycélienne de *B. bassiana* et la sporulation sont portées sur les tableaux suivants.

Tableau n°47 : Analyse de la variance sur l'influence du pH sur la croissance mycélienne de *B. bassiana*.

Source de variation	S.C.E	DDL	Carrés moyens	F. obs.	F. théo.	Proba.	E.T.	C.V.
Var. totale	8819,52	48	183,74					
Var. facteur 1	1242,12	6	207,02	22,67	2,37	0,0008		
Var. facteur 2	7248,84	6	1208,14	132,31	2,37	0,0000		
Var. résiduelle 1	328,68	36	9,13				3,02	15,8%

L'analyse de la variance montre une différence très hautement significative pour les facteurs pH et temps (F.obs.>F.théo et prob.<0,05). Le pH affecte significativement la croissance mycélienne de *B. bassiana*, dans le temps.

Tableau n° 48 : Analyse de variance sur l'influence du pH sur la sporulation de *B.bassiana*.

**Recherche fondamentale sur l'entomothogène *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.)Vuill.
(Ascomycota: Hypocreales) :**

Source de variation	S.C.E	D.D.L	Carrés moyens	F. obs.	F. théo.	Proba	E.T.	C.V.
Var. totale	1,43	13	0,11					
Var. facteur 1	1,44	6	0,24	2306,74	3,87	0,0000		
Var. résiduelle 1	0,00	7	0,00				0,01	0,1%

L'analyse de la variance montre une différence très hautement significative pour le facteur pH avec une probabilité nulle ($F_{théo} < F_{obs}$). Donc le pH du milieu influence significativement la production des spores de *B.bassiana* au 15^{ème} jour de culture sur milieu malt.

Selon les résultats de cette expérience, on constate que le pH du milieu influence significativement ($P=0$ et $F_{théo} < F_{obs}$) le développement de notre souche qui croit et sporule préférentiellement sur milieux acides (pH : 4 et 5) que sur milieux basiques (pH:9).

b- Discussion

L'effet du pH sur l'activité cellulaire des microorganismes est très important. Il se traduit par un phénomène d'allure comparable à celle de la température. Les champignons sont peu sensibles au pH du milieu. Ils se développent entre 4,5 et 8 avec un optimum entre 5,5 et 7,5.

Les pH alcalins sont d'une façon générale préjudiciable aux microorganismes surtout les bactéries ou l'optimum se situe à 7 (neutophilie). Les champignons quant à eux sont reconnus d'être acidophile mais ils ont une bonne aptitude à métaboliser les acides organiques et se développent très bien dans de large zones de valeurs du pH comprises entre 3 et 8 avec toute fois des variations selon le type d'acide organique présent et la souche fongique considérée (Samson et Reenen-Hoekstra, 1988).

En effet la plupart des moisissures se développent sur une gamme du pH de 5,5 à 9 (Reboux, 2006). Pour autant, certaines espèces comme *Wallemia sebi* peuvent se développer sur des pH très bas (pH3) (Perrone *et al.*, 2006). Notre souche s'est confortablement développée sur tous les pH étudiés, y compris le pH 3 très acide.

Attrassi *et al.* (2005) travaillant sur l'effet du pH sur la flore fongique rencontrée sur pomme pourris ont montré que toutes les espèces fongiques étudiées se développent parfaitement à un pH de 5 à 7. En dehors de ces pH, la croissance mycélienne diminue, sauf pour *Rhizopus stolonifer*, qui semble indifférent aux pH testés. Le pH 4 est favorable à la sporulation de *Saccharomyces cerevisiae*, *Cryptosporiopsis malicorticis*, *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus fumigatus*, *A. niger* et *Penicillium expansum*.

Selon Murray (1988), les croissances radiales de *Cephalosporium gramineum* les plus importantes ont été observées à des valeurs du pH égales ou inférieures à 6,0 et les plus faibles à pH 7,5.

III-2-1-2-5- Etude de l'influence du feuillage sur la persistance des spores de *B. bassiana*

a- Résultat

Les résultats relatifs au nombre de colonies par unité de surface foliaire (cm) exprimant la quantité des spores viables relevés sur chaque culture étudiée sont consignés sur le tableau n°49 et Figure n°61.

Tableau n°49 : Evolution du nombre de colonies de *B. bassiana* sur le feuillage de différentes plantes.

Culture	Tomate			Laitue			Fève			Orge			Blé		
	R1	R2	M± ET	R1	R2	M± ET	R1	R2	M± ET	R1	R2	M± ET	R1	R2	M± ET
3 ^{ème}	234	201	217,5±22,6	226	176	201±35,9	359	121	100±29,7	94	111	102,5±12,0	120	86	100±19
6 ^{ème}	103	191	147±62,75	92	83,5±12,4	53	68,5±21,0	68	72±5,66	65	43	54±15,6			
9 ^{ème}	94	85	89,5±6,40	2	43	72,5±42,2	13	27,5±20,5	9	17±11,81	12	10±2,83			
12 ^{ème}	17	11	14±4,2	8	15	11,5±4,9	6	6,5±0,71	0	2	1±1,41	4	5±2,12		
15 ^{ème}	1	3	2±1,4	0	0	0±0	0	0	0±0	0	0	0±0	0	0	0±0
18 ^{ème}	0	0	0±0	0	0	0±0	0	0	0±0	0	0	0±0	0	0	0±0

R₁ , R₂ : Répétition 1, répétition 2. M± E: Moyenne (spores / ml) ± l'erreur type.

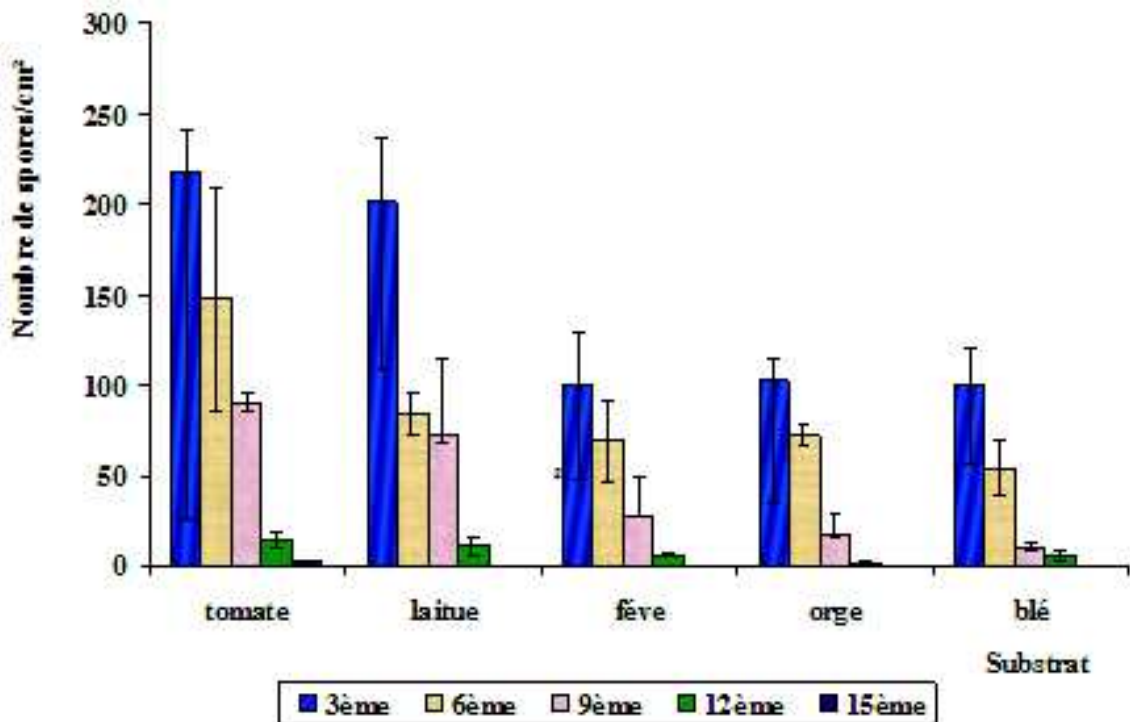


Figure n°61 – Influence du feuillage sur la persistance des spores de beauveria bassiana.

Les résultats du tableau n°49 et de la Figure n°61 ont été traités statistiquement par une analyse de variance à deux facteurs (temps et type de culture) et sont rapportés dans le tableau n°50.

Tableau n°50 : Analyse de la variance sur l'évolution de nombre de colonies de *B. bassiana* sur le feuillage de différentes plantes.

Source	DDL	Somme des carrés	Carrés moyens	F de Fisher	Pr > F
Modèle	29	217581,733	7502,818	21,699	< 0,0001
Résidus	30	10373,000	345,767		
Total	59	227954,733			

Les résultats du tableau n°49 et de la Figure n°61 ainsi que les résultats de l'analyse statistique font ressortir que le nombre des colonies de *B. bassiana* diminue significativement selon le type de feuillage des plantes et dans le temps ($p < 0,05$). C'est ainsi que les spores ont mieux persisté sur feuille de tomate (15 jours) suivie consécutivement de la laitue, de la fève, de blé et d'orge (12 jours).

b- Discussion

L'estimation de la quantité de spores viables, par dénombrement des colonies sur milieu Sabouraud nous a permis de suivre la concentration de la population initiale des spores jusqu'à une limite inférieure qui correspond au 14^{ème} jour.

L'observation des résultats présentés dans le graphique (Figure n°61) obtenus à partir du nombre de spores survivantes exprimés en UFC par unité de surface foliaire (cm^2) en fonction du temps nous permet de constater que le paramètre temps a une influence sur la survie des spores. En effet, nous remarquons que le nombre de spores viables diminue en fonction du temps ainsi que selon le matériel biologique en question.

Lors du premier dénombrement effectué au bout du 3^{ème} jour après pulvérisation des spores, le nombre de spores viables (UFC) le plus important est enregistré sur tomate avec un nombre de $217,5 \pm 23 \text{ UFC/cm}^2$ suivi de la laitue avec $201 \pm 35 \text{ UFC/cm}^2$; l'orge avec $102,5 \pm 12,02 \text{ UFC/cm}^2$; la fève $100 \pm 29,7 \text{ UFC/cm}^2$ et le blé avec $100 \pm 19 \text{ UFC/cm}^2$.

Au fur et à mesure qu'on avance dans le temps le nombre de spores viables restant sur le feuillage diminue progressivement pour s'annuler au 18^{ème} jour pour la tomate et au 15^{ème} pour les plantes restantes.

Cette diminution est peut être due à l'arrosage des plantes, qui provoque le détachement ou la chute des spores dans le sol préconisé à la culture de la matière végétale.

Le couvert végétal présentant une surface plus au moins lisse permet également le détachement des spores et par conséquent la diminution du nombre sur la surface végétale. Par ailleurs, la tomate a permis une meilleure persistance des spores de *B. bassiana* par rapport aux autres plantes, ceci pourrait être dû au nombre de poils relativement élevés tapissant le feuillage de cette plante et qui retiendraient les spores de ce champignon.

Divers travaux ont également touché à cet aspect. Les plus importants sont ceux réalisés par Inglis *et al.* (1997) qui ont montré que la densité des conidies dans les champs traités par une suspension de l'ordre de $10^8 \text{ conidies/cm}^2$ diminue significativement dans le temps. Selon ces auteurs, un nombre important de conidies de *Beauveria bassiana* s'infiltrer sous la couverture des récoltes, tombe à la surface du sol et continue de vivre dans les sols argileux glaiseux.

Les résultats émanant des travaux de Fargues et Rodriguez-Rueda (1980) montrent que la persistance des spores de l'entomopathogène *Nomurea rileyi* est importante sur feuille de fève que sur feuilles de chou.

De même Inglis et *al.* (1997) ont enregistré une meilleure persistance des spores de *B. bassiana* sur chiendent que sur Luzerne.

Par ailleurs, les résultats nous ont fait également constater une diminution progressive du nombre de spores viables sur feuillage, ainsi que leur présence non significative au bout du 14^{ème} jour. Alors qu'au bout de 15^{ème} jour nous avons pu observer après un examen microscopique d'un échantillon de sol prélevé sur le support de chaque plante des spores de *B. bassiana*, ceci nous mène à déduire que les spores gardent une longévité plus importante sur le sol que sur le feuillage des plants.

Ce constat est supporté par les travaux de Gaugler et *al.* (1989) qui rapportent que l'incorporation des spores de *B. bassiana* dans le sol augmente leur viabilité, et attribue cela à la protection des spores des rayons solaires et de la température ainsi que de l'humidité extérieure.

III-2-2- Aspect biotechnologique de *Beauveria bassiana*

L'utilisation de l'activité métabolique des microorganismes comme celle des bactéries et des champignons, constitue la branche de la microbiologie industrielle, science ayant pour objet la recherche, l'orientation et le contrôle de l'activité des microorganismes capables de réaliser au dépens de substrats connus, la production d'un produit intéressant l'économie, l'agriculture ou la thérapeutique (Scriban, 1982).

Sous tendu par des avancées majeures dans le domaine des connaissances scientifiques (biochimie des protéines, enzymologie, voies métaboliques, biologie moléculaire, génie génétique...) et de la technologie (aération des fermenteurs, régulation, modélisation), le domaine des fermentations s'est largement étendu (Scriban, 1982).

Le terme de fermentation est apparu au XVI^e siècle ; il vient du latin *fervere*: bouillir (dégagement de bulles de CO₂ dans un moût de vinification).

Pasteur, le fondateur de la microbiologie, l'a défini comme « la vie en absence d'oxygène ». Un tel critère ne convient plus actuellement tant sur le plan scientifique que technologique. Une acception plus pragmatique est préférable, incluant outre la vie en absence d'oxygène (anaérobiose), la vie en présence d'oxygène (aérobiose), dès lors que l'organisme vivant est un microorganisme.

Les microorganismes sont classiquement cultivés dans des fermenteurs. Les possibilités de synthèse sont très importantes. Les conditions physico-chimiques de développement ne sont pas trop exigeantes mais le maintien d'un niveau d'aération des cultures est souvent un facteur limitant (une culture en croissance à une consommation en oxygène maximale).

Ainsi, il est possible de mettre en oeuvre des fermenteurs de plus d'un millier de m³. A grande échelle, les fermenteurs sont utilisés pour la production de produits associés (éthanol, acide lactique), partiellement (pénicilline) ou non associés (acide citrique) à la croissance.

Tout d'abord réalisées au dépens de substances glucidiques, les fermentations s'adressent aujourd'hui aussi bien à des acides organiques ou à leurs sels, qu'à des protéines et enzymes, graisses et stérols, alcools et esters et tout autres composés fermentescibles par les microorganismes (Simon et Meunier, 1990).

L'intérêt économique des champignons et spécialement des Deutéromycètes repose sur leur capacité à produire une grande diversité de molécules : acides organiques, antibiotiques, enzymes.

D'ailleurs les enzymes d'origine fongique ont donné en industrie fromagère, des résultats comparables à ceux de la présure (Ramet et Hardy, 1973).

III-2-2-1- Paramètres de la fermentation

III-2-2-1-1- Evolution du pH

a- Résultat

Les résultats relatifs à l'évolution du pH pendant les 15 jours de la conduite de la fermentation de la souche *Beauveria bassiana* sur les trois milieux Moût d'orge, LD et PDA sont consignés dans le tableau n°51 et la Figure n°62.

Tableau n° 51 : Evolution du pH au cours de la conduite de la fermentation discontinue dans les trois milieux.

Milieu	Jours	Moût d'orge				Lactosérum déprotéiné (LD)				Potatos Dextros Agar (PDA)			
		R1	R2	R3	M±ET	R1	R2	R3	M±ET	R1	R2	R3	M±ET
1 ^{er}		5	5	5	5 ±0	5	5	5	5±0	5	5	5	5±0
3 ^{ème}		4,06	3,64	3,86	3,85±0,21	4,35	4,32	4,32	4,33±0,02	4,86	4,82	4,81	4,83±0,03
6 ^{ème}		3,6	3,54	3,58	3,57±0,03	4,22	4,21	4,21	4,21±0,01	4,81	4,8	4,8	4,8±0,01
9 ^{ème}		3,47	3,43	3,46	3,45±0,02	4,02	3,38	3,39	3,6±0,37	4,68	4,65	4,65	4,66±0,02
12 ^{ème}		3,3	3,31	3,3	3,3±0,01	3,35	3,34	3,34	3,34±0,01	4,1	3,97	3,97	4,01±0,08
15 ^{ème}		3,28	3,27	3,27	3,27±0,01	3,4	3,31	3,32	3,34±0,05	3,82	3,8	3,76	3,79±0,03

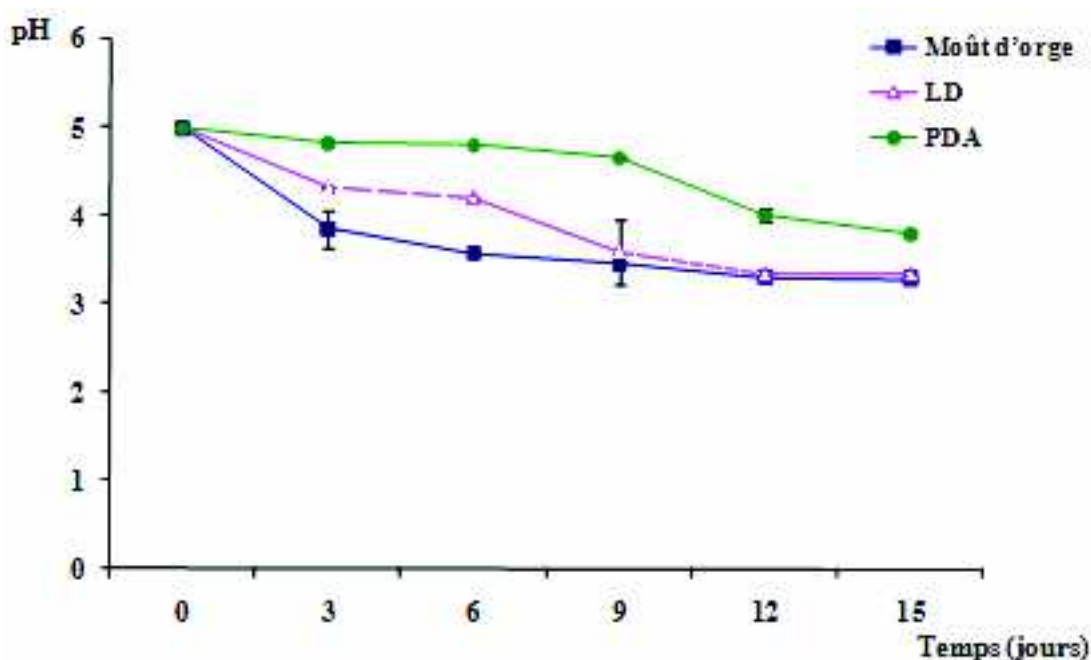


Figure n°62 – Culture discontinue de la souche *B. bassiana* en reacteur de 2L. : variation du PH obtenue sur différents milieux de fermentation.

Les résultats du tableau n°51 et de la Figure n°62 ont été traité statistiquement par une analyse de variance à un critère de classification (facteur : consommation des sucres).

Tableau n° 52 : Analyse de la variance sur l'évolution du pH, au cours de la fermentation de *B.bassiana* sur les trois milieux de culture retenus.

Source de variation	DDL	Somme des carrés	Carrés moyens	F de Fisher	Pr > F
Modèle	17	21,653	1,274	92,546	< 0,0001
Résidus	36	0,495	0,014		
Total	53	22,148			

Les résultats de l'analyse de la variance montrent que dans le temps et d'un milieu de fermentation à un autre le pH diffère significativement ($p < 0,05$).

A la vue des résultats mentionnés dans le tableau n°51 et le graphique de la Figure n°62, il ressort que dans le temps, le pH suit la même évolution sur les trois milieux étudiés au cours de la fermentation de *B.bassiana*. En effet au 3^{ème} jour de la fermentation, le pH a diminué à 3,66 sur mout d'orge ; 4,35 sur LD et 4,81 sur PDA. On a enregistré ensuite une légère augmentation du 6^{ème} au 9^{ème} jour.

Un abaissement du pH est enregistré par la suite pour atteindre au 15^{ème} jour 3,58 ; 3,84 et 4,22 sur respectivement les milieux MO ; LD et PDA. Si on compare la variation du pH selon les milieux on constate un pH plus acide sur MO suivi par le LD ensuite vient le PDA.

b- Discussion :

La diminution du pH peut être tributaire de l'excrétion ou la synthèse des produits acides issus du métabolisme des éléments nutritifs qui rentrent dans la composition des milieux de culture testés notamment les sources de carbone tels que les sucres.

Dans la majorité des fermentations industriels, la formation de CO₂ et d'acides organiques acidifie le milieu (Simon et Meunier, 1990). L'augmentation par contre du pH peut être traduite par la production en parallèle par notre souche des métabolites basiques comme exemple l'ammoniac qui neutralise l'acidité du milieu comme l'ont déjà souligné Bidochka et Khachatourians en 1991 qui travaillaient sur la production d'acides organiques par *Beauveria bassiana*.

De pareils résultats ont été apportés par Guellal et Khechkhouche en 2002 et Sadjji et Ladjici en 2003 sur la souche *B.basianna* cultivée sur lactosérum.

III-2-2-1-2- Evolution de la consommation des sucres

Le dosage des sucres réducteurs par la méthode à l'Anthrone nous a révélé des concentrations variables dans le temps et selon les milieux (Tableau n°53 et Figure n°63).

Tableau n°53 : Evolution de la concentration des sucres réducteurs (g/l) au cours de la fermentation en discontinu de *B. bassiana*.

Recherche fondamentale sur l'entomothogène *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.)Vuill.
(Ascomycota: Hypocreales) :

Milieux (jours)	Mps d'orge (MO)			Lactosérum déprotéiné (LD)			Potatos Dextros Agar (PDA)		
	R1	R2	M±ET	R1	R2	M±ET	R1	R2	M±ET
1 ^{er}	40	40,11	40,06±0,08	50,05	50,01	50,03±0,03	57,3	57,1	57,17±0,13
3 ^{ème}	31	31,7	31,35±0,49	49	49,32	49,16±0,23	56,3	56	56,15±0,16
6 ^{ème}	28	28	28±0	47,28	47	47,14±0,2	40,1	40	40,06±0,08
9 ^{ème}	25	25,4	25,2±0,28	38	38	38±0	34,6	34,5	34,57±0,09
12 ^{ème}	23	23,7	23,35±0,49	35	35,06	35,03±0,04	24,6	24,5	24,53±0,04
15 ^{ème}	20	20	20±0	30	30,08	30,04±0,06	22,9	22,6	22,75±0,21

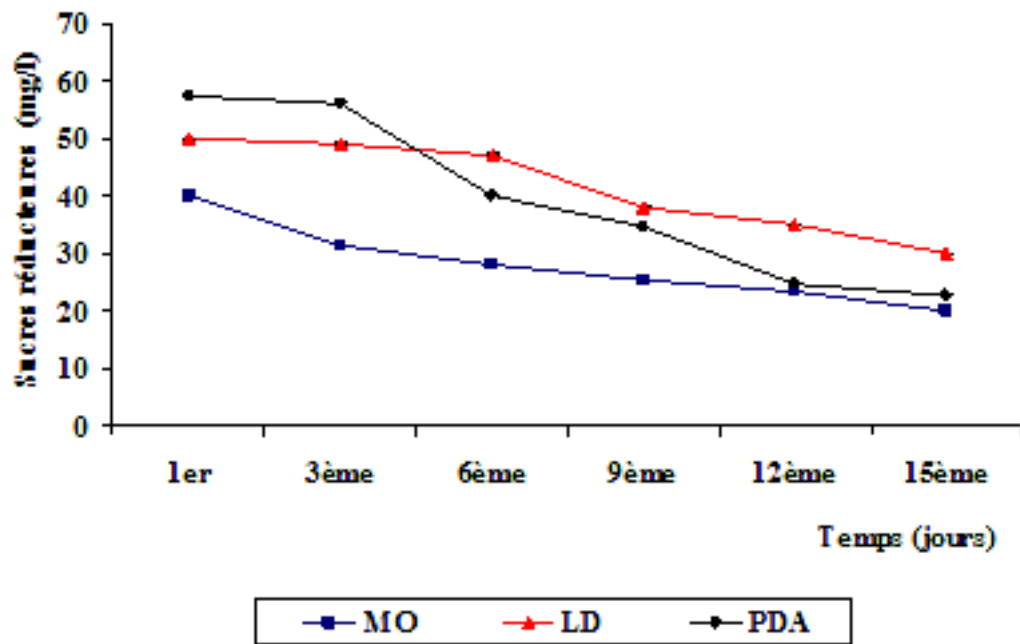


Figure n°63 – Culture discontinue de la souche *B. bassiana* en reacteur de 2L. : variation de la production des sucres réducteurs obtenus sur différents milieux de fermentation.

Les résultats de tableau n°36 ont été analysés par le test statistique de la variance (tableau n°54).

Tableau n°54 : Analyse de la variance sur l'évolution de la concentration des sucres réducteurs (g/l) au cours de la fermentation en discontinu de *B. bassiana*.

Source de variation	DDL	Somme des carrés	Carrés moyens	F de Fisher	Pr > F
Modèle	17	4689,481	275,852	6600,642	< 0,0001
Résidus	18	0,752	0,042		
Total	35	4690,233			

A travers les résultats affichés sur tableau n°53 et ceux de l'analyse de la variance (tableau n°54) on constate que la consommation des sucres par *B. bassiana* au cours de la fermentation discontinue diffère significativement d'un milieu à un autre ($P \leq 0,05$).

Sur le graphique de la Figure n°45, la concentration des sucres réducteurs (glucose) diminue progressivement sur les trois milieux de cultures de 40g/l à 20g/l sur MO ; de 50,03g/l à 30,04g/l sur LD et de 57,17g/l à 22,75g/l sur PDA respectivement dU 1^{er} jour au 15^{ème} jour de fermentation.

Ceci explique l'utilisation de cette source de carbone par notre souche pour la synthèse des métabolites nécessaires pour sa croissance.

b- Discussion

A travers la comparaison des résultats concernant l'utilisation des sucres par *B.bassiana* au cours de la fermentation discontinuée selon les milieux, il s'est avéré que la consommation la plus élevée est obtenue sur MO et PDA puisqu'ils contiennent le glucose comme seule source de carbone, par contre sur le milieu LD la diminution du concentration de glucose suit une allure plus faible au cours du temps à cause de lactose qui est un sucre complexe nécessitant plus de temps et un bagage enzymatique spécifique pour être métabolisé.

Ceci a déjà été signalé par Guellal et Khachhouche, en 2001 et Abdelhag et Dali en 2004 qui ont obtenu une consommation en sucre de *B.basianna* qui avoisine les 10g / l sur lactosérum. Par ailleurs Amelung (1927) et Bernhaver (1928) ont démontré que le saccharose est la meilleure source de carbone. Pour les espèces du genre *Aspergillus*, Doelger et Prescott (1934) obtiennent le plus haut rendement en utilisant du saccharose à 14% avec la souche *Aspergillus nigerou* de la mélasse vue sa richesse en éléments nutritifs Fried (1971).

III-2-2-1-3- Evolution de la production d'acide citrique

a- Résultat

Les résultats relatifs à la production d'acide citrique par *B. bassiana* au cours de la fermentation discontinuée conduite sur les trois milieux de culture (MO, LD, PDA) sont inscrits dans le tableau n°55 et portés par le graphe de la Figure n°64.

Tableau n°55 : Evolution de la production de l'acide citrique (mg /l) au cours de la fermentation discontinuée de *Beauveria bassiana* sur les milieux MO, LD et PDA.

Milieux	Jours	Moût d'orge (MO)			Lactosérum déprotéiné (LD)			Potatos Dextros Agar (PDA)		
		R1	R2	M±ET	R1	R2	M±ET	R1	R2	M±ET
	1 ^{er}	1,7	1,3	1,5±0,28	1,3	1,4	1,35±0,07	1	1,1	1,05±0,07
	3 ^{ème}	1,71	1,76	1,74±0,04	1,7	1,8	1,75±0,07	2,2	2,3	2,25±0,07
	6 ^{ème}	1,8	1,8	1,8±0	4,6	4,3	4,45±0,21	2,9	2,8	2,85±0,07
	9 ^{ème}	2,01	2,61	2,31±0,42	5,7	5,4	5,55±0,21	3,6	4,01	3,80±0,29
	12 ^{ème}	4,6	5,2	4,9±0,42	5,9	6,5	6,2±0,42	4,7	4,3	4,5±0,28
	15 ^{ème}	9,11	10,03	9,57±0,65	9,9	10	9,95±0,07	10	11,06	10,53±0,75

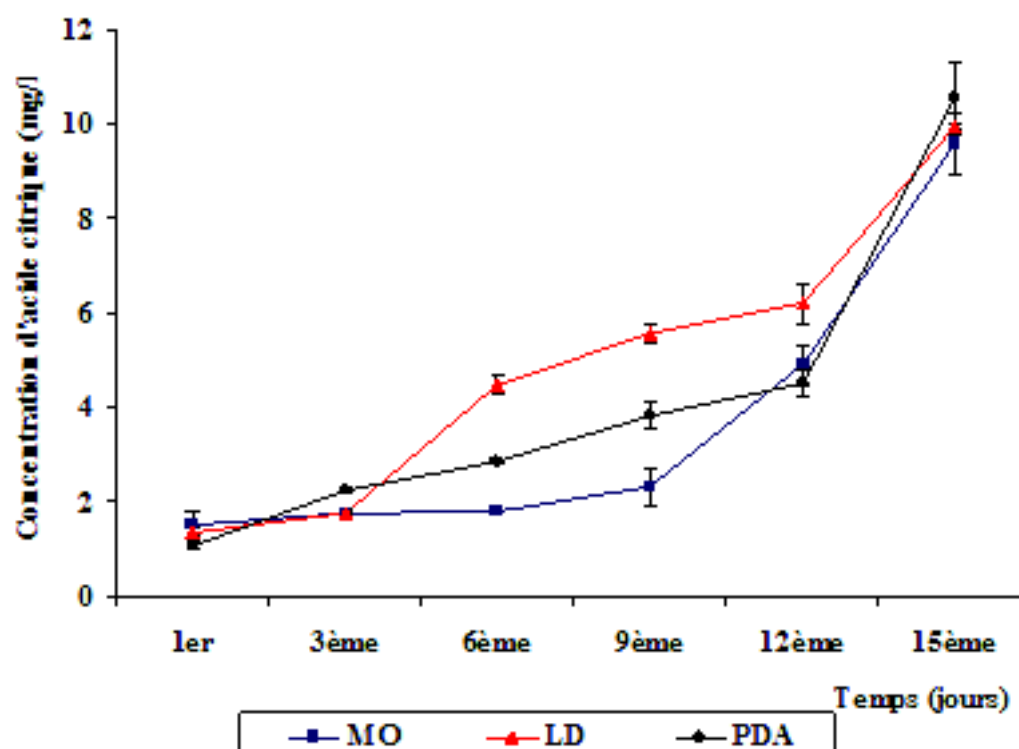


Figure n°64 – Culture discontinue de la souche *B. bassiana* en reacteur de 2L. : variation production d'acide citrique obtenue sur différents milieux de fermentation.

Les résultats du tableau n°56 ont été traités statistiquement par une analyse de variance à un critère de classification (facteur acide citrique).

Tableau n°56 : Analyse de la variance sur l'évolution de la production de l'acide citrique au cours de la fermentation discontinue de *Beauveria bassiana* sur les milieux MO, LD et PDA.

Source	DDL	Somme des carrés	Carrés moyens	F de Fisher	Pr > F
Modèle	17	2,828	0,166	291,903	< 0,0001
Résidus	18	0,010	0,001		
Total	35	2,838			

L'analyse de la variance montre que la production des citrates diffère significativement selon les milieux de fermentation et dans le temps ($p \leq 0,05$).

Les résultats mentionnés dans le tableau n°39 et porté sur la Figure n°64 font ressortir que la production d'acide citrique suit une évolution régulière dans le temps et varie significativement selon les milieux ($p < 0,05$). En effet, la meilleure production a été noté au 15^{ème} jour, qui s'est évaluée d'une façon croissante de $9,57 \pm 0,65$ mg ; $9,95 \pm 0,07$ mg et $10,53 \pm 0,75$ mg sur respectivement MO; LD et PDA.

b- Discussion

L'acide citrique (acide 2-hydroxy-1,2,3-propanetricarboxylique) est très diffus dans la nature. Il intervient dans le métabolisme de nombreux animaux et plantes. Il a été isolé sous forme cristalline à partir du jus de citron, en 1784, par Sheele et sa structure a été établie par Liebig en 1838 (Figure n°65).

La synthèse chimique de l'acide citrique, à partir de glycérine, remonte à 1880. En 1893, Wettmer découvrit quelques micromycètes capables de produire l'acide citrique par fermentation de substrats contenant du sucre (Bidochka et Khachatourians (1990).

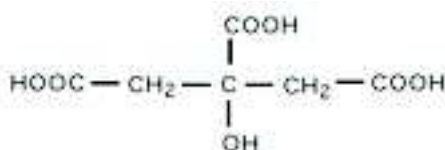


Figure n°65 - Formule semi-développée de l'acide citrique.

L'acide citrique est biodégradable et n'est pas toxique pour l'homme ni pour l'environnement. A cet effet il est ajouté à certains aliments et à certaines boissons, en particulier les limonades pour leur donner un goût acide agréable. Cette molécule se trouve également utilisée comme agent conservateur dans l'industrie alimentaire ; dans certains médicaments et dans l'imprimerie.

L'acide citrique a été obtenu pour la première fois par fermentation par CARL, avec des moisissures du genre *Mucor*, *Citomyces* et *Penicillium*. Néanmoins, l'espèce *Aspergillus niger* reste le microorganisme de choix pour la production d'acide citrique (Kapoor et al, 1981).

De nombreux acides organiques peuvent s'accumuler dans le milieu de culture, résultant de métabolisme des oses. Ce sont des produits terminant de la glycolyse, ou résultent de l'oxydation incomplète de ces oses tel que l'acide citrique. A l'échelle industrielle, souvent produit par fermentation d'*Aspergillus niger* sur le milieu mélasse de betterave ou de canne à sucre.

Pour notre souche qui appartient au même ordre qu'*A. niger* (*Phialidale*). Les résultats mentionnés dans le tableau n°55 et porté sur la Figure n°64 font ressortir que la production d'acide citrique suit une évolution régulière dans le temps et varie significativement selon les milieux ($p < 0,05$).

Il est à noter que sur les trois milieux étudiés, la production des citrates a débuté au 2^{ème} jour et a suivi une évolution régulière dans le temps pour atteindre le maximum au 15^{ème} jour et a été meilleure sur milieu PDA suivi du LD et enfin MO. Cette même évolution a été rapportée par Bidochka et Khachatourians (1990) pour la même espèce cultivée sur milieu malt.

Dans certains types de fermentation, notamment celles conduites en Erlenmeyer la production des citrates est faible, voir même nulle en début de fermentation et devient massive en fin de croissance comme l'ont signalé Abdelhag et Dali en 2004 et Gana et Hami en 1992 qui ont suivi la production de l'acide citrique par *B.bassiana* cultivé sur lactosérum et par *A. niger* cultivé sur mélasse de canne à sucre respectivement.

Il n'y a pas eu le phénomène d'excrétion massive de citrates en fin de croissance. Ceci est dû au rôle conjugué de l'aération et de l'agitation qui ont rendu cette excrétion régulière et abondante. Ceci explique la diminution du pH qui devient plus rapide en fin de croissance (Figure n°64).

Par ailleurs Botton (1985) ont rapporté chez *Aspergillus niger* cultivé sur milieu à base de mélasse de canne à sucre un rendement de production en acide citrique de 112g/l. Il en est de même pour Karow et Walksman (1947) ; Shu (1947) et Trumpy (1963) qui ont obtenu

une concentration d'acide citrique de l'ordre de 100g/l .L' excrétion des citrates par notre souche est relativement faible comparativement aux résultats rapportés par la bibliographie.

Ceci pourrait être expliqué par le fait que nous n'avons pas optimisé le milieu de culture qui est utilisé tels quel. Il n'ya eu aucun changement dans la composition ni dans les paramètres d'aération qui influencent de très près la production des acides organiques. Cest ainsi que la production d'acide citrique par des moisissures est optimale dans un milieu acide, carencé en fer et très aéré.

La production d'acide gluconique est réalisée avec le même type d'organismes en milieu également très aéré, mais appauvri en azote et contenant du carbonate de calcium neutralisant l'acide gluconique formé. D'après Hemant (1986) la souche *Aspergillus niger* accumule de grandes quantités d'acide citrique extracellulaire quand la croissance s'effectue sur milieu minimal en sels.

L'amélioration des rendements est obtenue en utilisant des organismes mutants (naturels ou isolés après irradiation ou traitement chimique de souches sauvages) qui ont conserve la possibilité de synthétiser le produit recherché, mais ont perdu celle de l'utiliser, ce qui provoque son accumulation.

Il y a également intérêt a ce que cette accumulation soit suivie d'une ex sorption dans le milieu de culture, la purification pouvant être plus aisée a partir du milieu qu'a partir des organismes (Gana et Hami, 1992) .

III-2-2-1-4- Evolution de la biomasse

a- Résultat

Les résultats obtenus de la pesée de la masse mycélienne obtenus sur les trois milieux (MO, LD et PDA) sont mentionnés dans le tableau n°56 et portés par le graphe de la Figure n°66.

Tableau n° 57 : Evolution de la biomasse en grammes de *Beauveria bassiana* dans les trois milieux de fermentation.

Milieux	Moût d'orge (MO)			Lactosérum déprotéiné (LD)			Potatos Dextros Agar (PDA)		
	R1	R2	M±ET	R1	R2	M±ET	R1	R2	M±ET
1 ^{er}	2	2	2±0	2	2	2±0	2	2	2±0
3 ^{ème}	6,45	6,86	6,66±0,29	3,6	3	3,3±0,42	5,6	6,03	5,815±0,3
6 ^{ème}	8,35	7,99	8,17±0,25	5,1	5,84	5,47±0,52	7,1	7,54	7,32±0,31
9 ^{ème}	9	10,1	9,55±0,78	7,43	6,57	7±0,61	10,43	10	10,22±0,3
12 ^{ème}	10,3	11,2	10,76±0,63	9,22	9,45	9,34±0,16	10,76	10,9	10,83±0,1
15 ^{ème}	10,2	12,6	11,4±1,70	9,3	9,5	9,4±0,14	10,7	11,02	10,86±0,23

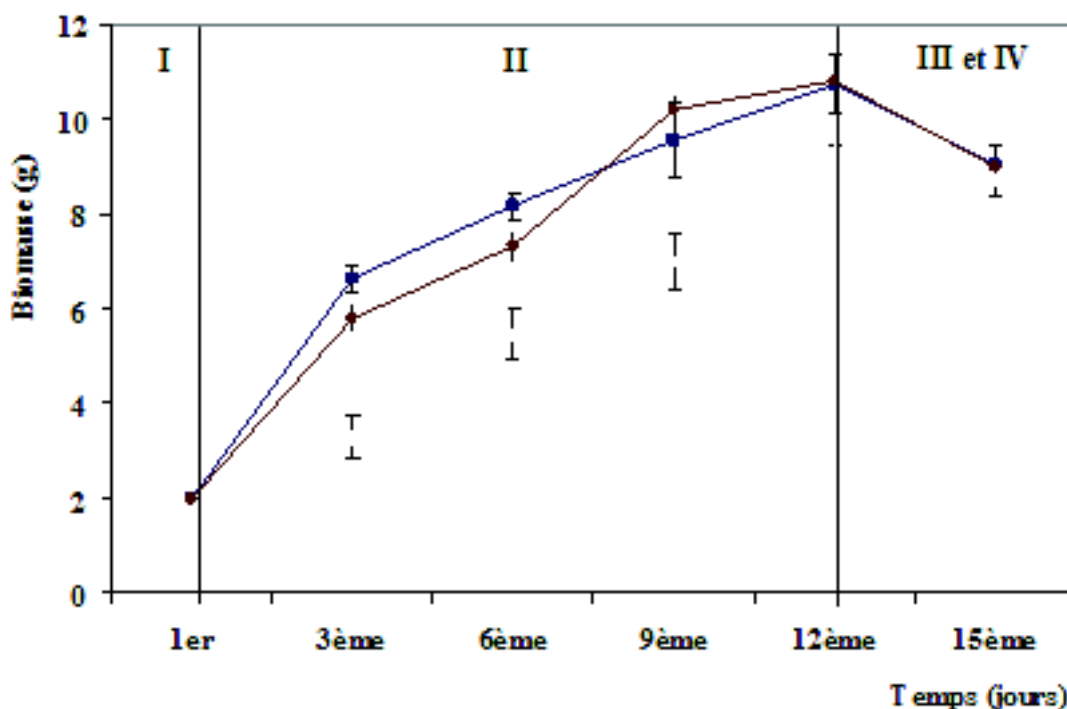


Figure n°66 – Culture discontinue de la *B. bassiana* en reacteur de 2L. : variation de biomasse obtenue sur différents de culture.

I : Phase de latence

II : phase exponentielle

III et IV : Phases de décélération (stationnaire et déclin).

Les résultats du tableau n°57 ont été traités statistiquement par une analyse de variance à un critère de classification (facteur biomasse).

Tableau n° 58 : Analyse de la variance sur l'évolution de la biomasse au cours de la fermentation discontinue de *Beauveria bassiana* sur les milieux MO, LD et PDA.

Source	DDL	Somme des carrés	Carrés moyens	F de Fisher	Pr > F
Modèle	17	366,041	21,532	73,801	< 0,0001
Résidus	18	5,252	0,292		
Total	35	371,293			

Les résultats de l'analyse de la variance affichent des différences hautement significatives de l'évolution de la biomasse d'un milieu à un autre ($P \leq 0,05$).

L'allure de la Figure n°66 fait apparaître les phases habituelles de la croissance microbienne (Phases : I, II, III et IV). Cependant, on note l'absence de la phase de latence qui correspond à une période d'adaptation des microorganismes aux milieux nutritifs proposés et essentiellement à la synthèse des enzymes nécessaire pour métaboliser les nutriments.

Ceci est dû au pré cultures dans lesquelles notre souche a déjà réalisé sa phase de latence. Durant la phase d'accélération et la phase exponentielle (II), le taux de croissance est maximum, les microorganismes se multiplient sans entrave, la mortalité est faible. Durant

la phase de décélération la capacité limite du milieu est atteinte, le taux de croissance diminue et régresse (phases : III et IV).

b- Discussion

D'après les résultats de la pesée qui sont enregistrés dans le tableau n°56 et portés sur la Figure n°66 on remarque que la meilleure production de biomasse est obtenue au 12^{ème} jour sur PDA avec 10,83g suivi de MO et de LD avec respectivement 10,76g et 9,34g.

Nos résultats étaient loin des résultats trouvés par Abdelhag et Dali (2004) qui ont enregistré de très faibles biomasses. Elles ont utilisés des Erlenmeyers agités dans leur expérimentation. Certainement, l'utilisation de ces derniers est nécessaire pour l'optimisation des conditions de culture seulement elle se heurte à divers inconvénients notamment la reproductibilité des résultats. Par contre, les fermentations en fermenteurs agités et aérés sont les mieux adaptés car elles se rapprochent le plus des conditions de fermentations industrielles

Ces résultats nous mènent à conclure que pour la culture en discontinu le moût d'orge et le PDA sont plus performants pour la souche *Beauveria bassiana* comme l'ont déjà confirmé les résultats obtenus pour la croissance diamétrale.

Rombach et al., (1989) ont pu obtenir une grande quantité de spores de *B. bassiana* (10^{12} spores/ml) au 8^{ème} jour de fermentation sur milieu contenant 3,5% de maltose et 0,75% d'extrait de levure.

III-2-2-1-5- Evolution de la production de protéines

a- Résultat

Les taux de protéines enregistrés pour notre souche par la méthode de biuret au 15^{ème} jour de fermentation sont consignés sur le tableau n°58 et le graphique de la Figure n°67.

Tableau n° 59 : Concentration en protéines totales au 15^{ème} jour de fermentation de *B.bassiana*.

Milieux	Protéines totales (g/l)		
	R1	R2	M±ET
Moût d'orge (MO)	9,93	11,2	10,57±0,99
Lactosérum déprotéiné (LD)	8,45	7,65	8,05±0,57
Potatos Dextros Agar (PDA)	3,91	5,2	4,55±0,91

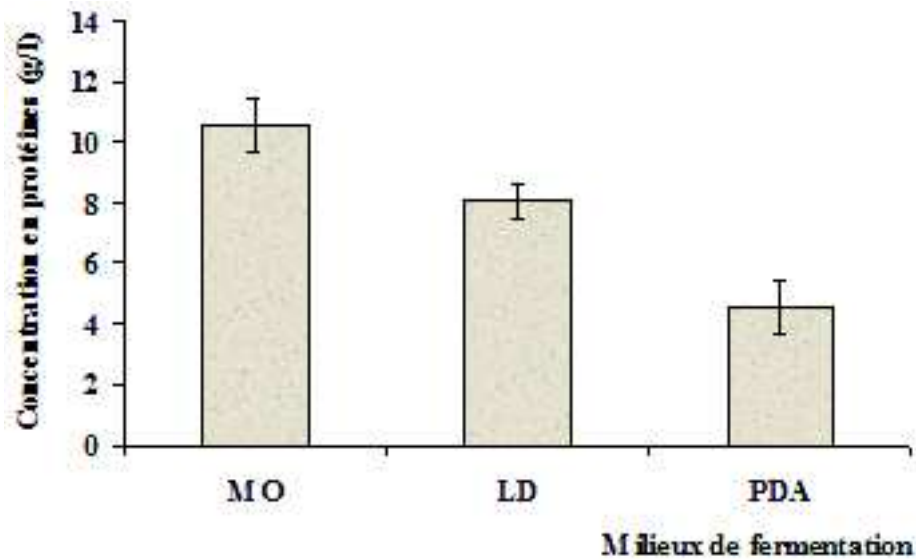


Figure n°67 – Concentration en protéine totales au 15^{ème} jour de fermentation de *B. bassiana*.

Les résultats du tableau n°58 ont été traités statistiquement par une analyse de variance à un critère de classification (facteur protéines totales).

Tableau n°60 : Analyse de la variance sur l'influence de substrat de fermentation sur le taux de protéines produites par *B.bassiana*:

Source	DDL	Somme des carrés	Carrés moyens	F de Fisher	Pr > F
Modèle	2	36,440	18,220	27,909	0,012
Résidus	3	1,959	0,653		
Total	5	38,399			

Les résultats de l'analyse de la variance mettent en évidence une influence significative de type de moût de fermentation sur la quantité de protéines produites par *B.bassiana* ($p < 0,05$).

En effet au 15^{ème} jour de fermentation discontinue de *B.bassiana*, la meilleure production est notée sur milieu MO $10,57 \pm 0,99 \text{ g/l}$ suivi de milieu LD avec une production de $8,05 \pm 0,57 \text{ g/l}$ et en 3^{ème} lieu sur milieu PDA avec $4,55 \pm 0,91 \text{ g/l}$ (Figure n°67).

b- Discussion

Un grand nombre de microorganismes a la propriété d'élaborer à partir d'hydrates de carbones et de sels minéraux, les acides aminés nécessaires à la synthèse de leurs protéines et à leur croissance. Cependant l'homme et les animaux supérieurs ne pouvant effectuer la synthèse de ces acides aminés, ils doivent donc les trouver dans leur nourriture (Leveau et Bouix, 1993)

La production d'acides aminés permet de suppléer à cette carence et présente du point de vue social une grande importance.

La production industrielle d'acide aminé par voie microbiologique a pris une telle extension que ces méthodes sont parvenues à concurrencer très largement les techniques classiques de la synthèse chimique Vananuvat et Insella (1975).

Dans la fermentation discontinue de *B.bassiana*, les quantités de protéines produites par notre souche par la méthode de biuret au 15^{ème} jour s'évaluent à 10,57±0,99g/l sur milieu moût d'orge ; 8,05±0,57g/l sur lactosérum déprotéiné et 4,55±0,91g/l sur PDA (Figure n°67). Le milieu moût d'orge semble offrir à notre souche les meilleurs éléments pour le métabolisme protéique.

D'autres part plusieurs souches de levures cultivées sur lactosérum ont été à l'origine d'une forte production de POU (protéines d'organismes cellulaires) citons *Kluveromyces marxianus*; *K.fragilis*; *K.lactis* et le genre *Candida* comme l'ont rapporté; Vananuvat et Insella (1975); Moulin (1981) et Kallel(1991)

III-2-2-1-6- Evolution de la production d'agents anti-microbiens

a- Résultat

Les résultats relatifs à la production d'agents antimicrobiens par la méthode de disque réalisée sur les souches testées : *Escherichia coli*, *Klebssiella* ; *Pseudomonas aeruginosa* et *Candida albicans* à partir des moûts de fermentation sont mentionnés dans le tableaux n°59, 60, 61 et 62 et indiqués aussi sur la photo de la Figure n°68.

Tableau n°61 : Diamètre de la zone d'inhibition (mm) de *E. coli*

Milieu Temps	Moût d'orge (MO)	Lactosérum déprotéiné (LD)	Potatos Dextros Agar (PDA)
1 ^{er}	0	0	0
3 ^{ème}	4	4	4
6 ^{ème}	9	9	4
9 ^{ème}	4	8	2
12 ^{ème}	4	5	3
15 ^{ème}	1	2	1

Tableau n° 62 : Diamètre de la zone d'inhibition (mm) de *Klebssiella*.

Milieu Temps	Moût d'orge (MO)	Lactosérum déprotéiné (LD)	Potatos Dextros Agar (PDA)
1 ^{er}	0	0	0
3 ^{ème}	2	1	3
6 ^{ème}	1	1	1
9 ^{ème}	7	2	4
12 ^{ème}	6	3	5
15 ^{ème}	1	3	5

Tableau n°63 : Diamètre de la zone d'inhibition (mm) de *C. albicans*.

Milieu Temps	Moût d'orge (MO)	Catosérum déprotéine (LD)	Potatos Dextros Agar (PDA)
1 ^{er}	0	0	0
3 ^{ème}	3	5	5
6 ^{ème}	1	1	1
9 ^{ème}	4	9	2
12 ^{ème}	7	4	3
15 ^{ème}	1	4	4

Tableau n° 64 : Diamètre de la zone d'inhibition (mm) de *P. aeruginosa*.

Milieus Temps	Moût d'orge (MO)	Catosérum déprotéine (LD)	Potatos Dextros Agar (PDA)
1 ^{er}	0	0	0
3 ^{ème}	1	1	2
6 ^{ème}	2	3	3
9 ^{ème}	6	6	4
12 ^{ème}	4	5	4
15 ^{ème}	1	7	1

A la vue des résultats qui sont enregistrés dans le tableau n°45, 46, 47 et 48 durant les 15 jours de fermentation en discontinu sur les 3 milieux de culture (MO, LD, et PDA), on remarque qu'il y a une production d'agents anti-microbiens contre les souches cibles testés (*E.coli*, *Klebssiela*, *C.albicans* et *P.aeruginosas*) qui s'est traduite par la formation des zones d'inhibition (Figure n°68).

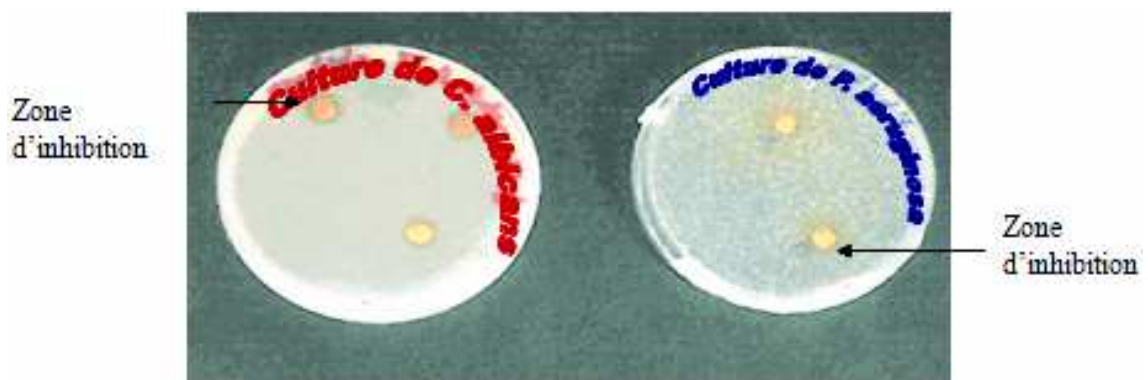


Figure n°68 - Zones d'inhibition du aux agents antimicrobiens produits par *B. bassiana*.

b- Discussion

La grande majorité des antibiotiques est produite par des micro-organismes. Signalons cependant, sans nous y arrêter, l'intérêt qu'offrent les plantes supérieures dans cette

production. Parmi les micro-organismes, les bactéries sont responsables d'environ 80 % de la production, les champignons de 20 % (Vandamme, 1985).

Les champignons ont été à l'origine de la découverte et de la production industrielle d'antibiotiques. Plusieurs milliers d'antibiotiques produits par ces organismes sont connus, mais un petit nombre seulement est commercialisé et exploité industriellement. Ils appartiennent essentiellement aux genres *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cephalosporium*, *Helminthosporium* et *Fusidium* (Vandamme, 1985).

Depuis 1940, la fabrication des antibiotiques a pris une part prédominante dans l'industrie pharmaceutique, la production de Pénicilline et de Streptomycine et de leurs dérivés constituent 60% des antibiotiques produits. On voit apparaître une large gamme de nouveaux antibiotiques actifs contre tout type de microbes avec le développement de la microbiologie industrielle.

On peut citer comme antibiotique obtenu par fermentation la bacitracine, la néomycine; les tétracyclines, La découverte de nouvelles molécules synthétise par les microorganismes non exploiter regain un intérêt capital.

Pour notre part nous avons essayé d'apporter notre contribution par l'étude d'éventuelle synthèse d'agents antimicrobiens par la souche *B. bassiana* au cours de la fermentation discontinue qui a montré que la sensibilité à l'agent produit diffère dans le temps selon la souche testée, l'agent producteur et le milieu de production.

Le début de production de ces agents anti-microbien (présence de la zone d'inhibition) commence au 3^{ème} jour de fermentation dans les trois milieux de culture pour les quatre souches testées, par la suite au 6^{ème} jour les substances produites dans les trois milieux (MO, LD et PDA) montre un effet positif contre la souche cible *E. coli*.

Néanmoins, au 9^{ème} jour on a enregistré une activité importante d'agents antimicrobiens pour les souches bactériennes testées *Klebsiella*, *C. albicans* et *P. aeruginosa*. L'inhibition maximum arrive jusqu'à 9mm sur le moût d'orge pour la souche *E. coli*, et le LD qui atteint la valeur 8mm. Les phloroglucinoles sont des métabolites secondaires phénoliques produites par *Pseudomonas aeruginosa* qui peuvent supprimer une large gamme d'agents phytopathogènes incluant bactéries ; champignons et nématodes (Bolwerk et al., 2003).

III-2-2-1-7- Evolution de la production d'éthanol et autres solvants

a- Résultat

Les résultats concernant la production d'éthanol et les composées chimiques séparées par la méthode de CPG/MS sur les trois milieux de fermentation discontinue (MO, LD et PDA) aux 3^{ème}, 9^{ème} et 15^{ème} jour par *B. bassiana* sont enregistrés sur les tableaux n°63, 64 et 65.

Tableau n° 65 : Les probabilités d'existence d'éthanol et autres composées chimiques de fermentation sur MO.

Temps	somme de pk	Produits séparés	formule moléculaire	La plus grande probabilité d'existence
Début de fermentation	1 2 3 4 5 6 7	Ethanol Acide acétique 1,3-Butanediol Acide 2-Heptanoïque - Acide decanoïque -	C2H6O C2H4O2	96% 90% 98% 162% 42% 35% 32%
9 ^{ème} jours	1 2 3 4 5 6 7 8	- Ethanol Ethanol 1-Butanol 1,3-Butanediol - Xanthosine -	CH6N2O2 C2H6O	96% 106% 94% 102% 41% 82% 68%
15 ^{ème} jours	1 2	Ethanol 2-Butanone, 3-hydroxy-	C2H6O C4H8O2	96% 94%

Tableau n°66 : Les probabilités d'existence d'éthanol et autres composées chimiques de fermentation sur le milieu LD.

Temps	somme de pk	produits séparés	formule moléculaire	la plus grande probabilité d'existence
Début de fermentation	1 2 3 4 5	2,3-Butanediol 2-Butanol, 3-(1,3-dimethylbutoxy)- N-Ethyl-N'-nitroguanidine Acide Butanoïque, 3-hydroxy-	C4H10O2 C2H6O	83% 65% 82% 70% 78% 4%
9 ^{ème} jours	1 2 3 4 5	Acide Carbamique, sel monoammonium Ethanol Acide acétique 2-Butanone,3-hydroxy- 4-Fluorohistamine 4-Fluorohistamine	CH6N2O2 C2H6O	99% 99% 1% 90% 26% 92% 4%
15 ^{ème} jours	1 2 3 4 5	Ethanol,2-nitro- 2,3-Butanediol 2,3-Butanediol 2,3-Butanediol Acide acétique 1,3-Butanediol 2,3-Butanedol	C2H5NO3 C4H10O2	102% 94% 40% 92% 49% 0%

Tableau n°67 : Les probabilités d'existences d'éthanol et autres produits chimiques de fermentation sur le milieu PDA.

Temps	Somme de pk	Produits séparés	Formule moléculaire	la plus grande probabilité d'existence
Début de fermentation	1 2 3 4 5	Acétone Di-n-octyl phthalate	C3H6O C22H15N	38% 37% 13% 36% 24% 39%
9 ^{ème} jour	1 2 3 4 5	Ethanol 2-Acide Heptanoïque, éthyle ester, Acide Decanoïque, decyl ester Hexacosane, 13-dodecyl	C2H6O C9H16O2	95% 73% 50% 2% 20% 43% 2 63%
15 ^{ème} jour	1 2 3 4 5	2-Hydroxy-Propylamide 2,3-Butanediol 2,5,8-Triphenyl benzotriazole 2-Acide Heptanoïque,ethyl ester,	C3H7NO2 C4H10O2	90% 25% 47% 32% 35% 39%

Sur les trois milieux de fermentation discontinue de *B.bassiana* (tableau n°63, 64 et 65) on note une forte probabilité de synthèse d'éthanol par *B.bassiana* qui s'évalue à 96% au début de fermentation seulement sur milieu MO, la probabilité de synthèse d'éthanol apparaît dès le 9^{ème} jour sur LD et PDA qui s'évalue respectivement à 94% et 95%. Au 15^{ème} jour la probabilité d'apparition augmente sur milieu LD jusqu'à 98%, puis se stabilise pour le milieu MO avec 96%, mais sur milieu PDA elle est nul.

b- Discussion

Jusqu'en 1940, l'alcool, l'acide acétique, l'acétone, le butanol, le propanol et parfois la glycérine furent produits par fermentation. Toutefois, depuis cette date, la compétition avec les produits de synthèse obtenus à partir du pétrole a considérablement réduit l'intérêt des procédés biologiques qui ont cependant pu survivre lorsque les sources abondantes et bon marché d'hydrate de carbone étaient disponibles (Maiorella et al., 1983).

L'éthanol est produit industriellement en grande quantité (environ un million de tonnes par an). Il est surtout utilisé comme intermédiaire de synthèse et comme solvant. Il permet d'obtenir de nombreux produits chimiques, dont le butadiène, utilisé dans la synthèse du caoutchouc synthétique, ou le chlorure d'éthyle, employé comme anesthésique local. Il constitue également une matière de base pour la fabrication de parfums, de laques, de vernis et d'explosifs (Nagashima, 1990).

Il constitue le produit le plus fréquemment synthétisé lors des fermentations, notamment par les levures en utilisant différentes enzymes comme la zymase qui provoque la décomposition des sucres naturels en éthanol et en dioxyde de carbone. L'une des souches les plus connues pour une telle production est *Saccharomyces fragilis* (Vananuvat et Insilla, 1975).

La production de l'éthanol ne se limite pas à celle des levures, les champignons sont aussi capables de produire l'éthanol

Les résultats de notre essai mettent en évidence une forte probabilité de synthèse d'éthanol par *B.bassiana* qui s'évalue à 96% au début de fermentation seulement sur milieu MO. La probabilité de synthèse d'éthanol apparaît dès le 9^{ème} jour sur LD et PDA qui s'évalue respectivement à 94% et 95%. Au 15^{ème} jour la probabilité d'apparition augmente sur milieu LD jusqu'à 98%, elle reste stable pour le milieu MO 96%, et absente sur PDA.

D'autres composés organiques et chimiques ont une forte probabilité d'existence, telle que l'acide acétique, butanediol et butanol sur le milieu MO et LD qui varient entre 91%-98%, l'acétone est apparue par 98% sur milieu PDA.

Des faibles concentrations d'éthanol ont été enregistrées par la souche *Kluyveromyces fragilis*, qui varient entre 0,03 à 6,01 mg/l (Kebouche, 1998).

III-2-2-2- Lyophilisation

Les champignons sont incapables de poursuivre indéfiniment leur croissance, après une certaine durée, ils deviennent sénescents puis meurent (Rapilly, 1968).

Plusieurs techniques de conservation sont mises en œuvre telle que la conservation à basse température ; sous huile ; en milieu inhibiteur de croissance et la lyophilisation.

Cette dernière est de plus en plus utilisée, elle consiste à dessécher sous vide et à basse température le mycélium ou les spores (Greathead et al., 1994).

Par le biais de cette méthode nous avons pu obtenir à partir de mycélium de *B. bassiana* un lyophilisat ou une poudre de couleur marron (Figure n°69) à la fois facile à conserver et à déssiminer sur terrain une fois mise en solution pour combattre les ravageurs des cultures.

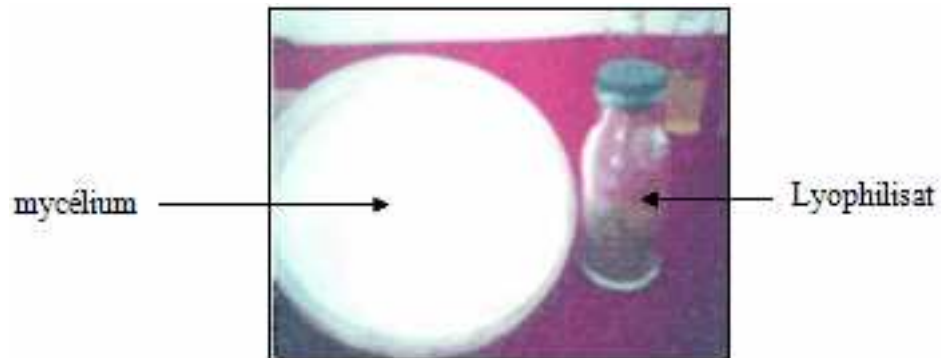


Figure n°69 - Lyophilisat de *B.bassiana*.

III-2-2-3- Recherche des coagulases

a- Résultat

□ - Extraction de protéase

Après 5 jours d'incubation sur du son de blé, la souche fongique *B.bassiana* a recouvert la surface du milieu (Figure n°70).



Figure n°70 - *B.bassiana* recouvrant la surface du son de blé.

L'extraction des protéases nous a permis d'obtenir un extrait enzymatique brut de couleur marron (Figure n°71).



Figure n°71 - Extrait enzymatique brut.

Le dosage des protéines totales de l'extrait enzymatique nous a révélé une concentration de 0,11 mg/ml.

III-2-2-3-1- Détermination de l'activité coagulante

Les essais portant sur l'activité coagulante de l'extrait enzymatique brut ont révélé un temps de coagulation de 5mn et 38s (Figure n°72).

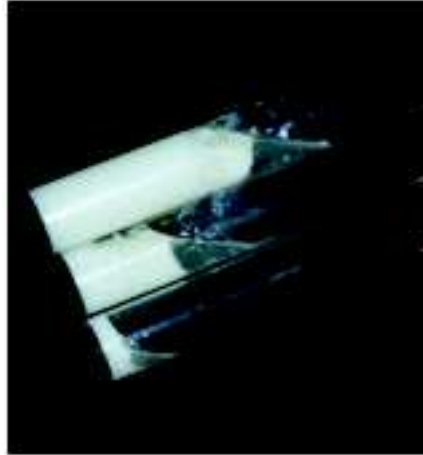


Figure n°72 - Effet coagulant de l'extrait enzymatique sur le lait.

Le calcul de l'activité coagulante selon la formule citée auparavant a donné un résultat de 0,2958 UP et une force coagulante de 65,74 UP.

b- Discussion

Les enzymes coagulantes, la présure ou ses substituts, sont des endopeptidases appartenant au groupe des aspartyl protéases. Ces enzymes ont une double activité, l'une est très spécifique sur la caséine κ , l'autre de protéolyse générale portant sur toutes les protéines, étant susceptible de se manifester au cours de l'affinage des fromages (Choisy et al., 1997).

Nos résultats sont loin de ceux trouvés par Bidochka et Khachatourians en 1987 sur la même souche mais sur milieu différent.

De pareils travaux ont été réalisés par Abdellaoui en 2007 sur la souche *Mucor sp* qui a enregistré une concentration en protéines de 0,14 mg/ml.

Selon les travaux de Bidochka et Khachatourians en 1987 sur *B.bassiana* cultivée sur milieu à base de gélatine comme source de carbone et d'azote, l'activité coagulante est de 64,24 UP. Hassouni (2002) ont produit des lipases et des tannases par *Aspergillus niger* et *Rhizopus microsporus*) cultivé sur grignons d'olives à 30°C.

Kumar et al. (2005), dans une étude similaire sur une coagulase purifiée de *Rhizopus oryzae* ont rapporté une activité coagulante de l'ordre de 32 110UP. Cependant Khan et al. (1983) ont obtenu une activité coagulante de l'ordre de 47 170UP pour la coagulase de *Mucor pusillus*.

Par rapport à une présure bovine de référence dont la force de coagulation est de 1/10000 (Matoub, 2000), et par rapport même aux coagulases d'origine fongique, la force coagulante de notre extrait enzymatique est trop faible.

Ceci peut être expliqué par le fait que notre milieu de culture (son de blé) et le tampon utilisé retenus sont préconisés pour d'autres souches fongiques (*Mucor*) et non pour *Beauveria bassiana*. Il n'y a aucune étude faite sur le milieu optimal pour la production

de coagulase de *B. bassiana*. Par contre, beaucoup de recherches ont été effectuées sur *Mucor pusillus* et *Aspergillus niger* (Khan et al., 1983 et Ratledge et Kristiansen, 2004).

III-3- Activité toxique et inflammatoire de *B.bassiana* vis-à-vis des rats et souris

II-3-1- Effet toxique

a- Résultats

- Effet sur la mortalité

Le suivi des rats traités aux trois doses de *B. bassiana* ($6,9 \times 10^5$ spores/ml, 10^8 spores/ml, 10^{10} spores/ml) du n'a décelé aucun cas de mortalités. Les rats traités ainsi que témoin ont survécu et leur activité nutritionnelle a été le plus normalement possible? ils se sont même reproduit.

- Effet sur l'évolution du poids corporel

Les résultats relatifs à la prise du poids des rats témoins et traités aux différentes doses de *B.bassiana* au 1^{er} jour et au 20^{ème} jour de traitement sont consignés sur le tableau n°66 et le graphique de la Figure n°73.

Tableau n °68 : Gain du poids des rats témoins et traités au *B. bassiana* entre le 1^{er} et le 20^{ème} jours après traitement.

Ind.	Témoins			D1			D2			D3		
	1 ^{er} jour	20 ^{ème} jour	GN	1 ^{er} jour	20 ^{ème} jour	GN	1 ^{er} jour	20 ^{ème} jour	GN	1 ^{er} jour	20 ^{ème} jour	GN
I1	185	194,25	9,25	183,11	192,36	9,25	207	216,25	9,25	185,2	194,45	9,25
I2	176	185,25	9,25	175,5	184,75	9,25	135,15	144,4	9,25	208,25	217,4	9,15
I3	102	113,05	11,05	205	214,25	9,25	120	132,1	12,1	193,23	202,48	9,25
I4	194,23	203,48	9,25	198,16	207,41	9,25	175,01	184,26	9,25	197,3	206,55	9,25
I5	170,15	179,4	9,25	175,33	184,58	9,25	185,3	194,55	9,25	188	197,25	9,25
I6	186,43	195,68	9,25	160	169,45	9,45	178,02	187,25	9,23	109	118,75	9,75
I7	180	189,25	9,25	182	191,25	9,25	195,3	204,55	9,25	165,2	174,45	9,25
I8	171,41	180,66	9,25	158	167,25	9,25	200	209,25	9,25	158,7	167,95	9,25
I9	178,21	188,21	10	193,31	202,35	9,04	193,41	202,25	8,84	191,2	200,45	9,25
I10	181,23	190,57	9,34	175,16	184,41	9,25	178	187,25	9,25	177	186,25	9,25
M.	9,514			9,249			9,492			9,29		
E.T	0,56			0,097			0,93			0,16		

M : moyenne E.T. : écart type l : individus GN : gain de poids

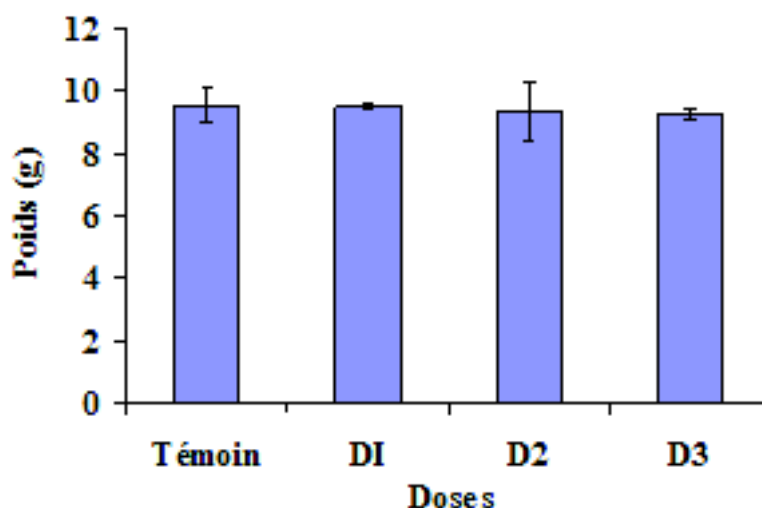


Figure n°73 – Gain du poids des rats témoins et traités au *B. bassiana* du 1^{er} au 20^{ème} jour de traitement.

Les résultats de gains de poids sont analysés statistiquement par le test analyse de la variance à un seul critère de classification (tableau n°67).

Tableau n° 69 : Analyse de la variance sur le gain du poids des rats témoins et traités au *B. bassiana* entre le 1^{er} et le 20^{ème} jours après traitement.

Source	DDL	Somme des carrés	Carrés moyens	F de Fisher	Pr > F
Modèle	3	0,362	0,121	0,485	0,695
Résidus	36	8,956	0,249		
Total	39	9,318			

L'analyse de la variance (tableau n°67) révèle que l'application de *B.bassiana* aux doses testés n'interfère pas avec l'évolution de poids corporel des rats testés ($p>0,05$).

D'après les résultats affichés sur le tableau n°66 et le graphique de la Figure n°73, on constate un gain dans le poids presque identique des rats du 1^{er} au 20^{ème} jour d'expérimentation, aussi bien pour les individus témoins que traités dont les valeurs sont très rapprochées.

Ceci est appuyé par les résultats de l'analyse de la variance qui a fait ressortir des différences non significatif entre le témoin et les différents doses ainsi qu'entre les trois doses ($p>0,05$). Néanmoins le meilleur gain de poids est enregistré pour les rats témoins $9,514 \pm 0,56$ g suivi d'individus traités à la 2^{ème} dose $9,492 \pm 0,93$ g et finalement les individus traité à la 3^{ème} et la 1^{ère} dose avec respectivement un gain de poids de $9,249 \pm 0,097$ g et $9,29 \pm 0,16$ g.

Notre souche n'a entravé ni l'évolution, ni la prise de nourriture des rats expérimentés dont aucun cas de décès n'a été enregistré.

III-3-2- Effet inflammatoire

Les résultats de l'effet inflammatoire après 4h d'injection de *B.bassiana* sur les souris cobayes dans la surface plantaire de la patte gauche arrière, sont mentionnés sur les tableaux n°68, 69, 70 et 71 et la Figure n°74.

Tableau n°70 : Poids de pattes gauches et droites enregistrés chez les souris témoins.

Lot	N°de souris	Poids (g)		
		Souris	Patte droite	Patte gauche
Souris	1	20	0,1537	0,1470
	2	22	0,1562	0,1612
	3	23	0,1564	0,1507
	4	20	0,1474	0,1380
	5	23	0,1632	0,1507
	6	28	0,1731	0,1700
	7	17	0,1333	0,1301
	8	21	0,1490	0,1505
	9	27	0,1639	0,1601
	10	24	0,1651	0,1603
Moyens		22,5 ± 3,30	0,15613±0,0112	0,15186±0,0117

Tableau n°71 : Poids de pattes gauches et droites enregistrés chez les souris traités par *B.bassiana* à la dose D1 : $6,9 \times 10^5$ spores/ml.

Lot	N°de souris	Poids (g)		
		Souris	Patte droite	Patte gauche
Souris traités à la D1	1	20	0,1437	0,1500
	2	22	0,1564	0,1612
	3	23	0,1522	0,1707
	4	20	0,1474	0,1502
	5	23	0,1452	0,1407
	6	28	0,1631	0,1700
	7	17	0,1333	0,1401
	8	21	0,1490	0,1605
	9	27	0,1739	0,1801
	10	24	0,1641	0,1703
Moyens		22,5±3,30	0,15283±0,0118	0,15938±0,0136

Tableau n° 72 : Poids de pattes gauches et droites enregistrés chez les souris traités par *B.bassiana* à la dose D2 : 10^8 spores/ml.

**Recherche fondamentale sur l'entomothogène *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.)Vuill.
(Ascomycota: Hypocreales) :**

Lot	N°de souris	Poids (g)		
		Rat	Patte droite	Patte gauche
Souris traités à la D2	1	20	0,1537	0,1600
	2	22	0,1464	0,1612
	3	23	0,1562	0,1707
	4	20	0,1474	0,1502
	5	23	0,1452	0,1607
	6	28	0,1631	0,1900
	7	17	0,1333	0,1401
	8	21	0,1490	0,1605
	9	27	0,1539	0,1801
	10	24	0,1641	0,1703
Moyens		22,5 ± 3,30	0,1532 ± 0,0116	0,1633 ± 0,094

Tableau n° 73 : Poids de pattes gauches et droites enregistrés chez les souris traités par *B.bassiana* à la dose D3 = 10¹⁰ spores/ml.

Lot	N°de souris	Poids (g)		
		Souris	Patte droite	Patte gauche
Souris traités à la D3	1	24	0,1435	0,2078
	2	25	0,1617	0,2996
	3	27	0,1572	0,2509
	4	20	0,1528	0,2070
	5	16	0,1253	0,2102
	6	19	0,1165	0,1597
	7	17	0,1480	0,2441
	8	20	0,1210	0,2074
	9	21	0,1409	0,1949
	10	19	0,1143	0,1957
Moyens		20,8 ± 3,52	0,1381 ± 0,0184	0,2177 ± 0,0405

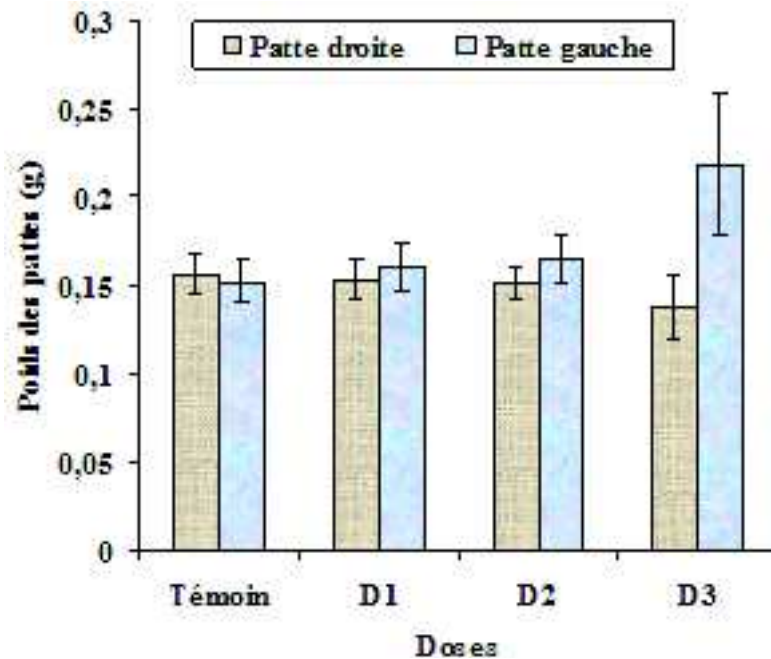


Figure n°74 – Effet de *B.bassiana* sur le poids des pattes gauches (traités) et droites (non traités) chez la souris cobaye.

Pour faire ressortir l'influence traitement par de *B. bassiana* sur le poids de la patte gauche traité comparativement à la patte droite non traité nous avons fait appel à l'analyse de la variance à un critère de classification (Le facteur poids en fonction des doses) (tableau n°72).

Tableau n°74 : Analyse de la variance sur l'effet de *B. bassiana* sur le poids des pattes gauches (traités) et droites (non traités) chez la souris cobaye.

Source	DDL	Somme des carrés	Carrés moyens	F de Fisher	Pr > F
Modèle	6	0,040	0,007	20,507	< 0,0001
Résidus	73	0,024	0,000		
Total	79	0,064			

Les résultats affichés sur le graphique de la Figure n°74 traduisant l'effet inflammatoire de *B.bassiana* évoqué par l'augmentation de la patte gauche traité comparativement à la patte droite non traité? font ressortir que l'inflammation évolue avec la concentration de l'inoculum appliqué.

En effet , la faible dose : $6,9 \times 10^5$ spores/ml à fait augmenter le volume ou le poids de la patte de $0,15283 \pm 0,0118g$ à $0,15938 \pm 0,0136g$, ensuite cette augmentation se prononce pour la dose moyenne 10^8 spores/ml de $0,1532 \pm 0,0116g$ à $0,1633 \pm 0,094g$ et elle s'accroît davantage pour la plus forte dose 10^{10} spores/ml de $0,1381 \pm 0,0184g$ à $0,2177 \pm 0,0405g$.

Par ailleurs chez le lot témoin, l'eau physiologique n'a entraîné aucun signe d'inflammation traduit par une élévation de poids ,bien au contraire le poids de la patte

gauche est légèrement moins élevé ($0,15186 \pm 0,0117g$) que le poids de la patte droite ($0,15613 \pm 0,0112g$).

III-3-3- Effet de *B.bassiana* sur la structure de foie des souris

a- Résultat

Après observation à l'œil nu, aucune anomalie n'a été enregistrée au niveau des foies des individus traitées par notre souche *Beauveria bassiana* par rapport aux foies des souris témoins le foie présente une architecture lobulaire normale (Figure n°75).



Figure n°75 - Aspect de Foie de souris.

De point de vue histologique, le foie des souris témoin coloré par l'hématoxyline-éosine, montre que les travées d'hépatocytes (cellules hépatiques) sont déposées en rayons autour d'une veine centrale appelée veine centrolobulaire. Les travées sont séparées par des espaces appelées capillaires sinusoides à travers lesquels circule le sang (Figure n°76a).

Cette organisation permet au maximum le contact entre les hépatocytes et le flux sanguin chez les souris, le lobule hépatique n'est pas bien délimité par des bandes de tissu conjonctif. La veine centrolobulaire représente le centre de lobule.

Les hépatocytes présentent des noyaux ovulaires et des nucléoles visibles colorés en rouge par le colorant hématoxyline éosine. Le foie des souris traitées par la souche de *B. bassiana*, montre une structure semblable à celle du foie des souris témoins sans aucune différenciation structurale (Figure n°76b).

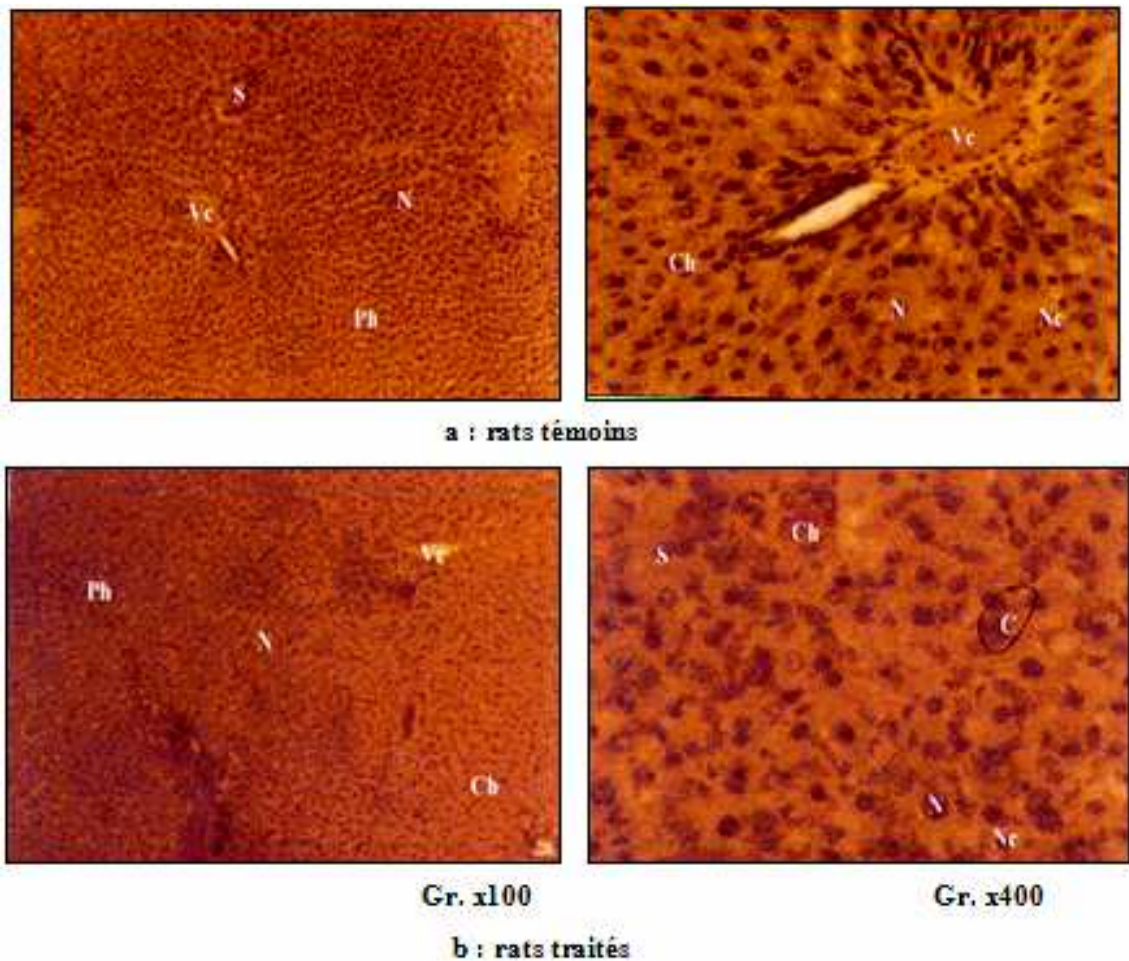


Figure n°76 - Histologie du foie chez les rats témoins et traités au *B. bassiana*.

c : cytoplasme, Ch : cellule hépatique, N : noyau, Nc: nucléole, Ph : Parenchyme hépatique, Vc: veine centrolobulaire, S : sinusoide.

b- Discussion

L'organisme résiste aux pathogènes de deux manières: par la réponse immunitaire innée ou immunité naturelle et par l'immunité adaptative ou immunité acquise .Les mécanismes de l'immunité innée sont les premières à être mis en jeu .Cette immunité est assuré par le système défensif de la peau et des muqueuses constituant une barrière physique et chimique qui empêche les microorganismes d'accéder au cellules et tissus .Quand cette barrière est rompue les germes pénètrent dans les tissus mous et déclenchent l'infection qui se traduit alors par des lésions et des inflammations (Benzar,1999).

L'acridopathogène *B.bassiana* s'est montré peu agressif vis-à-vis de mammifère choisi, les trois doses appliquées n'ont ni tués, ni interrompues le comportement habituel de l'animal (prise de nourriture, accouplement ...) de même il n'a engendré aucun effet sur la structure de foie, qui est la glande la plus volumineuse de l'organisme assurant des fonctions métaboliques différentes.

Tels que détoxification qui permet d'évacuer la quasi totalité des bactéries et des toxines issue des intestins après digestion. Par ailleurs appliquée à la forte dose 10^8 spores par ml *B.bassiana* a entraîné une légère inflammation de la patte des souris testés (Figure n°77).



a : patte normale

b : patte enflammée

Figure n°77 - Aspect de la patte des souris après traitement.

Nos résultats sont en accord avec les résultats de beaucoup de travaux traitant les perturbations physiologiques causées par les champignons Hyphomycètes vis à vis des animaux et de l'Homme. En effet, après 7jour d'exposition des poules au spores d'*Aspergillus fumigatus* concentré à 10^7 par ml il y a eu apparition de l'oedème et une atteinte des alvéoles pulmonaire (Femenia et al., 2007).

De pareilles affections ont également été détectées chez des rats infectés par $10\mu\text{g}$ de poudre de *Metarhizium anisopliae*. Chez ce mammifère l'effet d'une dose de 10^8 spores/ml de *B.bassiana* a engendré des nécroses et des oedèmes au niveau des muscles 12h après l'application (Semalulu et al., 1992).

Chez l'Homme plusieurs affections et troubles allant même jusqu'au décès ont été tributaire d'une exposition à des propagules fongiques. En effet deux semaines après l'infection d'*Aspergillus versicolor*, et de *Beauveria alba* des microperforations et des inflammations de la cornée ont été observé chez des patients adultes (MacDonnell et al.1985; Bifrare et Wolfensberg, 2007).

Des individus exposés à des fortes doses de *B.bassiana* et de *M.anisopliae* ont présenté des signes d'allergie au niveau de la peau et des poumons (Ward et al., 1998 et Ward et al., 2000; Greg et al., 2005). Plusieurs genres de Zygomycètes étaient responsables des cas de morbidité chez l'Homme notamment ceux appartenant à l'ordre des Mucorales (*Rhizopus*; *Rhizomucor*...). (Ribes et al., 2000).

CONCLUSION

Ce travail a été entrepris dans le but de contribuer à dégager l'activité biologique de l'acridopathogène *Beauveria bassiana* vis-à-vis des imagos de *Schistocerca gregaria* et de *Locusta migratoria* et d'apporter quelques notions sur l'aspect biécologie, biosécuritaire et technologique de cette souche fongique.

L'étude de l'efficacité de *B. bassiana* envers les imagos des deux acridiens a révélé que les mortalités évoluent avec les doses appliquées. Néanmoins *S. gregaria* s'est montré plus sensible, tous les individus sont morts au 6^{ème} jour qui suit le traitement à la forte dose $1,64 \times 10^7$ spores/ml suivi de ceux traités à la dose moyenne $1,64 \times 10^6$ spores/ml où 100% de mortalité sont obtenues au 7^{ème} jour.

Pour la faible dose $1,64 \times 10^5$ les individus ont tous succombé au 9^{ème} jour. Alors que pour le criquet migrateur les mortalités sont obtenus tardivement, elles ont débutés au 5^{ème} jour et se sont achevées au 13^{ème} jour qui suit le traitement.

La DL50 obtenue sont de $6,9 \times 10^5$ spores/ml pour le criquet pèlerin et de $11,75 \times 10^7$ spores/ml pour le criquet migrateur. Les TL50 enregistrés pour chaque dose sont compris entre le 3^{ème} jour et le 6^{ème} jour pour *S. gregaria* et entre le 7^{ème} jour et le 9^{ème} jour pour *L. migratoria*.

L'étude de l'effet de *B. bassiana* sur la cuticule des L5 et des adultes de *S. gregaria* a fait ressortir une réduction significative dans le poids sec de cette cuticule, passant de 36,50mg à 32,93mg chez les L5 et de 46,49mg à 42,31mg chez les adultes. Il en est de même pour son contenu en chitine qui est passé de 7,38mg à 6,44mg chez les L5 et de 7,41mg à 4,20mg chez les adultes. Pour les protéines, la quantité a baissé de 29,12mg à 26,48mg chez les L5 et de 39,08mg à 37,88mg chez les adultes.

L'étude de l'effet de *B. bassiana* sur l'hémogramme des L5 et des adultes de *L. migratoria* au 3^{ème} jour après traitement met en évidence une perturbation de la cytologie du sang de cet acridien de manière quantitative et qualitative dont la fonction phagocytaire est sévèrement réduite.

A l'issu des résultats obtenus de l'étude sur l'influence du substrat cultural et des facteurs de l'environnement sur la bioécologie de *B. bassiana* que ont souligné que *B. bassiana* a très bien évolué sur tous les milieux de culture de composition extrêmement variée et a pu utiliser toutes les sources de carbone pour son métabolisme.

Les facteurs abiotiques étudiés, telle que l'activité de l'eau ; la température et le pH influent significativement sur le développement de cet hyphomycète. Nous avons également remarqué que les spores de cette souche fongique diminuent significativement au cours de temps et varient avec le feuillage du support cultural. En effet, la meilleure persistance est enregistrée sur feuilles de tomate suivie de la laitue; de la fève; du blé et finalement de l'orge.

Après 15 jours de suivi des paramètres de fermentation d'une culture discontinue ou en batch de *B.bassiana* en fermenteur de 2 litres sur les trois milieux naturels moûts d'orge (MO) et lactosérum déprotéiné (LD) avec comme témoin le milieu PDA (Potatos Dextros Agar), nous avons constaté à propos du paramètre pH, une fluctuation similaire sur les trois milieux, mais le pH était plus acide sur MO que LD et PDA.

La consommation des sucres réducteurs (glucose) suit une allure décroissante. Le lactose du milieu LD était moins rapidement dégradé que le glucose et le maltose sur respectivement les milieux PDA et MO.

Pour le paramètre production de métabolites secondaires, on a noté une excrétion timide de l'acide citrique dont la concentration a évolué au cours de la fermentation sur les milieux testés pour atteindre au 15^{ème} jour, 10,53mg/l sur PDA, 9,95mg/l sur LD et 9,57mg/ml sur MO. Le second métabolite sont les protéines dont la plus forte concentration été observée sur milieu MO avec 10,57g/l suivi de LD avec 8,05g/l et finalement du PDA avec 4,55g/l.

Le troisième métabolite produit par notre souche sont les agents antimicrobiens avec un maximum de zone d'inhibition enregistré au 9^{ème} jour vis-à-vis de *C.albicans* (9mm) à partir de milieu LD, au même jour sur *Klebsiella* (7mm) à partir de milieu MO ainsi que contre *E.coli* mais cette fois ci au 6^{ème} jour sur milieu MO et LD. Quant à *P.aeruginosa*, le maximum d'inhibition est noté au 15^{ème} jour sur LD.

Le dernier métabolite excrété est l'éthanol qui a été détecté sur les trois milieux mais plus intensivement sur milieu MO. D'autres solvants ont été parallèlement détectés par la CPG-SM: l'acétone; le butanol ; le butandediol; l'acide acétique.....etc.

Durant cette fermentation en batch, la meilleure biomasse mycélienne est obtenue sur milieu MO s'évaluant à 11,4g/l suivi de PDA puis LD avec respectivement 10,86g/l et 9,4g/l.

Le procédé de lyophilisation du mycélium de *B. bassiana* nous a permis d'obtenir une poudre marron prête à être conservée et utilisée après solubilisation comme bio insecticide. La culture de la souche *Beauveria bassiana* sur milieu solide à base de son de blé, a permis la récupération de protéases extracellulaires à activité coagulante après leur extraction avec une concentration en protéines de 0,11 mg/ml.

L'étude toxicologique à travers l'application de l'hyphomycète *Beauveria bassiana* sur les rats n'a montré aucun cas de décès. De même il n'a pas interféré l'évolution de la prise du poids chez l'ensemble des individus traités comparativement aux individus témoins.

Les résultats de l'étude topographique nous certifient que l'entomopathogène *B.bassiana* ne manifeste aucun effet sur la structure morphologique et histologique du foie de ce mammifère. Par contre aux mêmes doses appliquées pour l'activité toxique, nous avons enregistré une inflammation matérialisée par les oedèmes observés sur les pattes gauches des traitées comparativement aux pattes droites des souris testées et de témoin.

A travers cette contribution, on peut confirmer d'une façon concordante que notre souche *B.bassiana* en plus de son activité insecticide très marquée et reconnue (Inglis et al., 1997), présente des grandes performances et aptitudes technologiques du moment que cultivée sur des milieux peu coûteux, bon marché, elle est arrivée à se développer aisément et à produire des métabolites très utiles pour l'industrie.

Pour conclure on peut avancer que les propriétés biologiques de *B.bassiana* font d'elle un candidat idéal pour la lutte biologique.

Dans le cadre des perspectives de notre travail, nous recommandons une étude qui portera sur les points suivants :

- De point de vue aspect toxicité de *B. bassiana* vis-à-vis des deux acridiens ainsi que les autres locustes, il serait intéressant en premier lieu d'approfondir les recherches sur ce champignon afin d'étudier son action sur la biologie, la physiologie et le comportement des acridiens ainsi qu'étudier et comprendre les modalités d'infection par cette entomopathogène. En second lieu trouver une formulation adéquate préservant un certain gradient d'humidité pour épandre *B. bassiana* à grande échelle dans plusieurs régions d'Algérie et à différentes périodes de l'année afin d'intégrer ce modèle biologique dans le programme d'une lutte préventive contre les locustes. Il serait intéressant aussi de caractériser la souche fongique à l'échelle moléculaire et identifier et extraire les toxines responsable de l'infection.
- Quant à l'aspect biotechnologique, il serait intéressant :
 - D'optimiser les paramètres de fermentation pour une meilleure production de biomasse
 - D'exploiter les potentialités et les aptitudes de *B. bassiana* à produire des vitamines, acides gras et organiques et autres métabolites utiles.
 - De revaloriser les sous produits de l'industrie (lactosérum, mélasses, biomasse végétale...) par leur utilisation comme substrats de fermentation.
 - D'étudier la toxicité des coagulasses ainsi que les paramètres influençant leur activité (pH, T°, [CaCl₂]).
 - De purifier l'enzyme coagulase.
- De point de vue biosécurité, il serait souhaitable d'évaluer la DL50 pour le rat et son effet sur d'autres paramètres physiologique de ce mammifère.
- Il est souhaitable également de promouvoir de nouvelles souches locales autres que celles déjà exploitées.

Références bibliographiques

- Abbaci S. & Hamza Z., 1995** – Action d'un nouveau régulateur de croissance le triflumuron chez les nymphes de *Tenebrio molitor* (L) (Coleoptera, Tenebrionidae). Toxicologie histology et biochimie. Mém. Fin d'étude, Univ. Annaba, 52p.
- Abbott W.B., 1925**, A method for compting the effectiveness of an insecticide. J. Econ. Ent., 18, pp. 265-267.
- Abdelhag S. & Dali S. -2004** : Contribution à l'étude de l'influence d'un milieu de culture naturel:le lactosérum sur le développement de *Beauveria bassiana* hyphomycète. Mém. DEUA, Univ Boumerdès, 28p.
- Abdellaoui R., 2007**- Recherche des enzymes coagulant le lait en remplacement de la présure traditionnelle, extraction purification et caractérisation. Thèse mag. Tech. Alim., Univ. Boumerdès. 84p.
- Agnes N., 1986** – Production des protéine à partir de lactosérum brut. Thèse Docorat, Univ. Lyon, 100p.
- Anonyme, 1988** – Antiseptiques et désinfectants, AFNOR, T2, Paris, p 65.
- Alais C., 1975** - Science du lait, principes de techniques laitières. Ed. sep. , pp. 7-10
- A lbrecht F.O., 1967** – Polymorphisme phasaire et biologie des acridiens migrateurs. Ed. Masson, paris, 194 p.
- Alexopoulos C. J. & Mins C. W., 1979**: Introductory mycology. Ed. Wiley & Sons, Newyork, 632p.
- Allache F., 2005** - Activité biologique d'un dérégulateur de croissance des insectes: l'hexaflumuron sur la cuticule des larves de *Locusta migratoria* (Linné, 1758) (orthoptera, oedipodinae). Thèse Magister Sci. agro., Inst. Nati. Agro., El Harrach, 186p.
- Amouriq L., 1973** – Elément sur la relation entre les insectes et champignons. Ed. Harman, Paris, 135P.
- Andersen S.O., 2002** - Characteristic properties of proteins from pre-ecdysial cuticle of larvae and pupae of mealworm *Tenebrio molitor*. Insect Biochem. Molec. Biol., 32: 1077-1087.
- Amelung Y. H., 1927** - Journal Physiologie. Chemie, n°166, 161p.
- Appert J. & Deuse J., 1982** – Les ravageurs des cultures vivrières et maraîchers sous les tropiques. Ed. Maisonneuve et Larousse, paris, 419 p.
- Apria A., 1977** - les lactosérum, une richesse alimentaire. Colloque, novembre, Paris, pp. 201-205.
- Arnold J.W., 1974** - The hemocytes of inscetes in inscetes physiology. Ed. Academic Press, New York, Vol. 5, pp.201-214.

- Arthur S. & Thomas M.B., 2000** - Effect of mycoinsecticide on feeding and fecundity of the brown locust *Locustana pardalina*. *Biocontrol Science and Technology*, 10: 321-329.
- Attrassi K., Selmaoui K., Ouazzani Touhami A., Badoc A., Douira A., 2005** - Biologie et physiologie des principaux agents fongiques de la pourriture des pommes en conservation et lutte chimique par l'azoxystrobine. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 2005, 144(1-2), Pp : 47-62.
- Auld B. A., 1991** - Production de masse, préparation et application des champignons agent de lutte biologique. Pp : 221-213 in Lomer C.J. et Prior C., 1991- Lutte biologique contre les acridiens. Ed. CAB international, Wallingford, 339p.
- Barnett H. L. & Hunter B. B., 1998:** Illustrated genera of imperfect fungi. Ed. The American Phytopathological Society, 216p.
- Barson G., Renn N. & Bywater A. F., 1994:** Laboratory evaluation of six species of entomopathogenic fungi for the control of the house fly (*Musca domestica* L.), a pest of intensive animal units. *J. Invertebr. Pathol.* 64: pp 107-113.
- Belayel T., 1992:** Effet de deux champignons et de 20 souches bactériennes vis à vis des larves de *Geotrogus deserticola* (Coleoptera-Melolonthinae). Thèse Ing. Agro. Inst. Nat. Agro. , El-Harrach, 40p.
- Bensaad H., 1999** - Activité biologique de *Beauveria bassiana* Bals (Hyphomycètes, Deuteromycotina) sur *Locusta migratoria* (Linné, 1758) (Orthoptera, Acrididae). Etude de l'influence de la température sur la croissance mycélienne, la sporulation et le cycle biologique de cet Hyphomycète. *Mém. Ing. agro., Inst. nati. agro., El-Harrach*, 98p.
- Benzar A.B., 1999** - Pour comprendre l'immunologie. Ed. Dés. Iris, Paris, 192p.
- Berkan, T : Ustunes, L : Lermioglu, F : Ozer, A., 1991-** Antiinflammatory, analgesic, and antipyretic effects of an aqueous extract of *Erythraea centaurium*. *Planta-Med.* 1991 Feb; 57(1), pp : 7-34.
- Bernhaver A., 1928** – *Biochimie. Z;* pp : 164-202
- Berridge R. N. J., 1945** - *Biochimie*, Ed. Masson, Paris, 314 p
- Betman N., Inglis G.D & Goettel M.S. , 1966:** Screring of *Metarhizium* and *Beauveria* ssp., conidia with exposure to stimulated sunlight arang of temperature. *Mycol. Res.* Vol 100, n°1: 31-38.
- Bidochka M. J. & Kachatourians G. G., 1991** – The implication of matabolic acid produced by *Beauveria bassiana* in pathogenesis of the migratory grasshopper, *Melanoplus sanguinipes*. *J. Invert. Path.*, n°58, pp: 106-117.
- Bifrare Y.D. & Wolfensberger T.J., 2007** - Protracted *Aspergillus versicolor* Endophtalmitis caused by corneal microperforation. *Klin Monatsbl Augenheilkd.* 224(4): 314-6.
- Bissaad F.Z., 1998** – Etude de l'activité biologique de *Beauveria bassiana* sur *Schistocerca gregaria* (Orthoptera, Acrididae). Efficacité et effet sur la respiration et le rythme cardiaque de cet acridien. *Mém Ing. agro., Inst. nati. agro., El Harrach*, 94 p.
- Bolwerk A., Lagopodi A., Wijfjer G., Lamine A., Chine F.& Luglengbeg B., 2003** - Interactions in the tomato rhizosphere of two *Pseudomonas* biocontrol strains with

the phytopathogenic fungus *Fuossarium oxysporum* sp. radicus-lycopersici nf. Plant
microbe interact., 16, pp: 983-993.

Boquet J .1993: Généralités sur les micro-organisme en biotechnologie. Ed.Tech &
Doc Lavoisier, pp .9-58.

Bouhacein M., 1999 - Effet de deux entomopathogènes (Hyphomycètes,
Deuteromycotina), *Beauveria bassiana* (Balasmo) Veuillemin et *Metarhizium*
flavoviride Gams et Rozyspal sur les métabolites hémolympatiques, l'hémogramme et
les protéines circulaires chez *Locusta migratoria* (Linné, 1758). Mém. Ing. agro., Inst.
nati. agro., El Harrach, 121 p.

Bouhous M. 1995 - #####

#####Verticillium canli, Beauveria bassian: Trialeurades vaporatorum
(Hanoptera, Aleurodidae)

Boutaoua N., 1992 - Etude physico-chimique et microbiologique d'un fromage
artisanal. Mém. Fin d'étude INIA, 43p.

Bouznad Z., 1978 – Contribution à la reconnaissance de quelques aspects biologiques
et physiologiques de l'antracnose du pois causée par *Ascochyta pisi* Lib. Thèse
Mag., Inst. Nat. Agro., El Harrach, 149p.

Botton B., 1985- Biotechnologies, moisissures utiles et nuisibles, importance
industrielles. Ed. Masson, Paris, 2225p.

Brachemi R. & Halimi F., 2005 - Caractérisation biochimique d'une souche
l'hyphomycete *Beauveria bassiana* cultivée sur lactosérum et mout d'orge. Mém.
Microbio. Dept ., Biol. Facu ., Sci. Uni, Boumerdes.48P

Bradford, M. M., 1976 - A rapid and sensitive method for the quantification of
microgram quantities of protein utilising the principal of protein-Due Binding. Ed.
Analytical Biochemistry. 248p.

Brehelin H.M. & Hoffman JA., 1972 – Les modifications de la composition protéique
de l'hémolymphe de larves et de stades V de *Locusta migratoria* (R. et F.) à la suite
d'une injection de poudre inerte (saccharate de fer). Acrida, n°1, pp. 197-203.

Brinkman M. A., Fuller B. W. & Hild reth M.B.,1997 - Effect of *Beauveria bassiana* on
migratory grasshoppers (Orthoptera: Acrididae) and Nontarget yellow Mealoworms
(Coleoptera: Tenebrionidae) in spray tower bioassays. J. agri. Entomol., vol. 14, n°2:
121-127.

Cartoux G., Calver J., Ferron P. & Blacher E., 1970 – Mise au point d'une préparation
entomopathogène à base de blastospores de *Beauveria bassiana* Tenella (Delacr.)
Siemaszko pour la lutte contre le ver blanc (*Melolontha melolontha* L.). Ann. Zool.
Ecol. Anim., 2, pp : 281-296.

Caudwell R. W. & Gatherhouse A. G. 1996: Laboratory and field trials of bait
formulations of the fungal pathogen, *Metarhizium anisopliae*, against a tropical
grasshopper and locuste. Biocontrol sci. Tech. , n°6: 561-567.

Cavelier A. 1976 - Cours phytopharmacie. Ed. Inst. Nat. Agro. El-Harrach, T.1, 514 p

Chara B., 1995 - Eléments sur la biologie et l'écologie du criquet pèlerin *Schistocerca*
gregaria (Forsk., 1775). Stage de formation de lutte antiacridienne. Ed. I.N.P.V -
O.A.D.A., El Harrach, Alger, : 32 - 45.

- Chandler D.R., King R.G., Jewess P. & Reynolds S.E., 1991** - Temperature effects on the action of acylurea insecticides against tobacco hornworm (*Munduca sexta*) larvae. *Pestic. Sci.*, 31: 295-304.
- Charnley A.K., 1989** - Mechanisms of fungal pathogenesis in insects: *Mycol. Res.* 101 (12):1469-1474.
- Chauvin R., 1956** – *Physiologie de l'insecte*. Ed. Min. agr., Inst. Nat. Rech. Agr., Paris, 917p.
- Chevillon I., Larrose C. & Moreau N., 1998** - Conservation des échantillons de sang avant analyse des paramètres biochimiques les plus courants. *Ann. Biol. Clin. Paris*. Vol 56; pp.200-204.
- Choisy M., Desmazeaud J. C., Gripon G., Lambert G., LENOIR J., 1997**. La biochimie de l'affinage, in : le fromage, Ed. Tec & Doc Lavoisier, Paris. 256 p.
- Chopard L., 1943** – Orthoptéroïdes de l'Afrique du Nord. Ed. Librairie Larose, Paris, 447p.
- Combes A. & Saada M., 1968** – Exercices et problèmes de probabilité et de statistique. Ed. Vubert, Paris, 733p.
- Dagnellie P., 1975** – Théorie et méthodes statistique, applications agronomiques. Ed. Les presses agronomiques, Belgique, Vol.II, 243p.
- Dajoz R., 1974** – Dynamique des populations. Ed. Massonet C^{ie}., Paris, 301 p.
- Dahoun G., 2000** - Activité biologique d'un dérégulateur de croissance le téflubenzuron sur le cinquième stade larvaire de *Locusta migratoria* (Linné, 1758) : Efficacité et effet sur la biochimie de la cuticule, l'hémolymphe et les ovaires. *Mém. Ing. Agr., Inst. Nat. Agro., El-Harrach*, 175p.
- DeGregorio R., 1996** – Le criquet pèlerin *Schistocerca gregaria*, biologie et élevage : Durée de développement et rythme de ponte dans les conditions de laboratoire. Ed. C.A.U.P.P.A., Serv. Film Rech. Scien., Pau (Paris).
- Delgado F. X., Labo-Lima M. L., Bradley C. Britton J. H., Henry J. E. & Swearigen W. D. 1997**: Laboratory and field evaluation of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin against grasshoppers and locusts in Africa. *Mém. entom. soc. of Canada*, n°171: 239-251.
- Dhouib S., 1994** - Action de quelques substrats alimentaires sur la croissance, le développement et la structure de la cuticule chez le criquet pèlerin *Schistocerca gregaria* (Forsk., 1775) (Orthoptera, Acrididae). *Mém. ing. Agro., Inst. Nat. Format. Sup. Agro. Sahar. Ouargla*, 50p.
- Dillon R.J., Charnly A.K., 1988** - Inhibition of *Metarhizium anisopliae* by the gut bacteria flora of the desert locust: characterisation of antifungal toxins. *J. Can. Micr.*, Vol. 34, pp : 1075- 1082.
- Doelger, W. P. & Prescott, S. C., 1934** - Citric acid fermentation. *Ind. Eng. Chem.*, Vol. 26, pp: 1142-1149.
- Doumandji S. & Doumandji-Mitiche B., 1994** – criquets et sauterelles (acridologie). Ed. Off. Publ. Univ., Alger, 99p.

- Doumandji-Mitiche B., Halouane F., Chahbar N., Agrane S., Merabti N., Seddik A. & Doumandji S., 1997** - Note sur la présence de l'entomopathogène *Beauveria bassiana* (Hyphomycètes, Deuteromycotina) sur *Schistocerca gregaria* sur terrain à Adar. Effet sur le rythme cardiaque et la respiration de cet acridien. Ed. Med. Fc. Landbouww. Univ. Gent. 62/2b, pp. 499-506.
- Durant J.F., Launois M., Launois-Luong M.H. & Lecoq M., 1982** - *Manuel de prospection acridienne en zone tropicale sèche*. Ed. Cirad / PRIFAS, Départ. G.E.R.D.A.T, Paris, T. I, 695 p.
- Durant J.F., Launois M., Launois-Luong M.H., Lecoq M. & Rachadi T., 1987** – *Guide antiacridien du Sahel*. Ed. Cirad / Prifas, Départ. G.E.R.D.A.T, Montpellier, 343 p.
- Durant J.F. & Lecoq M., 1990** – Crique pèlerin au Sahel. Ed. Cirad/Prifas 'Collection Acridologie Opérationnelle n°6', Montpellier, 183 p.
- Fargues J. & Rodriguez-Rueda D., 1980** - Sensibilité des larves de *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera : Noctuidae) aux hyphomycètes entomopathogènes *Nomuraea rileyi* et *Paecilomyces fumosoroseus*. Entomophaga, 25, 43-54.
- Fargues J., Goettel M.S., Smits N., Ouedraogo A., & Rougier M., 1997** - Effect of temperature on vegetative growth of *Beauveria bassiana* isolates from different origins. Mycologia, 89, 383-392.
- Fargues J., Maniania N.K., Delmas J.C. & Smits N., 1992** - Influence de la température sur la croissance in vitro d'hyphomycètes entomopathogènes. Agronomie, 12, 557-564.
- Fargues J., Rougier M., Goujet R. & Itier B., 1988** - Effet du rayonnement solaire sur la persistance des conidiospores de l'hyphomycète entomopathogène, *Nomuraea rileyi*, à la surface d'un couvert végétal. Entomophaga, 33, (3), 357-370.
- Femenia F., Fontaine J.J., Lair-Fuller S., Berkova N., Huet D., Towanou N., **Radotovo F., Granet OI, Loc'h G.L., Arne P. & Guillot J., 2007** - Clinical, mycological and pathological findings in turkeys experimentally infected by *Aspergillus fumigatus*. Avian Pathol., 36(3): 213-9.
- Ferron P., Fargues J. et Riba G., 1991** - Les champignons agents de lutte microbiologiques contre les ravageurs. Dost. Cell. Env., n°5, pp. 55-76.
- Fried J. H., 1971** - Ger. Offen 2, Vol 28, 933p.
- Gabe M., 1968**: Techniques histologiques. E. Masson, Paris, 1113p.
- Gana M.L. & Hami F., 1992** - Production de l'acide citrique par *Aspergillus Niger* sur un milieu à base de melasse de canne à sucre. Mém. Ing. Génibologique, USTHB, Bab Ezzouar, 53p.
- Gaugler R., Costa S.D. & Lashomb J., 1989** – Stability and efficacy of *Beauveria bassiana* soil inoculation. Env. Entomol., n°18, pp 412-417.
- Gavrilovic M., Maginot M.J., Schwartz-Gavrilovic C. & Wallach J., 1996** – Manipulations d'analyse biochimique. Ed. Doin, Paris, 453p.
- Goettel M.S. & Roberts D.M., 1991**- Production en masse, formulation et application en plein champ des champignons entomopathogènes, pp:120-128 in Lomer J.

- et Prior C., 1991- Lutte biologique contre les acridiens. Ed. CAB International, Wallingford, 399p.
- Grassé P. P., 1949-** Traité de zoologie. Anatomie, systématique et biologie. Ed. Masson et Cie, Paris, T. IX, 1117 P.
- Greathead D.J., Kooyman C., Launois-Luong M.H. & Popov G.B., 1994** –Les ennemis naturels des criquets du Sahel. Ed. Cirad/Prifas, 'Collection Acridologie Opérationnelle n°8', Montpellier, 147 p.
- Greg S. W., Shih-Wen H. & Nemat O. K., 2005-** Allergens of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. Clinical and molecular allergy. Vol. 3,
- Guellal D. et Khachkhouche S. ,2002** - Contribution à l'étude de la production de citrate par *Beauveria bassiana* cultivée sur lactosérum. Mém. DEUA. Boumerdès, 62p.
- Guiraud J.P., 1998-** Microbiologie alimentaire. Ed. Dunod, Paris, 200p.
- Guzo D. et Stolz D.B., 1987** – Observations on cellular immunity and parasitisme in the the tissok moth. Jour. Insect. Physiol. n°33, pp. 19-31.
- Habes D., 1989** – Effet de *Bacillus thuringiensis* sur l'néral de *Thaumetopoea pityocampa* Scheff (Lepidoptera, Notodontidae). Thèse magister, Inst. Sci. Nat., Annaba, 70p.
- Haddadj F, 2001** – Evaluation de l'activité biologique de l'entomopathogène *Beauveria bassiana* Bals (Hyphomycètes, Deuteromycotina) : efficacité sur la cuticule des L5 de *Schistocerca gregaria* (Forsk., 1775)(Acrididae, Cyrtacanthacridinae). Thèse Magister Sci. agro., Inst. nati. agro., El Harrach, 96 p.
- Hajek A.E., Carruthers R.I. & Soper R., 1990-** Temperature and moisture relations of sporulation and germination by *Entomophaga mainaiga* (Zygomycetes: Entomophthoraceae) a fungal pathogen of *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae). Environmental Entomology, 19, 85-90.
- Hall R.A., Peterkin D. & Ali B., 1994-** Fungal control of whitefly, *Trips palmi* and sugarcane froghopper in Trinidad and Tobago, Proceeding of the Vth International Colloquium of Invertebrate Pathology and Microbial Control, 1, 277-282.
- Hallsworth J.E. & Magan N., 1999-** Water and temperature relations of growth of the entomophagus fungi *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, and *Paecilomyces farinosus*. Journal of Invertebrate Pathology, 74, 261-266.
- Halouane F., 1997-**Cycle biologique de *Schistocerca gregaria* (Forsk., 1775) et de *Locusta migratoria* (Linnée, 1758). (Orthoptera, Acrididae). Efficacité de *Metarhizium anisopliae* (Metch) (Hyphomycète, Deteromycotina) et effet sur quelques paramètres physiologiques de *Schistocerca gregaria*. Thèse Mag. Sci. Agro., El Harrach, 235p.
- Halouane F., Fazouane F., Bissaad F., Bousdira M. & Kaloune R., 2007** – Caractérisation biotechnologique de *Beauveria bassiana* cultivé sur moût d'orge. 3^{ème} jour. Nat. Bio., Boumerdès. 75p.
- Hassani M., 2000** – Development and proving of biocontrol methods based on *Bacillus thuringiensis* and entomopathogenic fungui against the cotton pests *Spodoptera littoralis*, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera, Noctuidae) and *Aphis gossypii*

(Homoptera, Aphididae). Thesis Doctor Agri. Sci., Justus Leibig University, Giessen, 130p.

Hassouni H., 2002. Etude de la sporulation des champignons thermophiles en culture solide pour la production d'enzymes. Mémoire de fin d'études. Section IAA, IAV-Hassan II, Rabat, 73 p.

Hemour S., 2005-Etude morphométrique et effet de deux champignons entomopathogènes *Beauveria bassiana* Bals. et *Metarhizium anisopliae* (*Deuteromycotina*, *Hyphomycètes*) sur quelques paramètres physiologiques de *Schistocerca gregaria* (Forsk., 1775) (*Cyrtacanthacridinae*, *Acrididae*). Mém. Ing. Agro., Int. nati. agro., El-Harrach, 103p.

Henry J.G., Omae A., Onsager J. A et Oldacress W., 1979- Infection of the corn Earworm, *Heliothis zea*, with *Nosema acridophagus* and *Nosema cuneatum* from Grasshoppers. Relative virulence and production of spores. Journ. Invert. Path. n°: 34, pp. 125-132.

Hillerton J.E. and Purslow P.P., 1981- An investigation of some matrix protein components critical to the extensible properties of insect cuticle. *J. Materials Science*, 16: 1673-1679.

Hillerton J.E. and Vincent J.F.V., 1979- The stabilisation of insect cuticles. *J. Insect Physiology*, 25: 957-963.

Hemant J., 1986- The relationship of some metal ion with citric acid production by *Aspergillus niger* using tamarind seed powder as row material. *J. Fermant. Technolo.* Vol. 64, n°6, pp : 561-565.

Hywel-Jowes N. L. et Gillespie A.T., 1990 –Effect of temperature on spore germination in *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*. *Mycological Research*, 94 (3), 389-392.

Inglis G.D. Johnson D.L. et Goettel M.S. 1997: Field laboratory evaluation of two conidial batches of *Beauveria bassiana* (Balsamo) against grasshoppers. *Candian. Entomologie*, Vol. 29, pp. 171-186.

Inglis G.D., Johnson D.L. & Goettel M.S., 1993- Effects of temperature and thermoregulation on mycosis by *Beauveria bassiana* in grasshoppers. *Biological Control*, 7, 131-139.

Injeyan H.S., Tobe S.S. and Rapport E., 1979- The effects of exogenous juvenile hormone treatment on embryogenesis in *Schistocerca gregaria*. *Can. J. Zool.*, 57: 838-845.

Jenkins E. & Goettel M., 1997- Methods for mass production of microbial control of grasshoppers and locust. *Mem.entomo.soc. of Canada*, n°171, pp: 37-48.

Jaronski S.T. & Goettel M. S., 1997: Development of *Beauveria bassiana* for control of grasshoppers and locusts. In *Microbial control of grasshoppers and locusts* (Goettel M. S. and Johnson D. L.). *Memoire of entomological society of Canada* 171: 400 p.

Kaidi N., 2004 – Effet de la température et des milieux de culture sur *Beauveria bassiana* Bals. (*Hyphomycètes*, *Deuteromycotina*). *Activité biologique de cet entomopathogène vis-à-vis des imagos de Schistocerca gregaria* (Forskål,

- 1775) (*Cyrtacanthacridinae, Acrididae*) et de *Locusta migratoria* (Linné, 1758) (*Oedipodinae, Acrididae*). Mém. Ing. agro., Inst. nati. agro., El-Harrach, 115 p.
- Kallel H., 1991** – Optimisation d'une culture continue de *K. fragilis* sur un ultrafiltrat de lactosérum. Influence des minéraux et de vitamines sur la croissance et le métabolisme. Rev. Microbio. Alim. Nutri., Vol.9, pp : 309-317.
- Kapoor K. K., Chaudhary K. & Tauro P., 1981** - Citric acid in industrial microbiology. Ed. Mac Graw Hill Book company. INC New York. London, pp 709-739.
- Karow E. O. & Waksman S.A., 1947** – Industrie. Eng. Che. Vol 39, Vol. 821-825.
- Kebouche S., 1998** – Isolement et sélection de souches de levures locales utilisées dans la production de protéines d'organismes unicellulaires sur lactosérum. Thèse Mag., Ecole Nat. Polytech., El-Harrach, 23p.
- Keith D. et Kevan M.E., 1992**- Les agents de lutte biologique existants et potentiels contre les orthoptéroïdes nuisibles, pp.107-150 in Vincent C. et Coderre D., la lutte biologique. Ed. Gaetan Morin, Quebec, 671p.
- Khan M. R., Blain J.A. & Patterson J.D.E., 1983** – Partial purification of intracellular proteases. Appl. Envir. Micro., n°1, vol. 45, pp : 94-96.
- Khider B., 1999** - Biométrie, régime alimentaire et répartition des zones de reproduction du criquet pèlerin *Schistocerca gregaria* (Forskål, 1775)(Acrididae, Cyrtacanthacridinae) au sud algérien. Thèse Mag., Inst. nati. agro., El Harrach, 142 p.
- Kleespies R.G., Huger A. M. & Stephan D., 2000** – Diagnosis and pathology of diseases from locusts and other orthopterans. Ed. Gesellschaft für Pflanzenzüchtung (G.T.Z.) and B.B.A., Berlin, 43 p.
- Kotze A.C. and Reynolds S.E., 1991**- An examination of cuticle chitin and protein in cyromazine-affected *Manduca sexta* larvae. Pesticide Biochemistry and Physiology, 41: 14-20.
- Kouassi M., 2001** – Les possibilités de lutte biologique : emphase sur le champignon entomopathogène *B. bassiana*. Sci. Environ., Vol. 2, (2).
- Kramer K.J. and Koga D., 1986**- Insect chitin- physical state, synthesis, degradation and metabolic regulation. *Insect Biochem*, 16 (6): 851- 877.
- Kramer K.J., Dziadik-Turner C. and Koga D., 1985**- Chitin metabolism in insects, pp. 75-115 in Kerkut G.A. and Gilbert L.I., Comprehensive insect physiology biochemistry and pharmacology, Integument, Respiration and circulation, vol. 3, Ed. Pergamon Press, Oxford.
- Kumar S., Shuma N.S., Saharab M. & Siggho R., 2005** – Extracellular acid protease from *Rhizopus oryzae* : purification and characterization. Elsevier Process Biochemistry, vol. 40, pp : 1710-1750.
- Lan B.S., Trinci A.P.J. & Gillespie A.T., 1991**- Influence of cultural conditions on the virulence of conidia and blastospores of *Beauveria bassiana* to the green leafhopper *Nephotettix virescens*. Micological Research, 95, pp: 829-833.
- Langewald S., Jaronski S. T. & Goettel M. S. 1997**: Development of *Metarhizium flavoviride* for control of grasshoppers and locusts. Mem. of entom. soc. of Canada, n° 171: 225-237.

- Larpent J.P et Sanglier J.J., 1989** - Biotechnologie des antibiotiques. Ed. Masson, Paris, Millan, Barcelone, Mexico, pp. 28-31.
- Larreta J., 1997**- Enzymes en agroalimentaire. Ed. Tec & Doc Lavoisier, Paris, 380p.
- Latchininsky A. V. et Launois-luong M. H., 1997** – Le criquet pèlerin *Schistocerca gregaria* (Forskal, 1775) dans la partie Nord-orientale de son aire d'invasion. Ed. Cirad / Prifas, Montpellier, 192p.
- Latgé J. P., 1975** -Croissance et sporulation de 6 espèces d'entomophthorales 1. Influence de la nutrition, carbonée. [BioControl](#) , [Volume 20, n° 2,](#) pp : 201-207.
- Launois-Luong M.H. et Lecoq M., 1989** – *Vade Mecum des criquets du Sahel*. Ed. CIRAD / PRIFAS, 'Collection Acridologie Opérationnelle n°5, Montpellier, 125 p.
- Launois-Luong M.H. et Lecoq M., 1993** – Manuel explicatif du code OMM de transmission des informations sur les criquets ravageurs. Ed. Org. Météo. Mond. et Org. Islam. Educ. Scie. Cult., Genève, 30 p.
- Launois-Luong M.H., Launois M. et Rachadi T., 1988** - Lutte chimique contre les criquets du Sahel. Ed. CIRAD/PRIFAS, Coll. "Acrid.Opérat. " n°3, Montpellier, 83 p.
- Latchininsky A. V. & Launois-Luong M. H., 1997** – Le criquet pèlerin *Schistocerca gregaria* (Forskal, 1775) dans la partie Nord-orientale de son aire d'invasion. Ed. Cirad / Prifas, Montpellier, 192 p.
- Latgé J. P., 1975** - Croissance et sporulation de 6 espèces d'entomophthorales. Influence de la nutrition, carbonée : Vol. 20, N° 2, Ed. Springer Netherlands.
- Lawrence A. Lacey N. & Riberio C. 1994** -Pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* for adults of the japense beetle: *Popillia japonica* (Coleoptera: Scarabeidae). Jour. Entomol. n°: 91, pp. 313-319.
- Lecoq M., 1991**- Le Criquet pèlerin : enseignements de la dernière invasion et perspectives offertes par la biomodélisation. Ed. AUPELF-UREF, John Libbey Eurotext, Paris, 98p.
- Lecoq M., Wilps H. et Zelazny B., 2003** – Locust literature. Ed. ISPI Pest-Directory Locust, GTZ, CIRAD, FAO, Rome
- Lepesme P. 1938.** : Parasites et pseudo-parasites du Criquet pèlerin. Bull. Soci. Hist. Nat. de l'Afrique du Nord, T. XXIX, pp. 38-41.
- Levadoux W., Johnson M., Andre G., 1989** - Monitoring the degradation of commercial microbial rennet preparation. 150p.
- Leveau J.Y., Bouix M., 1993** –Microbiologie industrielle. Les microorganismes d'intérêt industriel. Ed. Tec. & Doc. Lavoisier, Paris, 612p.
- Lipa J. J., 1975**:White muscardines (*Beauveria sp.*). In: An Outline of Insect Pathology. Foreign Sci. Publ. Dept NCSTEL, Warsaw, Poland, pp 139-142.
- Locke M., 2001**- The Wigglesworth lecture: Insects for studying fundamental problems in biology. J. Insect Physiol., 47: 495-507.
- Lomer C.J., 1997** – *Metarhizium flavoviride* recent results in the control of locust and grasshoppers In New Strategies in locust control. Ed. Krall, R.Peveling, D.Ba Diallo Birkhauser Verlag Basel,p.159-169.
- Londershausen M., Kammann V., Spindler-Barth M., Spindler K.D. and Thomas H., 1988**- Chitin synthesis in insect cell lines. Insect Biochem., 18(7): 631-636.

- Louveaux A. & Benhalima T., 1986** – Catalogue des orthoptères *Acridoidea* d'Afrique du Nord. Ouest. Bull. Soc. Ent., France, T. 91, (3– 4), 73 – 87.
- Magalhaes B.P., Lecoq M., De Faria M.R., Schmidt F.G.V. & Guerra W.D., 2000-** Field trial with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* var *acidum* against bands of grasshopper *Rhammatocerus schistocercoides* in Brazil. *Biocont. Sci. Tech.*, 10: 427-441.
- Maiorella, B.; Blanch, H.W.; Wilke, C.R., 1983** - product inhibition effects on ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng.*, 25:103-121.
- Mallamaire. A et Roy. J., 1968** - La lutte contre le criquet pèlerin (*Schistocerca gregaria* Forsk.) En Afrique occidentale française , Ed .O.R.S.T.O.M ,113 p.
- Marier J .R & Boulet M., 1958:** Etude de métabolisme de production des acides citriques et isocitrique chez la levure *Saccharomycopsis lipolytica* cultivée sur n – alcanes. Thèse de doctorat des sciences physique L.N.P de Lorraine France.
- Martoja R. & Martoja Pierson M., 1967-** Techniques d'histologie animale. Ed. Masson et Cie, Paris Vol V, 331p.
- Matoub L., 2000-** Essai de purification et de caractérisation d'une coagulase produite par la souche locale de *Bacillus subtilis* sélectionnée .Thèse Magi.,INA, 91p.
- Mazet I. & Boucias D.G., 1995-** Effects of the fungal pathogène, *Beauveria bassiana* on protein biosynthesis of infected *Spodoptera exigua* larvae. *J. inst. physiol.*, vol42, n°2, pp.91-99.
- Mehenni M.J., & Aiouz M., 1981-** Etude de l'hémolymphe de *Pamphagus elephas* L. (Insectes; Orthoptères). 1re Coll. Nat. Rech. Biol., Univ. Scien Tech. Houari Boumedienne, Bab- Ezzouar, 7p.
- Merabti N., 1993-** Contribution à l'étude de l'antracnose de la fève : Caractérisation de l'agent pathogène *Ascochyta fabae* et l'étude de la résistance variétale de *Vicia fabae*. Thèse Ing. Agr., Inst. Nat. Agro., El-Harrach, 63p.
- Michel C., Matte-Tailliez O., Kerouault B., Bernardet J.F., 2005.** Resistance pattern and assessment of phenicol agents' minimum inhibitory concentration in multiple drug resistant *Chryseobacterium* isolates from fish and aquatic habitats. *Journal Of Applied Microbiology*, 99 (2): 323-332.
- Morley-Davies J., Moore D. & Prior C., 1995** - Screening of *Metarhizium* and *Beauveria* sp. Conidia with exposure to simulated sunlight and a range of temperatures. *Mycol. Res.* 100, pp : 31-38.
- Moulin G., 1981** – Etudes physiologiques de *K. fragilis*, conséquences pour la production de levures sur lactosérum. *Le lait*, juillet- août 1977, n°607, pp: 323-332.
- Moussa A., 2003** - Effet de l'huile de Neem (*Azadirachta indica*) sur quelques paramètres biologiques et physiologiques de *Locusta migratoria migratorioides* (R et F, 1850) (Orthoptera, Acrididae). Thèse mag. Sci. agro., Inst. Nat. Agro., El-Harrach, 123p.
- Munson S.C., 1953** - The hemocyte, pericardial cells, and fat body. pp.128-231 IN Roeder K.D., 1953 – insect physiology. Ed. John Wiley and sons. I.N.C., New York, 1100p.

- Murray T. D.** 1988- Influence of pH on *Cephalosporium gramineum.*, radial growth and dry matter accumulation :Can. J. Bot. 66(11): 2299–2304 (1988)
- Nagashina M.**, 1990 – Progress in ethanol production with yeasts. In Verachtert H, De mot R, Yeast biotechnology, and biocatalysis, Dekkar eds, N Y, 57p.
- Nasiruddin M. and Mordue A. J.**, 1993 - The effect of azadirachtin on the midgut histology of the locust, *Schistocerca gregaria* and *Locusta migratoria*. Tissue and Coll. 25(6), pp. 875-884.
- Nøhr C. and Andersen S.O.**, 1993 - Cuticular proteins from fifth instar nymphs of migratory locust, *Locusta migratoria*. Insect Biochem. Molec. Biol., 23(4): 521-531.
- Nurein H.O.M.**, 1989 -Le criquet pèlerin. Révision des locustes et sautériaux. Ed. Bayer, Levertusen, 39 p.
- Oerke E.C., Dehne H.W., Schönbeck F. & Weber A.**, 1994 - Crop Production and Crop Protection, estimated losses in major food and cash crops, Elsevier Science B.V., Amsterdam, 880 p.
- Ouatar .F – 2006 –** Effet de deux entomopathogènes, *Beauveria bassiana* Bals. Et *Metarhizium anisopliae* var *acridium* Metch. (hyphomycètes.Deuteromycotina) sur l'état embryonnaire du criquet pèlerin *Schistocerca gregaria* (Forskal, 1775) (Cyrtacanthcridinae, Acrididae). Mém. Ing. agro., Inst. nati. agro., El Harrach, 102 p.
- Paillot A.**, 1933 – l'infection chez les insectes : immunité et symbiose. Ed. Patissier, Paris, 471p.
- Pardo, J., A. Bosque, R. Brehm, R. Wallich, J. Naval, A. Mullbacher, A. Anel, and M.M. Simon.** 2003 - Apoptotic pathways are selectively activated by granzyme A and/or granzyme B in CTL-mediated target cell lysis. J. Cell Biol. 167:457–468.
- Pasquier R.**, 1952 - Terminologie concernant le comportement et l'aspect des acrididae gregariaptes. Ann. Inst. Agri. et Serv. rech. et expér. agri. Algérie, T. VI. fasc. 6, pp.1-16.
- Pastre A., Smolikowski S. et Thews G.**, 1988 – *La lutte antiacridienne, dossier deltamethrine*. Ed. Roussel UCLAF, Divis. Agro-Vert, Paris, 127 p.
- Percy-Cunningham J., Nicholson D. & Retnakaran A.**, 1987 - The effect of ingested benzoylphenylurea on the ultrastructure of the cuticle deposited during the last larval instar of *Choristoneura fumiferana* Clem. (Lepidoptera: Tortricidae). *Can. J. Zool.*, 65: 2715-2723.
- Perrone, G., Mule, G., Susca, A., Battilani, P., Pietri, A. & Logrieco, A.** 2006 - Ochratoxin A Production and Amplified Fragment Length Polymorphism Analysis of *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus tubingensis*, and *Aspergillus niger* Strains Isolated from Grapes in Italy. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 680–685.
- Popov G.B.**, 1997 - Atlas des aires de reproduction du criquet pèlerin. Ed.FAO-Rome, 121p.
- Popov G.B., Launois-Luong M.H. & Vanderveel J.J.**, 1990 -Les oothèques des criquets du Sahel. Ed. Cirad/Prifas, 'Collection Acridologie Opérationnelle n°7', Montpellier, 153p.
- Povolny D. & Weyda F.**, 1981 - On the glandular character of larval integument in the genus *Zygaena* (Lepidoptera: Zygaenidae). *Acta Ent. Bohemoslov.*, 78: 273-279.

- Prior C., Lomer C. J., Herren H., Poccuso A., Koogmon C. and Smit J.J., 1992** : Collaborative research programme on the biological control of locusts and grasshoppers. In biological control of locusts and grasshoppers. 1992. Ed. CABI, 394 p.
- Pursegleve J.W., 1968** - Tropical crops : dicotyledons. Longman, London.
- Raccaud Schoeller J., 1980**- Les insectes, physiologie et développement. Ed. Masson, Paris, 269 p.
- Rajnpel-Massi J., 1990** – Les biopesticides. Biofutur, Paris, pp : 23-24.
- Ramet J. P. & Hardy J., 1973** – les enzymes coagulantes en fromagerie. Tech. Du lait, Vol. 4, pp : 7-10.
- Rappily F., 1968** – Elément d'écologie fondamentale. Ed. Mac. Graw. Hill, Paris, 197p.
- Ratledge, C., Kristiansen, B., 2004** - [Basic Biotechnology](#) . Cambridge University Press, Cambridge, pp : 181-200.
- Raymond J., Stlege R., Lokesh-Josh I., Michael J., Bidochka M.J., Donald W. & Ret al ., 1995** - Protein synthesis in *Metarhizium anisopliae* growing on host cuticle. Mycol. Res., 99, (9), pp: 1034-1040.
- Reboux, G. 2006.** Mycotoxins: health effects and relationship to other organic compounds. Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique,46, 208–212.
- Regnault J. P., 2002** : Eléments de microbiologie et d'immunologie. Ed. Décarie, 601 p.
- Retnakaran A., Pallis S.R., Tomkins W.L., Primavera M.J. & Brownwright A., 1996** - The regulation of chitin synthesis and deposition in an insect, the spruce budworm, at the biochemical and ultrastructural level, pp. 174-182 in Stevens W.F., Rao M.S. and Chandkrachang S., Chitin and Chitosan, Environmental friendly and versatile biomaterials, Ed. Asian Institute of technology, Bangkok, Thailand.
- Reynolds S.E., 1987** - The cuticle, growth and moulting in insects: the essential background to the action of acurea insecticides. Pestic. Sci., 20: 131-146.
- Reynolds S.E., 1989** - The integument as a target for insecticides: disruption of cuticle chemistry, structure and function, pp. 73-87 in McFarlane N.R., Progress and prospects in insect control, B.C.P.C. Monograph no. 43, Ed. British Crop Protection Council, London.
- Ribes J.A., Vanovar-sams C.L. & Baker D.J., 2000** - Zygomycètes in human disease. Clin microbial, 13 (2), 236-301.
- Rodman L.F.& Rath. A.C., 1997** - Isolations and characterization of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* from subantartic Macquarie Island. Journal of Invertebrate Pathology, 69, 285-288.
- Rombach M.C., 1989** – Production of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina, Hyphomycètes) sympduleconidia in submerged culture. Entomophaga, 34, pp : 45-52.
- Rudall K. M., 1963** - The chitin, protein complexes of insect cuticles in Beamen J.W.L., Treherne J.E. et Wigglesworth, 1963- insect physiologie. Ed. Academic Press, London et New York, Vol. 1, pp.310- 316.

- Sadji D. & Ladjaci L., 2003** - Contribution à l'étude de l'excrétion d'acide citrique et d'agents anti-microbiens par *Aspergillus niger* et *Metarhizium anisopliae* sur deux milieux naturels: Lactosérum et Moût d'orge. Mém. DEUA, Boumerdès, p.62.
- Salama E.M., El-Sherbini S., Abdel-Kader M.H. and Jori G., 2002** - Site of action of hematoporphyrin (a photo-activated insecticide) in *Culex pipiens* larvae. Egyptian J. Biol., 4: 133-141.
- Samson R.A. & Van Reenen-Hoekstra E.S., 1988** - Introduction to food-borne fungi. Third edition. Centraalbureau voor Schimmelcultures, 299 pp.
- Scanlan J.C., Grant W.E., Hunter D.M. & Milner R.J., 2001** - Habitat and environmental factors influencing the control of migratory locust (*Locusta migratoria*) with an entomopathogenic fungus (*Metarhizium anisopliae*). Ecological Modelling, 136: 223-236.
- Scriban R., 1982** - Biotechnologie, Ed. Lavoisier, Paris, 1042 p
- Semalulu S.S., Mac Pherson J.M., Schiefer H.B. & Khachatourians G.G., 1992** - Pathogenicity of *Beauveria bassiana* in mice. Zentralbl veterinarmed B., 39(2): 81-90.
- Shu P., 1947** - Effect of the composition of the sporulation medium on acid citric production by *Aspergillus niger* in submerged culture. J. bact., Vol 54, 161p.
- Simon P. et Meunier R., 1990** - Microbiologie industrielle et génie biochimique, Ed. Masson et Cie, Paris, 567 p.
- Sitouh M., 1967** – Relations entre les crues et *Schistocerca gregaria* en phase solitaire dans le Sahara central. A nn . Inst. Nat. Agro ., El-Harrach pp. 33 – 83.
- Smaghe G., Auda M., Van Laecke K. and Degheele D, 1997** - Significance of penetration and metabolism on topical toxicity of deflubenzuron in *Spodoptera littoralis* and *Spodoptera exigua*. Entomol. Exp. & Appl., 82(3): 255-260.
- Soltani N., Chebira S., Pitoizet N., Delbecque J.P., Delachambre J., 1995** - Effect of Flucycloxuron, a novel benzoylphenylurea derivate, on the in vivo and in vitro, production of ecdysteroids in *Tenebrio molitor*. Med. Fac. Landbowi. Univ. Gent. 607 (3b):1017-1022.
- Soltani N. & Habes D., 1995** - Effet du thuringicide HP, une formulation commerciale de *Bacillus thuringiensis*, sur la composition chimique de l'hémolymphe chez *Thaumetopoea pityocampa*. Med. Fac. Landbouww, Univ. Gent., 59/29, pp. 473-480.
- Soltani-Mazouni N. & Soltani N., 1992** - Protein synthesis in the fat body of *Tenebrio molitor* (L.) during oocyte maturation: Effect of diflubenzuron, cycloheximide and starvation. **Journal of Stored Products Research** . Volume 31, pp : 117-122.
- Spindler-Barth M., Spindler K.D., Londershausen M. and Thomas H., 1989** - Inhibition of chitin synthesis in an insect cell line. Pest. Sci., 25: 115-121.
- Stephan D. & Zimmermann G., 1997** - Mass production of *Metarhizium flavoviride* in submerged culture using waste products. The development of biopreparation in locust control. Ed. Kral Switzerland, pp : 227-229.
- Stephan D., Welling M. & Zimmermann G. 1997** - Locust control with *Metarhizium flavoviride* : New approches in the development of biopreparation based on blastospores in new strategies in locust control. Ed. Kral, Switzerland, pp. 151-158.

- Stephan D., Welling M. & Zimmerman G., 1997** - Locust control with *Metarhizium flavoviride*: New approaches in the development of biopreparation based on blastospores, pp.151-158 in Krall S., Peveling R. and Ba Diallo D., *New strategies in locust control*, Ed. Birkhäuser Verlag, Basel/ Switzerland, 522p.
- Sun Chul K., Sanggyu P. & Dong Gyu L., 1998** - Purification and characterisation of a novel chitinase from the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*. *J. Invert. Path.*, 73 : 267-281.
- Swearingen W.D., 1993** - Lutte biologique contre les acridiens. Lettre d'information du 19 Octobre. Ed. S.A.A. CIRAD-PRIFAS, Montpellier, pp. 17-20.
- Symmons & Cressman, 2001** – Directives sur le criquet pèlerin : Le criquet pèlerin, biologie et comportement. Ed. Food Alimentation Organisation (F.A.O.), Rome, 43 p.
- Todorova S., Cote J., Martel P. & Coderre P., 1994** - Heterogeneity of two *Beauveria bassiana* strains revealed by biochemical tests, protein profiles and bio-assays on *Leptinotarsa decemlineata maculata* leng (Col: Coccinellidae) Karvae. *Entomophaga* 39(12), pp. 159-169.
- Torocco M.E., T.M. Bickhart, and R.T. Zappalorti., 2005** - Redbelly turtle habitat evaluation at the proposed redevelopment project for the Holtwood Hydroelectric Plant in York and Lancaster Counties, Pennsylvania. Unpublished report submitted to Kleinschmidt Associates. HA File No. PA05.26.
- Trumpy B. H., 1963** – *J. Gen Microbiol.*, Vol. 30, 381p.
- Vananuvat J. & Insella J., 1975** - Production of yeast protein from crude lactose by *Saccharomyces fragilis* batch culture studies *J. of food sciences*, Vol. 40, pp : 330-341.
- Vandamme E.J., 1985** - Biotechnology of industrial antibiotics, drug and pharmaceuticals. Col. Vol. 27, New York, Dekker, 808p.
- Vey A., Cavalier F., Courtiade B., Dumas C., Lange C., Lontelier C., Traris M. et Verducci J. ,1996** - Au secours de la protection des plantes contre les insectes : des substances produites par des champignons. *Phytoma*, n°489, pp.16-20.
- Vey A., Quinot J.M. & Pais , 1986** – Toxémie d'origine fongique chez les invertébrés et ses conséquences cytologiques: Etude sur l'infection à *Metarhizium anisopliae* (Hyphomycètes, Moniliales) chez les lépidoptères et les coléoptères. *Soc. Biol.*, 180, pp : 105-112.
- Vidal C., Fargues J., & Lacey L.A., 1997** – Effect of various liquid culture media on morphology, growth, propagule production, and pathogenic activity to *Bemisia argentifolia* of the entomopathogenic hyphomycètes, *Poecilomyces fumosoroseus*, *Mycopathologia*, 143, 33-46.
- Vidal C., Fargues J., Lacey L.A., & Jackson M.A., 1998** - Effect of various liquid culture media on morphology, growth, propagule production, and pathogenic activity to *Bemisia argentifolii* of the entomopathogenic hyphomycetes, *Paecilomyces fumosoroseus*. *Mycopathologia*, 143, 33-46.
- Vincent J.F.V. and Clarke L., 1985**- Effects of diflubenzuron on the stabilisation of protein within the cuticular matrix of the locust (Ensifera: Locustodae). *Entomol. Gener.*, 11(1/2): 15-24.

- Ward M.D., Madison S.L., Sailstad D.M., Gavett S.H. & Selgrade M.K., 2000** - Allergen-triggered airway hyperresponsiveness and lung pathology in mice sensitized with the biopesticide *Metarhizium anisopliae*. *Toxicology*, 143(2), 141-54.
- Ward M.D., Sailstad D.M. & Selgrade M.K., 1998** - Allergic responses to the biopesticide *Metarhizium anisopliae* in Balb/c mice. *Toxicol. Sci.*, 45 (2): 195-203.
- Weiser J., 1972:** *Beauveria* Vuill. In: Nemoci hmyzu. Naklad. Ceskoslov. Akademie, Praha, pp 361-377.
- Welling M., Nachtigall G. & Zimmermann G., 1994** - *Metarhizium ssp.* Isolates from madagasker: morphology and effect of high temperature on growth and infectivity to the migratory locust, *Locusta migratoria*. *Entomophaga*, 39, (3/4), 351-361.
- Wigglessworth V.B., 1972** - The principles of insect physiology. Ed. Chapman and Hall, London, New York, 827p.
- Zafack J., 2004** - Le criquet pèlerin : un acridien tout particulier. *Bull. Infor. Phyto.* (42) : 1-3.
- Zhengzhen R.M.N., Jaronsky S., Delgado F. & Swearingen W., 1996** – Analysis and modeling of time. Doses mortality of *Melanoplus sanguinipes*, *Locusta migratoria migratorioides* and *Schistocerca gregaria* (Orthoptera, Acrididae) from *Beauveria*, *Metarhizium* and *Poecilomyces* isolates from Madagascar. *J. Inv. Patho.*, Vol. 67, pp. 236-252.
- Zimmermann G., 1993** – The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and its potential as a biocontrol agent pestic. *Rev. Sci.*, n° 37, pp : 375-379.
- Zimmermann G., Zelazmy B., Kleespies R & Welling M., 1994** – Biological control of African locusts by entomopathogenic microorganismes In : *New Trends in locust control.* eds .S .Krall, H Wilps), GTZ , Eschborn, TZ –Verlags gesellschaft Rossdorf, pp:127-138.
- Zolan M., & Pukkia P.J., 1986** - Inheritance of DNA methylation in *Coprinus cinereus* *Molecular and Cell Biology*, Vol. 6, pp : 195-200.

Annexe

Annexe I

Tableau n° 1 : Equipements, verrerie, produits et réactifs utilisés.

Equipement	Verrerie et petits matériels	Produits et réactifs
-Agitateur à plaque chauffante (VELP Scientifica). - Autoclave (Raypa). -Bain Marie (Memmert). -Balance analytique (SCALTEC). - Bec Bunsen. -Centrifugeuse (SIGMA). -Débit mètre (ION Science). -Diffuseur d'air. - Hotte (Captair). -Microscope photonique (Novex). -pH mètre (Inolab). -Spectrophotomètre UV/Vis (Shimadzu). -Vortex (VELP Scientifica).	-Pipettes de 1, 2, 5 et 10 ml. - Pipettes Pasteur. -Erlen Meyer de 100, 250 ml. -Fioles de 25,50,100et 1000ml. -Tubes à essai. -Béchers. -Creusés. - Entonnoirs. -Flacons. -Boîtes de Pétri. -Papier aluminium. -Coton cardé. -Lames et lamelles.	-Acide chlorhydrique (1N). - Acide citrique anhydre. -Acide citrique à 0,1M. -Acide 3,5 dinitrosalicylique (DNSA). -Acide phosphorique à 85%. -Agar. - Anhydride acétique. - Bleu de Coomassie G250. -Bovin serum albumin (BSA). -Eau distillée. - Eau physiologique. -Ethanol absolu. -Hydroxyde de sodium (NaOH 2N, 1N). -Glucose. -Lait écrémé en poudre. -Phosphate disodique à 0,2M. -Pyridine. - Tartrate double de sodium et potassium. -Solution de chlorure de calcium (CaCl ₂ à 0,01M). - Sulfate d'ammonium à 0,01%. - Tween 80.



Figure n°17 - Fermenteur de 2 litres pour la culture en batch de *B.bassiana*.



Figure n°18 - Préculture de *B.bassiana* pour l'inoculation des fermenteuses de 2 litres.

ANNEXE II : ASPECT BIOÉCOLOGIQUE

Recherche de la Bétagalactosidase : Test d'O.N.P.G

On utilise les disques imprégnés d'ortho-nitrophényl-bétagalactopyranoside(O.N.P.G.) .
L'ornitophénol libéré par l'intermédiaire de \square galactosidase donne une coloration jaune .

Technique

Préparer une suspension dense d'une culture de champignon dans 0,5 ml d'eau physiologique, ajouter un disque d'O.N.P.G et incuber à 28°C.

Lecture

Le test est positif quand la suspension se colore en jaune citron.

Annexe III : ANALYSES DE LA VARIANCE

Tableau I - Analyse de la variance sur l'effet de la température sur la germination des conidies de *B.bassiana*.

Source	DDL	Somme des carrés	Carrés moyens	F de Fisher	Pr. > F
Modèle	11	63314,083	5755,826	459,445	< 0,0001
Résidus	24	300,667	12,528		
Total	35	63614,750			

Tableau II : Classement et regroupements des groupes non significativement différents

Modalités	Moyenne	Regroupements			
T35h8	1,667	A			
T30h8	4,000	A			
T20h8	6,000	A			
T25h8	9,333	A	B		
T35h16	16,667		B		
T35h24	38,333			C	
T30h16	46,000			C	
T20h16	96,667				D
T25h16	97,667				D
T30h24	98,667				D
T20h24	100,000				D
T25h24	100,000				D

Tableau III : Classement et regroupements des groupes non significativement différents :

Modalités	Moyenne	Regroupements					
T35h8	1,667	A					
T30h8	4,000	A	B				
T20h8	6,000	A	B				
T25h8	9,333		B				
T35h16	16,667			C			
T35h24	38,333				D		
T30h16	46,000					E	
T20h16	96,667						F
T25h16	97,667						F
T30h24	98,667						F
T20h24	100,000						F
T25h24	100,000						F

Tableau IV : Classement et regroupements des groupes non significativement différents

Modalités	Moyenne	Regroupements					
T35h8	1,667	A					
T30h8	4,000	A	B				
T20h8	6,000	A	B				
T25h8	9,333		B				
T35h16	16,667			C			
T35h24	38,333				D		
T30h16	46,000					E	
T20h16	96,667						F
T25h16	97,667						F
T30h24	98,667						F
T20h24	100,000						F
T25h24	100,000						F

Tableau V - Analyse de la variance sur l'évolution de nombre de colonies de *B. bassiana* sur le feuillage de différentes plantes.

**Recherche fondamentale sur l'entomothogène *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.)Vuill.
(Ascomycota: Hypocreales) :**

Source	DDL	Somme des carrés	Carrés moyens	F de Fisher	Pr > F
Modèle	29	217581,733	7502,818	21,699	< 0,0001
Résidus	30	10373,000	345,767		
Total	59	227954,733			

Tableau VI : Classement et regroupements des groupes non significativement différents

Modalités	Moyenne	Regroupements					
TOM18	0,000	A					
LAITU15	0,000	A					
LAITU18	0,000	A					
FEVE15	0,000	A					
FEVE18	0,000	A					
ORGE15	0,000	A					
ORGE18	0,000	A					
BLE15	0,000	A					
BLE18	0,000	A					
ORGE12	1,000	A					
TOM15	2,000	A					
BLE12	5,500	A					
FEVE12	6,500	A					
BLE9	10,000	A	B				
LAITU12	11,500	A	B				
TOM12	14,000	A	B	C			
ORGE9	17,000	A	B	C			
FEVE9	27,500	A	B	C	D		
BLE6	54,000	A	B	C	D		
FEVE6	68,500	A	B	C	D		
ORGE6	72,000	A	B	C	D	E	
LAITU9	72,500	A	B	C	D	E	
LAITU6	83,500		B	C	D	E	
TOM9	89,500			C	D	E	
BLE3	100,000				D	E	
FEVE3	100,000				D	E	
ORGE3	102,500				D	E	
TOM6	147,000					E	F
LAITU3	201,000						F
TOM3	217,500						F

Tableau VII : Classement et regroupements des groupes non significativement différents.

Modalités	Moyenne	Regroupements					
TOM18	0,000	A					
LAITU15	0,000	A					
LAITU18	0,000	A					
FEVE15	0,000	A					
FEVE18	0,000	A					
ORGE15	0,000	A					
ORGE18	0,000	A					
BLE15	0,000	A					
BLE18	0,000	A					
ORGE12	1,000	A					
TOM15	2,000	A					
BLE12	5,500	A					
FEVE12	6,500	A					
BLE9	10,000	A					
LAITU12	11,500	A					
TOM12	14,000	A					
ORGE9	17,000	A	B				
FEVE9	27,500	A	B				
BLE6	54,000		B	C			
FEVE6	68,500			C	D		
ORGE6	72,000			C	D		
LAITU9	72,500			C	D		
LAITU6	83,500			C	D		
TOM9	89,500			C	D		
BLE3	100,000				D		
FEVE3	100,000				D		
ORGE3	102,500				D		
TOM6	147,000					E	
LAITU3	201,000						F
TOM3	217,500						F

Tableau VIII : Classement et regroupements des groupes non significativement différents.

**Recherche fondamentale sur l'entomothogène *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.)Vuill.
(Ascomycota: Hypocreales) :**

Modalités	Moyenne	Regroupements					
TOM18	0,000	A					
LAITU15	0,000	A					
LAITU18	0,000	A					
FEVE15	0,000	A					
FEVE18	0,000	A					
ORGE15	0,000	A					
ORGE18	0,000	A					
BLE15	0,000	A					
BLE18	0,000	A					
ORGE12	1,000	A					
TOM15	2,000	A					
BLE12	5,500	A					
FEVE12	6,500	A					
BLE9	10,000	A					
LAITU12	11,500	A					
TOM12	14,000	A	B				
ORGE9	17,000	A	B				
FEVE9	27,500	A	B				
BLE6	54,000		B	C			
FEVE6	68,500			C	D		
ORGE6	72,000			C	D		
LAITU9	72,500			C	D		
LAITU6	83,500			C	D		
TOM9	89,500			C	D		
BLE3	100,000				D		
FEVE3	100,000				D		
ORGE3	102,500				D		
TOM6	147,000					E	
LAITU3	201,000						F
TOM3	217,500						F

Annexe VI : cuticule

Tableau IX : Analyse de la variance sur l'effet sur le poids sec de la cuticule.

Source de variation	DDL	Somme des carrés	Carrés moyens	F de Fisher	Pr > F
Modèle	3	653,619	217,873	291,710	< 0,0001
Résidus	20	14,938	0,747		
Total	23	668,556			

Valeur critique de Tukey : 3,958

Tableau X : Classement et regroupements des groupes non significativement différents.

Modalités	Moyenne	Regroupements			
L5TR	32,927	A			
L5T	36,495		B		
ADTR	42,310			C	
ADT	46,487				D

Tableau XI : Classement et regroupements des groupes non significativement différents.

Modalités	Moyenne	Regroupements			
L5TR	32,927	A			
L5T	36,495		B		
ADTR	42,310			C	
ADT	46,487				D

Tableau XII : Classement et regroupements des groupes non significativement différents.

Modalités	Moyenne	Regroupements			
L5TR	32,927	A			
L5T	36,495		B		
ADTR	42,310			C	
ADT	46,487				D

Tableau XIII - Analyse de la variance sur le poids sec de la cuticule sternale abdominale des L5 de *S. gregaria* et adultes traités par *B. bassiana*.

Source	Ddl	Somme des carrés	Carrés moyens	F de Fisher	Pr > F
Modèle	3	653,619	217,873	291,710	< 0,0001
Résidus	20	14,938	0,747		
Total	23	668,556			

Tableau XIV : Classement et regroupements des groupes non significativement différents.

Modalités	Moyenne	Regroupements			
L5TR	32,927	A			
L5T	36,495		B		
ADTR	42,310			C	
ADT	46,487				D

Tableau XV : Classement et regroupements des groupes non significativement différents.

Modalités	Moyenne	Regroupements			
L5TR	32,927	A			
L5T	36,495		B		
ADTR	42,310			C	
ADT	46,487				D

Tableau XVI : Classement et regroupements des groupes non significativement différents.

**Recherche fondamentale sur l'entomothogène *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.)Vuill.
(Ascomycota: Hypocreales) :**

Modalités	Moyenne	Regroupements			
L5TR	32,927	A			
L5T	36,495		B		
ADTR	42,310			C	
ADT	46,487				D

Table au XVIII - Analyse de la variance sur la teneur en protéine totale de la cuticule sternale abdominale des L5 de *S. gregaria* et adultes traités par *B. bassiana*:

Source	ddl	Somme des carrés	Carrés moyens	F de Fisher	Pr > F
Modèle	3	709,289	236,430	508,331	< 0,0001
Résidus	20	9,302	0,465		
Total	23	718,591			

Tablea u XIX : Classement et regroupements des groupes non significativement différents.

Modalités	Moyenne	Regroupements			
L5TR	26,482	A			
L5T	29,118		B		
ADTR	37,882			C	
ADT	39,075				D

Tableau XX : Classement et regroupements des groupes non significativement différents.

Modalités	Moyenne	Regroupements			
L5TR	26,482	A			
L5T	29,118		B		
ADTR	37,882			C	
ADT	39,075				D

Tableau XXI : Classement et regroupements des groupes non significativement différents.

Modalités	Moyenne	Regroupements			
L5TR	26,482	A			
L5T	29,118		B		
ADTR	37,882			C	
ADT	39,075				D

Tableau XXII - Analyse de la variance relative à la teneur en chitine de la cuticule sternale abdominale des L5 de *S. gregaria* et adultes traités par *B. bassiana*.

Source	DDL	Somme des carrés	Carrés moyens	F de Fisher	Pr > F
Modèle	3	45,174	15,058	17,668	< 0,0001
Résidus	20	17,046	0,852		
Total	23	62,220			

Tableau XXIII : Classement et regroupements des groupes non significativement différents.

Modalités	Moyenne	Regroupements
ADTR	4,203	A
L5TR	6,442	B
L5T	7,042	B
ADT	7,913	B

Tableau XXIV : Classement et regroupements des groupes non significativement différents.

Modalités	Moyenne	Regroupements
ADTR	4,203	A
L5TR	6,442	B
L5T	7,042	B C
ADT	7,913	C

Tableau XXV : Classement et regroupements des groupes non significativement différents.

Modalités	Moyenne	Regroupements
ADTR	4,203	A
L5TR	6,442	B
L5T	7,042	B C
ADT	7,913	C