

# LES CHAMPIGNONS ENTOMOPATHOGENES : EVOLUTION DES RECHERCHES AU COURS DES DIX DERNIÈRES ANNÉES

par P. FERRON

INRA. Station de Recherches de Lutte biologique. LA MINIERE 78000 VERSAILLES

Depuis une vingtaine d'années, les mises au point bibliographiques sur les travaux consacrés à la pathologie des insectes et à la lutte microbiologique ont été nombreuses : depuis les deux traités originaux de STEINHAUS (1947 et 1949), repris en collaboration avec de nombreux autres spécialistes en 1963, on a vu paraître les ouvrages de DE BACH (1964), MULLER-KOGLER (1965), WEISER (1966), BURGES et HUSSEY (1971), FRANTZ et KRIEG (1972), AFRIKIAN (1973), EVLAKHOVA (1974)... et on annonce, en 1975, la publication d'un nouvel ouvrage intitulé « Insect diseases » sous la direction de CANTWELL.

La création de l'Organisation Internationale de Lutte Biologique (O.I.L.B.) et de la Society for Invertebrate Pathology (S.I.P.), la publication régulière de leurs journaux scientifiques (*Entomophaga*, *Journal of Invertebrate Pathology*), l'organisation de Colloques internationaux (Paris, 1962 ; Wageningen, 1966 ; College Park, 1970 ; Oxford, 1973), de symposiums (Commission de Pathologie des Insectes et de Lutte microbiologique OILB/SROP : Amsterdam 1970, Montpellier 1971, Saint Christol les Alès 1974) ou de réunions annuelles (SIP : Oxford, 1973 ; Tempe, 1974 ; Corvallis, 1975) permettent de plus une excellente diffusion de l'information scientifique ainsi que des échanges directs entre les chercheurs. Parallèlement des réunions analogues se tiennent dans les capitales des pays de l'Est (Novosibirsk 1964, Riga 1968, Kichinev 1971, Bucarest 1973) et les différents Instituts de recherche concernés publient leurs travaux dans différentes revues telles que le Bulletin de l'Institut d'Etat de Recherches des Moyens de Lutte microbiologique de la Protection des Plantes (VNIIBACPREPARAT, Moscou), *Zakist Roslin* (Institut Ukrainien de Protection des Plantes, Kiev), du Bulletin de l'Institut de Recherches de l'Union Soviétique de Lutte biologique (Kichinev), de *Zaschita Rastenii* de l'Institut de Recherches de l'Union Soviétique de Protection des Plantes (Léningrad-Pouchkine), *Ekologia-Polska* (Vasvovie), *Ceska Mykologie* (Prague)...

On comprendra, dans ces conditions, qu'il est de plus en plus ardu de réunir et d'assimiler toute cette documentation qui traduit la vitalité croissante de ce secteur particulier de la protection des plantes ; même en se limitant à un seul domaine, ce qui n'est pas sans risque pour apprécier objectivement la valeur relative des différents travaux, la synthèse des

résultats obtenus ne peut être exempté d'omissions involontaires ou liées aux difficultés de faire traduire certaines publications rédigées en langues peu accessibles (telle le traité d'AOKI, 1957, consacré aux champignons entomopathogènes mais publié en japonais), sans omettre l'interprétation personnelle qu'instinctivement le lecteur leur donne en fonction de sa propre expérience.

Si, dans le cas particulier des champignons entomopathogènes, il est possible de dater les premières observations scientifiques aux environs des années 1830, avec l'ouvrage de BASSI (1835) sur la muscardine du ver à soie, les recherches se sont principalement développées d'une part entre 1880 et 1910, époque au cours de laquelle s'illustrèrent BAIL (1867) METSCHNIKOFF (1879), KRASSILSTSCHIK (1888), GIARD (1889)..., et d'autre part à partir des années 1950, suivant l'élan donné par la mise au point de préparations commerciales entomopathogènes à base des bactéries *Bacillus thuringiensis* Berliner ou *Bacillus populliae* Dutky (YENDOL et ROBERTS, 1970)

Un nombre encore limité de laboratoires consacrent leurs activités à ce domaine particulier de la lutte microbiologique, sauf dans les pays de l'Est tels que la Tchécoslovaquie, la Pologne et surtout l'Union Soviétique où depuis une vingtaine d'années un effort suivi est fourni pour aboutir à des solutions pratiques utilisables en agriculture, mais il est remarquable de constater l'intérêt croissant pour ce sujet manifesté par des spécialistes appartenant à d'autres disciplines que l'entomologie, qu'il s'agisse de systématiciens, de biochimistes ou de technologues.

L'ouvrage de base à partir duquel nous nous proposons d'analyser les publications est celui de MULLER-KOGLER (*Pilzkrankheiten bei Insekten. Anwendung zur biologischen Schädlingsbekämpfung und Grundlagen der Insektenmykologie*, 1965), véritable source de documentation pour tout travail consacré aux champignons entomopathogènes. Tous les aspects du problème ne pouvant être évoqués en quelques pages, il sera précieux de se référer, en cas de besoin, aux mises au point de COUCH et UMPHLETT sur les *Coelomomyces*, de MACLEOD sur les Entomophthorales, de MADELIN sur les *Fungi Imperfecti*, de MOEWENS sur les *Cordyceps* dans le traité de STEINHAUS (1963), de ROBERTS et YENDOL sur l'utilisation pratique des champignons dans la lutte contre les insectes et de GUSTAFSSON sur le problème particulier des mycoses d'aphides et de cochenilles (in BURGESS et HUSSEY, 1971).

## I. RECHERCHES FONDAMENTALES

### § 1. *Position systématique des champignons entomopathogènes.*

Alors qu'il y a seulement une quinzaine d'années, la littérature spécialisée étant encore encombrée d'une synonymie particulièrement riche pour désigner les genres et espèces de champignons entomopathogènes, malgré les travaux fondamentaux de PETCH (de 1921 à 1948) puis de MAINS (de 1950 à 1959) ; les efforts réalisés au cours des dernières années par les systématiciens permettent actuellement d'identifier avec sécurité la plupart des genres et espèces rencontrées. Le récent ouvrage d'EVLAKHOVA (1974), quoique en langue russe, est un précieux document de référence grâce aux nombreuses planches qui l'illustrent.

Rappelons que les champignons entomopathogènes se répartissent dans tous les groupes systématiques, des Phycomycètes aux *Fungi Imperfecti*, en passant par les Ascomycètes et

les Basidiomycètes. Cependant l'importance relative des différents groupes est très variable : les *Fungi Imperfecti* (Moniliales et Sphaeriales) et les Phycomycètes (Entomophthorales) constituent les classes les mieux représentées et les plus fréquentes. On doit cependant leur adjoindre les *Cordyceps* (Ascomycètes Hypocréales) fréquents dans certaines régions du globe mais à biologie et rôle encore mal connus, ainsi que les *Coelomomyces* (Phycomycètes Blastocladales) pathogènes des larves d'*Aedes*, *Anopheles* et *Chironomidae*.

#### A. *Fungi Imperfecti*.

Ils regroupent les germes les plus communément étudiés tels *Beauveria*, *Metarrhizium*, *Paecilomyces*, *Spicaria* (= *Nomuraea*), *Hirsutella*... MACLEOD (1954) réduisit l'abondante synonymie du genre *Beauveria* (*Sporotrichum*, *Isaria*, *Penicillium*, *Botrytis*...) et proposa de distinguer les deux seules espèces types *Beauveria bassiana* (Balsamo Vuillemin) et *Beauveria tenella* (Delacroix) Siemaszko ; récemment DE HOOG (1972) rétablit le nom *Beauveria bronniartii* (Saccardo) Petch sous lequel on doit désormais désigner *B. tenella*.

En ce qui concerne *Metarrhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin, on distingue depuis les observations originales de JOHNSTON (1915) confirmées ultérieurement par VEEN (1968), une forme major (dimensions des conidies 7-16 x 2,5-3,5  $\mu$ ) ainsi qu'une forme minor encore dite « *anisopliae* » (3-5 x 2,3  $\mu$ ). Récemment GAMS et ROZSYPAL (1973) ont décrit une nouvelle espèce, *Metarrhizium flavoviride*, caractérisée par la teinte vert-jaune de sa sporée typiquement vert foncé chez *M. anisopliae* et par la morphologie de ses conidies de forme grossièrement ellipsoïde et de taille intermédiaire entre les « major » et les « minor » (7-9 x 4,5-5,5  $\mu$ ) ; les mêmes auteurs pensent, sur la base des descriptions fournies par BOROWSKA, GOLONKOWA et KOTULAWA (1970), que l'espèce *Metarrhizium valutinum*, que ceux-ci ont décrite, est très voisine de *M. anisopliae*. D'après nos propres observations, *M. flavoviride* pourrait être un agent entomopathogène intéressant pour la lutte biologique car il provoque une mycose endémique dans les populations de l'*Otiorrhynchus* du fraiser en Bretagne.

Le genre *Paecilomyces* (*Paecilomyces farinosus* (Holm ex S.F. Gray) Brown et Smith et *Paecilomyces fumoroseus* (Wize) BROWN et SMITH (1957) vient d'être étudié à nouveau par SAMSON (1974) qui le découpe en deux sections, section *Paecilomyces* et section *Isaidioidea* dans laquelle sont regroupées les espèces entomopathogènes (les 2 précédemment indiquées ainsi que *P. amoeroseus* (P. Henn) Samson, nouvelle espèce isolée de larves et nymphes de coléoptères et de lépidoptères au Ghana). Si 3 espèces de *Paecilomyces* ont des stades sexués reconnus parmi les Ascomycètes, par contre en ce qui concerne les espèces entomopathogènes toutes les tentatives de culture visant à démontrer leur parenté avec les formes sexuées des Ascomycètes *Cordyceps* et *Torrubiella* ont jusqu'à présent échoué.

Le genre *Akanthomyces* (MAINS, 1950) qui développe des synnema semblables à ceux des *Paecilomyces* s'en distingue cependant par la disposition particulière des phialides tout au long des synnema, alors qu'elles ont une disposition verticillée chez *Paecilomyces*. Cependant SAMSON et EVANS (1974) signalent que *Akanthomyces gracilis*, pathogène pour les chenilles de lépidoptères et les Cercopides au Ghana, peut être considéré comme une forme de passage entre les deux genres.

Les mêmes auteurs donnent de nouvelles descriptions des genres *Gibellula* (MAINS, 1950) et *Pseudogibellula* (SAMSON et EVANS, 1973), pathogènes d'Arachnides, d'Hymenoptères *Formicidae* et d'Homoptères *Cercopidae*, dont les potentialités d'emploi en lutte micro-

biologique n'ont pas encore été éprouvées. Il en est d'ailleurs de même pour les *Akanthomyces* précédemment cités.

KISH, SAMSON et ALLEN (1974) ont récemment proposé que l'espèce *Spicaria rileyi* (Farlow) Charles, déjà écartée du genre *Paecilomyces* par BROWN et SMITH (1957) soit rattachée au genre *Nomuraea* décrit par MAUBLANC (1903) sous le nom *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson. Cette espèce réputée pour sa croissance lente (alors que l'utilisation d'un milieu de culture à base d'un cocktail commercial de 8 jus de légumes nous donne entièrement satisfaction à la Minière) cause des épizooties dans les populations de *Trichoplusiani* au Texas (GETZIN, 1961) et s'avère, d'après nos expérimentations un agent entomopathogène aux potentialités non négligeables (FARGUES et RODRIGUEZ, 1974). Une autre espèce, *Nomuraea atypicola* (Yasuda) Samson est décrite par SAMSON (1974) à partir de cultures isolées essentiellement d'araignées qui, d'après KOBAYASI (1941) sont fréquemment atteintes de cette mycose au Japon.

Le genre *Hirsutella* (MAINS, 1951) présente des analogies morphologiques avec le genre *Akanthomyces* par la formation de synnema portant des phialides latérales. Celles-ci ont cependant la particularité de se terminer par un long sterigmate portant à sa pointe une conidie le plus souvent englobée de mucus. Pathogènes d'insectes appartenant à tous les groupes systématiques, le genre compte un assez grand nombre d'espèces parmi lesquelles *Hirsutella gigantea* Petch (MACLEOD, 1959) et surtout *Hirsutella thompsonii* Fisher (FISHER, 1950) qui fait l'objet d'un programme de recherches et d'applications en Floride pour lutter contre les pullulations de l'acarien *Phyllocoptruta oleivora* en plantations de citrus (McCOY, 1969, 1971, 1972).

PROTSENKO (1967) a établi récemment une clé systématique du genre *Aschersonia* (Sphaeropsidales) pathogène de *Coccidae* et d'*Aleurodidae*. Ces espèces représentent le stade conidial d'espèces sexuées appartenant au genre *Hypocrella* (Ascomycètes) (cf. PETCH 1921, MAINS 1959 a et b). Cependant chez la plupart des espèces la formation des périthèces est rare. MAINS (1959b) a décrit 7 espèces pathogènes d'aleurodes en Amérique du Nord, dont la plus fréquente *Aschersonia aleyrodis* Weber. Elle se présente sous la forme d'un stroma circulaire convexe, de 0,5 à 5 mm de largeur, entouré d'un fin feutrage mycélien sur 1 mm de largeur, d'une couleur blanche à ocracée, généralement plus ou moins recouvert d'une sporée orange à l'état frais et percé de quelques orifices périthéciaux. Au début du siècle (BERGER 1907, ROLFS et FAWCETT 1908) des expérimentations prometteuses furent réalisées en Floride contre les aleurodes des citrus. Plus récemment des résultats très encourageants ont été signalés contre le même ravageur en République autonome d'Adjarie (URSS) par GA-PRINDASHVILI et al. (1964).

Signalons enfin deux genres de Moniliales qui comptent des espèces occasionnellement entomopathogènes : *Cephalosporium* et *Sporotrichum*. D'après BALAZY (1973) seuls *Cephalosporium Lecanii*, *C. lefroyi* ainsi que les formes conidiennes de *Torrubiella alba* et de *Cordyceps militaris* semblent pouvoir être considérés comme de véritables entomopathogènes. *Cephalosporium muscarium* Petch *Cephalosporium thripidum* Petch et *Acrostalagmus coccidicola* Guégen doivent être désormais considérés comme des synonymes de *Cephalosporium lecanii* Zimmermann, principalement isolé de cochenilles. De même *Cephalosporium dipteringenum* Petch et *C. aphilicola* sont des synonymes de *Cephalosporium lefroyi* Horne. FASSA-TOVIA (1967) présente une clé systématique des *Sporotrichum* entomopathogènes (*S. martinckii*, *S. cejpui* et *S. araneorum*), leur virulence pour les insectes ayant été démontrée expérimentalement uniquement pour *S. cejpui*.

#### B. *Entomophthorales* (Phycomycètes)

Cette classe regroupe à la fois des genres entomopathogènes (*Entomophthora*, *Massospora*) et des genres saprophytes ou parasites de végétaux (*Basidiobolus*, *Conidiobolus*...). La distinction entre les deux entomopathogènes tient au mode de formation des conidies qui se développent sur des conidiophores à l'extérieur du corps de l'insecte (*Entomophthora*) ou au contraire uniquement à l'intérieur (*Massospora*).

SOPER (1974) a commencé l'étude du genre *Massospora* par un revue systématique à partir du matériel récolté sur la cigale *Okanaga rimosa* Say ; parallèlement MACLEOD et MULLER-KOGLER (1970, 1973) ont entrepris une monographie du genre *Entomophthora* qui compte 150 espèces décrites et dont l'espèce type est *Entomophthora* (= *Empusa*) *muscae* Cohn. A partir des 8 sous-genres proposés au cours des vingt dernières années pour classer les différents types : *Zygaenobia* (WEISER, 1951), *Zoophthora*, *Triplosporium*, *Entomophaga* (BATKO, 1964a), *Culicicola* (BATKO, 1964b), *Strongwellsea* (BATKO et WEISER, 1965), *Tarichium* (WEISER, 1965) et *Myiophyton* (ARX, 1970), MACLEOD et MULLER-KOGLER ont tout d'abord décrit les espèces dont le stade conidial est inconnu et qui étaient pour la plupart désignées sous le genre *Tarichium* (1970), puis les espèces ayant des conidies pyriformes à sphériques (1973). Ultérieurement ils se proposent de prendre en considération les espèces dont les conidies ont une forme en cloche puis celles possédant des conidies fusiformes, ovales ou elliptiques.

Pour clarifier la situation, avant que cette importante monographie soit achevée, TYRRELL et MACLEOD (1972) ont proposé que les espèces produisant des microconidies, et en particulier l'espèce *Entomophthora coronata*, décrites sous les noms de genre *Delacroixia*, *Entomophthora* et *Conidiobolus*, soient regroupées sous le nom générique *Conidiobolus* subgen. *Delacroixia* (Sacc. et Syd.) Tyrrell et MacLeod (espèce type : *Conidiobolus coronatus* Cost. Batko).

#### C. *Coelomomycetaceae* (Physomycètes Blastocladales).

Caractérisés par leur spécificité pour les moustiques et les chironomides ainsi que par leur multiplication sous la forme de sporanges dans la cavité générale de l'insecte, les *Coelomomyces* ont retenu l'attention des entomologistes et des responsables de la santé humaine (O.M.S.) depuis près de vingt ans. La révision du genre par COUCH (1945) a subi peu de modifications, quelques espèces nouvelles telles que *C. tasmaniensis* (LAIRD, 1956), *C. opifexi* (PILLAI, 1969) devant y être adjointes, compte tenu des validations successives de LAIRD (1962), COUCH (1962), WEISER et VAVRA (1964).

#### D. *Ascomycètes*.

Ces champignons sexués comptent des genres entomopathogènes variés et relativement mal connus.

SKOU (1972) a présenté une monographie des *Ascospaerales* (*Euascomycetidae*) qui comprennent les deux genres *Bettsia* et *Ascospaera* = *Bettsia alvei* semble être uniquement un saprophyte du pollen dans les ruches alors que *Ascospaera apis*, *A. major* et *A. proliperda* occasionnent la maladie crayeuse du couvain (*chalk-brood disease*).

EVLAKHOVA (1974) donne une clé systématique des *Myriangiales* (*Loculoascomycetidae*), pathogènes d'Homoptères *Coccoidea* (*Myriangium duriaei* Mont. et Berk., *M. asterinosporum* E11. et Ev. Miller, *M. tuberculans* Miles et *M. floridanum* Hohnel) mais faute de révision récente du genre il est nécessaire de se reporter aux descriptions de PETCH (1924) et de MILLER (1940) ou à la monographie générale du genre de von ARX (1963).

Le genre *Cordyceps* (Pyrenomycètes Sphaeriales Clavicipitaceae) qui compte de nombreuses espèces pathogènes d'insectes très divers, est par contre bien connu sur le plan systématique (KOBAYASI, 1949 ; MAINS, 1958) mais a peu fait l'objet de travaux pathologiques et écologiques (LATGE, 1972).

Les genres *Torrubiella* (syn. *Globulina*), *Hypocrella* (syn. *Fleischeria*, *Hypocreophis*, *Moelleriella*) et *Podonectria*, tous de la même famille des Clavicipitaceae sont également reconnus entomopathogènes mais ne semblent pas avoir fait l'objet d'études récentes (cf. MULLER-KOGLER, 1965).

## § 2. Pathogénèse.

### A. Voies et modalités d'infection.

Il est désormais admis que d'une façon générale l'infection des insectes par les champignons entomopathogènes se produit par la voie tégumentaire et non pas par le tube digestif, voie d'entrée privilégiée des bactéries et des virus. On doit cependant mentionner que quelques auteurs tels ACATRINEI et PETCU (1966), BAJAN et KMITOVA (1968) décrivent l'infection des larves de doryphore par *Beauveria bassiana* à travers l'épithélium intestinal.

Alors que DAVID (1967) suggère que la pénétration du mycélium à travers le tégument peut être favorisée par les pores naturels qui le traversent, McCAULEY, ZACHARUK et TINLINE (1968) excluent cette hypothèse et confirment la théorie suivant laquelle après développement ou non, à la surface du tégument, de structures appressoriales (ZACHARUK, 1970) des mécanismes de nature physique et enzymatique déterminent la pénétration des hyphes infectants (ROBINSON, 1966). Il est fréquemment observé qu'au niveau des points d'infection le tégument se mélanise, sans toutefois que ce phénomène soit absolu. OAKI et YANASE (1970) interprètent cette manifestation comme la conséquence d'une modification de l'activité phénoloxidasique du tégument par le champignon. En présence d'un pathogène très virulent, la pénétration du tégument serait assez rapide pour que l'activité phénoloxidasique de celui-ci ne soit pas modifiée, alors qu'au contraire une souche peu active perturberait plus longtemps cette activité qui assurerait alors la mélanisation tégumentaire.

Rappelons que le tégument de l'insecte est essentiellement constitué de protéines et de chitine associées à des lipides et à des composés phénoliques. La partie externe ou épicuticule, très fine est caractérisée par sa teneur en lipides (acides gras et paraffines). SUSSMAN (1951), KOIDSUMI (1957), EVLAKHOVA et SHEKHURINA (1962) ont démontré l'activité antifongique de ces lipides épicuticulaires. Suivant les auteurs, leur élimination par voie physique ou chimique favoriserait ou non la pénétration des champignons. En fait LATGE (1972) lève cette apparente contradiction en démontrant que ces lipides possèdent effectivement une activité antifongique mais qu'elle ne se manifeste qu'à de fortes concentrations, bien supérieures à celles qu'on peut trouver dans l'épicuticule. D'ailleurs GABRIEL (1968), LATGE (1972), PARIS (1973) ont montré que des champignons aussi différents que *Beauveria bassiana*, *Cordyceps militaris* ou *Beauveria tenella* possèdent effectivement une activité lipasique.

L'originalité de l'équipement enzymatique des champignons entomopathogènes tient donc plus aux systèmes susceptibles d'attaquer le complexe chitine-protéine, puisqu'on estime que seulement 10 % des protéines totales du tégument ne sont pas liées. Il est donc nécessaire qu'une hydrolyse préalable des protéines par une protéase ait lieu avant que les chitinases entrent à leur tour en action. Or, dans le cas du tégument des insectes, la sclérotisation des chaînes protéiniques (par polymérisation des chaînes de polypeptides tannés par des quinones) assure une stabilité particulière du complexe chitine-protéine.

D'après les expériences de SAMSINAKOVA, MISIKOVA et LEOPOLD (1971) sur *Beauveria bassiana* et *Galleria mellonella* d'une part, de LATGE (1972) sur *Cordyceps militaris* d'autre part, il apparaît qu'outre les lipases déjà citées, protéases et chitinases sont effectivement produites par ces champignons et que les activités lipasiques et protéasiques précèdent l'activité chitinolytique. Chez les Entomophthorales, JONSSON a également reconnu (1968) la production de protéases chez 10 espèces différentes. Etant donné qu'il n'a pas été possible d'établir de corrélation entre la pathogénicité de diverses souches de *Beauveria tenella* pour les larves de *Melolontha melolontha* et leur activité protéasique (PARIS, 1973), il est vraisemblable que d'autres propriétés des souches pathogènes doivent être prises en considération.

Pour un même insecte et pour une même souche de champignon, ces phénomènes infectieux ont des évolutions différentes en fonction du site tégumentaire contaminé par l'inoculum de spores = après contamination ponctuelle de larves L3 de *Melolontha melolontha* par 1.10<sup>5</sup> conidies de *Beauveria tenella* au niveau du labium, du 1er tergite thoracique, du 2ème stigmat thoracique, du 7ème tergite abdominal, du tergite du telson ou enfin de la région anale, le développement de la mycose est le plus élevé d'une façon significative après la contamination du labium (DELMAS, 1973). VEEN (1966) avait déjà observé que les larves de *Schistocerca gregaria* peuvent être infectées à ce niveau par *Metarrhizium anisopliae*, mais par contre OAKI (1961) rapporte que la contamination des chenilles de *Bombyx mori* au niveau des pièces buccales n'est pas suivie d'effet. Faute d'études histologiques, on ne peut encore interpréter ces phénomènes.

Rappelons enfin que certains champignons dits occasionnellement entomopathogènes (*Mucor*, *Aspergillus*) ne peuvent infecter l'insecte que par des lésions ou blessures accidentelles du tégument (HEITOR, 1962 ; VEY, VAGO et DELANOUE, 1967), ce qui met en valeur l'importance de la barrière tégumentaire dans les processus infectieux. C'est d'ailleurs pour cette raison qu'à notre avis il est préférable d'éviter les expérimentations d'infection par injection artificielle intra-hémocoelienne lorsqu'on se propose d'étudier, sur le plan écologique, les relations entre un champignon et un insecte.

#### B. Développement de l'infection : mort ou guérison ?

Après la traversée du tégument, seul l'hypoderme présente localement des altérations d'une histolyse. Le mycélium se fragmente en éléments de colonisation par bourgeonnement (blastospores) ou abstriction, alors que les phagocytes se concentrent autour des points d'infection. VEY (1971) décrit la réaction hémocytaire des chenilles de *Galleria mellonella* atteintes d'une mycose à *Aspergillus niger* ; ce sont principalement les plasmatocytes de la formule sanguine, normalement dispersés dans l'hémolymphe, qui s'agglomèrent autour du champignon en un ensemble apparemment serré. Les cellules les plus internes semblent subir une lyse partielle, les plus proches du champignon étant touchées par un processus de mélanisation, les hyphes eux-mêmes étant entourés d'une graine mélanisée. Au bout de quelques jours ce pseudo-tissu hémocytaire prend un aspect feuilleté (granulome). Ce mécanisme de défense a pu être reproduit in vitro grâce aux techniques de culture de cellules d'invertébrés (VEY, 1967 ; VEY et VAGO, 1971), ce qui a révélé un phénomène d'attractivité à distance des hémocytes par les éléments mycéliens ainsi que l'impossibilité pour les cellules les plus profondes du granulome de se détacher et de reprendre leur individualité après explantation.

En quelques jours ces formations hémocytaires peuvent atteindre une taille importante, de l'ordre du millimètre et devenir visibles à travers le tégument ; ou bien l'évolution de la maladie est stoppée à ce stade et l'insecte continue son développement jusqu'au stade imaginal en présence de ces granulomes, ou bien le mycélium franchit cette barrière hémocytaire et l'infection se développe.

VEY et VAGO (1971) distinguent l'importance relative de ces phénomènes d'enkystement en fonction du pouvoir entomopathogène du champignon ; avec des agents faiblement pathogènes tels *Aspergillus niger* v. Tiegh il semble que dans certains cas on observe des processus prenant la voie de la guérison (VEY et VAGO, 1969) le champignon restant isolé dans son enveloppe pendant toute la vie de l'insecte ; avec des parasites de blessure tels *Mucor hiemalis* Wehmer, l'enkystement a une efficacité assez faible à la fois en raison de la rapidité du développement des hyphes et de la sécrétion de toxines, mais la guérison peut cependant arriver dans quelques cas particulier ; enfin avec des agents à pouvoir pathogène élevé, tels les *Beauveria*, si on observe une phase initiale de regroupement des hémocytes et même de phagocytose, ultérieurement des troubles surviennent dans le processus d'enkystement, vraisemblablement en raison de l'émission de toxines. La mort survient à la fois parce que la réaction hémocytaire est de trop faible durée et n'empêche pas l'émission de blastospores dans l'hémocoèle et surtout sous l'action des toxines puisque les attaques tissulaires sont encore très limitées à ce stade. Cependant ZACHARUK (1971) observa que l'ultrastructure des cellules du tissu adipeux, des tubes de Malpighi, du tube digestif, du ganglion abdominal ventral et des muscles est déjà modifiée au moment de la mort de l'insecte même si on ne détecte pas d'éléments mycéliens à leur voisinage (vacuolisation des cytoplasmes, augmentation du nombre et de la taille des lysosomes, dégénérescence des mitochondries).

Le rôle des toxines dans l'évolution ultime des processus infectieux est donc considéré comme déterminant. Divers auteurs ont en effet identifié divers composés toxiques à partir de cultures de *Beauveria*, *Metarrhizium*, *Cordyceps* et Entomophthorales. Ainsi, depuis les travaux originaux de KODAIRA (1961) qui purifia les destruxines A et B à partir de filtrats de culture de *Metarrhizium anisopliae*, RABERTS (1966a et b, 1969) précisa les conditions de synthèse de ces toxines en fonction de la composition chimique du milieu de culture et décrit les symptômes qu'elles provoquent après injection intrahémocoelienne (tétanie). Parallèlement TAMURA, KUYAMA, KODAIRA et HIGASHIKAWA (1964) puis KUYAMA et TAMURA (1965) indiquèrent la structure chimique de la destruxine B et le procédé conduisant à sa synthèse totale, alors que SUZUKI, KUYAMA, KODAIRA et TAMURA (1966) élucidaient la structure de la destruxine A. Ultérieurement SUZUKI, TAGUCHI et TAMURA (1970) puis SUZUKI et TAMURA (1972) ont isolé et décrit les structures de 3 autres composés toxiques, les destruxines C et D ainsi que la desmethyl-destruxine B. Après avoir identifié ces composés dans le filtrat de culture de *M. anisopliae*, SUZUKI, KAWAKAMI et TAMURA (1971) les ont à leur tour reconnus dans des vers à soie (*Bombyx mori*) infectés par ce même champignon, ce qui confirme qu'ils peuvent jouer un rôle dans les processus pathologiques conduisant à la mort de l'insecte.

Il s'agit de depsipeptides cycliques composés de 5 acides aminés et d'un acide gras, dont la structure présente des analogies avec d'autres polypeptides toxiques tels que la gramïcidine S (*Bacillus brevis*), la phalloïdine (*Ammanita phalloides*), l'islanditoxine (*Penicillium islandicum*) (cf. LYSENKO et KUCERA, 1971).

*Beauveria bassiana* émet également des composés toxiques tels la beauvericine (HAMILL, HIGGINS et GORMAN, 1969 ; DORSCHNER et LARDY, 1969) qui est également un cyclodepsipeptide de structure voisine de celle des enniatines des *Gibberella*. Des études récemment réalisées en France (FRAPPIER, communication personnelle) sur deux souches de *B. bassiana* et de *B. tenella* n'ont pas permis de révéler la présence de ce cyclodepsipeptide, mais par contre celle d'un autre composé de la même famille, le ténérolide, dont la structure varie suivant l'espèce considérée. Ces résultats confirment ceux de BRIGGS, FERGUS et SHANNON (1966) qui ont décrit la structure d'un isarolide (mélange de cyclodepsipeptides) obtenu à partir d'une souche d'un *Isaria* sp. Or DE HOOG (1972), à la suite d'un examen morpho-

logique de cette même souche (CBS 72271) l'a identifiée comme étant un *Beauveria bronniartii* (= *B. tenella*). Il est remarquable de noter la convergence de ces résultats obtenus au moyen de techniques totalement indépendantes l'une de l'autre.

YENDOL, MILLER et BEHNKE (1918) ont étudié les toxines produites par *Entomophthora coronata* (= *Conidiobolus coronatus*), *Entomophthora virulenta* et *E. apiculata* par injection aux chenilles de *Galleria mellonella* et aux imagos de *Musca autumnalis*. PRASERT-PHON et TANADA (1969) se sont livrés à des études analogues sur *Galleria*, *Bombyx mori*, *Heliothis zea* et *Hyalophora cecropia*. Par injection intra-hémocoelienne ces toxines ne provoquent pas de paralysie comme les destruxines mais une réaction de mélanisation généralisée, ainsi que des perturbations des mues larvaires et imaginales à fortes doses.

La Cordycepine fut isolée de cultures de *Cordyceps militaris* par CUNNINGHAM, HUTCHINSON, MASON et SPRING (1951) et sa structure étudiée en détail par BENTLEY, CUNNINGHAM et SPRING (1951) puis par HANNESSIAN, DEJONGH et McCLOSKEY (1966) mais il ne semble pas qu'elle ait fait l'objet d'expérimentations sur insectes, alors que son activité bactéricide a été mentionnée plusieurs fois.

KODAIRA (1961) démontra qu'*Aspergillus ochraceus*, *A. oryzae*, *A. flavus* donnent, en milieu de culture, des composés toxiques pour le ver à soie par ingestion. BEARD et WALTON (1969) ont obtenu des résultats comparables sur *Oncopeltus fasciatus*, *Musca domestica* et *Aedes atropalpus* avec un composé soluble dans l'eau provenant de cultures d'*A. flavus* var. *columnaris*. À partir de ces mêmes cultures, TOSCANO et REEVES (1973) ont séparé par le chloroforme deux fractions toxiques pour les larves de *Culex peus* et *Culex tarsalis*.

L'effet cytotoxique de l'un de ces composés, la beauvericine, a été récemment étudié par VEY, QUIOT et VAGO (1973) grâce à la technique des cellules d'insectes cultivées in vitro. L'effet le plus marquant, en dehors d'une influence sur la forme, les réactions et la migration des cellules, concerne les altérations nucléaires (groupement de la chromatine en amas denses et volumineux). VELITSKAIA (1968) note que les toxines de *B. bassiana* n'ont pas seulement une activité sur les insectes mais également sur les protozoaires (paramécies) et les végétaux. SIKURA et BEVZENKO (1972) ont établi une corrélation entre la production de toxines par *B. bassiana* en culture profonde et la virulence des souches pour *Galleria mellonella*.

Cette évolution plus ou moins rapide de la toxémie en fonction des propriétés des souches entomopathogènes considérées explique vraisemblablement que dans certains cas le champignon puisse avoir un développement végétatif marqué avant la mort de l'hôte. PRASERT-PHON et TANADA (1968) ont décrit la formation et la circulation des blastospores de *Metarhizium anisopliae* ou de *Beauveria bassiana* et des corps hyphaux (hyphal bodies) d'*Entomophthora coronata* et d'*E. apiculata* dans l'hémolymphe de *Galleria mellonella*. Quarante huit heures après la contamination tégumentaire des blastospores peuvent être repérées dans le sang et après soixante heures elles envahissent l'hémocoèle, la mort des insectes survenant en moyenne après 72 heures. La multiplication de ces blastospores a été étudiée par OAKI et YANASE (1970) qui établissent des corrélations entre leur nombre et leur taille et la composition chimique du milieu nutritif. En général la présence d'acides aminés monoaminomonocarboxyliques (glycine, alanine, isoleucine, leucine, valine) ou aromatiques (phenylalanine, tyrosine) le sont moins.

Au cours de cette phase de colonisation de l'hémolymphe, les blastospores peuvent être phagocytées par les cellules sanguines (KAWAKAMI, 1965) mais ce phénomène de défense ne semble être réellement efficace qu'en présence de champignons peu virulents.

### C. Développement post-mortem du champignon.

Après la mort de l'hôte, le champignon poursuit son développement en saprophyte en colonisant les différents tissus. Il entre alors en compétition avec la flore bactérienne intestinale, particulièrement abondante chez certaines espèces d'insectes saproxylophages comme les *Oryctes* par exemple.

Or dans la majorité des cas le cadavre des insectes tués par la mycose ne subit pas de putréfaction bactérienne, ce qui laisse supposer que des substances antibiotiques peuvent être émises par le pathogène. Il a été signalé précédemment que la cordycepine présente une activité antibactérienne. En ce qui concerne les *Beauveria*, VINING, KELLEHER et SCHWARTING (1962) ont démontré que l'oosporeïne, pigment responsable de la coloration des cadavres, a une activité bactéricide vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella pneumoniae* et *Pseudomonas aeruginosa*. Signalons d'ailleurs qu'outre cette oosporeïne, pigment rouge, des pigments jaunes dénommés respectivement bassianine et tenelline ont été identifiés (El BASYOUNI, BREWER et VINING, 1968) ; leur structure et leur bio-synthèse ont fait l'objet de travaux récents (McINNES, GAVIN, SMITH, WALTE R, VINING et WRIGHT, 1964, McINNES, GAVIN, SMITH, CHI KIT WAT, VINING et WRIGHT, 1974).

Après envahissement complet du cadavre transformé en momie, le développement ultérieur du champignon est conditionné par l'humidité relative de l'atmosphère ambiante = ce n'est que si l'humidité atmosphérique est élevée que le mycélium, après avoir à nouveau traversé le tégument, mais cette fois de l'intérieur du corps vers l'extérieur, croît en surface pour former des conidiophores, origine de la reproduction asexuée (conidiospores) ; sinon le cadavre reste à l'état d'une momie dure et cassante. Quelques observations indiquent que l'agent entomopathogène pourrait alors se conserver sous la forme de chlamydospores (PRA-SERTPHON et TANADA, 1968).

#### D. Particularités de l'infection au cours de la mue.

Alors qu'il était habituellement admis que le rejet tégumentaire consécutif aux mues pouvait assurer une protection de l'insecte contre l'infection par les champignons, ZACHARUK (1973) FARGUES et VEY (1974) ont analysé plus en détail les processus pathologiques au cours de cette phase particulière et démontré que, dans certains cas, l'infection pouvait être au contraire favorisée. Par exemple *Beauveria bassiana* peut traverser le tégument des larves du 3ème stade de *Leptinotarsa decemlineata* en prémue, coloniser le liquide exuvial et contaminer secondairement le nouveau tégument en formation soit suivant le processus classique de l'infection primaire, soit à travers les zones de lésions tégumentaires occasionnées par les adhérences entre les deux téguments sous l'action du champignon. Des bactéries peuvent d'ailleurs pénétrer également par ces blessures et provoquer des septicémies mortelles.

#### E. Sensibilisation des insectes aux infections cryptogamiques.

Les expériences d'infection dans les conditions contrôlées du laboratoire (FERRON, 1967, 1970 ; FARGUES, 1972) ont bien mis en évidence la corrélation entre le nombre de spores infectantes (inoculum) et la rapidité du développement létal de l'infection. Ces résultats révèlent que l'inoculum minimum indispensable est assez élevé = la DL 50 en spores de *Beauveria tenella* incorporé au substrat d'élevage des larves de *Melolontha melolontha* est respectivement de 2.10 4 après 145 jours, 8.10 4 après 100 jours et 1.10 6 après 50 jours à 23° (FERRON, 1967) ; 1.10 3 spores de *Metarrhizium anisopliae* par gramme de compost suffisent par contre pour provoquer 100 % de mortalité au bout de 21 jours chez les larves d'*Oryctes monoceros* (DIOMANDE, 1969) ; pour des insectes aériens comme les larves de

*Leptinotarsa decemlineata* des 3ème et 4ème stades, le seuil minimum par application directe sur le tégument de l'insecte est du même ordre de grandeur (1.10<sup>3</sup>) mais il passe à environ 50 000 spores par larves lors d'une pulvérisation sur le feuillage (TELENGA, SIKURA et SMETNIK, 1967).

On a donc cherché à augmenter la sensibilité des insectes à la mycose en perturbant leur état physiologique, soit par des substances chimiques à doses réduites, soit par association de germes entomopathogènes de natures différentes (champignon + bactérie, champignon + virus, champignon + protozoaire...).

Alors que PRISTAVKO (1966) attribue la sensibilisation des larves de *Leptinotarsa decemlineata* à la mycose à *Beauveria bassiana* à une altération de la perméabilité de l'épithélium intestinal à la flore bactérienne du tube digestif, VEY (1967) démontre que la réaction hémocytaire des chenilles de *Galleria mellonella* à une infection à *Aspergillus niger* peut être modifiée par une infection simultanée par le virus de la denso nucléose.

Des résultats contradictoires ont été obtenus lors de l'emploi de doses réduites d'insecticides chimiques en association avec les champignons entomopathogènes. Le synergisme d'action décrit par les auteurs soviétiques (TELENGA, 1964), n'a pu être reproduit, sur le même matériel (*Leptinotarsa decemlineata*) par FARGUES (1973) ; par contre l'addition de doses réduites d'HCH, parathion ou trichloronate (en général le cinquième de la dose conseillée dans la pratique agricole) à un inoculum de *Beauveria tenella* favorise nettement le développement de la muscardine blanche des larves du Hanneton commun (FERRON, 1970, 1971).

Lors de l'association d'agents pathogènes de natures différentes, on n'observe un effet favorable que lorsque l'infection cryptogamique est pratiquée après incubation préalable d'une maladie bactérienne ou virale (FERRON, HURPIN et ROBERT, 1969 ; FERRON et HURPIN, 1974).

### § 3. Spécificité des champignons entomopathogènes.

S'il est reconnu que les grands groupes de champignons entomopathogènes ont une spécificité marquée pour certains insectes, par exemple les *Coelomomyces* pathogènes de larves de moustiques ou de chironomides, les Entomophthorales pathogènes des Aphides, diptères et certains lépidoptères, par contre cette propriété semble beaucoup moins marquée parmi les différents genres de *Fungi Imperfecti*. On ne compte plus les espèces d'insectes les plus divers à partir desquels des isoléments de *Beauveria bassiana* ou de *Metarrhizium anisopliae* ont été effectués.

Il serait cependant fort imprudent de classer sommairement ces souches en souches très virulentes ou peu virulentes sur la seule base de quelques expériences d'infection sur insectes de référence. En effet, il a été démontré par exemple que seules les souches de *Metarrhizium anisopliae* forma *major* isolées d'*Oryctes* sp. sont pathogènes pour les diverses espèces de ce genre (FERRON et DIOMANDE, 1969). Les résultats obtenus récemment par FARGUES et RODRIGUEZ (1974) sur la pathogénicité des *Fungi imperfecti* pour les Noctuelles (*Mamestra brassicae*, *Cirphis unipuncta*, *Scotia segetum*, *Spodoptera litura*) sont encore plus démonstratifs = par exemple *Beauveria bassiana* n° 32 (mycothèque la Minière) très virulent pour les larves de *Leptinotarsa decemlineata* n'est pathogène pour aucune des Noctuelles étudiées, *Metarrhizium anisopliae* n° 51 virulent pour les larves d'*Oryctes* est sans action sur les vers gris, certaines souches de *Paecilomyces fumoro roseus* sont pathogènes pour *Mamestra* et *Spodoptera* mais sans action sur *Cirphis*, *Scotia*, *Nomurea rileyi* n° 3 est pathogène pour *Spodoptera* mais ne l'est pas pour *Mamestra*...

En utilisant les méthodes électrophorétiques et immunoélectrophorétiques utilisées dans l'étude des champignons pathogènes de l'homme, FARGUES, DURIEZ, ANDRIEU et POPEYE (1974) ont entamé un travail original de caractérisation des souches par l'étude des structures antigéniques et la révélation de leurs activités enzymatiques.

#### § 4. Sélection de souches entomopathogènes plus virulentes.

Cette orientation de recherches qui s'est révélée fructueuse dans d'autres domaines de la microbiologie n'a encore été que peu abordée, si ce n'est dans le laboratoire de biophysique de l'Institut de Protection des Plantes de Leningrad, et plus récemment à l'Institut Pasteur de Paris (S. PARIS).

EVLAKHOVA (1966), EVLAKHOVA et MARTENS (1968) ont utilisé des agents mutagènes chimiques ou physiques et étudié la survie de *Beauveria bassiana* en fonction de la dose et de la puissance du rayonnement ou x. Parmi les mutants morphologiques ainsi obtenus, un faible nombre possédait une virulence accrue pour les insectes par rapport aux souches d'origine. Une corrélation entre la virulence et la production d'amylase fut établie et proposée comme critère de sélection des mutants. Le problème de la stabilité à long terme de ceux-ci reste néanmoins posé.

La possibilité d'obtenir expérimentalement des hétérocaryons offre actuellement de nouvelles perspectives. On sait en effet que chez les champignons imparfaits, à cycle de reproduction sexuée inconnu, peuvent se manifester des phénomènes de parasexualité. Il est en effet prouvé qu'un hétérocaryon peut se former entre des hyphes génétiquement hétérogènes, les noyaux d'un génotype passant dans les cellules à noyaux appartenant à un autre génotype. Selon PONTECORVO (1956) la formation d'un hétérocaryon est la phase initiale d'un cycle parasexuel. D'une façon spontanée ou induite des noyaux génétiquement hétérogènes fusionnent dans des cellules hétérocaryotiques et forment ainsi un diploïde hétérozygote qui, lui-même, peut donner naissance à des formes possédant de nouveaux caractères à la suite de recombinaisons mitotiques elles-mêmes spontanées ou induites. Ce phénomène permet donc d'obtenir des hybrides chez les *Fungi Imperfecti* (YURCHENKO, ZAKHAROV et LEVITIN 1974).

TINLINE (1971) fut le premier à décrire ces phénomènes d'hétérocaryose chez *Metarrhizium anisopliae*, puis récemment YURCHENKO et al. (1974) observèrent les mêmes phénomènes chez *Beauveria bassiana*. Grâce aux travaux de LEVITIN, KIRSANOVA et YURCHENKO (1971) on sait comment obtenir, par l'emploi des rayons UV ou de la nitrosoguanidine, les mutants monoauxotrophes et diauxotrophes nécessaires à l'obtention expérimentale de ces hétérocaryons.

Cette orientation de recherche est donc à suivre avec une particulière attention au cours des prochaines années, car elle est susceptible de donner un nouvel élan à ce secteur de la lutte microbiologique.

## II. RECHERCHES APPLIQUEES

### § 1. Procédés de multiplication massive des champignons entomopathogènes.

La mise au point pratique de procédés de lutte microbiologique contre les insectes implique la production de la matière active, c'est-à-dire la multiplication du champignon. En raison de la facilité relative avec laquelle la plupart des espèces peuvent être multipliées sur des milieux nutritifs simples (sauf en ce qui concerne les Entomophthorales et les *Coelomomyces*) dans les conditions du laboratoire, on pourrait penser que la mise au point de procédés industriels de production ne pose pas de difficultés. En fait le problème n'est pas aussi

simple et requiert le concours de technologues pour déterminer les conditions économiques d'une production industrielle. Jusqu'à présent l'industrie privée ne s'est pratiquement pas intéressée à cette question, sauf la firme Nutrilite (USA) qui s'est limitée à produire des préparations échantillon de *Beauveria bassiana* et de *Metarrhizium anisopliae* ; par contre, en Union Soviétique, l'Institut d'Etat de Recherches des Moyens de Lutte microbiologique de la Protection des Plantes (VNIIBACPREPARAT, Moscou) poursuit depuis quelques années des études technologiques sur la production industrielle d'une préparation entomopathogène à base de *Beauveria bassiana* (Beauverine). Pour le reste, ce sont les entomologistes concernés par ces problèmes, qui ont cherché des solutions pratiques, parfois ingénieuses, pour résoudre ces problèmes à leur niveau (MULLET-KOGLER, 1967 ; FERRON, 1971).

#### A. Multiplication massive des *Beauveria*.

Depuis une vingtaine d'années différents procédés de multiplication ont été proposés. Ils se rattachent aux 3 types suivants :

- culture de surface pour obtenir des conidiospores,
- culture profondeur pour obtenir des blastospores,
- culture en profondeur pour obtenir des conidiospores.

Pour des raisons technologiques, mais également dans le but d'obtenir une préparation entomopathogène de conservation satisfaisante, il paraît préférable de s'orienter vers la multiplication de conidiospores en culture profonde. Ce procédé permet en effet l'utilisation des installations industrielles de fermentation déjà en place et donne les meilleures garanties de rendement et de conservation. Cependant la physiologie de la reproduction des champignons parfaits sous la forme conidienne en milieu liquide est encore mal connue, ce qui explique le développement tout récent de cette technologie.

C'est pourquoi les premières tentatives de multiplication massive des *Beauveria* ont été réalisées sur la base des techniques microbiologiques de laboratoire (cultures sur milieu gélosé en récipients stériles). Ce procédé n'est évidemment pas industrialisable en raison de son prix de revient et de son rendement assez faible (dans une fiole de Roux d'un litre on obtient de 25 à 50 milliards de conidies après une quinzaine de jours de culture). Dans une seconde étape on a alors tenté de multiplier le champignon, toujours sur des substrats nutritifs solides, mais dans des conditions non stériles, soit par addition de substances antibiotiques (EV-LAKHOVA, 1966), soit grâce à un ensemencement massif de blastospores obtenues en fermenteur (ZAKHARCHENKO, PRIMAK, GORAL, 1963 ; TELENGA et GORAL, 1966) ; ZAKHARCHENKO, 1967 ; MULLER-KOGLER et SAMSINAKOVA, 1970).

Parallèlement, dès 1960 (SAMSINAKOVA, 1962) commencèrent les premières études sur la culture de *Beauveria* en fermenteur. Dans une première étape les efforts se concentrèrent sur la production de blastospores (KAWAKAMI 1962 ; GORDON et SCHWARTZ, 1962 ; MOLITORIS, 1963 ; TELENGA et GORAL, 1966) et aboutirent à des réalisations à l'échelle pilote (SAMSINAKOVA, 1963, 1966 ; CATROUX, CALVEZ, FERRON et BLANCHERE, CALVEZ, FERRON, CORRIEU et PERINGER, 1973). Cette orientation fut abandonnée par la suite en raison des difficultés d'assurer la conservation de la viabilité des blastospores au cours du stockage (tableau 1).

Des progrès importants furent obtenus en Union Soviétique à partir des années 1970, lorsque les conditions d'obtention de conidies en fermenteur furent découvertes. Actuellement deux procédés sont préconisés d'une part par GORAL (1971) et d'autre part par KONDRATIEV, ALIOSHINA, ILITCHEVA, PERIKHANOVA, SINITSINA, OUPENSKALA et CHAGOV (1971).

Les deux procédés présentent des analogies, la différence fondamentale tenant à l'absence totale d'azote organique et l'addition de chlorure de calcium dans la composition du milieu de culture proposé par KONDRATIEV (1971). (cf. tableau n° 2). Avec le milieu de GORAL on obtient un mélange de blastospores et de conidiospores mais, d'après l'auteur, cet inconvénient est compensé par le fait que les conidiospores ont une viabilité supérieure à celle des conidies multipliées suivant la technique de KONDRATIEV (tableau 2).

Dans ces conditions le rendement après 3 à 4 jours de culture est de l'ordre de  $2.10^9$  conidies par millilitre (GORAL, 1971) à  $5.10^8 - 1.10^9$  conidies par millilitre (KONDRATIEV, 1971). Le rendement est variable suivant les conditions de culture et les souches utilisées ; c'est pourquoi les critères de sélection de celles-ci retiennent particulièrement l'attention (ALIOSHINA, ILITCHEVA, KONONOVA et KOLJADA, 1972).

Au terme de la fermentation, les conidies sont séparées du milieu de culture soit par filtration sous vide, soit à l'aide d'un filtre presse. La biomasse de conidies est alors lyophilisée en attendant le conditionnement pour les expérimentations. Habituellement le titre de la préparation est ajusté à  $6.10^9$  conidies par gramme dans une charge de kaolin.

Il semble que ces techniques de fermentation et de conditionnement doivent encore subir des améliorations pour obtenir une viabilité prolongée des conidiospores.

Tableau n° 1 : Composition des milieux de culture proposés pour l'obtention de blastospores de *Beauveria*.

pour <i>Beauveria bassiana</i> (SAMSINAKOVA, 1964, 1966)		pour <i>Beauveria tenella</i> (CATROUX et al., 1970)	
eau	1000 ml	eau	1000 ml
glucose	25 g	saccharose	30 g
amidon de pomme de terre	25 g	extrait soluble de maïs	20 g
extrait soluble de maïs	20 g	PO 4 H 2 K	2,26 g
NaCl	5 g	PO 4 NO 2 H, 12H 2 O	3,80 g
CaCO 2	2 g	MgSO 4, 7H 2 O	0,123 g
huile végétal	1 à 2 ml	FeSO 4, 7H 2 O	0,023 g
		Zn SO 4	0,020 g
		K 2 SO 4	0,174 g
		CaCl 2, 2H 2 O	0,147 g

Tableau n° 2 : Composition des milieux de culture proposés pour l'obtention de conidies de *Beauveria bassiana*.

GORAL (1971)		KONDRATIEV (1971)	
eau	1000 ml	eau	1000 ml
NaNO 3	2 à 5 g	NaNO 3	3 à 6 g
KH 2 PO 4	2 à 5 g	KH 2 PO 4	0,5 à 1,5 g
MgSO 4, 7H 2 O	0,5 à 2 g	MgSO 4, 7H 2 O	0,2 à 0,5 g
Saccharose	20 g	Saccharos	10 à 20 g
azote aminé *	0,3 g	CaCl 2, 6H 2 O	7,5 à 50 g

\* pratiquement la source d'azote aminé est soit du moût de bière soit de l'extrait soluble de maïs.

N.B. Régime technologique = 28-29°

avec réduction de l'aération lors de la formation des conidies.

N.B. Régime technologique = 25 à 28°, aération de 0,5 à 2 litres d'O 2 par litre de milieu et par heure.

### B. *Multiplication massive de Metarrhizium anisopliae.*

KALASHNIKOV (1939) a décrit la multiplication de l'agent de la muscardine verte sur milieu solide (fragments de tubercules de pomme de terre) et ADAMEK (1964) a proposé une technique de culture en milieu liquide. Dans ce cas l'addition d'un mouillant (Tween 80 à 0,2 %) au milieu de culture (extrait soluble de maïs 30 gr, glucose 40 gr, extrait de levure 40 gr, pour 1 litre de milieu) paraît indispensable.

GORAL et LAPPA (1973) utilisent un procédé mixte de multiplication : dans un premier temps le champignon est multiplié en fermenteur dans un milieu liquide (2 % d'extrait soluble de maïs + 6 % de mélange) à 26-28° pendant 40 à 50 heures, ensemencement initial à raison de 9 à 12.10<sup>9</sup> conidies par litre). La fermentation est arrêtée lorsque le milieu contient 15 à 20 gr par litre de poids sec. Cette biomasse est alors coulée, sur une épaisseur de 0,7 à 1 cm, dans de grandes cuvettes plates placées dans une étuve dont la température initiale de 20° est portée progressivement à 28°. Six jours plus tard la masse mycélienne et les spores sont recueillies et séchées à une température maximale de 35°. A partir de 100 litres de milieu liquide coulés dans les récipients d'une surface totale de 10 m<sup>2</sup> on obtient jusqu'à 2 kg de préparation titrant 50 à 75.10<sup>9</sup> conidies par gramme, soit au total 100.000 à 150.000.10<sup>9</sup> conidies.

### C. *Multiplication massive d'Hirsutella thompsonii.*

Pour lutter contre les pullulations de l'acarien *Phyllocoptura oleivora* en plantations de citrus, McCOY, HILL et KANAVAL (1972) se proposent d'utiliser le champignon *Hirsutella thompsonii* sous la forme de fragments mycéliens (McCOY, SELHINE, KANAVAL et HILL, 1971). A partir des travaux de base de MacLEOD (1954, 1959 a et b, 1960) sur les exigences nutritionnelles de l'espèce voisine *Hirsutella gigantea*, il semble que le glucose (5 gr/litre) et le saccharose (10 gr/litre) soient les meilleures sources de carbone, l'extrait de levure (5gr/litre) et la peptone (0,5 gr/litre) apportant l'azote nécessaire. Dans ces conditions les auteurs n'ont jamais observé la sporulation du champignon ce qui limite les possibilités de son utilisation en défense des cultures.

### D. *Multiplication des Entomophthorales.*

Plus encore qu'avec les espèces précédemment citées, les expérimentations de terrain avec les Entomophthorales se heurtent aux difficultés de multiplication du champignon. On sait que ces Phycomycètes ont des exigences nutritionnelles particulières et d'autres part que leurs conidies ont une durée de vie si brève qu'il paraît illusoire d'envisager de les multiplier sous cette forme. C'est pourquoi les efforts se tournent vers la multiplication des spores de résistance, bien que le déterminisme de leur germination soit encore mal connu (MAJCHROWICZ et SOPER, 1973).

### E. *Multiplication des Coelomomyces.*

La culture des champignons de ce genre sur milieu artificiel n'ayant pu être encore obtenue, il est donc nécessaire soit de récolter des insectes malades (larves de moustiques) dans la nature, soit de multiplier l'inoculum au laboratoire à partir d'un élevage de masse de l'hôte. Ces techniques s'apparentent donc à celles habituellement utilisées pour *Bacillus popilliae* et les virus entomopathogènes.

COUCH (1972) a récemment précisé dans quelles conditions il est possible de réussir l'infection des larves de moustique d'une façon reproductible (*Coelomomyces punctatus* sur larves d'*Anopheles quadrimaculatus*).

## § 2. Standardisation et titrage des préparations entomopathogènes.

Bien qu'il n'existe pas encore de formulations commerciales, des recherches sont développées pour apprécier les qualités des préparations expérimentales. Les techniques en cours d'élaboration diffèrent de celles internationalement admises pour *Bacillus thuringiensis* dans la mesure où on doit tenir compte du nombre de spores viables par gramme (MULLER-KOGLER, 1967).

Le titre d'une préparation peut être déterminé par comptage, sous le microscope, à l'aide d'une cellule hématimétrique (type cellule de Malassez Thoma ou Golaev par exemple). Ces mesures doivent cependant être effectuées avec précaution : il est indispensable que les spores soient bien dispersées (ce qui peut exiger l'emploi d'un mouillant ou l'utilisation d'un homogénéiseur approprié) et bien visibles, ce qui n'est pas toujours le cas en présence d'une charge inerte (kaolin). MULLER-KOGLER (1967) conseille alors de diluer la suspension de spores dans un volume égal de lactophénol additionné de bleu coton à 0,1 %. On sait en outre que l'utilisation de la technique des cellules hématimétriques, à la longue fastidieuse, suppose une erreur systématique élevée, de l'ordre de 10 %. C'est pourquoi nous proposons l'emploi d'un compteur automatique de particules (type Coulter Counter) équipé d'un tube à orifice adapté à la taille des conidies dénombrées (tube à orifice de 70 ou 100  $\mu$ ). L'acquisition d'un tel appareil se justifie dans un laboratoire de contrôle en raison des avantages qu'il procure : rapidité et fiabilité de la réponse. Il permet en outre de déterminer le pouvoir germinatif des conidies après culture d'un inoculum en milieu liquide (pendant 20 heures seulement, alors que la technique classique des dilutions sur boîtes de Petri (CLERK et MADELIN, 1965), ou mieux celle de la culture surlame proposée par MULLER-KOGLER (1960) nécessitent des délais d'incubation beaucoup plus longs (FERRON et DEOTTE, en préparation).

L'estimation du pouvoir pathogène d'une préparation n'est pas encore standardisée, faute d'une technique de titrage biologique éprouvée et surtout compte tenu de l'inexistence d'une préparation étalon de référence. Les problèmes de spécificité évoqués précédemment ne sont pas étrangers non plus à la difficulté du problème. Actuellement, l'appréciation de l'efficacité de la Beauverine est éprouvée, dans les laboratoires soviétiques, par contamination contrôlée des imagos de *Musca domestica* ; cependant il n'y a pas encore de norme retenue, et chaque Institut utilise une technique qui lui est propre. FERRON et ROBERT (1975) proposent l'emploi de la Bruche du haricot, *Acanthoscelides obtectus*, comme insecte test, mais les délais nécessaires pour obtenir la réponse (15 jours à 3 semaines) paraissent trop longs pour les besoins des technologues. Il est vraisemblable que dans les prochaines années ces techniques seront normalisées et pourront être utilisées couramment. Elles ne concernent cependant que les *Fungi Imperfecti* et devront certainement être adaptées aux particularités biologiques des autres champignons entomopathogènes.

## § 3. Innocuité des champignons entomopathogènes pour les vertébrés.

La manipulation de grandes quantités de spores dans les industries et laboratoires de contrôle, l'utilisation de formulations agricoles pour les expérimentations de terrain, l'homologation future de préparations commerciales impliquent que des précautions préalables soient prises, et en particulier que l'innocuité de ces agents entomopathogènes pour les vertébrés soit établie (IGNOFFO, 1973). Cette question est d'actualité pour tous les types de germes entomopathogènes ce qui a incité la Society for Invertebrate Pathology à créer un Groupe de travail consacré à ce problème qui est élargi aux autres espèces animales des biocoenoses considérées (LAIRD, 1973).

IGNOFFO (1973) a rassemblé les informations connues à ce jour et conclu que *Beauveria* n'est « relativement pas toxique ou pathogène pour vertébrés » (cf. tableau 3). Ces conclusions s'appuient principalement sur les travaux expérimentaux de MULLER-KOGLER (1967), de NESTERENKO et RUDICHENKO (1968), SCHAERFFENBERG (1968) ainsi que sur le dossier présenté par WESTALL et REHNBORG (Société Nutrilite Products) au Groupe de travail ad hoc de la SIP. L'appréciation d'IGNOFFO (1973), qui laisse subsister un doute, est vraisemblablement due aux réactions individuelles de types allergique qui peuvent se produire lors de la manipulation de grandes quantités de spores à l'état sec (matière active en poudre par exemple). Ces inconvénients peuvent être évités par le port de vêtements de protection et d'un masque.

Si la nature et le type des expériences de contrôle ne sont pas encore précisés ainsi que cela a été fait par les virus (Réunion FAO/WHO sur les virus d'insectes, 1973), on peut cependant retenir comme guide les protocoles utilisés par WESTALL et REHNBORG, NESTERENKO et RUDICHENKO (1968) pour *Beauveria*, IGNOFFO, BARKER et McCOY (1973) pour *Hirsutella thompsonii*, SOPER et RYAN (1974) pour *Entomophthora thaxteriana* ; et surtout les recommandations de contrôles de l'Agence américaine de Protection de l'environnement pour les agents microbiens en général (d'après WHO Technical Report Series n° 531).

a) *Dans tous les cas*, action d'une simple dose de l'agent microbien par voie orale sur 2 espèces de vertébrés, sur culture de tissu de vertébré et d'homme, par scarification dermique sur lapin, par inhalation sur rat, par examen de l'irritation de l'œil sur lapin et parallèlement action de doses répétées par alimentation durant 90 jours sur rats et une autre espèce de vertébré.

b) *Suivant les résultats précédents et en fonction de la formulation de la préparation* : applications répétées pendant 21 jours sur le derme de lapins, inhalation répétées pendant 14 jours à des rats, test de Landsteiner sur cobaye pour révéler des réactions allergiques de la peau, test sur cobaye pour mettre en évidence une allergie du système respiratoire. études de la reproduction et des risques tératogènes sur rats.

c) *En particulier pour les champignons*, études à long terme sur les risques cancérogènes.

d) Persistance et multiplication de l'agent microbien chez les mammifères, études sérologiques, mutations, contrôles chimiques et biologiques visant à s'assurer de la conformité de la préparation.

e) Essais sur les insectes utiles, la faune sauvage et les plantes : toxicité pour les abeilles, poissons, oiseaux et plantes.

LAIRD (1973) a récemment rassemblé les documents concernant l'impact des germes entomopathogènes sur l'environnement et suggère que les expérimentations de terrain soient complétées par des observations pathologiques sur la faune des biocoénoses associées.

§ 4. *Bases écologiques de l'utilisation des champignons entomopathogènes dans la pratique agricole.*

YENDOL et ROBERT (1970) rappellent que les préparations entomopathogènes peuvent être utilisées suivant les 3 concepts suivants :

— Colonisation visant à introduire d'une façon permanente l'agent pathogène dans la population hôte ;

— Insecticide microbien, supposant la répétition des interventions en fonction des besoins comme avec un insecticide chimique ;

— Lutte intégrée, la compatibilité de l'agent pathogène avec les autres facteurs naturels et artificiels de régulation des populations étant prise en considération de manière à définir une stratégie de lutte aussi harmonieuse qu'efficace.

A notre avis, ces 3 concepts se résument à 2 démarches complémentaires suivant lesquelles on envisage seulement l'effet immédiat d'une application ou au contraire les conséquences à long terme d'une infection.

En raison de la différence de nature entre une préparation chimique qui provoque une intoxication et une préparation microbiologique qui détermine un processus infectieux, on ne doit pas négliger les effets secondaires (épidémiologie, modification du potentiel biotique des survivants) dont l'importance est encore mal appréciée.

Etant donné que le champignon se multiplie sur ou dans le cadavre de l'insecte, on peut en effet considérer que chaque insecte tué par la mycose est un foyer potentiel d'infection susceptible de maintenir l'inoculum pathogène dans la biocoenose considérée d'une génération à la suivante, ou d'une année sur l'autre. Les milieux agricoles permanents, non perturbés par les rotations des cultures, paraissent évidemment particulièrement propices à ces études. Celles-ci sont liées à la connaissance de l'écologie du germe dans le milieu naturel, qui peut être d'autant plus déterminante que les possibilités de développement saprophyte de l'agent entomopathogène sont grandes.

CLERK (1969) a vérifié que des extraits aqueux de sols non stérilisés inhibent la germination des conidies ainsi que la croissance des tubes germinatifs de *Beauveria bassiana* et de *Paecilomyces farinosus*. Ce pouvoir inhibiteur peut être artificiellement réduit par l'addition de glucose. Ces observations s'apparentent au phénomène plus général de fongistatisme des sols (WARCUP, 1967 ; PARK, 1967). Les microorganismes du sol en sont vraisemblablement responsables puisque la filtration ou la stérilisation de ces extraits aqueux leur font perdre cette propriété. Dans les conditions naturelles la présence d'un insecte suffit à lever cette inhibition mais la nature de ce phénomène est inconnue (WARTENBERG et FREUND, 1961). Il n'est donc pas exclu d'imaginer que l'incorporation au sol de substrats nutritifs permettant le déplacement de certains équilibres microbiens puisse favoriser le développement des mycoses des insectes souterrains. Cette technique est à l'étude en phytopathologie pour favoriser au contraire la flore antagoniste des agents pathogènes pour les plantes.

Les études sur le développement de *Beauveria* ou d'autres champignons entomopathogènes en présence de la flore fongique associée présente dans les sols sont encore peu développées (BLONSKA-PAWLAK, 1962 ; LAINE et NUORTEVA, 1970). A notre connaissance les interactions susceptibles de se manifester au niveau de la phyllosphère n'ont pas encore été prises en considération.

L'influence des conditions climatiques sur le développement des mycoses d'insectes a par contre été évoquée maintes fois (MACLEOD, CAMERON et SOPER, 1966 ; MOORE, 1973 ; SCHAEFFENBERG, 1964 ; WALSTAD, ANDERSON et STAMBAUGH, 1970). Les températures optimales pour le développement des champignons entomopathogènes varient entre 20 et 30° C. On peut occasionnellement observer des différences sensibles de croissance en fonction de la température pour différentes souches d'une même espèce ; par exemple il a été signalé, et nous avons observé que quelques souches de *Metarrhizium anisopliae* se développent mieux à 20° C qu'à 28° C, température optimale pour la majorité des souches de ce genre. MACLEOD et al. (1966) rapportent même des cas d'épidémies à *Entomoph-*

*thora* à des températures voisines de 0°. Des études complémentaires sur cet aspect particulier pourraient donc apporter des informations précieuses sur les potentialités d'emploi des champignons entomopathogènes.

L'humidité relative de l'ambiance est également souvent évoquée comme un facteur déterminant le succès de l'infection. On admet en général que les spores de champignons pathogènes ne peuvent germer qu'en présence d'un film d'eau liquide ou d'une atmosphère saturée en eau. Cependant plusieurs auteurs (cf. MULLER-KOGLER, 1965) ont mis en évidence que l'infection des insectes est possible à des hygrométries basses (45 à 50 % HR), ce qui laisse supposer que le microclimat au niveau du tégument de l'insecte joue un rôle particulier. Le développement saprophyte du mycélium après la mort de l'hôte est cependant étroitement lié aux humidités élevées. Ce n'est qu'en atmosphère saturée que le champignon se développe à l'extérieur du cadavre et sporule, ce qui a évidemment des conséquences directes sur le potentiel épizootique d'une infection (BAJAN et KMITOVA, 1968). REMAUDIERE et MICHEL (1971), ROBERT, RABASSE et SCHELTES (1973) se sont particulièrement attachés à décrire les processus épizootiques des infections à *Entomophthora* dans des populations de pucerons en fonction de l'évolution des conditions climatiques.

On ne peut également négliger l'influence de la dessiccation des spores emportées par le vent ou projetées, dans le cas des Entomophthorales, et du rayonnement ultra-violet sur la viabilité des spores.

Enfin les processus épidémiologiques sont conditionnés également par la densité de la population d'insectes et celle du champignon entomopathogène. ROBERT et al. (1973) confirment des observations de BOMBOSCH (1963) sur l'indépendance entre le développement de l'épizootie à Entomophthorale et la densité des populations de pucerons. L'importance et la distribution de l'inoculum pathogène paraissent donc avoir un rôle prépondérant. SOPER (d'après MACLEOD et al., 1966) confirme cette hypothèse en comparant l'évolution dans le temps de la mycose à *Entomophthora aphidis* sur *Schizolachnus piniradiatae* en fonction de la densité initiale de l'inoculum pathogène, et ROBERT et al. (1973) estiment que le seuil épidémique de l'entomophthorose d'*Aphis fabae* en Bretagne est de 300 pucerons infectés au minimum par tige de féverole.

On a, jusqu'à présent, accordé peu d'intérêt au devenir des insectes survivants à une infection ; pourtant les auteurs soviétiques ont maintes fois rapporté (FERRON, 1970) que leur potentiel biotique est altéré (réduction de la longévité des imagos, diminution de la fécondité, altération du processus d'entrée en diapause). SIKURA et GRITSAENKO (1973) ont à nouveau attiré l'attention sur ce phénomène dans le cas de *Carpocapsa pomonella* infecté par *Beauveria bassiana* (PRIMAK, 1967). Ainsi la fertilité des imagos survivant à un traitement sur la 2ème génération annuelle est réduite de 2,5 à 6,5 fois par rapport au témoin. Ces auteurs préconisent l'emploi de la Beauverine pour obtenir une réduction progressive des populations de ce ravageur. Des observations semblables ont été faites sur *Leptinotarsa decemlineata* (JIGAEV, 1963 ; SIKURA et SIKURA, 1967 ; SIKURA, 1968). Pour DIEHTIAROVA (1967) ces phénomènes pourraient être dus aux modifications du métabolisme des réserves protéo-glucidiques de l'insecte sous l'action du champignon entomopathogène.

##### § 5. Expérimentations de plein champ avec des champignons entomopathogènes.

###### A. *Beauveria bassiana* contre *Leptinotarsa decemlineata*.

Ce programme d'applications se développe depuis plus d'une dizaine d'années en Union Soviétique (FERRON, 1970). Alors que jusqu'à ces dernières années les auteurs soviétiques préconisaient d'utiliser une association beauverine + dose réduite d'insecticide (2 kg de Beau-

verine/ha à  $6.10^9$  conidies au gramme + dose réduite de DDT ou de PKP), les recherches s'orientent actuellement vers l'emploi de la Beauverine seule à plus forte dose (1 à 1,5 kg de Beauverine/ha à  $30.10^9$  conidies au gramme, soit de 3 à 4 fois plus que précédemment) de manière à obtenir surtout une réduction des populations larvaires (la mortalité différée au stade imaginal n'est évidemment pas sans intérêt mais survient après l'époque des dégâts aux cultures). En général deux traitements successifs sont pratiqués (LAPPA et GORAL, Institut Ukrainien de Protection des Plantes, Kiev, communication orale).

#### B. *Beauveria bassiana* contre *Carpocapsa pomonella*.

En Ukraine, dans le district de Zaporozje, où le ravageur des pommes se développe pendant 2 générations annuelles, la Beauverine n'est employée qu'au cours de la deuxième génération car les traitements fongicides ne sont alors plus nécessaires.

Trois pulvérisations de Beauverine (1 kg/ha à  $6.10^9$  conidies/gramme) en association avec une dose réduite au cinquième ou au dixième de Chlorophos, Rogor ou Phosalone sont ainsi pratiquées depuis plusieurs années. Le pourcentage de fruits attaqués varie, suivant les années, de 6 à 18 % contre 18 à 50 % dans les lots témoins. Ce n'est qu'à partir de 1973 qu'une protection plus satisfaisante des vergers a été obtenue (1 % de fruits attaqués contre 1 % dans le témoin) en augmentant la dose de Beauverine (1 kg/ha à  $24.10^9$  conidies/gramme) JIGAEV, Institut Ukrainien de Protection des Plantes, communication personnelle).

Par contre, dans la région de Kiev, le Carpopapse n'a régulièrement qu'une génération annuelle. L'emploi de la Beauverine est donc lié au programme de traitements avec les fongicides. Les interventions phytosanitaires sont alors espacées les unes des autres de 10 à 12 jours (3 traitements par *Beauveria*). Quand on emploie la Beauverine pure, le pourcentage de fruits attaqués reste sensiblement le même (24 % contre 35 % dans le témoin) quelle que soit la concentration de l'inoculum pathogène (2kg de Beauverine/ha à  $6.10^9$ ,  $12.10^9$  ou  $30.10^9$  conidies/gramme). Avec addition de Chlorophos au cinquième de la dose normale, ce pourcentage est abaissé à 16 % (avec la Beauverine à  $6.10^9$  conidies/gramme), et à 11 % en portant l'inoculum de *Beauverine* à 3 kg/ha (DROSDA, Institut Ukrainien de Protection des Plantes, communication personnelle).

Comme dans le cas de la lutte contre le doryphore, l'évolution des recherches va vers une augmentation de l'inoculum entomopathogène.

A l'Institut de Recherches Scientifiques des moyens biologiques de Protection des Plantes de l'Union Soviétique (Kishinev, Moldavie), la mise au point d'un procédé biologique de lutte contre le Carpopapse est poursuivie en s'inspirant de la théorie de TELENGA qui préconise l'association des préparations biologiques et de doses réduites d'insecticides chimiques.

Dans un verger d'une cinquantaine d'hectares, constitué d'une part d'arbres âgés de 17 à 18 ans et d'autre part d'une jeune plantation de 6 à 7 ans, le programme de traitements comprend des insecticides chimiques aux doses normales (1), l'Entobactérine (*Bacillus thuringiensis*) à 3 kg/ha associée à un insecticide chimique au dixième de la dose normale (2), la Beauverine ( $2.10^9$  spores/g) à 2 kg/ha associée également à un insecticide chimique au dixième (3) (ces deux combinaisons étant uniquement employées contre la 2ème génération de Carpopapse, la lutte étant exclusivement chimique au cours de la 1ère génération), l'Entobactérine à 5 kg/ha contre les 2 générations (4), et un témoin (5). Chaque parcelle élémentaire a donc une superficie de 6 à 8 hectares et reçoit les mêmes traitements chaque année depuis 1971. Ces traitements se décomposent ainsi :

— Contre la 1ère génération de Carpopapse : 2 traitements ;

— Contre la 2ème génération de Carpocapse : ou bien 3 traitements avec les insecticides chimiques, ou bien 4 traitements avec les préparations biologiques associées aux doses réduites d'insecticides chimiques.

Au terme de la campagne 1971, le nombre de fruits attaqués dans le vieux verger était sensiblement le même (9 à 11 %) dans les variantes (1), (2) et (3), contre respectivement 24 % dans la variante (4) et 80 et 85 % dans le témoin (5). Dans le jeune verger, les mêmes contrôles donnaient 1 à 3,5 % de fruits attaqués pour les variantes (1), (2) et (3) contre 52 % dans le témoin. Dans ce dernier cas l'Entobactérine à 5 kg/ha contre les deux générations de Carpocapse n'était pas appliquée.

En 1972 les résultats furent mauvais (30 à 50 % de fruits attaqués en 1, 2 et 3, contre 95 % dans le témoin), vraisemblablement en raison des mauvaises conditions climatiques qui provoquèrent une sortie très échelonnée du ravageur et perturbèrent la mise en œuvre du programme de traitements. En 1973, au moment où je recueillis ces informations (SIMCHUK, communication personnelle) les résultats de la campagne n'étaient pas encore complètement analysés mais semblaient s'apparenter à ceux de l'année 1971.

Il faut évidemment tenir compte des conditions économiques d'exploitations des vergers en Union Soviétique lors de la discussion de ces résultats. Alors qu'en Europe occidentale, il faut actuellement obtenir une protection quasi totale des vergers contre le Carpocapse (99 % des fruits sains au minimum), par contre on admet, en Union Soviétique, un refus de l'ordre de 10 % car parallèlement à la commercialisation de fruits de table, la production d'alcool de fruit est une source de revenu non négligeable.

#### C. *Beauveria bassiana* contre les Noctuelles.

La lutte microbiologique contre les lépidoptères *Noctuidae* est actuellement inscrite au programme de différents instituts, à travers le monde, mais il s'agit d'une orientation encore récente si on exclut les travaux américains sur les maladies à virus de *Trichoplusia ni*.

D'après SIKURA (1974) quelques expériences en plein champ ont été réalisées en Asie Centrale par CHARAFOUTDINOF (1970) à l'aide de *B. bassiana* contre *Laphygma exigua* (réduction de 76 % de la population en plein champ). Contre *Agrotis segetum*, en Moldavie, SIKURA et TKATCH (1974) ont également employé la Beauverine : 46 % de mortalité avec la Beauverine seule, 80 % avec l'association Beauverine + Chlorophos à dose réduite, 16 % avec le chlorophos à dose réduite seule, 10 % dans le témoin.

Rappelons que FARGUES et RODRIGUEZ (1974) ont indiqué que les souches de *B. bassiana* semblent moins pathogènes pour les Noctuelles que d'autres *Fungi Imperfecti* tels que *Nomuraea rileyi* ou *Paecilomyces fumoso roseus*.

#### D. *Beauveria tenella* contre *Melalontha melolontha*.

Les vers blancs ou larves du Hanneton commun sont sensibles à des infections cryptogamiques, virales, bactériennes... mais parmi tous les germes éprouvés, le champignon *Beauveria tenella* paraît être le plus prometteur (HURPIN et ROBERT, 1972). D'après des études de laboratoire (FERRON, 1967) la quantité minimum de spores à épandre au champ est de 1.10<sup>14</sup> par hectare soit approximativement 10 fois plus que ce qui est utilisé pour des insectes aériens. Les résultats de traitements à la surface du sol, sans incorporation mécanique de l'inoculum, se sont révélés jusqu'à présent décevants : les contrôles de l'état sanitaire des larves récoltées par sondage et placées en quarantaine au laboratoire révèlent que la contamination des insectes a été effectivement réussie mais l'évolution de la maladie dans les conditions naturelles est trop lente pour réduire d'une façon significative les niveaux de population

(FERRON, 1973). Des expériences en cours, par l'inoculation du sol en profondeur à l'aide d'injecteurs tractés, semblent donner des résultats plus satisfaisants.

E. *Metarrhizium anisopliae* contre *Mahanarva posticata* Stal. (Homoptère Cercopidae) au Brésil.

Des résultats satisfaisants de lutte contre *M. posticata* en culture de canne à sucre dans la partie nord-est du Brésil sont signalés par GUAGLIUMI, MARQUES, MENDONÇA FILHO et MENEZES (1969), et GUAGLIUMI (1971). Les doses de spores ne sont pas précisées mais la mortalité obtenue retient l'attention (65 % des nymphes et 31 % des adultes), d'autant plus qu'une extension de l'infection hors des zones traitées est observée.

F. *Metarrhizium anisopliae* contre *Oryctes rhinoceros* à Tonga.

Alors que la lutte contre les pullulations d'*Oryctes Rhinoceros* dans les îles de l'Océan Pacifique sud s'oriente vers l'introduction du Rhabdionvirus, YOUNG (1974) rapporte une expérimentation réalisée en 1969 et 1970 à l'aide de *M. Anisopliae* dans l'île Tongatapu (Tonga).

Le champignon fut introduit dans les gîtes larvaires constitués par des troncs de cocotiers en décomposition. Alors que la mycose se développa bien dans les gîtes artificiellement contaminés, aucune extension de la maladie ne fut observée, à la différence de la virose à Rhabdionvirus qui colonisa progressivement l'île grâce à sa dispersion par les imagos. La potentialité épidémique du virus lui confère évidemment un avantage déterminant qui justifie le développement des recherches et des applications dans cette voie.

G. *Hirsutella Thompsonii* contre *Phyllocoptruta Oleivora* en Floride.

McCOY, SELHIME, KAVANEL et HILL (1971) préconisent des applications du champignon *H. thompsonii* contre l'acarien *Phyllocoptruta oleivora* dans les plantations d'orangers. Bien que la multiplication de masse de l'agent pathogène se fasse sous la forme d'éléments mycéliens, et non pas de conidiospores, les résultats obtenus paraissent très satisfaisants : 1 semaine après le traitement, la population d'acariens décline rapidement et se maintient ensuite à un faible niveau pendant plus de 3 mois. Les auteurs attribuent cette réussite à la conjugaison de facteurs favorables, parmi lesquels la haute virulence de l'agent pathogène, la richesse de l'inoculum utilisé et les conditions climatiques subtropicales de la Floride.

Si on doit souligner l'originalité de ces travaux, en raison du fait que jusqu'à présent aucun programme de lutte contre les acariens à l'aide de champignons entomopathogènes n'avait été préconisé, rappelons cependant les observations des collègues tchèques sur la sensibilité de ces arthropodes aux mycoses : alors que SAMSINAK (1964) et MARAN (1968) rapportent que ni *Tyrophagus putrescentiae*, ni *Acarus siro* ne sont sensibles aux muscardines à *Beauveria Bassiana* ou *B. Tenella*, SAMSINAKOVA et SAMSINAK (1970) soulignent que les acariens peuvent jouer le rôle de vecteurs, ce qui fut confirmé lors d'une étude plus détaillée (SAMSINAKOVA, KALAKOVA, DANIEL, DUSBABEK, HONZAKOVA et CERNY, 1974). De plus *Ixodes ricinus* est sensible aux mycoses à *B. bassiana*, *B. tenella* et *Paecilomyces fumoso* (GORSHKOVA, 1966, 1967) alors que des entomophthoroses se développent sur *Tetranychus altaeae*, *Veigaia nemorensis* et *Proctolaelaps pygmaeus* (WEISER, 1968 ; WEISER et DANIEL, 1969). Il serait donc souhaitable de tenir compte de ces informations et de contrôler l'état sanitaire des populations d'acariens lors des expérimentations réalisées dans la nature avec des préparations entomopathogènes.

H. *Aschersonia aleyrodis* contre les *Aleurodes* en Georgie.

En 1964, GAPRINDASHVILI, ISARLISHVILI et MOSULISHVILI ont signalé des résultats encourageants après l'emploi d'une préparation expérimentale du champignon *Aschersonia aleyrodis* contre l'aleurode du citronnier (mortalité larvaire de 81 à 96 %). S'il paraît nécessaire de pratiquer des pulvérisations sur chaque arbre, en raison d'une dispersion naturelle trop faible de l'agent pathogène, par contre l'infection se maintient d'une année sur l'autre dans les conditions climatiques de la République autonome d'Adjarie. Je n'ai malheureusement pu recueillir d'informations récentes sur le développement d'un objet de lutte qui concernait les plantations de citrus de cette région.

#### I. *Entomophthora* sp. contre les Aphides.

Les travaux de GUSTAFSSON (1965, 1966, 1969) sur les mycoses à Entomophthorales d'*Aphis fabae* et de *Myzus persicae* ne concernent malheureusement pas les expérimentations en plein champ. TSINOVSKII et EGINA (1972) rapportent les résultats de leurs expériences de lutte contre *Aphis pomi*, *Dysaphis mali*, *Lachnus persicae*, *Rhopalosiphon padi* et *Aphis frangulae* avec *Entomophthora thaxteriana* et *E. sphaerosperma*. En serre une préparation expérimentale des deux champignons, contenant à la fois conidies et mycélium, s'avère efficace contre *Aphis frangulae*, alors que dans la nature la mortalité de *Rhopalosiphon padi* atteint 92 % dès 48 heures après le traitement par *E. thaxteriana*. Le développement de telles expérimentations est évidemment conditionné par la mise au point de procédés de multiplication massive de ces champignons.

#### J. Champignons pathogènes de moustiques.

Il y a une dizaine d'années, seuls les *Coelomomyces* (Blastocladales) étaient reconnus comme pathogènes de moustiques et susceptibles d'apporter une solution biologique à la lutte contre ces vecteurs de maladies. Des informations récentes montrent que d'autres champignons entomopathogènes ont des potentialités non négligeables.

Les populations de moustiques subissent une mycose à *Coelomomyces* à l'état endémique (moins de 10 % des individus sont naturellement contaminés) mais occasionnellement de véritables épizooties se développent (UMPHLETT, 1969 ; CHAPMAN et GLENN, 1972). Quatre tentatives d'introduction de ces pathogènes se sont soldées par des succès (LAIRD, 1967) ; MUSPRATT, 1963 ; COUCH, 1972 ; GAD et SADEK, 1968), mais il reste à préciser les différentes phases du cycle de cet agent entomopathogène su surtout à mettre au point une technique de multiplication massive in vitro.

La potentialité des *Lagenidium* (Phycomycètes Lagenidiales) pour la lutte contre les moustiques n'a été révélée qu'au cours des dernières années (McCRAE, UMPHLETT et FAY, 1973 a ; McCRAE, WOMELDORF, HUSBANDS et ELIASON, 1973 b). Leur large spectre d'activité pour les différentes espèces de moustiques, leur développement rapide et leur efficacité, la possibilité de les multiplier facilement sur des milieux artificiels confèrent aux *Lagenidium* des potentialités non négligeables. A l'inverse leur inefficacité sur Anophèles, leur sensibilité au NaCl et polluants organiques et surtout la très faible viabilité des sporanges et zoospores constituent des inconvénients.

UMPHLETT et HUANG (1972) ont obtenu des résultats satisfaisants en Caroline du Nord contre *Culex restuans* (disparition des moustiques 6 jours après le traitement), alors qu'en Californie, McCRAE, WMELDORF, HUSBANDS et ELIASON (1973 b) relatent des résultats analogues sur deux espèces de moustiques résistants aux insecticides chimiques, *Aedes nigromaculis* et *Culex tarsalis*.

De nombreuses mycoses à *Entomophthora* ont été signalées sur imagos de moustiques

(BATKO, 1966 ; JENKIS, 1964 ; ANDERSON et RINGO, 1969), et des travaux ont été consacrés plus particulièrement à *E. conglomerata* (GOL'BERG, 1969 ; IL'CHENKO, 1968 ; KUPRIYANOVA, 1966), *E. destrens* (NOVAK, 1967, 1967 ; WEISER et BATKO, 1966), *E. aquatica* (ANDERSON et RINGO, 1969) ; cependant, comme souvent dans le cas des Entomophthorales, on ne mentionne pas d'expérimentations de terrain.

Parmi les *Fungi Imperfecti*, on relate seulement une épizootie naturelle à *Beauveria tenella* dans une population d'*Aedes sierrensis* en Californie (SANDERS, 1972 ; PINNOCK, GARCIA et CUBBIN, 1973). Auparavant CLARK, KELLEN, FUKUDA et LINDEGREN (1968) avaient réalisés des infections expérimentales sur *Anopheles albimanus*, *Culex pipiens*, *Culex tarsalis*, *Aedes aegyptis* et *Aedes sierrensis*. Seules les espèces dont les valves pérspiraculaires n'étaient pas infectées par le champignon (*Ae. aegypti* et *Ae. sierrensis*) échappaient à la mycose. Lors d'application dans la nature CLARK et al. (1968) ont obtenu une réduction des populations larvaires de *Culex pipiens* variant de 69 à 95 % deux semaines après le traitement. Avec *B. tenella* (à raison de 5.10<sup>3</sup> ou 5.10<sup>5</sup> Blastospores par millilitre d'eau), PINNOCK et al. (1973) observent une diminution des populations imaginale d'*Aedes sierrensis* de 53 à 71 %.

ROBERTS (1967, 1970) a également démontré que certaines souches de *Metarrhizium anisopliae* sont pathogènes pour les larves de moustique. Des réductions de populations de *Culex pipiens pipiens* et d'*Aedes sollicitans* atteignant 85 à 98 % ont été obtenues dans des mares artificielles (ROBERTS, 1974).

### III. CONCLUSION

Cette analyse bibliographique des travaux consacrés aux champignons entomopathogènes au cours des dix dernières années traduit l'évolution spectaculaire de l'intérêt croissant que lui portent les chercheurs de toutes disciplines. Alors qu'autrefois seuls les entomologistes s'efforçaient de démontrer les potentialités de ces germes pour la lutte biologique contre les insectes vecteurs de maladies humaines ou ravageurs des cultures et des forêts, actuellement les systématiciens, pathologistes, biochimistes, technologues contribuent à cet efforts par l'emploi de leurs propres connaissances et techniques.

Parmi les thèmes étudiés, ceux qui prennent une place répondérante sont ceux qui concernent la caractérisation biochimique des souches, leur spécificité pour les insectes et leur innocuité pour les vertébrés, les phénomènes de défense de l'insecte (enkystement), les processus d'enchaînements de maladies et de synergie, l'établissement des relations dose-mortalité préalables à la mise au point de titrages biologiques, la multiplication massive de ces microorganismes en culture profonde... La sélection, sur des bases génétiques, des souches les plus virulentes et les plus propres à une multiplication industrielle n'en est qu'à ses tous débuts mais ouvre des perspectives prometteuses.

L'écologie et la biologie des germes employés restent malheureusement un secteur délaissé, ce qui a pour conséquence directe de retarder l'évolution des concepts d'utilisation des préparations en plein champ. Un certain nombre d'informations convergentes sur les possibilités d'infecter les insectes par les champignons lorsque l'humidité relative de l'atmosphère ambiante n'est pas saturée lèvent cependant l'hypothèse que de nombreux auteurs opposaient à l'éventuelle utilisation de ces agents pathogènes comme moyen de lutte. KALVISH (1974) a d'ailleurs rapporté tout récemment que les souches d'une même espèce (*Beauveria tenella*, *B. Bassiana*, *Metarrhizium anisopliae* et *Paecilomyces farinosus*) germent et sporulent de façons sensiblement différentes suivant leur origine géographique. Ainsi les souches provenant des régions septentrionales de l'Union Soviétique germent et sporulent à des températures plus basses que celles venant des zones méridionales ; celles issues de régions climatiques hu-

mides sont plus sensible à une réduction de l'humidité atmosphérique relative que celles provenant de pays secs... Il est donc possible de tenir compte de ces caractéristiques lors du choix ou de la sélection de souches en fonction des conditions climatiques du biotope d'étude considéré.

Il reste enfin aux agronomes de concevoir l'utilisation pratique de ces agents biologiques suivant des principes qui ne doivent pas nécessairement s'inspirer de ceux de la lutte chimique. Si l'efficacité d'une intervention phytosanitaire doit évidemment rester leur préoccupation première, le mode d'action particulier des agents entomopathogènes doit les conduire à aborder les problèmes d'une façon plus large, en tenant compte par exemple des répercussions à long terme apportées dans la biocoenose considérée par l'introduction ou la multiplication artificielle d'un inoculum pathogène, non pas inerte, mais au contraire bien vivant et de ce fait confronté aux phénomènes de compétition et incorporé aux chaînes tropiques des écosystèmes. Il a été maintes fois signalé qu'une mortalité différée importante se manifeste au stade imaginal alors que souvent seuls les stades larvaires ravagent les cultures. Pour tenir compte de cette propriété il faut donc envisager la lutte non plus au niveau de la parcelle individuelle mais en fonction de la distribution des populations du ravageur et définir une stratégie collective conduisant à leur régression progressive et permanente non pas immédiate et éphémère comme avec les pesticides chimiques.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ACATRINEI G, et PETCU T.P., 1966. Développement du champignon *Beauveria bassiana* Vuill. dans le corps des larves de doryphore (*Leptinotarsa decemlineata* Say) et son action histopathologique. *An. St. Univ. «Al. I. Cuza », Iassi, NS, Sect II a. Biologie*, 12, 123-131.

ADAMEK L., 1965. Submerge cultivation of the fungus *Metarrhizium anisopliae* (Metsch.). *Folia microbiol. (Praha)*, 10, 255-257.

AFRIKYAN E.K., 1973. Les bactéries entomopathogènes et leur importance. *Izdatel'stvo an Armianskoe CCP, Ecrivan*, 418 pp.

ALIOSHINA O.A., ILYICHEVA S.N., KONONOVA E.V. et KOLIADA N.A., 1972. Main criteria applied to breeding *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. strains to be used in industry. *Micologia i Fitopatologia*, 6, 341-344.

ANDERSON J.F. et RINGO S.L., 1969. *Entomophthora aquatica* sp. n. infecting larvae and pupae of floodwater mosquitoes. *J. Invert. Pathol.*, 13, 386-393.

ANONYMOUS, 1973. The use of viruses for the Control of Insect Pests and disease vectors. *Wld Hlth Org. techn. Rep. ser.*, 531, 48 pp.

AOKI K., 1957. Insect pathology. *Gibodo, Tokyo*, 493 pp.

AOKI J., 1961. Studies on the infection of *Aspergillus* disease in silkworm larvae, *Bombyx mori*. II. The invading loci of causal fungus. *J. Seric. Sci. Japan*, 30, 43-48.

OAKI J. et YANASE K., 1970. Studies on the nutrition and metabolism of pathogenic fungi of muscardine. II. The influences of amino-acid for the formation and multiplication of hyphal bodies of *Spicaria fumoso rosea* (Wize) and of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. *J. Sericult. Sci. Japan*, 39, 285-292.

ARX J.A. von, 1963. Die Gattungen der Myriangiales. *Persoonia, Leiden*, 2, 421-475.

ARX J.A. von, 1970. The genera of fungi sporulating in pure culture. *J. Gramer, Lebre*, 288 pp.

BASSI A., 1835. Del mal del segno, calcinaccio o moscardino, mallatia che afflige i bachi da seta, e sul modo di leberarne le bigattiage anche le piu infestante. *Lodi, tipografia Orcesi. Réédition par The American Phytopathological Society 1958 Phytopathological Classics*, 10, 49 p.

BAIL Th., 1867. Uber Epidemien der Insekten durch Pilze. *Ent. Ztg. ent. Verein Stettin*, 28, 445-462.

BAJAN C. et KMITOWA K., 1968. Possibilités d'utilisation du champignon insecticide dans la lutte biologique contre les insectes. *Postepy nauk Rol.*, 3, 21-25.

BALAZY S., 1973. A review of entomopathogenic species of the genus *Cephalosporium* Corda (*Mycota, Hyphomycetales*). *Bull. Amis. Sc. Lettres, Poznan*, 14, 101-137.

BASYOUNI SOHAIR H. El., BREWER D. et VINING L.C., 1968. Pigments of the genus *Beauveria*. *Can. J. Bot.* 46, 441-448.

BATKO A., 1964. On the new genera : *Zoopthora* gen. nov., *Triplosporium* (Thaxter)

gen. nov. and *Entomophaga* gen. nov. (Phycomycetes : *Entomophthoraceae*). *Bull. Acad. Polon. Sci. Cl. II, Sér. Sci. biol.*, 12, 323-326.

BATKO A., 1964. Some new combinations in the fungus family *Entomophthoraceae* (Phycomycètes). *Bull. Acad. Polon. Sci., Cl. II. Sér. Sci. biol.*, 12, 403-406.

BATKO A. et WEISER J., 1965. On the taxonomic position of the fungus discovered by Strong, Wells and Apple : *Strongwellsea castrans* gen. et sp. nov. (Phycomycètes ; *Entomophthoraceae*). *J. Invert. Pathol.*, 7, 455-463.

BEARD R.L. et WALTON G.S., 1969. Kojic acid as an insecticidal mycotoxin. *J. Invert. Pathol.*, 14, 53-59.

BENTLEY H.R., CUNNINGHAM K.G. et SPRING F.S., 1951. Cordycepin, a metabolic product from cultures of *Cordyceps militaris* (Linn.) Link. Part II. The structure of Cordycepin. *J. Chem. Soc., Ser. C*, 2301-2305.

BERGER E.W., 1907. Whitefly conditions in 1906. The use of the fungi. *Florida Univ., Agr. Expt. Sta. (Gainesville)*, Bull., 88, 85 pp.

BLACHERE H., CALVEZ J., FERRON P., CORRIEU G. et PERINGER P., 1973. Etude de la formatoin et de la conservation d'une préparation entomopathogène à base de blastospores de *Beauveria tenella* (Delacr.) Siemask. *Ann. Zool. - Ecol. anim.*, 5, 69-79.

BLONSKA-PAWLAK A., 1962. Der Einfluss der Filtrate einiger Bodenpilze auf die Entwicklung von *Beauveria bessiana* (Bals.) Vuill. *Zesz. probl. Post Nauk rol., Warszawa*, 35, 241-147.

BOMBOSCH S., 1963. Untersuchungen zur Vermehrung von *Aphis fabae* Scop. in Samenrubenbeständen unter besonderer Berücksichtigung der Schwebfliegen (*Diptera, Syrphidae*). *Z. Angew. Ent.*, 52, 105-141.

BOROWKA A., GOLONKOWA J. et KOTULOWA W., 1970. *Metarrhizium velutinum* n.sp. *Acta mycol. Warszawa*, 6, 329-336.

BRIGGS L.H., FERGUS B.J. et SHANNON J.S., 1966. Chemistry of fungi. IV. Cyclopeptides from a new species of *Isaria, Tetrahedron*, 8, 269-278.

BROWN A.H.S. et SMITH G., 1957. The genus *Paecilomyces* Bainier and its perfect stage *Byssoclamys* Westling. *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, 40, 17-89.

BURGES H.D. et HUSSEY N.W., 1971. Microbial control of insects and mites. *Academic Press, London et NewYork*, 861 pp.

CANTWELL G.E., 1975. Insect Diseases. *Marcel Dekker Inc., New York*, 2 vol.

CATROUX G., CALVEZ J., FERRON P. et BLACHERE H., 1970. Mise au point d'une préparation entomopathogène à base de Blastospores de *Beauveria tenella* (Delacr.) Siemasko pour la lutte microbiologique contre le ver blanc. *Ann. Zool. Ecol. anim.*, 2, 281-294.

CHAPMAN H.C. et GLENN J. F.E., 1972. Incidence of the fungus *Coelomomyces punctatus* and *C. dodgei* in larval populations of the mosquito *Anopheles crucians* in two louisiana ponds. *J. Invert. Pathol.*, 19, 256-261.

CHARAFOUTDINOF, 1970. D'après SIKOURA A.I., 1974.

CLARK T.B., KELLEN W.R., FUKUDA T. et LINDEGREN J.E., 1968. Field and laboratory studies on the pathogenicity of the fungus *Beauveria bassiana* to three genera of mosquitoes. *J. Invert. Pathol.*, 11, 1-7.

CLERK G.C., 1969. Influence of soil extracts on the germination of conidia of the fungi *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces farinosus*. *J. Invert. Pathol.*, 13, 120-124.

CLERK G.C. and MADELIN M.F., 1965. The longevity of conidia of three insectparasitizing Hyphomycetes. *Trans. Brit. mycol. Soc.*, 48, 193-209.

CORDON T.C. and SCHWARTZ J.H., 1962. The fungus *Beauveria tenella*. *Science*, 138, 1265-1266.

COUCH J.N., 1945. Revision of the genus *Coelomomyces*, parasitic in insect larvae. *J. Elisha Mitchell Sci. Soc.*, 61, 124-136.

COUCH J.N., 1962. Validation of the family *Coelomomycetaceae* and certain species and varieties of *Coelomomyces*. *J. Elisha Mitchell Sci. Soc.*, 78, 135-138.

COUCH J.N., 1972. Mass production of *Coelomomyces*, a fungus that kills mosquitoes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 69, 2043-2047.

CUNNINGHAM K.G., HUTCHINSON S.A., MANSON W. and SPRING F.S., 1951. Cordycepin, a metabolic product from cultures of *Cordyceps militaris* (Linn.) Link. Part I. Isolation and Characterisation. *J. Chem. Soc., SerC*. 2299-2300.

DAVID W.A.L., 1967. The physiology of the insect integument in relation to the invasion of pathogens. in « *Insects and Physiology* », J.W.L. Beament et J.E. Treberne, Oliver et Boyd ed., Edinburgh et London, 17-35.

DeBACH P., 1964. Biological control of insect pests and weeds. *Chapman and Hall Ltd., London*, 844 pp.

DE HOOG G.S., 1972. The genera *Beauveria*, *Isaria*, *Tritirachium* and *Acrodontium* gen. nov. *Stud. Mycology, CBS Baarn*, 1, 41 pp.

DELMAS J.C., 1973. Influence du lieu de contamination tégumentaire sur le développement de la mycose à *Beauveria tenella* (Delacr.) Siemaszko (*Fungi Imperfecti*) chez les larves du Coléoptère *Melolontha melolontha* L. *C.R. Acad. Sci., Paris, Ser. D.*, 277, 433-435.

DIEHTIAROVA E.N., 1967. Modification protéo-glucidiques des larves du doryphore sous l'action du champignon *Beauveria bassiana*. *Zachtychita rastieni*, 4, Kiev, 110-113.

DIOMANDE T., 1969. Contribution à l'étude du développement de la mascardine verte à *Metarrhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin (*Fungi Imperfecti*) des larves d'*Oryctes monoceros* (Coleoptère Scarabaeidae). *Bulletin de l'I.F.A.N.*, 21, Ser. A, 1381-1405.

DORSCHNER E. et LARDY H., 1968. Specificity of ion transport induced by beauvericin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 8, 11-14.

EVLAKHOVA A.A., 1966. Culture intensive de champignons entomopathogènes. *Zashita Rastenii*, 11, 43.

EVLAKHOVA, A.A., 1966. Augmentation expérimentale de la virulence des champignons entomopathogènes par l'action des facteurs physiques et chimiques. Travaux de la Société des Naturalistes de recherches de Moscou, 22, 257-261.

EVLAKOVA A.A., 1974. Les champignons entomopathogènes : systématique, biologie et importance pratique. Izdatel'stvo « Nauka » Leningradskoe Otdelenie, Leningrad, 260 pp.

EVLAKOVA A.A. et MARTENS B.K., 1968. Action des rayons X et gamma sur l'agent de la muscardine blanche des insectes (*Beauveria*). *Bull. Nautsb. issl. Inst. Zashitb. Rast.*, 3, 38-41.

EVLAKHOVA A.A. et SEKHURINA T.A., 1964 L'activité de défense de la cuticule de la punaise des céréales (*Eurygaster integriceps* Put.) contre les microorganismes végétaux. *Colloq. Int. Path. Insectes, Lutte Microbiol.* (Paris, 1962). *Entomophaga, Mém. Hors. Ser.*, 2, 521-529.

FARGUES J., 1972. Etude des conditions d'infection des larves de doryphore, *Leptinotarsa decemlineata* Say, par *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuil. (*Fungi Imperfecti*). *Entomophaga*, 17, 319-337.

FARGUES J., 1973. Sensibilité des larves de *Leptinotarsa decemlineata* Say (Col. Chrysomelidae) à *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (*Fungi imperfecti*, Moniliales) en présence de doses réduites d'insecticide. *Ann. Zool. - Ecol. anim.*, 5, 231-246.

FARGUES J., DURIEZ T., ANDRIEU S. et POPEYE R., 1974. Analyse sérologique comparée de deux champignons entomopathogènes *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. et *Beauveria tenella* (Delacr.) *Siem C.R. Acad. Sc. Paris*, 278, Série D., 2245-2247.

FARGUES J. et RODRIGUEZ D., 1974. Etude préliminaire sur la pathogénicité pour les Noctuelles des champignons imparfaits (Deutéromycètes) entomopathogènes. *Rev. Zool. agric. Pathol. vég.*, 1, 28-34.

FARGUES J. et VEY A. 1974, Modalités d'infection des larves de *Leptinotarsa decemlineata* par *Beauveria bassiana* au cours de la mue. *Entomophaga*, 19, 311-323.

FASSATINOVA O., 1967. The species of the form genus *Sporotrichum* Link on Insects. *J. Invert. Pathol.*, 9, 563-566.

FERRON P., 1967. Etude en laboratoire des conditions écologiques favorisant le développement de la mycose à *Beauveria tenella* du ver blanc. *Entomophaga*, 12, 257-293.

FERRON P., 1970. Orientations des recherches effectuées en URSS sur les champignons entomopathogènes. *Ann. Zool.-Ecol. anim.* n° HS, 3, 117-134.

FERRON P., 1970. Orientation de la sensibilité des larves de *Melolontha melolontha* L. (Coléoptère : Scarabaeidae) à *Beauveria tenella* (Delacr. Siemaszko au moyen de quantités réduites de HCH. *Coll. Intern. sur la Pathologie des Insectes IV. College Park (Maryland)* 66-79.

FERRON P., 1971. Méthodes de multiplication et d'application des préparations de *Beauveria* sp. (*Fungi Imperfecti*) pour la lutte microbiologique contre les Insectes. in « Microbiological control of insects », *Séminaire IOBB, Helsinki, sect XII*, 13 pp.

FERRON P., 1971. Modification of the development of *Beauveria tenella* mycosis in *Melolontha melolontha* larvae, by means of reduced doses of organophosphorus insecticides. *Ent. exp. et appl.*, 14, 457-466.

FERRON P., 1974. Essai de lutte microbiologique contre *Melolontha melolontha* par contamination du sol à l'aide de blastospores de *Beauveria tenella*. *Entomophaga*, 19, 103-114.

FERRON P. et DIOMANDE T., 1969. Sur la spécificité à l'égard des insectes de *Metarrhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin (*Fungi Imperfecti*) en fonction de l'origine des souches de ce champignon. *C.R. Acad. Sci., Paris, Série D.*, 268, 331-332.

FERRON P. et HURPIN B., 1974. Effets de la contamination simultanée par *Beauveria tenella* et par *Entomopoxvirus melolonthae* des larves de *Melolontha melolontha* (Col. Scarabaeidae). *Ann. Soc. ent. Fr. (N.S.)* 10, 771-779.

FERRON P., HURPIN B., ROBERT P.H., 1969. Sensibilisation des larves de *Melolontha melolontha* L. à la mycose à *Beauveria tenella* par une infection préalable à *Bacillus popilliae*. *Entomophaga*, 14, 429-437.

FERRON P. et ROBERT P.H., 1975. Virulence of entomopathogenic fungi (*Fungi Imperfecti*) for the adults of *Acanthoscelides obtectus* (Coleoptera Bruchidae) *J. Invert. Pathol.*, (sous presse).

FISHER F.E., 1950. Two new species of *Hirsutella* Patouillard. *Mycologia*, 42 ; 290-297.

FRANZ J.M. et KRIEG A., 1972. Biologische Schadlingsbekämpfung. *Paul Parey Berlin et Hamburg*, 208 pp.

GABRIEL B.P., 1968. Enzymatic activities of some entomophthoraceous fungi. Histochemical studies of the insect cuticle infected by *Entomophthora coronata* *J. Invert. Pathol.*, 11, 70-89.

GAD A.M. et SADEK S., 1968. Experimental infection of *Anopheles pharoensis* larvae with *Coelomomyces indicus*. *Egypt Pub. Health Assoc. J.*, 43, 387-391.

GAMS W. et ROZSYPAL J., 1973. *Metarrhizium flavoviride* n. sp. isolated from insects and from soil. *Acta Bot. Neerl.*, 22, 518-521.

GAPRINDASHVILI N.K., ISARLISHVILI S.Ja. et MOSULISHVILI N.M., 1964. Emploi du champignon *Aschersonia aleyrodis* Weber pour la lutte contre l'Aleurode du Citronnier dans la République autonome d'Adjarie. Issled po biolog. metod bor'by s vreditel. sel'skogo i lesnogo khozjaistva, *Symposium de Novossibirsk*, 34-36.

GETZIN L.W., 1961. *Spicaria rileyi* (Farlow) Charles, an entomogenous fungus of *Trichoplusia ni* (Hubner). *J. Insect Path.*, 3, 2-10.

GIARD A., 1889. Sur quelques types remarquables de champignons entomophytes. *Bull. Sci. France, Belgique*, 19, 298-309.

GIARD A., 1889. Sur quelques types remarquables de champignons entomophytes. *Bull. Sci. France, Belgique*, 20, 197-205.

GOL'BERG A.M., 1969. The finding of entomophthoraceous fungi on mosquitoes (*Culicidae*) and midges (*Ceratopogonidae*). *Med Parazit. i Parazit. Bolezni*, 38, 21-23.

GORAL V.M., 1971. Méthode d'obtention des conidies du champignon *Beauveria bassiana*. *Brevet d'invention n° 301 142 (URSS)*.

GORAL V.M., 1973. The conditions of conidia formation of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. *Proc. Intern. Colloquim Insect Pathol. Microb. Control, Oxford*, 76.

GORAL V.M. et LAPPА N.V., 1973. Culture de la muscardine verte en profondeur et en surface. *Zashchita rastenii*, 1, 19.

GORSHKOVA G.I., 1966. Decrease of fecundity of females of *Ixodes ricinus* infected by the fungus *Beauveria bassiana*. *Vestnik Leningradskogo Universiteta, Seria Biologii*, 21, 13-16.

GORSHKOVA G.I., 1967. Histological picture of infecting larvae *Ixodes ricinus* by strains of fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. *Vestnik Leningrad. Pniver.*, 9, 25-32.

GUAGLIUMI P., 1971. As cigarrinhas das pastagens do nordeste do Brasil. *Ruralidade*, 70, 3-31.

GUAGLIUMI P., MARQUES E.J., MENDONCA FILHO A.F. et MENEZES C. 1969. Primeiros resultados na luta biologica contra a « cigarrinha da fôlha », *Mahanarva posticata* (Hom., *Cercopidae*) no nordeste do Brasil. *Boletine Acucareiro*, 8, 4ème trimestre.

GUSTAFSSON M., 1965. On species of the genus *Entomophthora* Fres. in Sweden. I. Classification and distribution. *Lantbr. Hogsk. Annbr* 31, 102-212.

GUSTAFSSON M., 1966. On species of the genus *Entomophthora* Fres. in Sweden. II Cultivation and physiology. *Lantbr. Hogsk Annbr*. 31, 405-457.

GUSTAFSSON M., 1969. On species of the genus *Entomophthora* Fres. in Sweden. III. Possibility of usage in biological control. *Lantbr. Hogsk. Annbr.*, 35, 235-274.

HAMILL R.L., HIGGENS C.E., BOAZ H.E. et GORMAN M., 1969. The structure of beauvericin, a new depsipeptide antibiotic toxic to *Artemia salina* *Tetrabedron Lett.*, 49, 4255-4258.

HANNESSIAN S., DeJONGH D.C. et MCLOSKEY J.A., 1966 Further evidence en the structure of cordycepin. *Biochem. Biophys. Acta*, 117, 380-382.

HEITO F., 1962. Parasitisme de blessure par le champignon *Mucor hiemalis* Webmer chez les insectes. *Ann. Epiphyties*, 13, 179-203.

HURPIN B. et ROBERT P.H., 1972. Comparison of the activity of certain pathogens of the Cockhafer *Melolontha melolontha* in plots of natural meadowland. *J. Invert. Pathol.*, 19, 291-298.

IGNOFFO C.M., 1973. Effect of entomopathogens on vertebrates. in « *Regulation of Insect Populations by microorganisms* ». *Ann. New York Acad. Sci.*, 217, 141-172.

IGNOFFO C.M., BARKER W.M., McCOY C.W., 1973. Lack of per os toxicity or pathogenicity in rats fed with the fungus *Hirsutella thompsonii*. *Entomophaga*, 18, 333-335.

IL'CHENKO L. Ya., 1968. Infection rate of *Culex pipiens* L. mosquitoes with the parasitising fungus *Entomophthora conglomerata* Sorok. in the vicinity of Novocherkassk. *Med. Parazit. i Parasit. Bolezni*, 37, 613-615.

PENKINS D.W., 1964. Pathogens, parasites and predators of medically important arthropods : annotated list and bibliography. Suppl. to Vol. 30, *Bull. Wild. Hlth. Org.*, 150 pp.

JIGAEV G.N., 1963. Influence de la Beauverine sur la survie et la fécondité du doryphore. in « *Coloradski jouk ta novi metedy borot'by z nym. Naoukovi pratsi*, Kiev, 12, 89-94.

JOHNSTON J.R., 1915. The entomogenous fungi of Puerto-Rico. *Puerto-Rico Board of*

*Commissionners of Agric. Bull.*, 10, 1-33.

JONSSON A.G., 1968. Protease production by species of *Entomophthora*. *Appl. Microbiol.*, 16, 450-475.

KALASHNIKOV K.Ja., 1939. Essai de culture massive du champignon *Metarrhizium anisopliae* Sorok. *Zash. ch. Rast. Vredit*, 18, 154-158.

KALVISH T.K., 1974. Influence of temperature and relative air humidity on muscardine fungi. *Izvestia Sibirskogo Otdelenia*, 5, 67-77.

KAWAKAMI K., 1962. Studies on the cylindrical spores of muscardines. II. The Growth of muscardines in the shaking culture with liquid media. *Bull. Sericult. Exp. Station, Tokyo*, 18, 147-156.

KAWAKAMI K., 1965. Phagocytosis in muscardine-diseased larvae of the silk-worm *Bombyx mori* (Linnaeus). *J. Invert. Pathol.*, 7, 203-208.

KISH L.P., SAMSON R.A. et ALLEN G.E., 1974. The genus *Nomuraea* Maublanc. *J. Invert. Pathol.*, 24, 154-158.

KOBAYASI Y., 1941. The genus *Cordyceps* and its allies. *Sci. Repts. Tokyo Bunrika Daigaku Sect. B*, 5, 53-260.

KODAIRA T., 1961. Biochemical studies on the muscardine fungi in the silk-worms *Bombyx mori*. *J. Facul. Textile Sci. & Techno. Shinshu Univers*, 29, Ser. E., Agric. & Sericic., 1-68.

KOIDSUMI K., 1957. Action antifongique des lipides cuticulaires des insectes. *J. Insect Physiology*, 1, 40-51.

KONDRYATIEV N.N., ALIOSHINA O.A., ILITCHEVA S.N., PERIKHANOVA A.G., SINITSINA L.P., OUSPENSKAIA A.A. et CHAGOV E.M., 1971. Méthodes d'obtention du matériel entomopathogène du champignon *Beauveria bassiana*. *Brevet d'invention n° 313-531 (URSS)*.

KRASSILSTCHIK J., 1888. La production industrielle des parasites végétaux pour la destruction des insectes nuisibles. *Bull. sci. France, Belgique* 19, 461-472.

KUPRIYANOVA E.S., 1966. *Entomophthora* fungus parasitizing mosquitoes of the *Culex pipiens* L. *Complex. ool. Zhur.*, 45, 675-678.

KUYAMA S. et TAMURA S. 1965. *Agr. Chem.*, 29, 168, d'après SUZUKI, TAGUCHI et TAMIRA, 1970.

LAINÉ L. und NUORTEVA M., 1970. Über die antagonistische Einwirkung der insektenpathogenen Pilze *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. und *B. tenella* (Delacr.) Siem. auf den Wurzelschwamm (*Fomes annosus* Fr. Cooke). *Acta Forestalia Fennica*, 111, 3-15.

LAIRD M., 1956. A new species of *Coelomomyces* (fungi) from Tasmanian mosquito larvae. *J. Parasitol.*, 42, 53-55.

LAIRD M., 1962. Validation of certain species of *Coelomomyces* (Blastocladales Coelomomycetaceae) described from the Australian and oriental regions. *J. Elisha Mitchell Sci.*

LAIRD M., 1967. A coral island experiment : a new approach to mosquito control. *Chron. Wld. Hlth. Org.*, 21, 18-26.

LAIRD M., 1973. Environmental impact of insect control by microorganisms. *Ann. New York Acad. Sci.*, 217, 218-226.

LATGE J.P., 1972. Contribution à l'étude du *Cordyceps militaris* (Fr.) Link. Systématique, Biologie, Physiologie. *Tèse Doct. Spécialité Biol. vég. appl.*, Univ. Toulouse, 85 pp.

LEVITIN M.M., KIRSANOVA R.V. et YURCHENKO L.V., 1971. Génétique et sélection du champignon entomopathogène *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. I. Effet léthal et mutagène des rayons ultra-violet et X. *Genetika*, 7, 105-111.

LYSENKO O. et KUCERA M., 1971. Micro-organisms as sources of new insecticidal chemicals toxins. in « *Microbial Control of Insects and Mites* » H.D. Burges et N.W. Hussey édit., *Academic Press, London, New York*, 205-228.

MacLEOD D.M., 1954. Investigations on the genera *Beauveria* Vuill. and *Tritirachium* Limber. *Canad. J. Botany*, 32, 818-890.

MacLEOD D.M., 1959. Nutritional studies on the genus *Hirsutella*, I. Growth response in an enriched liquid medium. *Canad. J. Botany*, 37, 695-714.

MacLEOD D.M., 1959. Nutritional studies on the genus *Hirsutella*. II. Nitrogen utilization in a synthetic medium. *Canad. J. Botany*, 37, 819-834.

MacLEOD D.M., 1960. Nutritional studies on the genus *Hirsutella*. III. Acid-hydrolysed casein and amino-acid combinations as sources of nitrogen. *J. Insect Pathol.*, 2, 139-146.

MacLEOD D.M., CAMERON MacBAIN J.W., SOPER R.S., 1966. The influence of environmental conditions on epizootics caused by entomogenous fungi. *Revue Roum. Biol.-Botanique*, 11, 125-134.

MacLEOD D.M. et MULLER-KOGLER E., 1970. Insect Pathogens : species originally described from their resting spores mostly as *Tarichium* species (Entomophthorales : Entomophthoraceae). *mycologia*, 62, 33-66.

Mac LEOD D.M. and MULLER-KOGLER E., 1973. Entomogenous fungi : *Entomophthora* species with pearshaped to almost spherical conidia (Entomophthorales : Entomophthoraceae). *mycologia*, 65, 823-893.

MAINS E.B., 1950. The genus *Gibellula* on spiders in North America. *Mycologia*, 42, 306-321.

MAINS E.B., 1950. Entomogenous species of *Akanthomyces*, *Hymenostilbe* and *Insecticola* in North America. *Mycologia*, 42, 566-589.

MAINS E.B., 1951. Entomogenous species of *Hirsutella*, *Tilachlidium* and *Synnematium* *Mycologia*, 43, 691-718.

MAINS E.B., 1958. North American entomogenous species of *Cordyceps*. *Mycologia*, 5-, 169-222.

MAINS E.B., 1959. Species of *Ascherson*(Sphaeropsidales). *Lloydia*, 22, 215-221.

MAINS E.B., 1959. North American species of *Aschersonia* parasitic on *Aleyrodidae*. *J. Insect Pathol.*, 1, 43- 47.

MAJCHROWICZ I. et R. SOPER, 1973. Investigation of resting spores of *Entomophthora thaxteriana* germination. *Vth Intern. Colloq. Insect Pathol. Microb. Control, Oxford*, p. 78.