



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULA

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université des Frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة والحياة

Département : Microbiologie

قسم : الميكروبيولوجي

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Biotechnologie

Spécialité : Mycologie et biotechnologie fongique

Intitulé :

Metarhizium comme un agent de la lutte biologique

Préparé par :

Le : 16/09/2021

Bechiri Rahma & Hanachi Hadjer

Jury d'évaluation :

Présidente du jury : Mme. Benkahoul M (MCA UFM CONSTANTINE 1).

Rapporteuse : Mme. Abdelaziz O (MCB UFM CONSTANTINE 1).

Examinatrice : Mme. Meziani M (MCB UFM CONSTANTINE 1).

Année universitaire

2020- 2021

REMERCIEMENTS

Nous remercions Allah le tout qui a donné du courage et la volonté d'avoir réussi dans nos études.

Nous retenons à remercier toute personne qui a contribué de près ou loin à la réalisation de cette mémoire plus particulièrement :

Notre encadreur **Madame Abdelaziz Ouided** maitre de conférence B à l'université Constantine1 qui nous a proposé ce sujet de recherche et qui nous a encadré et soutenu par ses conseils sa compréhension ; ses encouragement et sa gentillesse.

Nous remercions également **Mme. Benkahoul M** maitre de conférence A à l'université Constantine 1et **Mme. Meziani M** maitre de conférence B à l'université constantine 1 Pour l'honneur qu'il nous a fait en acceptant de juger notre travail

En fin notre respect à tous les enseignants de la faculté de la science de la nature de l'université des frères mentouri constantine 1.

Dédicaces

*À ma chère maman **Rachida**, tu étais une mère et un père après la mort de mon père tu resteras pour toujours la jeune femme qui a tant pris soin de moi qui m'a tout appris et qui a toujours été là pour moi, et je n'oublierai jamais tout ce que tu as fait pour moi. Qu'Allah vous garde et vous bénisse. À Mon père **Mohamed** que dieu repose son âme ; je sais que vous avers toujours souhaité voir votre fille en ce jour, mais vous êtes toujours dans mon cœur, que dieu vous fasse miséricorde cher père*

*À mon cher frère : **Noufel**.*

*À ma chère binôme et ma sœur : **Hadjer et sa chère famille** .*

*À ma chère personne qui m'a toujours soutenu dans ma vie ; surtout mes études : **Mezhoud Samia**.*

*À ma cher frère de la famille : **Nadir***

Et merci à tous mes amis.

Bechiri Rahma

Dédicaces

Je dédie ce travail : A mes chers parents

*Mon père **Bachir** et ma mère **Fouzia***

Si je suis arrivée là C'est bien grâce à eux, et leur patience illimitée, leur encouragement contenu, leur aide, en témoignage de mon profond amour et respect pour leurs grands sacrifices que dieu les bénisse, et leur accorde longue vie et les protège.

*À ma chère sœur : **Besma***

*À mon cher frère : **Salah Eddine***

*À toute la famille : **Hanachi et Bouza***

*À chère binôme et ma sœur **Rahma et sa famille***

*Et aussi à mon beau chien : **Pipou***

Et tous mes amis

Hanachi hadjer

Liste des figures

Figure 1 : caractéristiques de la colonie de *Metarhizium anisopliae*

Figure 2 : (a) et (b) Aspect microscopique de *Metarhizium anisopliae*

Figure 3 : Cycle de développement du champignon *Metarhizium anisopliae*

Figure 4 : Mode de pénétration des champignons entomopathogènes dans la cuticule des insectes

Figure 5 : Schéma du cycle biologique des champignons entomopathogène

Figure 6 : Taux de Mortalité souche 1, 1er traitement

Figure 7 : Taux de Mortalité souche 1, 2ème traitement

Figure 8 : Taux de Mortalité souche 2, 1er traitement

Figure 9 : Taux de Mortalité souche 2, 2ème traitement

Figure 10 : Taux de Mortalité souche 3, 1er traitement

Figure 11 : Taux de Mortalité souche 3, 2ème traitement

Figure 12 : Spores de champignon coupées × 400

Figure 13 : *Metarhizium anisopliae* sur grain de riz F : filament, Gr : grain de riz. ×40

Figure 14 : *Oedaleus senegalensis* infecté

Figure 15 : *Oedaleus senegalensis* infecté avec cuticule décolorée

Figure 16 : coupe *metarhizium anisopliae*. Pap

: paroi du pédicelle, P : pédicelle, S : spore

Figure 17 : Coupe de l'insecte, Tm : tube de Malpighi

Figure 18 : Système nerveux céphalique de l'insecte.

Gso : ganglion sous œsophagien, D : deutocérébron, P: protocérébron, T: tritocérébron, O: œil

Liste des Abréviations

DDT : dichloro-diphényl-trichloroéthane

DTX : destruxines

ADN : **acide** désoxyribonucléique

°C : degré Celsius unité de l'échelle de température Celsius

% : pourcentage

TL50 : Le temps qui s'écoule pour la moitié des insectes traités soient tués

µm : **millième** de millimètre

L3 : les larves de stade 3

Tables des matières

Remerciements

Dédicaces

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction... 01

Revue bibliographique

Chapitre 1 : Le champignon entomopathogène *Metarhizium anisopliae*

1	Généralité sur les champignons entomopathogènes.....	04
2	<i>Metarhizium anisopliae</i>	
2.1	Taxonomie et classification.....	04
2.2	Identification	
2.2.1.	Caractères morphologiques et cultureux.....	05
2.2.1.1	Aspect macroscopique.....	05
2.2.1.2	Aspect microscopique	06
3	Ecologie	
3.1	Facteur abiotique	07
3.2	Facteur biotique.....	07
4	Biologie.....	07

Chapitre 2 : *Metarhizium* comme un agent dans la lutte biologique

1	La lutte biologique	
1.1	Objectif.....	10
1.2	Concept de la lutte biologique.....	10
2	Historiques du <i>Metarhizium anisopliae</i>	11
3	Importance de <i>Metarhizium anisopliae</i> en agriculture : lutte biologique	
3.1	Production de <i>Metarhizium anisopliae</i>	11
3.2	Les toxines et le mode d'attaque	12
3.3	Mode d'infection de <i>Metarhizium anisopliae</i>	13

3.4	L'évaluation de l'infection et les Cultures protégés par <i>Metarhizium anisopliae</i>	15
3.5	Avantages de l'utilisation de <i>Metarhizium anisopliae</i>	15
3.6	Inconvénients de l'utilisation de <i>Metarhizium anisopliae</i>	16
4	Facteurs affectant l'efficacité de <i>Metarhizium anisopliae</i>	
4.1	Facteurs liés à la cible.....	16
4.2	Facteurs de l'environnement	16

Chapitre 3 : Analyse de l'article

Titre de l'article : Histopathologie et effet de *Metarhizium anisopliae* sur les stades larvaires du criquet sénégalais (*Oedaleus senegalensis*).

Les auteurs : Mamour Toure, Amadou Fall, Fawrou Seye et Mady Ndiaye

1	Matériel et méthode	
1.1	Matériels.....	19
1.2	Méthode	
1.2.1	Préparation du biopesticide.....	19
1.2.2	Capture des larves et traitement.....	19
1.2.3	Étude histopathologique	20
2	Résultats	
2.1	Efficacité des souches... ..	20
2.2	Coupes histopathologies.....	22
3	Discussion.....	24
	Conclusion Générale	27
	Références bibliographiques	29
	Résumé en français	
	Résumé en anglais	
	Résumé en arabe	

Introduction

Introduction

Malgré des siècles de développement technologique, les insectes ravageurs continuent à infliger des dommages très élevés à la production agricole et à la santé humaine. L'utilisation des pesticides chimiques commençait vers la moitié du XIX^{ème} siècle pour protéger les cultures. En 1939, le premier insecticide chimique nommé dichloro-diphényl-trichloroéthane ou DDT s'est apparu. Mais au cours des années, l'apparition des gènes résistants, l'augmentation des risques sur la population humaine et les effets néfastes de l'environnement limitent l'utilisation des produits chimiques (**Hamon *et al.*, 1972**). Face aux méfaits de l'utilisation des produits chimiques, Une solution probante bien établie à ce problème consiste à faire appel à des ennemis naturels, appelés agents de lutte biologique, pour maîtriser les populations d'insectes ravageurs. L'agent de lutte biologique peut être un prédateur, un parasitoïde, une bactérie, un champignon ou un virus. Actuellement, l'utilisation de ces produits biologiques est de plus en plus recherchée et demandée par les producteurs.

Les champignons (fungi ou mycètes), riches de quelques 120000 espèces, et composant par un groupe d'organismes hétérotrophes ubiquistes ; ils caractérisent par des structures et des caractéristiques biologiques extrêmement diversifiées, adaptés au mode de vie saprophyte, parasitaire ou symbiotique (**Senal et viseur *et al.*, 1993**)

Dans ce contexte ont concentre sur L'usage des champignons entomopathogènes qui sont les plus étendus, Ils appartiennent au sous-taxon des Mastigomycotina, Zygomycotina, Ascomycotina et Deuteuromycotina. Sont les champignons qui provoquent des maladies aux insectes est limité aux genres ou aux espèces de champignons qui peuvent être des agents pathogènes d'arthropodes tels que des insectes ou des acariens. Les premières observations sur les maladies de ces invertébrés ont été faites en Chine et la plus ancienne publication sur ce sujet remonte à 1726 avec la description de l'espèce *Cordyceps sinensis* récoltée sur des larves d'un lépidoptère. Il est plus de 700 espèces de microchampignons sont entomopathogènes et sont très répons dans l'environnement naturel, (**Starnes *et al.* , 1993**). Considérés comme une alternative pour assurer une meilleure protection de la santé et de l'environnement (**Lacey et Undeen *et al.*, 1986**). Ils jouent un rôle important dans la régulation naturelle des populations d'insectes et Ils provoquent des infections chez un large éventail d'insectes et des acariens. Ils produisent par germination des spores qui infectent leur hôte insecte sur sa surface, puis de plus en plus dans son corps. Le temps de La mort (prend entre 4 et 10 jour) solen le type de champignons et le nombre de spores sur le cadavre qui se dispersent et continuent leur cycle de vie sur les nouveaux hôtes. (**Wraight et Roberts *et al.*, 1987; Kouassi *et al.*, 2001**).

L'un des plus intéressants appartient à la classe des Ascomycètes : il s'agit de *Metarhizium anisopliae* connu comme agent pathogène sur plus de 8 ordres d'insectes (**Veen, 1968 ; Samuels *et al.*, 1989**). Naturellement présent dans le sol, a de pouvoir pathogène important envers les champignons et les bactéries phytopathogènes et les insectes nuisibles de la culture (**Samuels *et al.*, 1989 ; Veen *et al.*, 1968**). Il semble alors important d'utiliser ce espèce pour protéger les cultures contre les dégâts, des bioagresseurs dans le domaine agricultures car sans impact environnemental, sans impact sur la vie sociale de la population comme la santé, mais économiquement rentable grâce à l'augmentation de la production.

Quel est l'effet entomopathogène de ce champignon sur des espèces ravageurs et son rôle comme un agent de la lutte biologique ?

Chapitre 1 :

Le champignon entomopathogène *Metarhizium anisopliae*

1. Généralités

Les champignons entomopathogènes sont des agents pathogènes eucaryotes qui provoquent des maladies chez les insectes, représentent un vaste groupe hétérogène. Ils se répartissent en 700 espèces appartenant approximativement à 100 ordres. Ce type de champignons possède des noyaux, des organites bien définis et une paroi chitineuse. Ils se présentent parfois sous forme de cellules individuelles, mais le plus souvent sous forme de filament constituant le mycélium et dans lesquels sont rangées les cellules. Leur reproduction se fait par formation de spores sexuées ou asexuées.

Ils peuvent être transmis de trois façons, au sein d'une population d'insectes : horizontalement (au sein d'une même génération par des individus infectés), verticalement (entre générations) ou être déplacés par des vecteurs. Cette troisième méthode joue un rôle important dans la dissémination des champignons vers de nouveaux habitats. Le cycle de vie des champignons entomopathogènes comprend une phase parasite (de l'infection à la mort) et une phase saprophyte (après la mort).

Ils appartiennent au sous-taxon des Mastigiomycotina, Zygomycotina, Ascomycotina et Deuteuromycotina. Le plus grand nombre de pathogènes se trouvent dans la classe des Zygomycètes, mais les plus utilisées en lutte biologique proviennent des Deutéromycètes dont on connaît la reproduction asexuée (champignon imparfait), comme les espèces de genre *Metarhizium* sont les plus utilisées en lutte biologique (Wraight et Roberts, 1987 ; Goettel, 1992) et ont un intérêt agronomique considérable dans la lutte biologique contre les ravageurs de cultures et sont donc l'objet d'études de plus en plus poussées.

2. *Metarhizium anisopliae*

2.1. Taxonomie et classification

La classification de *Metarhizium anisopliae* a été disposée à plusieurs reprises au cours des dernières années. Dans le passé l'espèce a été classée principalement sous la division des Deutéromycètes, dans la classe des Hyphomycètes. Cette classe est partant des formes mycéliennes qui sont des spores asexuées, appelées conidies, apportées sur des cellules conidiogènes spécialisées. Actuellement, la plupart des mycologistes n'acceptent plus les Deuteromycota et ses sous-classes comme formant un assemblage taxonomique.

L'espèce *M. anisopliae* est parmi des différents espèces de champignons ont été coassocié avec des membres de la division des Ascomycota sur une base d'homologie d'ADN (**Inglis et al., 2001**). Cette espèce fait dès lors partie du règne des Fungi, de la division des Ascomycota et de l'ordre des Hypocreales.

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

Règne : Fungi

Embranchement : Dikarya

Sous-embranchement : Ascomycota

Classe : Pezizomycotina

Ordre : Hypocreales

Famille : *Clavicipitaceae*

Genre : *Metarhizium*

Espèce : *Metarhizium anisopliae*

2.2. Identification :

2.2.1. Caractères morphologiques et culturels

Le genre *Metarhizium* est caractérisé par des spores spécialisées appelées conidies et un appareil végétatif (ou mycélium) septé, autrement dit, les filaments (ou hyphes) sont cloisonnés. il caractérisé par la présence des chaînes porteuses des phialides, des colonies de conidies cylindriques, sèches et généralement de couleur verte.

2.2.1.1 Aspect macroscopique

Après l'ensemencement sur un milieu de culture gélosé, les colonies de la souche apparaissent au bout de 7 jours d'incubation à 28°C et à l'obscurité. Les colonies sont formées d'une agrégation des chaînes conidiennes (**Zimmerman et al., 2007**) et sont poudreuses où

cotonneuse de couleur blanche devenues verdâtre foncée après la maturation, contournées à leur périphérie. (Amouriqet al.,1973).

Au 21^{ème} jour d'incubation, pratiquement toutes les souches apparaissent pigmentées.

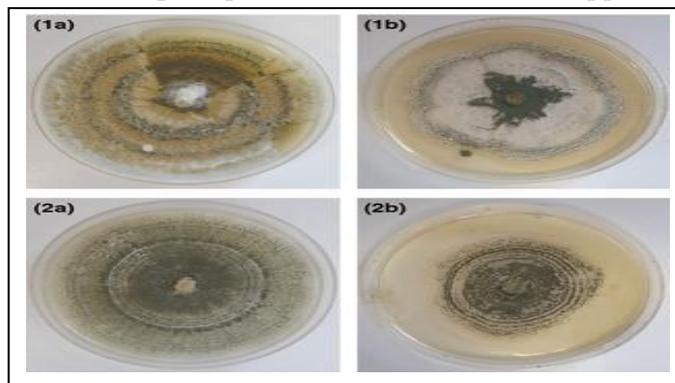


Figure 1 : caractéristiques de la colonie de *Metarhizium anisopliae* (Characterization and comparison of *Metarhizium* strains isolated from *Rhynchophorus ferrugineus*).

2.2.1.2 Aspect microscopique

Un échantillon déposé sur une lame qui est couvert par une lamelle, puis observées au microscope optique.

Le *Metarhizium anisopliae* est caractérisée par un mycélium cloisonné, des conidiophores de longueur variable, courte, irrégulièrement ramifiées ou non et arrangés en groupes compacts formant une masse de spores. Leur aspect microscopique, montre que leur fructification se fait sous forme de phialides ; ces derniers donnent naissance aux conidies ou phialospores. Les phialides peuvent être uniques, en paires ou plusieurs, ont une forme cylindrique ou légèrement gonflés. les spores étant allongées avec des cotés parallèles (Bischoff et al., 2009).

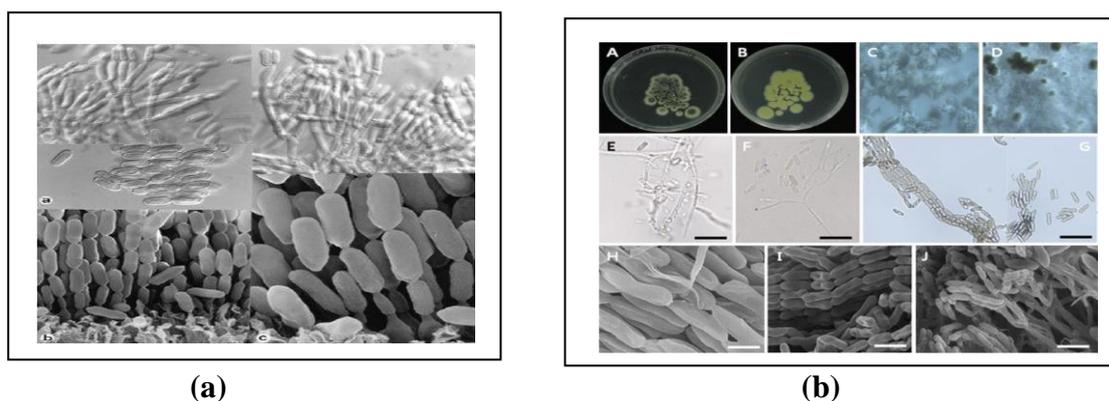


Figure 2 : (a) et (b) Aspect microscopique de *Metarhizium anisopliae*

(Bischoff et al.,2009)

3. Ecologie

3.1. Facteur abiotique

Des conditions climatiques influencent sur le développement et la croissance de *Metarhizium anisopliae*. Des études ont établi que la température de la croissance de *Metarhizium anisopliae* était plus importante à 20°C qu'à 23°C. Mais au-dessus de 35°C, généralement empêchent la croissance ainsi que le développement des champignons entomopathogènes (**Benserradj et al., 2014**). C'est pour cette raison que les conidies de *Metarhizium anisopliae* ne peuvent pas survivre plus de 15 minutes à 40°C. Sa température optimale est de 25°C.

La croissance et la sporulation du champignon est aussi influencé par le taux d'humidité, La plupart de ces champignons exigent au moins 95 % de l'humidité relative à la surface de l'insecte afin de germer (**Hallsworth et Magan et al., 1999**). les souches de *Metarhizium* peuvent germer et infecter efficacement les insectes même le taux d'humidité est faible mais à condition qu'il y ait suffisamment d'humidité dans les micro habitats (**Inglis et al., 2001**), car les études démontrent que les conditions sèches justes après l'application des champignons entomopathogènes sont moins pathogènes. L'humidité relativement élevée plus de 90% dans les endroits abrités fournit un environnement favorable pour le développement des spores. (**Liu et al., 2003**).

Le sol est l'habitat dans lequel le champignon *Metarhizium anisopliae* pousse naturellement, nécessaire pour l'application correcte de ces champignons dans le champ. Ces derniers, Ils sont présentent presque dans tous les sols du monde. Mais ils préfèrent un sol acide ayant un pH inférieur à 7 (**Joséphine et Marie, 2015**). Son développement est favorisé par les climats tempérés et humides. Alors, il se concentre en grande quantité dans les pays ayant une latitude supérieure à 40°Nord comme les Etats-Unis (**Joséphine et Mari, 2015**).

3.2. Facteur biotique

L'espèce *Metarhizium anisopliae* est un champignon entomopathogène donc l'insecte est son hôte principal. Après la pénétration dans l'insecte, ce champignon entre directement dans l'appareil respiratoire de l'hôte puis il se multiplie dans toutes les surfaces de l'insecte. Ainsi, tous les organes de l'hôte sont concernés.

4. Biologie

D'après **Paine, 1983** ; Le cycle biologique des champignons entomopathogène diffère légèrement selon les groupes taxonomiques, mais il comprend toujours une phase parasitaire

(de l'infection de l'hôte jusqu'à la mort de ce dernier) et une phase saprophyte (après la mort de l'insecte-hôte). La survie de ces champignons, et leur reproduction, est dépendante de l'infection d'insectes-hôtes et entraîne invariablement la mort de ceux-ci.

Le cycle biologique de *Metarhizium anisopliae* commence par le contact de la cuticule de l'hôte qui n'est autre que l'insecte, sous forme des spores asexuées également appelées des conidies. Dans des conditions favorables de température et d'humidité (généralement élevée), ces spores germent, se développent sous forme d'hyphes et colonisent la cuticule de l'insecte, après la germination, ils traversent la cuticule et le champignon croît rapidement dans l'hémocoel. Au bout d'un certain temps, l'insecte est généralement tué (parfois par des toxines fongiques) dans un délai court de 3 à 10 jours. Lorsque l'insecte meurt, le champignon colonise les organes internes avec un stade hyphal, puis sporule à la surface de l'insecte et il se multiplie avant de trouver un autre hôte.

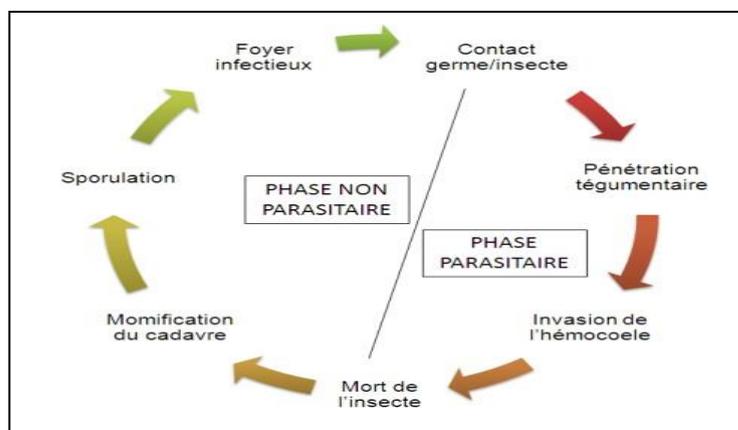


Figure 3 : Cycle de développement du champignon *Metarhizium anisopliae* (**Rakotoarisoa, 2007**)

Deux phases ont été observées lors de la multiplication de *metarhiziumanisopliae* (**Kamp et Bidochka et al., 2002**) : une phase végétative marquée par la croissance de mycélium, au cours de cette phase le champignon vit aux dépens de l'insecte hôte jusqu'à ce que ce dernier meurt (3 à 4 jours). Une deuxième phase reproductive durant laquelle se forment les spores et relâchées dans l'environnement, les spores fixent sur les cadavres d'insectes jusqu'à ils trouvent un nouvel hôte, donc le mode de désamination du champignon dans la nature est assurée par l'insecte hôte, le vent et l'eau.

Chapitre 2 :

Metarhizium comme agent dans la lutte biologique

1. La lutte biologique

La lutte biologique est basée sur des relations naturelles entre individus ou entre espèces, consiste à réguler les populations d'organismes nuisibles aux cultures ou à la santé à l'aide d'autres organismes (prédateurs, pathogènes...). Les organismes vivants utilisés sont restreints à quelques groupes taxonomiques. On retrouve entre autres certains arthropodes (insectes et arachnides), nématodes, protozoaires, bactéries et champignons. Ces organismes, ennemis naturels des ravageurs visés, sont aussi nommés auxiliaires de lutte (**Raymond et al., 1992 ; Brown et al., 2004**)

La première utilisation référencée de lutte biologique a été effectuée par les Chinois. Dans les vergers d'agrumes, les fermiers utilisaient des fourmis tisserandes (*Oecophylla smaragdina* Fabricius) indigènes qui consommaient une variété de ravageurs pour protéger les fruits (**Peng et al., 1983**).

Du XVI^e siècle jusqu'au début du XVIII^e, divers naturalistes ont étudié des prédateurs et des parasitoïdes d'insectes. En 1740, le physicien et naturaliste français René-Antoine Ferchault de Réaumur a eu l'idée de s'en servir pour lutter contre les organismes nuisibles. En 1760, la lutte biologique a commencé à être utilisée par les Européens.

1.1 Objectif

Le but de la lutte biologique est de réduire et de contrôler les populations de ravageurs en deçà d'un seuil d'intervention pour lequel les dommages sont économiquement et esthétiquement acceptables (**Waage et al., 2004 ; Congress et al., 1995**). Et Remplacer, en totalité ou en partie, les pesticides chimiques utilisés en agriculture et en foresterie.

La lutte biologique peut devenir une composante importante de systèmes de production intégrée ou biologique.

1.2 Concept de la lutte biologique

Les organismes bénéfiques utilisés en lutte biologique doivent avoir un bon taux de reproduction, être spécifiques, avoir une bonne capacité d'adaptation et leur cycle de vie doit être synchronisé à celui du ravageur (**Weeden et al., 2007**).

Les prédateurs comme les insectes et arachnides sont ceux qui tuent et mangent plusieurs proies au cours de leur développement, car la prédation est moins spécifique que le parasitisme. Des parasitoïdes (parasites, qui vivent aux dépens d'un unique hôte, lequel meurt après l'achèvement du développement du parasitoïde), Ces organismes sont souvent privilégiés en

lutte biologique contre d'autres insectes pour leur grande mobilité, spécificité et capacité de repérage des hôtes. Néanmoins, ils possèdent également plusieurs des désavantages des prédateurs, en plus de leur action relativement lente (**Cloutier et al., 1992**).

Si l'organisme antagoniste est un microorganisme pathogène, on parle de lutte microbiologique.

L'agent pathogène auxiliaire peut être un champignon, une bactérie, un virus, plus rarement un oomycète ou un protozoaire, Les entomopathogènes sont des micro-organismes (bactéries, champignons, protozoaires, etc.) causant des maladies mortelles chez les insectes. Se multiplie dans l'hôte et cause sa mort par destruction de tissus, par septicémie, parfois par l'émission d'une substance toxique, dans Le but de créer une épizootie (épidémie affectant les animaux) chez le ravageur visé (**Weeden et al., 2007**).

2. Historique de *Metarhizium anisopliae*

Dans les années 80, le champignon *Metarhizium anisopliae* était le premier pathogène utilisé par le Russe Eli Metchinnicoff contre des insectes ravageurs des cultures, mais il note aussi la présence des spores de tailles différentes pour la même espèce, En Ukraine Il a été identifié sur la paille de céréale sous le nom *Anisopliae austria* ou il l'a nommé *Entomophthora anisopliae*. En 1883, lors d'une étude faite par Sorokin, il donne le nom de ce champignon à la muscardine verte au genre *Metarhizium*. Ainsi il est connu sous le nom de *Metarhizium anisopliae* (**Benserradj et al., 2014**).

3. Importance de *Metarhizium anisopliae* en agriculture : lutte biologique

3.1 Production de *Metarhizium anisopliae*

La commercialisation d'un agent de lutte microbien dépend bien sûr de son action pathogène, mais également de la facilité et du coût de production. Selon des conditions de croissance, la production en masse du champignon *metarhizium anisopliae* est variée, et trois types de spores peuvent être produits par le champignon, la croissance du *metarhizium anisopliae* dans un milieu solide produit des conidies aériennes. Dans un milieu liquide, il produit surtout des blastospores, des conidies submergées (**Jenkins et al., 1998**). Les blastospores sont généralement de grande taille par rapport aux conidies et ont une durée de vie plus courte que celles-ci lors de l'entreposage (**Vega et al., 2003**). Les blastospores ont une stabilité limitée et sont moins virulentes que les conidies chez les espèces *metarhizium anisopliae*. De plus, les blastospores sont plus sensibles à la dessiccation que les conidies. Si pour ça, les formulations les plus couramment utilisées sont à la base des conidies sur le terrain.

La production en milieu solide présente l'avantage qui est facile à réaliser et que les conidies produites ont tendance à être plus tolérantes à la dessiccation et plus stables que les spores produites en culture liquide, mais plusieurs contraintes techniques et économiques par exemple les problèmes de stérilisation de substrats, les problèmes du contrôle de température affectent la production du champignon en milieu solide. La fermentation liquide est donc la méthode plus praticable. Elle assure un environnement nutritionnel homogène et les facteurs environnementaux (température) sont facilement contrôlés par rapport à la fermentation solide **(Benserradj et al., 2014)**.

L'étude de **(Masoud et al., 2014)** a permis d'évaluer les meilleurs substrats de culture, et de conclure sur le meilleur rendement en spores viables obtenu sur un substrat liquide composé de mélasse de canne à sucre avec un taux de germination des spores de 99.7%, par contre , 84.7% pour un milieu pomme de terre. Pour les milieux solides, le riz (95.3% de germination) et les graines de sorgho (93.7% de germination) ont les meilleurs résultats.

La température est un paramètre important lors de la production de champignon afin d'obtenir de grandes quantités de spores et une forte virulence de celles-ci, qui doit être entre 20°C et 23°C pour que la production des conidies soit importante, le taux d'humidité influençant la production des conidies **(Benserradj et al., 2014)**.

3.2 Les toxines et le mode d'attaque :

Le champignon doit surmonter le mécanisme immunitaire de l'hôte et de proliférer quand il atteint l'hémocoel par la production des composés toxiques non enzymatiques tels que les Destruxines et les cytochalasmes, pour commencer la production d'hyphes qui circuleront à travers l'hémolymphe **(Inglis et al., 2001)**. Les toxines agissent au niveau des tissus d'insectes et entraînent différents effets. Les Destruxines dépolarisent la membrane du muscle de l'insecte en activant les canaux calcium. Ainsi la fonction des hémocytes d'insectes peut être empêchée par les DTX **(Bradfish et al., 1990)**. À partir le 3ème jour à le 5ème jour de l'infection, survient la mort de l'insecte sous des conditions optimale et le champignon secrète un antibiotique l'oosporine qui lui permet de faire la compétition avec les autres microorganismes situés dans l'appareil intestinal de l'insecte **(Inglis et al., 2001)**. Ensuite le champignon entraîne dans une phase saprophytique, La production des spores par les conidiophores qui émergent du cadavre, Le cadavre est alors couverte par un feutrage mycélien vert nommé Muscardine constitué d'hyphes et de conidiophores portant des conidies.

Le mode d'attaque : Le mode d'attaque de *Metarhizium anisopliae* peut se faire par la colonisation de l'hémocoel de l'insecte ou par toxémie qui est due à la présence excessive des toxines dans le sang de l'hôte. La toxémie aura lieu quand la dose de l'inoculum est suffisamment élevée (Ravallec et al., 1989).

3.3 Mode d'infection de *Metarhizium anisopliae* :

Généralement, les champignons entomopathogènes tuent ou réduisent la vigueur des hôtes qu'ils infectent. Ces ennemis naturels sont plus efficaces lorsque l'insecte ciblé est préalablement affaibli par un autre facteur comme un stress nutritif. Compte tenu de leur mode de transmission et de leurs besoins abiotique.

Les champignons pénètrent directe à travers la cuticule pour infecter les insectes par Contrairement aux autres microorganismes (virus, bactéries, nématodes, protozoaires) où l'infection de l'hôte découle de leur ingestion obligatoire, (Clarkson et al., 1996)(figure 4).et Une fois le champignon affecte l'insecte cible, il entame la production d'hyphes pour ce faire le champignon doit surmonter les réactions immunitaires de l'hôte.

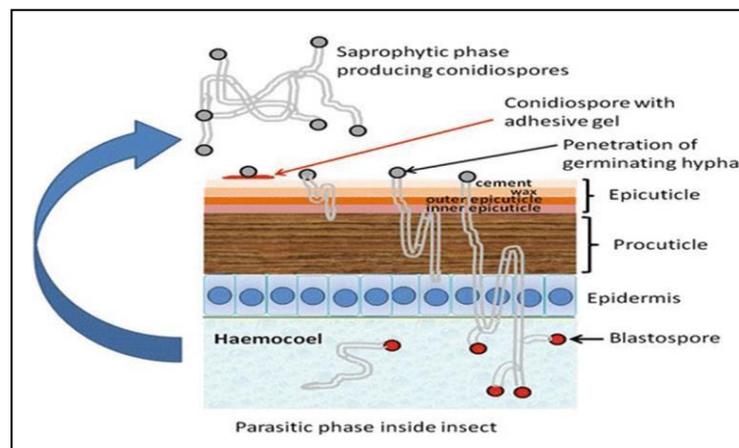


Figure 4 : Mode de pénétration des champignons entomopathogènes dans la cuticule des insectes. (Clarkson et al.,1996).

La spore, l'unité infectieuse du champignon, germe et pénètre à travers du tégument dans le cas de contact de la cuticule de l'insecte, et cette pénétration en combinant des pressions Mécanique et enzymatique (Legeretal.,1993).

Le champignon croît rapidement dans l'hémocoel. Les insectes susceptibles au champignon meurent généralement dans un délai de 3 à 10 jours. Quand l'insecte meurt, le champignon entre dans un stade hyphal, colonise les organes internes puis sporule à la surface de l'insecte.

Le cycle infectieux est généralement le même pour tous les champignons entomopathogènes. Pour Le mode d'infection des champignons entomopathogènes il se divise en quatre étapes distinctes : l'adhésion, la germination, la pénétration et la dissémination (**figure 5**)

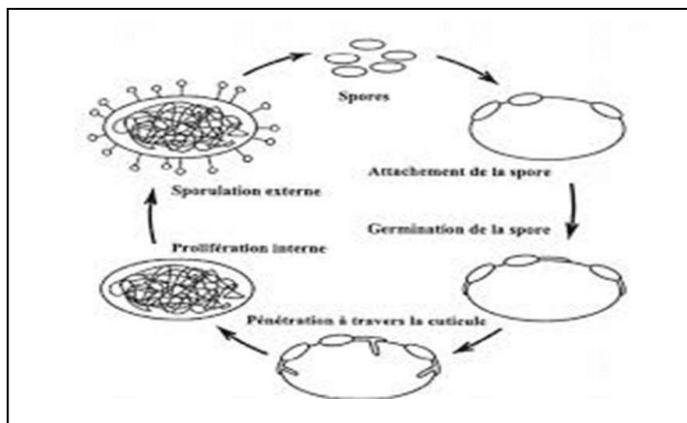


Figure 5 : Schéma du cycle biologique des champignons entomopathogène (agronomie hepia juin 2018)

La phase d'adhésion : L'adhésion est la première étape du processus d'infection. Les spores entrent en contact passivement avec les insectes à l'aide des agents naturels tels que le vent et l'eau. L'attachement des spores à la cuticule inclut des phénomènes plus actifs ; Les spores transportées mécaniquement se fixent sur la cuticule de l'insecte en produisant une couche de mucus adhésif (**Leger et al., 1989**, donc L'adhésion est déclenchée par un mécanisme de reconnaissance et de compatibilité des spores avec le tégument de l'insecte.

La phase de germination : La seconde phase d'infection est la germination. Celle-ci dépend à des conditions environnementales, telle que la température et l'humidité et aussi de l'état physiologique de l'hôte (**Butt et Becket et al., 1994**). La germination aboutit à la production d'appressoria, structures terminales servant à l'ancrage de la cuticule et favorisant la pénétration, et La valeur nutritive de la cuticule joue un rôle important pour la production d'appressoria. Le champignon puise les éléments nutritifs dans le milieu environnant. les conidies donnent naissance à un tube germinatif Sa longueur varie selon le contenu de la cuticule et ça Au niveau de la cuticule. (**Leger et al., 1989 ; Bidoshka et al., 1997**).

La phase de pénétration : La pénétration de *Metarhizium anisopliae* dans l'hôte s'effectue généralement à travers la cuticule de l'insecte, cette pénétration est assurée par la formation d'un appressorium : c'est un hyphe de pénétration qui dégrade la cuticule de l'insecte après une action enzymatique (**Bidoshka et al., 1997**). Une fois la cuticule hydrolysée des hyphes se développent dans l'hémocèle en blastopores. L'hémolymphe des insectes est complexe avec

une composition de nitrogène et de carbone, source de nutriments pour les champignons. Au niveau de l'hémolymphe le champignon secrète des toxines sous le nom de destruxine cyclodeptidase. Elle serait impliquée dans un mécanisme cellulaire bloquant le contrôle de la synthèse du calcium en provoquant une paralysie suivie de la mort (**Bidoshka et al., 1997**).

Phase de dissémination : Une fois que le champignon a franchi avec succès la cuticule et a percé l'épiderme adjacent de la cuticule, il entre dans le système circulatoire ouvert de l'insecte, l'hémocoèle. Le champignon se multiplie par la suite à l'intérieur de tous les organes de l'insecte hôte et il s'accroît sous forme de blastospores.

Il semble qu'une utilisation efficace des sucres sanguins est nécessaire pour une croissance optimale du pathogène.

3.4 L'évaluation de l'infection et les Cultures protégés par *Metarhizium anisopliae*

La réponse de l'infection peut être par le changement dans les caractéristiques des insectes en termes de poids, de forme, de taille, d'appétit, de changement, de comportement ou de la mort. Et par un essai biologique mesurée dans lequel la virulence, en exposant un nombre connu d'hôtes à un nombre connu d'agents pathogènes et en observant le nombre de morts au cours du temps (**Reichelderfer et al., 1993**). *Metarhizium anisopliae* est utilisé pratiquement sur les cultures florales, les arbres et arbustes ornementales en tant que lutte microbiologique. Ce champignon peut aussi protéger les fraisiers, les framboisiers, les pommes de terres, le maïs en affectant comme des insecticides.

3.5 Avantages de l'utilisation de *Metarhizium anisopliae*

Metarhizium anisopliae renferme une grande importance à l'heure actuelle. Cette espèce est devenue un pilier de l'agriculture à cause de sa capacité de tuer les insectes ravageurs. Le champignon *M. anisopliae* est inoffensif pour la santé humaine, en plus d'être sans danger pour l'environnement donc leur utilisation devient un facteur limitant l'emploi excessif des produits chimiques (**Faria et Wraight et al., 2001**).

Plusieurs facteurs favorisent une plus grande utilisation de *M. anisopliae* dans le futur. Il peut infecter l'hôte par ingestion ou par simple contact, contrairement aux autres agents entomopathogènes, qui doivent être ingérés pour infecter la cible. De plus, son activité après contact avec l'hôte est très rapide par rapport à celle des autres champignons entomopathogènes et on peut le conserver durant quelque temps. En outre, lors de l'application, il ne nécessite pas des outils spécifiques mais on peut répandre avec des utiles standards.

Autres avantages de l'utilisation de *Metarhizium anisopliae*, est l'augmentation des coûts sociaux résultant de l'utilisation massive des pesticides chimiques et de production des nouveaux insecticides chimiques. Les occasions d'utiliser cet entomopathogène conjointement à d'autres agents de lutte biologique et à diverses pratiques culturales et pesticides courants se sont accrues considérablement avec la découverte de nouveaux isolats plus efficaces, l'optimisation des formulations et l'amélioration des procédés d'application. Et plus, jusqu'à aujourd'hui il n'y a pas de résistance connue lorsqu'on l'applique et il n'exige pas beaucoup de temps lors de traitement.

3.6 Inconvénients de l'utilisation de *Metarhizium anisopliae*

Efficacité relative aux conditions climatiques, l'exposition trop longtemps aux rayons solaires entraîne l'inactivité de son potentiel active. Et leur Efficacité pas toujours constante d'une production à l'autre. En plus, Il faut attendre 3 à 4 jours après son application pour avoir des résultats donc l'efficacité de *metarhizium anisopliae* n'est pas immédiate, Pour cela les producteurs ont recours à d'autre produit (FAO *et al.*, 2008).

4 Facteurs affectant l'efficacité de *Metarhizium anisopliae*

4.1 Facteurs liés à la cible :

Généralement, l'efficacité de *Metarhizium anisopliae* est influence par la densité et la sensibilité de la cible. Selon la nature de l'isolat de *Metarhizium*, l'insecte révèle une sensibilité. Et si l'insecte est plus sensible, ce champignon le tue ou réduit peu à peu sa vigueur. *Metarhizium anisopliae* semble très efficace quand la densité d'insectes ciblés est très élevée. ; et plus efficace si l'insecte ciblé est influencé par d'autres facteurs comme le stress nutritif ou les conditions climatiques défavorables (exemple la température élevé).

4.2 Facteurs de l'environnement :

L'efficacité de *Metarhizium anisopliae* contre les insectes est souvent influencée par des conditions environnementales.

Tout d'abord, les rayonnements solaires ont des effets importants sur la persistance des spores fongiques entomopathogènes. A vrai dire, l'exposition à la lumière du soleil même pour quelques heures en particulier la partie d'ultraviolet du spectre (285- 315nm) peut complètement inactiver les conidies de *Metarhizium anisopliae*. La lumière peut stimuler

certaines étapes du cycle évolutif des champignons entomopathogènes cultivés in vitro ou in vivo malgré elle est nocif sur la persistance des conidies.

En outre, la température est un facteur important qui peut affecter le taux de germination, la croissance, la sporulation et la survie des champignons entomopathogènes comme *Metarhizium anisopliae*. En général, les températures supérieures à 35°C empêchent la croissance et le développement des champignons entomopathogènes. Quand la température est variée (élevées et basses) elle affecte la vitesse de l'infection des insectes par l'inhibition de la germination des spores, ce qui affecte à son tour la formation du tube germinatif et la pénétration à travers la cuticule de l'insecte (Fargues et Luz et al., 2000).

En plus, L'humidité environnementale est un paramètre très important pour la germination des conidies dans la nature. Elle affecte aussi la persistance et la survie des champignons entomopathogènes. Ces champignons exigent au moins 95 % de l'humidité relative à la surface de l'insecte afin de germer. Pour *Metarhizium anisopliae*, cette humidité doit être supérieure à 90%. Mais l'effet de cette humidité avec celui de la température sont intimement reliés d'où la tolérance du champignon à des températures extrêmes lorsqu'il y a plus d'humidité ou lorsque la condensation se produit aisément et la perte d'eau est réduite au minimum. Le vent considérablement affecte le comportement fongique modifié de manière significative l'humidité microclimatique (Benserradj et al., 2014).

Les effets de la température et de l'humidité sont intimement reliés d'où la tolérance de quelques champignons à des températures extrêmes lorsqu'il y a plus d'humidité ou lorsque la condensation se produit aisément et la perte d'eau est réduite au minimum.

Enfin, l'efficacité de Metarhizium anisopliae dépend du sol ; les champignons dans le sol sont protégés contre la dessiccation, le rayonnement ultraviolet et les températures extrêmes. Donc, la simple présence des microflore dans le sol peut influencer l'efficacité des entomopathogènes car les microflore protègent *Metarhizium anisopliae* contre la température élevée ou le rayonnement. Connaître l'écologie des champignons entomopathogènes dans l'environnement plus précisément le sol est alors nécessaire pour que son application soit correcte au champignon.

Chapitre 3 : Analyse d'article

See discussions, stats, and author profiles for this publication at: <https://www.researchgate.net/publication/329968924>

Histopathologie et effet de *Metarhizium anisopliae* sur les stades larvaires du criquet sénégalais (*Oedaleus senegalensis*)

Article · January 2018

CITATIONS

0

READS

264

6 authors, including:



Mamour Toure

Gaston Berger University, Saint-Louis

23 PUBLICATIONS 21 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)



Amadou Fall

Cheikh Anta Diop University, Dakar

7 PUBLICATIONS 4 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)



Fawrou Seye

Gaston Berger University, Saint-Louis

21 PUBLICATIONS 166 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)



Mady Ndiaye

Cheikh Anta Diop University, Dakar

36 PUBLICATIONS 584 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)

Some of the authors of this publication are also working on these related projects:



Mosquitoes control [View project](#)



Lutte biologique contre les insectes ravageurs de cultures [View project](#)

Histopathologie et effet de *Metarhizium anisopliae* sur les stades larvaires du criquet sénégalais (*Oedaleus senegalensis*)

Mamour TOURE^{1*}, Amadou FALL¹, Fawrou SEYE², Raymond Demba NDIONE¹,
Thierno Seydou BADIANE¹ et Mady NDIAYE¹

¹ Université Cheikh Anta Diop de Dakar, Faculté des Sciences et Techniques, Département de Biologie Animale, Laboratoire Biologie de la Reproduction, BP 5005 Dakar Fann, Sénégal

² Université Gaston Berger de Saint Louis, UFR Sciences de la Santé

* Correspondance, courriel : touresnfst@yahoo.fr

Résumé

Cette étude porte sur le criquet sénégalais *Oedaleus senegalensis* (Krauss, 1877) (Orthoptère, Acrididea) dont des larves sont capturées dans l'animalerie et dans le jardin botanique de la Faculté des Sciences et Techniques et sur trois souches locales de champignon deutéromycète *Metarhizium anisopliae* (Metschikoff, Sorokin). Nous avons effectué six traitements avec ces trois souches. Une microseringue remplie de la formulation est piquée sous le pronotum pour infecter les larves. Elles sont placées dans des cages et sont nourries quotidiennement avec de l'herbe. Le constat des résultats se fait chaque jour pendant la matinée. Ces souches ont entraîné chacune une mortalité de 100 % des larves au bout de 14 jours environ. Les insectes morts ont changé complètement de couleur avec une cuticule très sèche due à l'effet du champignon. Le temps létal pour 50 % des insectes traités (LT50) est compris entre 9 et 11 jours. Les parties externes de l'insecte sont aussi atteintes. La sporulation observée sur les larves mortes joue un rôle important pour la rémanence du produit. Les coupes histologiques montrent que les organes internes sont attaqués différemment par le biopesticide.

Mots-clés : *criquet sénégalais, Metarhizium anisopliae, efficacité, souche.*

Abstract

Histopathology and effect of *Metarhizium anisopliae* on the larval stages of the senegalese grasshopper (*Oedaleus senegalensis*)

Survey is achieved on senegalese grasshopper *Oedaleus senegalensis* (Krauss, 1877) of which larvas are captured in the reserve of animals and in the botanical garden of Sciences and Techniques Faculty and three local strains of *M. anisopliae*. We did six treatments with the strains. A microsyringe permits to infect the larvas near the thorax. These strains entailed a mortality of 100 % of the larvas on 14 days about. The lethal time for 50 % of insects treated (LT50) is between 9 days and 11 days. The dead insects changed color completely with a very dry cuticle due to effect of hyphomycete. The external parts of the insects are also reached. Sporulation observed on dead larvas has an important role in remanence (residual induction) of product. The histological cuts show that internal organs are attacked differently by the biologic pesticide.

Keywords : *senegalese grasshopper, Metarhizium anisopliae, efficiency, strain.*

1. Introduction

Depuis des millénaires l'homme est confronté aux pullulations des criquets pèlerin et sénégalais. Ces derniers compromettent l'équilibre alimentaire souvent fragile des populations surtout celles d'Afrique. Dans la lutte antiacridienne plusieurs méthodes sont utilisées. La lutte chimique est la plus employée et offre beaucoup plus de résultats. Durant la recrudescence acridienne de 2004-2005 qui a touché 16 pays la plupart en Afrique du nord-ouest et au Sahel, quelques 12,8 millions d'hectares infestés ont été traités à l'aide de pesticides chimiques [1]. Cependant cette méthode est entachée de conséquences très néfastes sur les écosystèmes naturels et par rétroaction sur l'homme lui-même. L'intérêt porté aux entomopathogènes dans la lutte biologique contre ces ravageurs de culture est vieux de plus d'un siècle [2]. Après la grande invasion de 1986 à 1989, des souches virulentes de *Metharizium anisopliae* ((Metschikoff) Sorokin) (Champignon Deutéromycète) sur les criquets ravageurs et moins offensives à l'environnement que les produits conventionnels ont donné de bons résultats [3]. Sous la formulation liquide les spores de *M. anisopliae* infectent principalement leur hôte par contact suite à une pénétration cuticulaire. [2], trouvent que ce produit assure une longue protection des zones traitées grâce à leur rémanence. Ainsi, une bonne maîtrise de la pathogénicité et des techniques d'application de *M. anisopliae* permet d'isoler des souches capables de surmonter les contraintes climatiques. Dans le présent travail, la sensibilité de larves de criquet sénégalais *Dedaleus senegalensis* (Krauss, 1877) (Orthoptère, Acrididea) à l'entomopathogène a été étudiée. L'effet sur les différents organes a été évalué. Nous avons insisté sur l'histopathologie car beaucoup d'auteurs ne s'intéressent pas sur ce domaine qui s'avère pourtant aussi important. La sélection des organes cibles contribue à déterminer la meilleure souche.

2. Matériel et méthodes

2-1. Matériel

Le matériel biologique utilisé est constitué par du criquet sénégalais *D. senegalensis* (Krauss, 1877) (Orthoptère, Acrididea) et d'un biopesticide *M. anisopliae* ((Metschikoff) Sorokin) qui est un champignon deutéromycète. Nous avons également utilisé des produits chimiques pour faire de l'histologie (boin alcoolique, carnoy II, alcool, paraffine), et des produits pour faire des coupes semi-fines (glutaralaldéhyde, épon, résine) sont également utilisés. Le matériel de laboratoire est constitué de : centrifugeuse, réfrigérateur, étuve, microtome manuel, microtome automatique Ultracut E. Un microscope Motic relié à l'ordinateur est aussi utilisé.

2-2. Méthode

2-2-1. Préparation du biopesticide

Les trois souches de *M. anisopliae* sont des souches locales isolées dans le pays et ont été obtenues grâce à la collaboration avec le laboratoire de zoologie agricole de la Direction de la protection des végétaux. Les spores sont ensuite cultivées dans de l'agar pour une multiplication massive. Pour voir l'aspect morphologique de ces souches, nous avons fait des coupes semi-fines de 0,75 μm d'épaisseur. L'observation est faite au microscope photonique Motic relié à l'ordinateur. Une culture de spore est réalisée dans de l'eau pour voir le taux de germination.

2-2-2. Capture des larves et traitement

Les larves du criquet sénégalais sont capturées dans l'animalerie et dans le jardin botanique grâce à un filet à insecte. Nous les identifions au laboratoire à l'aide d'une clef. Les larves au nombre de 240 de stade 3 et de stade 4 sélectionnées sont placées dans la chambre froide du réfrigérateur pendant 4 à 5 mn pour les immobiliser. Les spores sont formulées dans de l'eau distillée. L'inoculation de 5 µL du mélange soit une concentration de $5 \cdot 10^5$ spores viables est faite sous le pronotum. A la fin du traitement les larves sont placées dans des cages. Des insectes non traités ont servi de témoin. L'éclairage est d'environ 12 à 13 heures par jour comme dans les conditions naturelles. La température varie entre 22 et 26 ° et l'humidité se situe entre 60 et 95 %. Les individus sont nourris quotidiennement avec de l'herbe et de la poudre de pain. Le constat des résultats se fait chaque jour pendant la matinée.

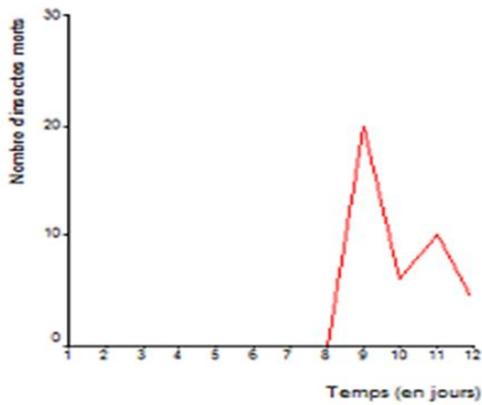
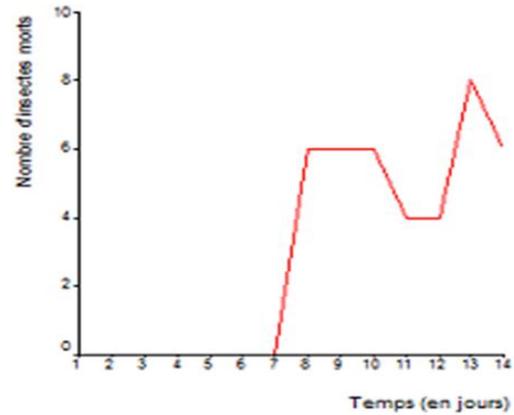
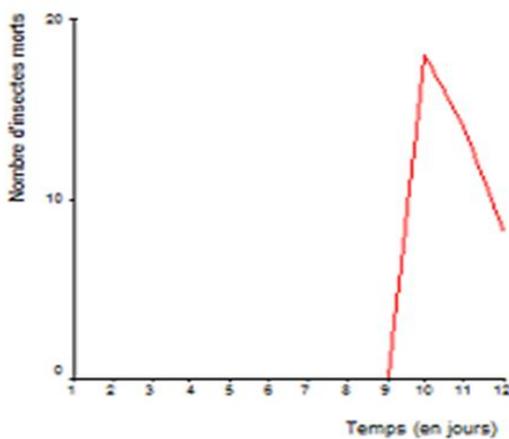
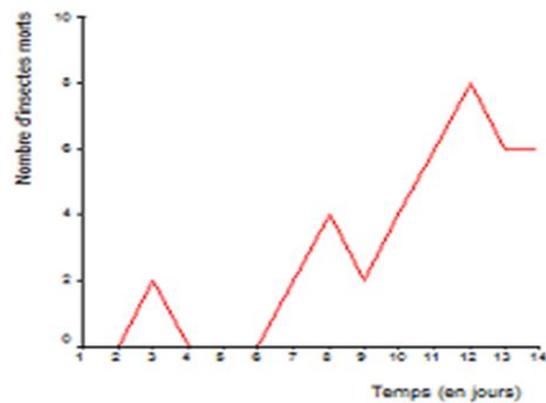
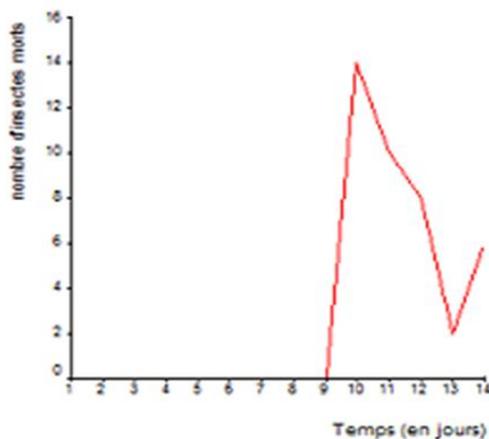
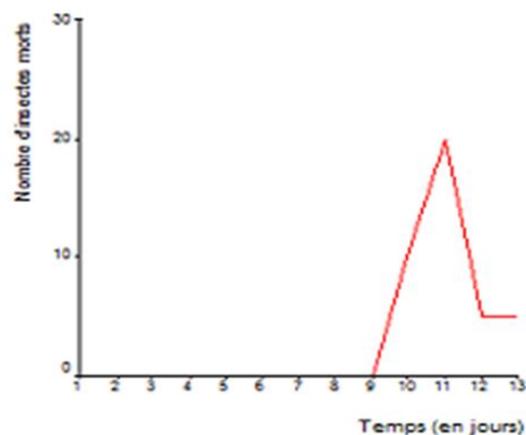
2-2-3. Étude histopathologique

Les insectes morts sont fixés dans une solution de boin alcoolique et de carnoy II. Le ramollissement de la cuticule est fait par une solution de Marc André, ensuite la déshydratation est réalisée à l'aide de bains d'alcool croissante. L'imprégnation est faite avec la butiparaffine et l'inclusion dans la paraffine. Les blocs ainsi obtenus sont taillés et coupés au microtome pour une épaisseur de 7 µm. Les lames sont colorées au Trichome de Masson puis sont observées au microscope photonique Motic relié à l'ordinateur et des photos sont prises avec l'ordinateur.

3. Résultats

3-1. Efficacité des souches

La mortalité des insectes avec la souche 1 commence à partir du 9^{ème} jour après le traitement. Pour cette manipulation les insectes sont complètement tués au 12^{ème} jour. Le nombre d'insectes morts est plus élevé au 9^{ème} jour (**Figure 1**). Pour le deuxième traitement le temps écoulé pour que l'ensemble des insectes soit tué est plus long que le premier traitement avec 14 jours. La mortalité des insectes est constante durant les trois premiers jours (**Figure 2**). Pour ces traitements les temps létaux pour 50 % des insectes (temps qui s'écoule pour que la moitié des insectes traités soient tués TL50) sont de 9 jours et de 10 jours respectivement pour le premier et le deuxième traitement. Avec la souche 2, les insectes commencent à mourir au 10^{ème} jour. Cette mortalité des larves se poursuit et prend fin au 12^{ème} jour. Le plus grand nombre d'insectes morts est enregistré au premier jour de mortalité, coïncidant avec le 10^{ème} jour après le traitement (**Figure 3**). Au deuxième traitement déjà au 3^{ème} jour on commence à avoir des insectes morts. La mortalité maximale est observée au 12^{ème} jour et se termine au 14^{ème} jour (**Figure 4**). Le TL50 des insectes est de 10 jours pour le premier traitement et 11 jours pour le deuxième. Les insectes commencent à mourir avec la souche 3 à partir du 10^{ème} jour et la mortalité se poursuit jusqu'au 14^{ème} jour (**Figure 5**). Le nombre d'insecte mort est plus élevé au 11^{ème} jour après le traitement et un jour après le début de mortalité (**Figure 6**). Le TL50 est de 10 jours pour le premier traitement et de 11 jours pour le deuxième traitement. Les témoins n'ont montré aucune mortalité durant tout le temps de l'expérience.

Figure 1 : Mortalité souche 1, 1^{er} traitementFigure 2 : Mortalité souche 1, 2^{me} traitementFigure 3 : Mortalité souche 2, 1^{er} traitementFigure 4 : Mortalité souche 2, 2^{me} traitementFigure 5 : Mortalité souche 3, 1^{er} traitementFigure 6 : Mortalité souche 3, 2^{me} traitement

3-2. Coupes histopathologiques

Les coupes montrent des spores avec un aspect et des formes différents. Les formes en bâtonnets sont plus nombreuses que les formes rondes. La taille des spores est aussi variable. (Figure 7). Les filaments sont allongés avec des sens d'orientation très divers dans le milieu de culture (Figure 8). Le filament mycélien passe sous le pronotum pour s'allonger ensuite sur le corps de l'insecte grâce aux phénomènes de thigmotropisme. Le pronotum est soulevé par la pression des filaments du champignon qui a gagné tout le

milieu intérieur de l'insecte. La cuticule de l'insecte est par ailleurs devenue très sèche (**Figure 9**). Les insectes sont neutralisés par le champignon avec des modifications importantes ; les antennes sont atteintes, les pattes perdent leur équilibre, l'organisme est sans motricité avant la mort (**Figure 10**). Les coupes histologiques montrent une destruction de la paroi du tube digestif et les filaments à l'intérieur de l'insecte, prennent une position longitudinale ou verticale (**Figure 13**). On voit aussi des tubes de Malpighi qui présentent des lésions et des ceaca gastriques qui sont détruits (**Figure 11**). Des granulomes (amas pseudotissulaires entourant le filament ou la spore) se forment à l'intérieur du muscle ou dans l'espace intermusculaire. Le système nerveux céphalique des insectes a été aussi affecté par le champignon. La diminution de taille est visible et très nette (**Figure 12**).

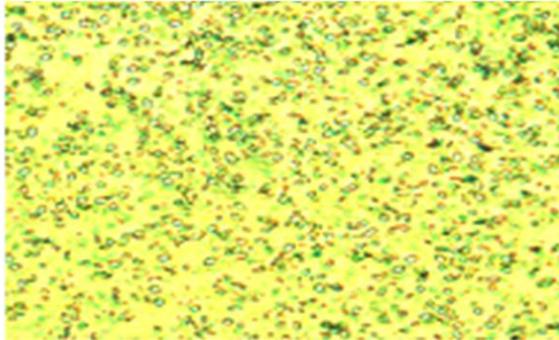


Figure 7 : Spores de champignon coupées $\times 400$



Figure 8 : *Metarhizium anisopliae* sur grain de riz
F : filament, Gr : grain de riz. $\times 40$

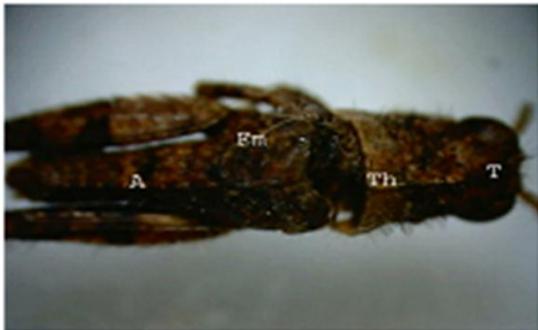


Figure 9 : *Oedaleus senegalensis* infecté



Figure 10 : *Oedaleus senegalensis* infecté avec cuticule décolorée

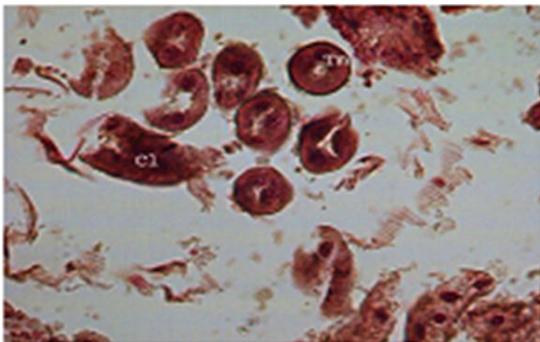


Figure 11 : Coupe de l'insecte, Tm : tube de malpighi

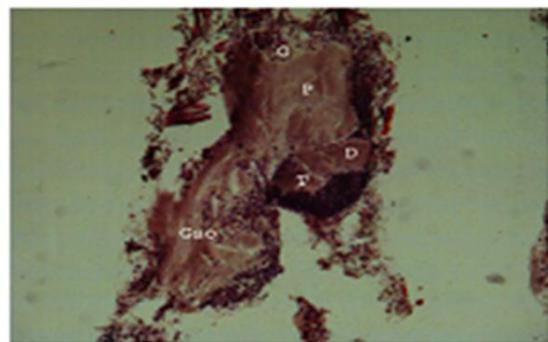


Figure 12 : Système nerveux céphalique de l'insecte. Gso : ganglion sous œsophagien, D : deutocérébron, P : protocérébron, T : tritocérébron, O : œil

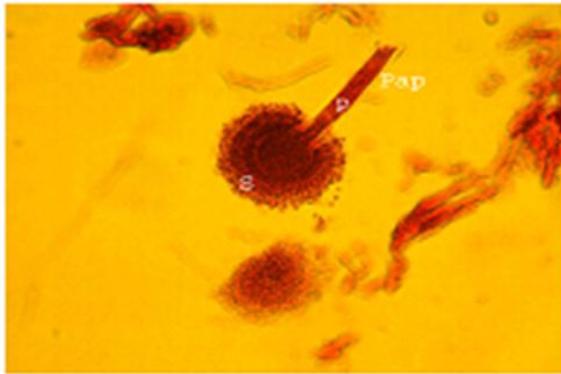


Figure 13 : Coupe *Metarhizium anisopliae*. Pap : paroi du pédicelle, P : pédicelle, S : spore

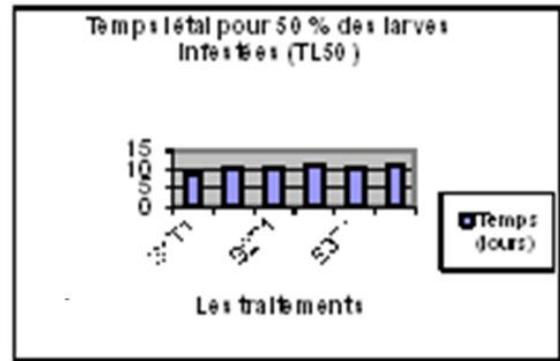


Figure 14 : Temps Létal pour 50 % des insectes

4. Discussion

Les températures du laboratoire révèlent un fort pouvoir d'infection et de germination du champignon montrant une sporulation et des filaments longs. Par ailleurs cette gamme de température confirme les travaux de [4] qui ont trouvé des optimums thermiques de 25 et 32 °C pour deux souches de *M. anisopliae*. [5] trouve les mêmes résultats que les notre avec des températures variant entre 25 et 32 °C. Cependant nos températures sont différentes avec la température optimale de 15 °C qu'a trouvé [6] pour la germination de *M. anisopliae*. Les travaux sur terrain de [7 - 10] révèlent des résultats similaires à ce que nous avons avec une température de 25 °C. Toujours en travaillant sur une gamme de température allant de 5 à 50 °C, [11] trouvent que les températures de 25 à 32 °C sont meilleures pour une bonne germination de l'hyphomycète *M. anisopliae*. De toutes ces observations on peut dire que la température est un facteur important dans la pathogénicité du champignon. L'humidité constitue aussi un facteur déterminant quant à l'attaque du champignon sur les larves. Les humidités enregistrées lors des manipulations ont une influence positive sur la mortalité des larves. Ainsi beaucoup d'auteurs ont travaillé sur l'humidité et le champignon. On peut citer [6, 10, 12 - 15]. Ces auteurs trouvent des humidités qui corroborent nos résultats. Par contre une grande différence est notée avec les travaux de [7, 16, 17] qui ont enregistré sur le terrain une humidité relative de 23 % alors qu'on a les mêmes résultats.

Le début de mortalité se situe entre 8 et 10 jours après le traitement sauf au deuxième traitement avec la souche 2 dont des insectes sont trouvés morts au 3^{ème} jour après le traitement. Vu la différence avec les autres traitements, nous pensons que cette mortalité n'est pas due à l'effet du champignon mais à d'autres facteurs tel que la fatigue, le stress. Nos résultats sont similaires avec ceux de [18 - 22] qui ont enregistré des insectes morts au 8^{ème} jour après avoir traité des adultes de *S. gregaria* avec du *M. anisopliae*. [23] en faisant une application à grande échelle dit qu'il est impossible de voir sur le terrain des insectes morts du champignon avant les 7 jours après traitement. La mortalité atteint son maximum au jour où le mycélium est au maximum de sa croissance. Pour évaluer l'efficacité des souches nous avons cherché le temps létal pour 50 % des insectes pour chaque traitement. Ce temps varie de 9 à 11 jours (**Figure 16**). Le test d'ANOVA appliqué aux TL50 des trois souches révèle que les différences observées ne sont pas significatives donc les souches ont les mêmes effets. (F observé = 5,79 est supérieur à F calculé = 0,6). [3] en travaillant sur des larves de stade 3 (L3) et des souches de *M. anisopliae* trouvent un TL 50 variant entre 4,3 et 10,7 jours (**Figure 14**). Prior (1997) rapporte que la dose utilisée par LUBILOSA (Lutte Biologique contre les Locustes et les SAuteriaux) et appliquée sur des larves de *O. senegalensis* tue 50 % des insectes au bout de 5 à 5 jours. Bateman *et al.* trouvent une moyenne du TL50 des 26 souches testées de 4,4 jours

(donnée non publiée citée par [24]). Si beaucoup de travaux sont menés pour étudier la toxicité générale des biopesticides, on constate que l'on ne se préoccupe guère de la pathogénicité. Le changement de couleur intervient après que l'insecte soit neutralisé. Ceci s'explique par l'action combinée des réactions de l'insecte et des effets du champignon. [25] isolent la substance active de dégradation de la cuticule dans le *M. anisopliae*. Les antennes atteintes par l'infection entraînent une perte du sens de l'orientation et l'animal finira par mourir. Les pattes touchées par le champignon montrent des anomalies et peuvent disparaître entraînant une difficulté pour la prise de nourriture. La prise de l'organisme par *M. anisopliae* avant la mort de l'insecte se manifeste par des événements distincts comme dans le cas des insecticides chimiques. Sandoz *et al.* découvrent quatre phases chez *Locusta migratoria migratorioides* (Reiche et Fairmaire 1850) traité avec la lindiane : une phase prodromique, une phase choréo-ataxique, une phase clonique et le dernier stade psérique ou paralytique (cité par [26]). Cependant, nos observations nous ont permis de constater une phase où l'insecte repose sur le dos et est incapable de se relever, les appendices et les segments abdominaux sont animés de mouvements convulsifs. Une deuxième phase où tous les muscles sont tétanisés et paralysés suivie de la mort de l'insecte.

Ces phases correspondent respectivement aux deux dernières phases de Sandoz *et al.* Les symptômes d'un criquet atteint par *Beauveria tenella* (Deher.) Siem) sont décrits par [27, 28]. La structure des apodèmes est intéressante, ils jouent un rôle important dans la défense de l'organisme par la formation de granulomes. L'intestin montre des troubles concernant le fonctionnement et des troubles conduisant à la formation de hernies épithéliales. Ces dernières sont l'indice d'un affaiblissement de la lame basale. Les troubles du fonctionnement sont sensibles à la diversité des traitements effectués. La destruction des tubes de Malpighi empêche l'élimination des déchets et par conséquent l'insecte meurt par accumulation de déchets. Le système nerveux atteint empêche la reproduction des insectes, donc le champignon peut retarder ou empêcher une génération tout entière de se construire. La sporulation est décrite par de nombreux auteurs : [7, 14, 28, 30, 31] mais celle observée à l'intérieur de l'insecte n'est mentionnée par aucun. Cette sporulation découle d'une prise de la biologie de l'insecte. La production des spores permet la protection de longue durée de la zone traitée. Ainsi, il n'est pas nécessaire de traiter à nouveau. D'autre part, la sporulation indique l'effet biologique du champignon et son absence indique sa disparition suite à sa dégradation.

Références

- [1] - N. GRAAFF, Une arme respectueuse de l'environnement permet de lutter contre les acridiens. <http://www.fao.org/newsroom/fr/news/2005/103849/index.html>, (2005)
- [2] - C. PRIOR, R. J. MILNER, G. L. BAKER, and G. H. S. HOOPER, Development of a mycoinsecticide for the Australian plague locust: New Strategies in Locust Control, Birkhäuser Verlag, Basel, (1997) 177 - 183
- [3] - G. ZIMMERMANN, B. ZELAZNY, R. KLEESPIES & M. WELLING, Biological control of african locust by entomopathogenic microorganisms. New Trends in Locust control, (1994) 127 - 138
- [4] - C. M. H. KANE & E. H. B. L. SAKHO, Effets de *Metarhizium flavoviride* (Deutéromycète, Hyphomycètes) sur *Schistocerca gregaria* (Forskäl, 1775) (Orthoptère Acrididea). Projet Lutte Biologique et intégrée contre les acridiens GTZ. Sst, (2000)
- [5] - A. OUEDRAOGO, Conditions d'infection des acridiens par l'hyphomycète entomopathogène, *Metarhizium*, et variabilité de la tolérance aux contraintes climatiques des isolats fongiques candidats à la lutte anti-acridienne. Mémoire thèse de doctorat es sciences, Université de Paris XI, Orsay (France), (1996)
- [6] - T. E. STATHERS, D. MOORE & C. PRIOR, The effect of Different Temperatures on the Viability of *Metarhizium flavoviride* Conidia Stored in Vegetable and Mineral Oils. *Journal of invertebrate pathology*, 62 (2) (1993) 111 - 115

- [7] - E. M. O. TALEB & A. DIALLO, Field Demonstration of the use of *Metarhizium anisopliae* for Desert Locust Control Using the Release-Spray-Method. [www.fao.org.](http://www.fao.org/) / NEWS / GLOBAL / LOCUSTS, (2001)
- [8] - R. B. LOPES, D. A. SOUZA, L. F. N. ROCHA, C. MONTALVA, C. LUZ, R. A. HUMBER, M. FARIA, *Metarhizium alvesii* sp. nov.: A new member of the *Metarhizium anisopliae* species complex. *Journal of Invertebrate Pathology*, Vol. 17, (2017) 0114 - 0137
- [9] - D. G. P. OLIVEIRA, R. B. LOPES, J. M. REZENDE, I. J. DELALIBERA, Increased tolerance of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* conidia to high temperature provided by oil-based formulations. *Journal of Invertebrate Pathology*, Vol. 16, (2017) 0131 - 0150
- [10] - C. G. ATHANASSIOU, N. G. KAVALLIERATOS, RUMBOS C. I., D. C. KONTODIMAS, Influence of Temperature and Relative Humidity on the Insecticidal Efficacy of *Metarhizium anisopliae* against Larvae of *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera : Pyralidae) on Wheat. *Journal of Invertebrate Pathology*, Vol. 17 (2017) 093 - 0114
- [11] - D. STEPHAN, M. WELLING & G. ZIMMERMAN, Locust control with *Metarhizium favouride*: new approaches in the development of a biopreparation based on blastospores. *New Strategies in Locust Control*, (1997) 151 - 158
- [12] - C. LOMER, Phase 3 final report- Lubillosa- Biological and Grasshopper Control Project. CABI, IITA, Cotonou, Benin, (1999) 73
- [13] - J. H. HAN, B. R. JIN, J. J. KIM, S. Y. LEE, Virulence of Entomopathogenic Fungi *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces fumosoroseus* for the Microbial Control of *Spodoptera exigua*. *Mycobiology*, 42 (4) (2014) 385 - 390
- [14] - D. MENT, G. GINDIN, I. GLAZER, S. PERL, D. ELAD, M. SAMISH, The effect of temperature and relative humidity on the formation of *Metarhizium anisopliae* chlamydospores in tick eggs. *Fungal Biology*., 114 (1) (2010) 49 - 56
- [15] - M. LEKIMME, C. FOCANT, F. FARNIR, B. MIGNON, B. LOSSON, Pathogenicity and thermotolerance of entomopathogenic fungi for the control of the scab mite, *Psoroptes ovis*. *Exp Appl Acarol.*, 46 (4) (2008) 95 - 104
- [16] - BROOKS A. J., M. A. DE MURO, E. BURREE, D. MOORE, M. A. TAYLOR, R. WALL, Growth and pathogenicity of isolates of the fungus *Metarhizium anisopliae* against the parasitic mite, *Psoroptes ovis*: effects of temperature and formulation. *Pest Manag Sci.*, 60 (10) (2004) 029 - 043
- [17] - M. M. EL-SHAZLY, M. M. SOLIMAN, A ZAYED, Seasonal abundance, number of annual generations, and effect of an entomopathogenic fungus on *Phlebotomus papatasi* (Diptera : Psychodidae). *Environ Entomol.*, 41 (1) (2012) 11 - 29
- [18] - H. WILPS, O. NASSEH, S. KRALL & O. KABO, Lutte contre les *Shistocerca gregaria* Adultes au Moyen de Nouvelles Préparations et Méthodes. Form Protect Vegetaux UCTR/PV, (1992)
- [19] - R. PEVELING, S. ATTIGNON, J LANGEWALD & Z. OUAMBAMA, An assesment of the impact of biological and chemical grasshopper control agent on ground – welling arthropods in Niger, based on presence/absence sampling. *Crop Protection*, 18 (3) (1999) 323 - 339
- [20] - V. KRYUKOV, O. YAROSLAVTSEVA, M. TYURIN, Y. AKHANAEV, E. ELISAPHENKO, T. C. WEN, O. TOMILOVA, Y. TOKAREV, V. GLUPOV, Ecological preferences of *Metarhizium* spp. from Russia and neighboring territories and their activity against Colorado potato beetle larvae. *Journal of Invertebrate Pathology*, Vol. 17, (2017) 001 - 007
- [21] - K. V. Y. RYUKOV, O. N. YAROSLAVTSEVA, M. M. WHITTEN, M. V. TYURIN, K. J. FICKEN, C. GREIG, N. R. MELO, V. V. GLUPOV, I. M. DUBOVSKIY, T. M. BUTT, Fungal infection dynamics in response to temperature in the lepidopteran insect *Galleria mellonella*. *Insect Sci.*, Vol. 10, (2016)
- [22] - L. P. BARRETO, C. LUZ, G. M. MASCARIN, D. W. ROBERTS, W. ARRUDA, É. K. FERNANDES, Effect of heat stress and oil formulation on conidial germination of *Metarhizium anisopliae* s.s. on tick cuticle and

- artificial medium. *Journal of Invertebrate Pathology*, Vol. 16, (2016) 094 - 103
- [23] - R. BATEMAN & T. MATTHEW, Pathogen application against locust and grasshoppers: insecticide or biological control. *Outlook on Agriculture*, 27 (1) (1998) 16 - 21
- [24] - R. G. KLEESPIES, A. M. HUGER & D. STEPHAN, Diagnosis and pathology of diseases from locusts and other orthopterans. GTZ (Eschborn, Germany) and BBA (Darmstadt, Germany), (2000) 43
- [25] - F. M. FREIMOSER, S. SCREEN, BAGGASAVITA, GANGAU & S. R. J.LEGER. Expressed sequence tag (EST) analysis of two subspecies of *Metarhizium anisopliae* reveals a plethora of secreted proteins with potential activity in insect hosts. *Microbiology*, 49 (1) (2003) 239 - 247
- [26] - A. V. LATCHININSKY & M. H. L. LUONG. Le criquet marocain *Dociostaurus maroccanus* (Thunberg, 1815), dans la partie orientale de son aire de distribution. *Presse de l'imprimerie DEHAN*, (1992) 95 - 114 p.
- [27] - A. A. NOURZHANOV & A. V. LATCHINININSKY, Les micro-organismes pathogènes des acridiens grégariaptés en Ouzbékistan.-IN : SHUMAKV E. M. (Ed. Sc.), (1987)
- [28] - C. HERNANDEZ-DOMINGUEZ, A. W. GUZMAN-FRANCO, M. G. CARRILLO-BENITEZ, R. ALATORRE-ROSAS, E. RODRIGUEZ-LEYVA, J. A. VILLANUEVA-JIMENEZ, Specific Diversity of *Metarhizium* Isolates Infecting *Aeneolamia* spp. (Hemiptera: Cercopidae) in Sugarcane Plantations. *Neotrop Entomol.*, 45 (1) (2016) 80 - 87
- [29] - R. M. OUEDRAOGO, M. CUSSON, M. S. GOEETTEL & J. BRODEUR, *Inhibition of fungal growth in thermoregulating locust, Locusta migratoria, infected by the fungus Metarhizium anisopliae var acridum.* *Journal of Invertebrate pathology*, 82 (2) (2003) 103 - 109
- [30] - B. G. EVANS, K. S. JORDAN, M. BROWNBIDGE, R. H. HALLETT, Effect of Temperature and Host Life Stage on Efficacy of Soil Entomopathogens Against the Swede Midge (Diptera : Cecidomyiidae). *J Econ Entomol.*, (2) (2015) 473 - 83
- [31] - Q. MA, K. JIN, G. PENG, Y. XIA, An ENA ATPase, MaENA1, of *Metarhizium acridum* influences the Na(+)-, thermo- and UV-tolerances of conidia and is involved in multiple mechanisms of stress tolerance. *Fungal Genet Biol.*, (83) (2015) 68 - 77

Titre de l'article : Histopathologie et effet de *Metarhizium anisopliae* sur les stades larvaires du criquet sénégalais (*Oedaleus senegalensis*).

Les auteurs : Mamour Toure, Amadou Fall, Fawrou Seye et Mady Ndiaye

1. Matériel et méthode

1.1 Matériel

Le matériel biologique utilisé est constitué par du criquet sénégalais *O. senegalensis* (Orthoptère, Acrididea) et d'un biopesticide *M. anisopliae* qui est un champignon deutéromycète. Nous avons également utilisé des produits chimiques pour faire de l'histologie (boin alcoolique, carnoy II, alcool, paraffine), et des produits pour faire des coupes semi-fines (glutaralaldéhyde, épon, résine) sont également utilisés. Le matériel de laboratoire est constitué de : centrifugeuse, réfrigérateur, étuve, microtome manuel, microtome automatique Ultracut E. Un microscope Motic relié à l'ordinateur est aussi utilisé.

1.2 Méthode

1.2.1 Préparation du biopesticide

Les trois souches de *M. anisopliae* sont des souches locales isolées dans le pays et ont été obtenues grâce à la collaboration avec le laboratoire de zoologie agricole de la Direction de la protection des végétaux. Les spores sont ensuite cultivées dans de l'agar pour une multiplication massive. Pour voir l'aspect morphologique de ces souches, Mamour, Amadou et Fawrou et Mady faits des coupes semi-fines de 0,75 μm d'épaisseur. L'observation est faite au microscope photonique Motic relié à l'ordinateur. Une culture de spore est réalisée dans de l'eau pour voir le taux de germination.

1.2.2 Capture des larves et traitement

Les larves du criquet sénégalais sont capturées dans l'animalerie et dans le jardin botanique grâce à un filet à insecte. Ils ont les identifiées au laboratoire à l'aide d'une clef. Les larves au nombre de 240 de stade 3 et de stade 4 sélectionnées sont placées dans la chambre froide du réfrigérateur pendant 4 à 5 mn pour les immobiliser. Les spores sont formulées dans de l'eau distillée. L'inoculation de 5 μL du mélange soit une concentration de 5×10^5 spores viables est faite sous le pronotum. A la fin du traitement les larves sont placées dans des cages. Des insectes non traités ont servi de témoin. L'éclairage est d'environ 12 à 13 heures par jour comme dans les conditions naturelles. La température varie entre 22 et 26 ° et l'humidité se

situé entre 60 et 95 %. Les individus sont nourris quotidiennement avec de l'herbe et de la poudre de pain. Le constat des résultats se fait chaque jour pendant la matinée.

1.2.3 Étude histopathologique

Les insectes morts sont fixés dans une solution de boin alcoolique et de carnoy II. Le ramollissement de la cuticule est fait par une solution de Marc André, ensuite la déshydratation est réalisée à l'aide de bains d'alcool croissante. L'imprégnation est faite avec la butiparaffine et l'inclusion dans la paraffine. Les blocs ainsi obtenus sont taillés et coupés au microtome pour une épaisseur de 7 μm . Les lames sont colorées au Trichome de Masson puis sont observées au microscope photonique relié à l'ordinateur et des photos sont prises avec l'ordinateur.

2. Résultats

2.1 Efficacité des souches

La mortalité des insectes avec la souche 1 commence à partir du 9^{ème} jour après le traitement. Pour cette manipulation les insectes sont complètement tués au 12^{ème} jour. Le nombre d'insectes morts est plus élevé au 9^{ème} jour (Figure n°6). Pour le deuxième traitement le temps écoulé pour que l'ensemble des insectes soit tué est plus long que le premier traitement avec 14 jours. La mortalité des insectes est constante durant les trois premiers jours (Figure n°7). Pour ces traitements les temps létaux pour 50 % des insectes (temps qui s'écoule pour que la moitié des insectes traités soient tués TL50) sont de 9 jours et de 10 jours respectivement pour le premier et le deuxième traitement. Avec la souche 2, les insectes commencent à mourir au 10^{ème} jour. Cette mortalité des larves se poursuit et prend fin au 12^{ème} jour. Le plus grand nombre d'insectes morts est enregistré au premier jour de mortalité, coïncidant avec le 10^{ème} jour après le traitement (Figure n°8). Au deuxième traitement déjà au 3^{ème} jour on commence à avoir des insectes morts. La mortalité maximale est observée au 12^{ème} jour et se termine au 14^{ème} jour (Figure n°9). Le TL50 des insectes est de 10 jours pour le premier traitement et 11 jours pour le deuxième. Les insectes commencent à mourir avec la souche 3 à partir du 10^{ème} jour et la mortalité se poursuit jusqu'au 14^{ème} jour (Figure n°10). Le nombre d'insecte mort est plus élevé au 11^{ème} jour après le traitement et un jour après le début de mortalité (Figure n°11). Le TL50 est de 10 jours pour le premier traitement et de 11 jours pour le deuxième traitement.

Les témoins n'ont montré aucune mortalité durant tout le temps de l'expérience.

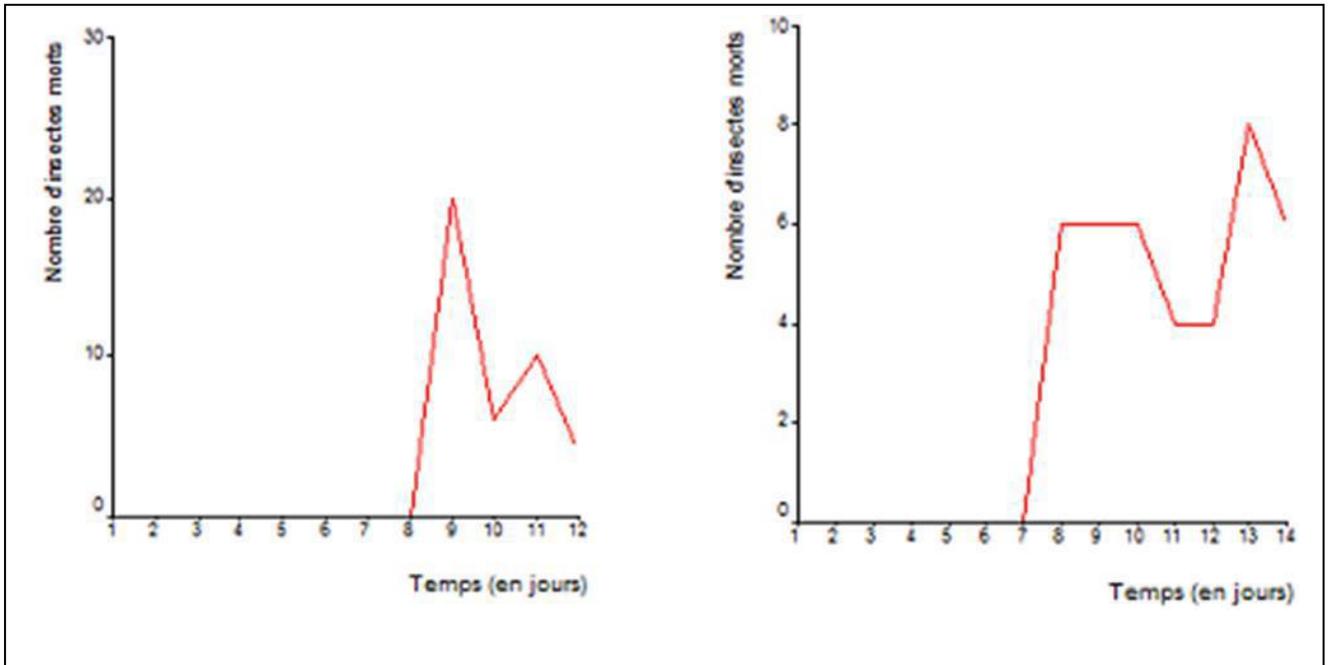


Figure 6 : Mortalité souche 1, 1er traitement

Figure 7 : Mortalité souche 1, 2ème traitement

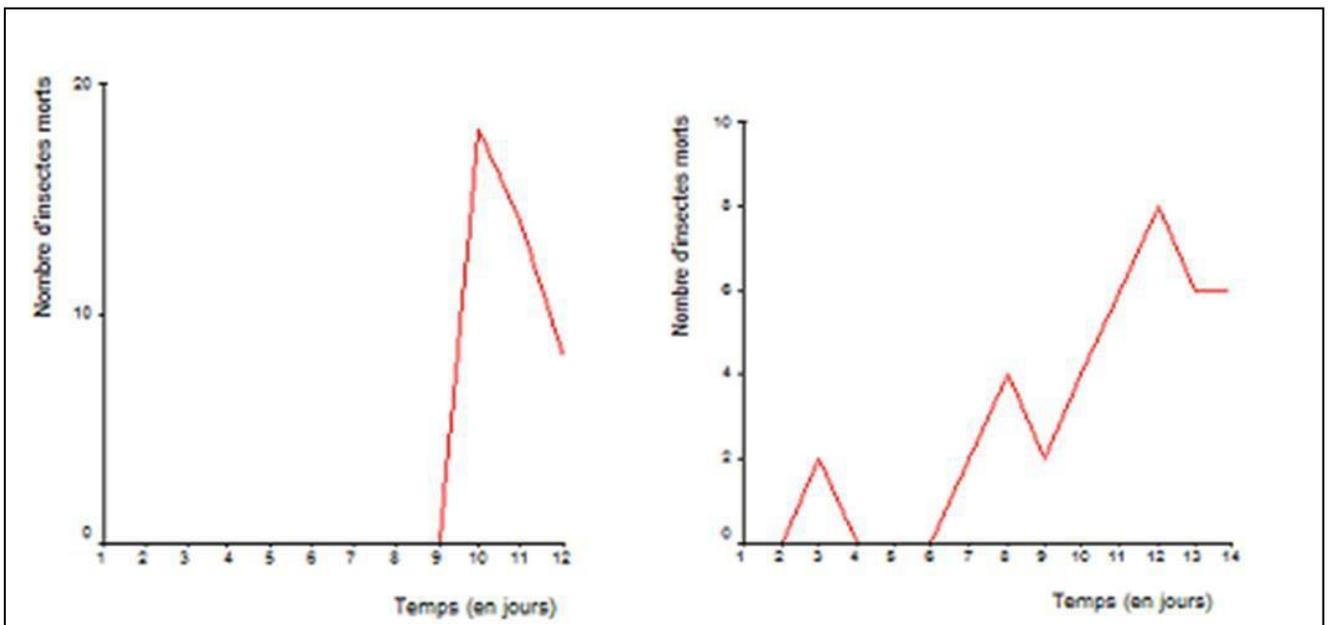


Figure 8 : Mortalité souche 2, 1er traitement

Figure 9 : Mortalité souche 2, 2ème traitement

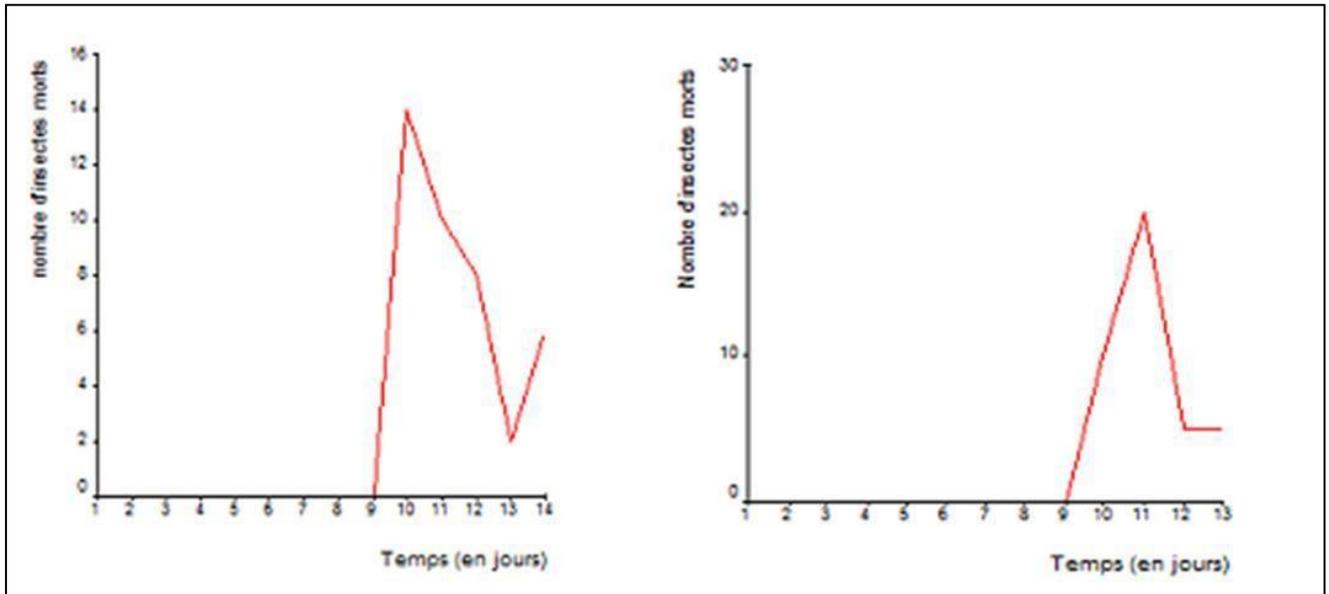


Figure 10 : Mortalité souche 3, 1er traitement

Figure 11 : Mortalité souche 3, 2ème traitement

2.2 Coupes histopathologies

Les coupes montrent des spores avec un aspect et des formes différents. Les formes en bâtonnets sont plus nombreuses que les formes rondes. La taille des spores est aussi variable. (**Figure n°12**). Les filaments sont allongés avec des sens d'orientation très divers dans le milieu de culture (**Figure n°13**). Le filament mycélien passe sous le pronotum pour s'allonger ensuite sur le corps de l'insecte. Le pronotum est soulevé par la pression des filaments du champignon qui a gagné tout le milieu intérieur de l'insecte. La cuticule de l'insecte est par ailleurs devenue très sèche (**Figure n°14**). Les insectes sont neutralisés par le champignon avec des modifications importantes ; les antennes sont atteintes, les pattes perdent leur équilibre, l'organisme est sans motricité avant la mort (**Figure n°15**). Les coupes histologiques montrent une destruction de la paroi du tube digestif et les filaments à l'intérieur de l'insecte, prennent une position longitudinale ou verticale (**Figure n°16**). On voit aussi des tubes de Malpighi qui présentent des lésions gastriques qui sont détruits (**Figure n°17**). Des granulomes (amas pseudo tissulaires entourant le filament ou la spore) se forment à l'intérieur du muscle ou dans l'espace intermusculaire. Le système nerveux céphalique des insectes a été aussi affecté par le champignon. La diminution de taille est visible et très nette (**Figure n°18**).

: tritocérébron, O : œil

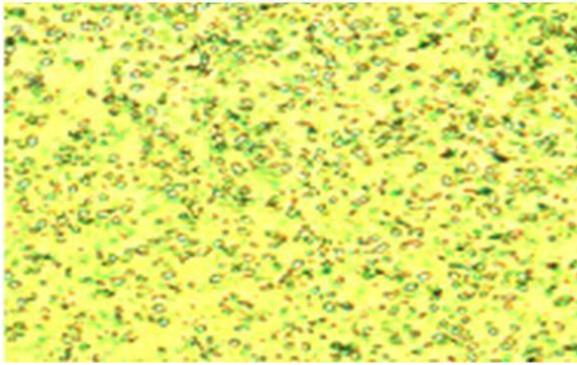


Figure 12 : Spores de champignon coupées
× 400

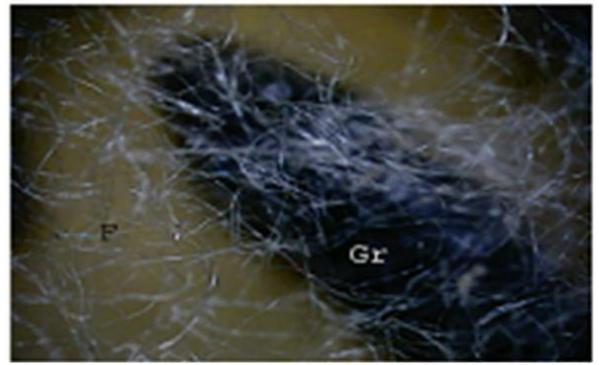


Figure 13: *Metarhizium anisopliae* sur grain de riz F : filament, Gr : grain de riz.
×40



Figure 14 : *Oedaleus senegalensis* infecté

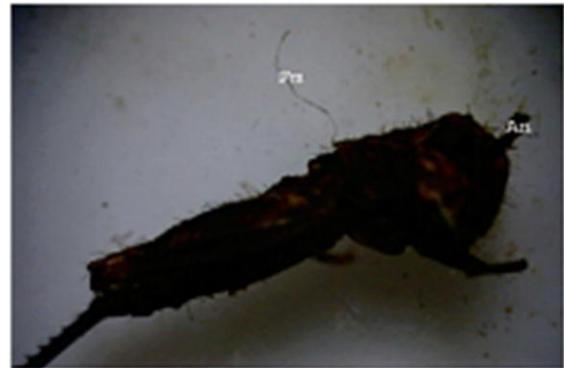


Figure 15 : *Oedaleus senegalensis* infecté avec cuticule décolorée

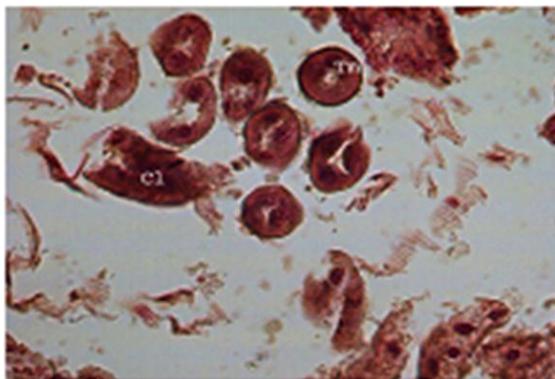


Figure 17 : Coupe de l'insecte, Tm : tube de malpighi

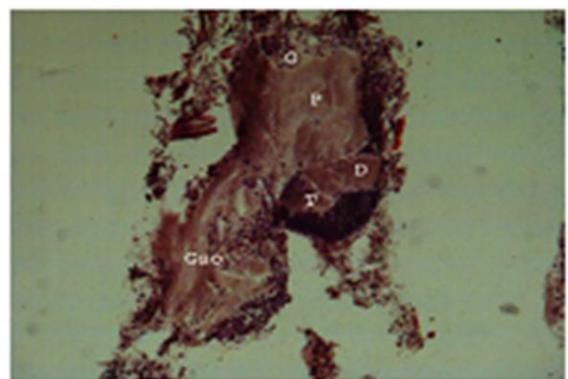


Figure 18 : Système nerveux céphalique de l'insecte. Gso : ganglion sous oesophagien, D : deutocérébron, P : protocérébron, T

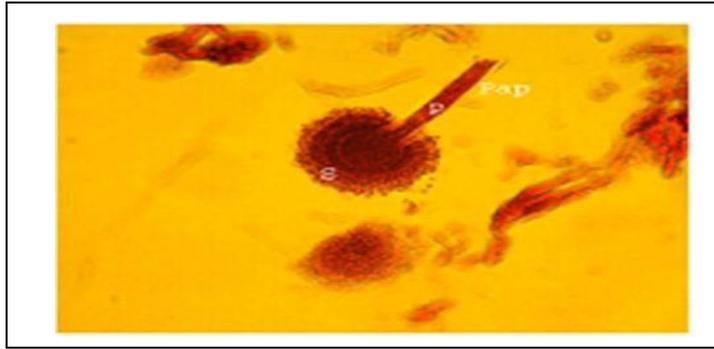


Figure 16: coupe *metarhizium anisopliae*. Pap : paroi du pédicelle,
P :pédicelle, S :spore

3. Discussion

Les résultats sur l'infection du champignon entomopathogène *metarhizium anisopliae* permettent de dire que l'infection des hôtes exige des conditions d'humidité et des températures relative de saturation pour, d'une part, permettre la libération des conidies, et d'autre part, assurer l'infection par la germination et la pénétration de l'inoculum montrant une sporulation et des filaments longs.

Mamour et Amadou *et al* sont travaillé sur une gamme de température allant de 5 à 50 °C. Avec des températures variant entre 25 et 32 °C, ont trouvé les mêmes résultats que chez (Oudraogr, 1996).

Des résultats confirmés par (Welling et Zimmerman, 1997) que Les températures de 25 à 32 °C sont meilleures pour une bonne germination de l'hyphomycète *M. anisopliae* confirmé. Les humidités enregistrées lors des manipulations ont une influence positive sur la mortalité des larves et Beaucoup d'auteurs ont travaillé sur l'humidité et le champignon et trouvent des humidités de 23 % entraîne une mortalité qui corroborent les résultats de Mamour *et al*

Les courbes illustrent l'allure de la progression des pourcentages de mortalité des larves de Criquet sénégalaise traitées par *Metarhizium anisopliae*. Le début de mortalité se situe entre 8 et 10 jours après le traitement sauf au deuxième traitement avec la souche 2 dont des insectes sont trouvés morts au 3ème jour après le traitement. Vu la différence avec les autres traitements, ils pensent que cette mortalité n'est pas due à l'effet du champignon mais à d'autres facteurs tel que la fatigue, le stress. Des études faite par des chercheurs sur le

traitement des adultes de *S. gregaria* avec du *M. anisopliae*, ont enregistré des insectes morts au 8ème jour. La mortalité des insectes est plus importante au jour où le mycélium est au maximum de sa croissance. Pour évaluer l'efficacité des souches Mamour *et al* cherché le temps létal pour 50 % des insectes pour chaque traitement. Ce temps varie de 9 à 11 jours. (Zimmerman, 2007) en travaillant sur des larves de stade 3 (L3) et des souches de *M. Anisopliae* trouvent un TL 50 variant entre 4,3 et 10,7 jours. (Bateman et al., 1998). trouvent une moyenne du TL50 des 26 souches testées de 4,4 jours. (Prior, 1997) rapporte que la dose utilisée par LUBILOSA (Lutte Biologique contre les Locustes et les Sauteriaux) et appliquée sur des larves de *O. senegalensis* tue 50 % des insectes au bout de 4 à 5 jours.

Le changement de couleur intervient après que l'insecte soit neutralisé. Ceci s'explique par l'action combinée des réactions de l'insecte et des effets du champignon. (Hu et Leger, 2003). L'atteinte des antennes par l'infection entraîne une perte du sens de l'orientation et l'animal finira par mourir. Les pattes touchées par le champignon montrent des anomalies et peuvent disparaître entraînant une difficulté pour la recherche de nourriture. L'attaque de *M. anisopliae* avant la mort de l'insecte se manifeste par des événements distincts comme dans le cas des insecticides chimiques. La destruction des tubes de Malpighi empêche l'élimination des déchets et par conséquent l'insecte meurt par accumulation de déchets. Le système nerveux atteint empêche la reproduction des insectes, donc le champignon peut retarder ou empêcher une génération tout entière de se construire.

Cependant leur observations ont permis de constater une phase où l'insecte repose sur le dos et est incapable de se relever, alors que les appendices et les segments abdominaux sont animés de mouvements convulsifs. Une deuxième phase où tous les muscles sont tétanisés et paralysés suivie de la mort de l'insecte.

Conclusion Générale

Conclusion

La protection de notre santé vis-à-vis les attaques des insectes est très importante, les Méthodes de lutte traditionnelles (chimiques et physiques) sont généralement moins efficaces, Très couteuses et affectent négativement notre environnement. La lutte biologique représente L'alternative des méthodes conventionnelles. C'est dans ce cadre que notre travail est établi Dans le but de contribuer à dégager l'activité biologique des entomopathogènes, qui sont les plus étendus.

La lutte biologique avec le champignon entopathogènes *Metarhizium anisopliae* est basée sur des relations naturelles entre individus ou entre espèces. Pour réduire et de contrôler les populations de ravageurs avec des avantages de son spécifique, son acceptabilité sociale potentielle, l'absence de développement de résistance chez les ravageurs, son adaptabilité aux cultures et la potentielle des produits ajoutée aux ainsi cultivés. Les principaux inconvénients sont le risque d'effet sur des organismes non dirigés, et non irréversible. Comme résultats, plusieurs Facteurs affectant l'efficacité de *Metarhizium anisopliae*, La pathogénicité du *metarhizium anisopliae* survient généralement à de fortes densités de la population hôtes, ainsi souvent influencée par des conditions environnementales, les rayonnements solaires, la température (inferieur a 35 c°), en plus d'humidité et d'autres facteurs. Dans le but de contribuer à dégager l'activité biologique des entomopathogènes. Les résultats obtenus montrent que le *Metarhizium* peut être utilisé contre le criquet sénégalais. Il est a noté aussi que les larves sont les stades qui sont les plus faciles à atteindre avec le produit. C'est ce qui explique que la plupart des luttes sont menées sur ces dernières

Les références bibliographiques

- A.Ouedraogo**, Conditions d'infection des acridiens par l'hyphomycète entomopathogène, *Metarhizium*, et variabilité de la tolérance aux contraintes climatiques des isolats fongiques candidats à la lutte anti-acridienne. Mémoire thèse de doctorat es sciences, Université de Paris XI, Orsay (France), (1996)
- Benserradj O., 2014.** Evaluation de *Metarhizium anisopliae* à titre d'agent de lutte biologique contre les larves de moustiques. Thèse En vue de l'obtention du diplôme de Doctorat 3ème cycle LMD En Biotechnologies, Biologie et Environnement. 166p.
- Benserradj O et Mihoubi I. (2014).** Larvicidal activity of entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* against mosquito larvae in Algeria. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci.*3 (1): 54-62.
- **Bischoff, J. F., Rehner, S. A., & Humber, R. A., 2009.** A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. *Mycologia*, 101, 512-530
- **Bradfish G. A. et Harmer S. L. (1990).** Omega-Conotoxin GVIA and nifedipine inhibit the depolarizing action of the fungal metabolite, destruxin B on muscle from the tobacco budworm (-*Heliothis virescens*). *Toxicon*. 28 (11): 1249-1254
- Brown, J.K. (2004).** Tracing the Origin of Cryptic Insect Pests and Vectors, and their Natural Enemies. In Ehler, L.E., Sforza, R. et Mateille, T. (réd.), *Genetics, evolution and biological control* (chap. 6, 113-135). Wallingford (RU), CABI Publishing.
- Clarkson J.M et Charnley A.K. (1996)** .New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects, *Trends Microbiol.*4 :197-204
- Cloutier, C. et Cloutier C. (1992).** Les solutions biologiques de lutte pour la répression des insectes et acariens ravageurs des cultures. In Vincent, C. et Coderre, D. (réd.), *La lutte biologique* (chap. 2, p. 19-88). Boucherville (Québec), Gaëtan Morin Éditeur.
- **D. STEPHAN, M. WELLING & G. ZIMMERMAN,** Locust control with *Metarhizium* favouride: new approches in the development of a biopreparation based on blastospores. *New Strategies in Locust Control*, (1997) 151 - 158
- FAO, 2016.** Bulletin de situation acridienne Madagascar. 44p
- **Faria M. et Wraight S.P, 2001.** Biological control of *Bemisia tabaci* with fungi. *Crop Protect.* 20 :767-778

- **Fargues. J et Luz C., 2000.** Effects of fluctuating moisture and temperature regimes on sporulation of *Beauveria bassiana* on cadavers of *Rhodnius prolixus*. *Biocontrol. Sci Technol.* 8: 323-334

- **F. M. FREIMOSER, S. SCREEN, BAGGASAVITA, GANGAU & S. R. J.LEGER.** Expressed sequence tag (EST) analysis of two subspecies of *Metarhizium anisopliae* reveals a plethora of secreted proteins with potential activity in insect hosts. *Microbiology*, 49 (1) (2003) 239 -247

- **Jenkins N.E., Hevief G., Langewald J., Cherry A.J et Lomer C.J. (1998).** Development of mass production technology for aerial conidia for use as mycopesticides. *Biocontrol News Information.* 19 :21–31

- **J. H. HAN, B. R. JIN, J. J. KIM, S. Y. LEE,** Virulence of Entomopathogenic Fungi *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces fumosoroseus* for the Microbial Control of *Spodoptera exigua*. *Mycobiology*, 42 (4) (2014) 385 - 390

- **Joséphine D., Marie M., 2015.** *Metarhizium anisopliae*: à propos d'un cas rare de kératite fongique invasive. *Mycologie médicale* vol 25: 238p.

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

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

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

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

- **Kamp A.M et Bidochka M.J. (2002) .** Conidium production by insect pathogenic fungi on commercially available agars. *Lett. App. Microbiol.* 35 :74-77.

- Kouassi, M.** Les possibilités de la lutte microbiologique en phase sur le champignon entomopathogène *Bauveria bassina* Vertigo. La revue électronique en science de l'environnement 2 : 2 (2001) 2-6.
- **Lacey L. A et Undeen, A.H.(1986).**Microbial control of flies and mosquitoes. Ann. Rev. Entomol. 25 :265-296.
- **Liu B.L., Chen J.W et Tzeng Y.M.(2000).**Production of cyclodepsipeptides destruxin A and B from *Metarhizium anisopliae*. Biotechnol Prog .16 :993–999.
- **Peng, S. (1983).** Biological control - One of the fine traditions of ancient Chinese agricultural techniques. Scientia Agricultura Sinica, no 1, p. 92-98.
- RAKOTOARISOA H. L., 2007** – Contribution à l'étude de l'efficacité biologique du *Metarhizium anisopliae* contre *Heteronychus plebejus* (Coleoptère Scarabaeidae Dynastinae) sur riziculture sur couverture végétale morte dans la région du Lac Alaotra, Mémoire de DEA, Faculté des Sciences, Entomologie, Université d'Antananarivo, 57 p.
- Ravallec M., Riba G et Vey A. (1989).** Sensibilité d' *Aedes albopictus* (Diptera : Culicidae) à l'hyphomycète entomopathogène *Metarhizium anisopliae*. Entomophaga.34 :209-217.
- Raymond, M. (1992).** La lutte biologique contre les mammifères. In Vincent, C. et Coderre, D. (réd.), La lutte biologique (chap. 31, p. 573-583). Boucherville (Québec), Gaëtan Morin Éditeur.
- R. BATEMAN & T. MATTHEW,** Pathogen application against locust and grasshoppers: insecticide or biological control. Outlook on Agriculture, 27 (I) (1998) 16 -21
- Reichelder C.F. (1993).** Biological assays with insect pathogens. In: N. B. Mandava (ed.). CRC handbook of natural pesticides: methods. V.I Theory practice and detection. New Delhi. CBS Publishers and Distributors. 489-515.
- **Senal J., Fraselle J., Impens R., Kummert J., Lepoivre Ph., Meulmans M., Seilleur P., Vandevcken J.et Viseur J. (1993).** Traité de pathologie végétale. Gembloux. Belgique.
- Starnes R.L., Liu C.L et Marone P.G. (1993).**History, use and future of microbial insecticides. Amer. Entomol. 39 :83-91
- **St Leger R.J., 1993.** Biology and mechanisms of insect-cuticle invasion by deuteromycete fungal pathogens, In :Parasites and pathogens of insects .Beckage NE, Thompson SN,(eds),Federici BA (eds.).Academic Press Inc.,New York,USA .2 : 211-225.

- **St Leger R.J. (1986a)**. Cuticule- degrading enzymes of entomothogenic fungi : Synthesis in culture on cuticle. *J. Inverbr.Pathol.* 48 :85-95.
- **Veen K.H. (1968)**. Recherches sur la maladie due à *Metarhizium anisopliae* chez le criquet pèlerin. *Meded . Land bouwhoge school, Wageningen .* 68 :1-77.
- **Vega F.E., Jackson M.A., Mercadier G et Poprawski T.J. (2003)**. The impact of nutrition on spore yields for various fungal entomopathogens in liquid culture, *World J. Microbiol. Biotechnol.* 19 :363-368.
- **Waage, J. (2004)**. La lutte biologique – Réaliser la promesse. *Dossiers Biocontrôle*, décembre, p. 1.
- **Weeden, C.R., Shelton, A.M. et Hoffman, M.P. (2007)**. *Biological Control: A Guide to Natural Enemies in North America*, [En ligne]. <http://www.nysaes.cornell.edu/ent/biocontrol/info/needstatus.html> (Page consultée le 3 décembre 2009).
- **Wraight R.J et Roberts D.W. (1987)**. Insect control effort with fungi. *Devel. Industr. Microbiol.* 28 :77-87.
- **Zimmermann G. (2007)**. Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Biocontr.Sci.Technol .*17 :879-920.

Résumés

Résumé

Les champignons, sont des organismes eucaryotes et jouent de nombreux rôles dans différents écosystèmes, Les champignons entomopathogènes sont parmi les principaux agents de contrôle biologique utilisés, qui est très prometteuse pour assurer une protection phytosanitaire performante de par l'ubiquité naturelle des agents microbiologiques dans les écosystèmes, leur grande variété, leur dissémination facile, leur spécificité d'action et aussi leur persistance dans l'environnement. Plus de 500 espèces de champignon sont susceptibles d'infecter des insectes. L'objet de notre travail connaître les caractéristiques du champignon *metarhizium anisopliae* et surtout son rôle comme un agent dans la lutte biologique en agriculture et l'évaluation de leur efficacité. Les maladies et les insectes ravageurs font parties des facteurs limitant la production agricole dont la stratégie de protection appliquée par les paysans se repose sur la lutte chimique ayant des effets néfastes sur l'homme et l'environnement. De ce fait, la prospection des études faites sur les produits microbiologiques révèle nécessaire.

Mot clés : *Metarhizium anisopliae*, la lutte biologique, Agriculture, la production agricole, les produits microbiologiques, protection phytosanitaire.

الفطريات هي كائنات حقيقية النواة وتلعب العديد من الأدوار في النظم البيئية المختلفة، وتعد الفطريات الممرضة للحشرات من بين عوامل مكافحة البيولوجية الرئيسية المستخدمة، وهو أمر واعد للغاية لضمان حماية فعالة للصحة النباتية بسبب الانتشار الطبيعي للعوامل الميكروبيولوجية في النظم البيئية، وتنوعها الكبير، وسهولة استخدامها. نشرها، وخصوصية عملها وكذلك ثباتها في البيئة. أكثر من 500 نوع من الفطريات عرضة للإصابة بالحشرات. الهدف من عملنا هو معرفة وخاصة دوره كعامل في مكافحة البيولوجية في الزراعة وتقييم فعاليتها *metarhizium anisopliae*. خصائص فطر تعتبر الأمراض والآفات الحشرية من بين العوامل التي تحد من الإنتاج الزراعي والتي تعتمد استراتيجيات الحماية التي يطبقها المزارعون على مكافحة الكيمائية، والتي لها آثار ضارة على الإنسان والبيئة. لذلك، من الضروري التنقيب عن الدراسات التي أجريت على المنتجات الميكروبيولوجية.

الكلمات المفتاحية *Metarhizium anisopliae* مكافحة البيولوجية، الزراعة، الإنتاج الزراعي، المنتجات، الميكروبيولوجية، حماية الصحة النباتية

Abstract

Fungi, are eukaryotic organisms and play many roles in different ecosystems, Entomopathogenic fungi are among the main biological control agents used, which is very promising to ensure effective phytosanitary protection due to the natural ubiquity of microbiological agents in ecosystems, their great variety, their easy dissemination, their specificity of action and also their persistence in the environment. More than 500 species of fungus can infect insects. The object of our work to know the characteristics of the fungus *metarhizium anisopliae* and especially its role as an agent in the biological control in agricultural and the evaluation of their effectiveness. Diseases and insect pests are among the factors limiting agricultural production, the protection strategy of which applied by farmers is based on chemical control, which has harmful effects on humans and the environment. As a result, prospecting for studies made on microbiological products proves necessary.

Key words: *Metarhizium anisopliae*, biological control, agricultural, agricultural production, microbiological products, phytosanitary protection.

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Filière : Biotechnologie
Spécialité : Mycologie et Biotechnologie fongique

Metarizium comme agent de la lutte biologique

Résumé :

Les champignons, sont des organismes eucaryotes et jouent de nombreux rôles dans différents écosystèmes, Les champignons entomopathogènes sont parmi les principaux agents de contrôle biologique utilisés, qui est très prometteuse pour assurer une protection phytosanitaire performante de par l'ubiquité naturelle des agents microbiologiques dans les écosystèmes, leur grande variété, leur dissémination facile, leur spécificité d'action et aussi leur persistance dans l'environnement. Plus de 500 espèces de champignon sont susceptibles d'infecter des insectes. L'objet de notre travail connaître les caractéristiques du champignon metarhizium anisopliae et surtout son rôle comme un agent dans la lutte biologique en agriculture et l'évaluation de leur efficacité. Les maladies et les insectes ravageurs font parties des facteurs limitant la production agricole dont la stratégie de protection appliquée par les paysans se repose sur la lutte chimique ayant des effets néfastes sur l'homme et l'environnement. De ce fait, la prospection des études faites sur les produits microbiologiques révèle nécessaire.

Mot clés : *Metarhizium anisopliae*, la lutte biologique, Agriculture, la production agricole, les produits microbiologiques, protection phytosanitaire.

Membre du jury :

Président du jury : Mme. Benkahoul M (MCA UFM CONSTANTINE 1).

Rapporteuse : Mme.Abdelaziz O (MCB UFM CONSTANTINE 1).

Examinatrice : Mme.Meziani M (MCB UFM CONSTANTINE 1).

Présentée par : Bechiri Rahma et Hanachi Hadjer

Année universitaire : 2020-2021