



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



**Université Constantine 1 Frères Mentouri**

جامعة قسنطينة الاخوة منتوري

**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie**

كلية علوم الطبيعة و الحياة

**Département : Microbiologie**

قسم : الميكروبيولوجيا

**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**

**N° d'ordre :**

**N° de série :**

**Intitulé :**

**Evaluation de *Metarhizium anisopliae* à titre d'agent de lutte  
biologique contre les insectes ravageurs des cultures  
céréalières les larves de *Ténébrio molitor***

**Présenté par :**

**Le : 23/06/2025**

MECHOUCHE Meriem Malak

MENASERI Hanadi

**Jury d'évaluation :**

**Président de jury : Dr. GHORRI Sana (MCA - Université Frères Mentouri, Constantine).**

**Encadrant : Dr. BENSSERADJ Ouafa (M.C.A - U Constantine 1 Frères Mentouri).**

**Examinateur : Dr. ZAAMOUCHI Ahlem (M.C.B - U Constantine 1 Frères Mentouri).**

**Année universitaire**

**2024 - 2025**

# Remerciements

*Nous remercions avant tout **ALLAH**, le Tout-Puissant, pour la force et la patience qu'Il nous a accordées tout au long de ce parcours.*

*Nous tenons ensuite à exprimer notre profonde gratitude à **Dr.***

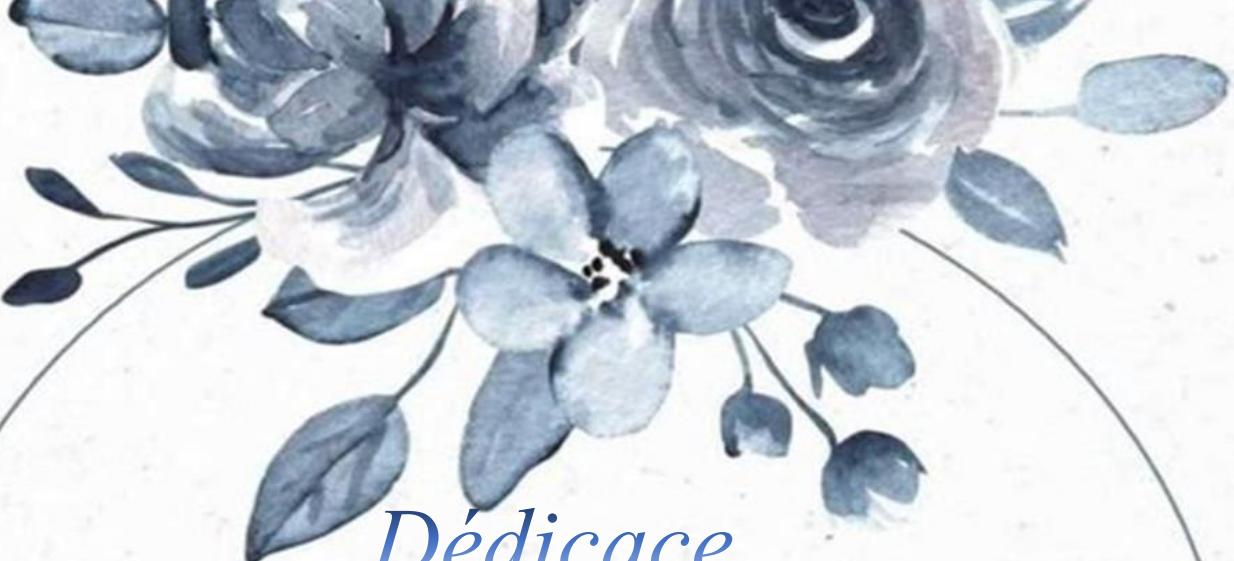
**BENSSERADJ Ouafa** Maître de Conférences à l'Université Frères Mentouri – Constantine 1, pour sa précieuse direction, sa disponibilité constante, ses conseils éclairés ainsi que pour l'encadrement rigoureux et bienveillant dont nous avons bénéficié tout au long de ce travail.

*Nous remercions également **Dr. GHORRI Sana**, Maître de Conférences à l'Université Frères Mentouri – Constantine, Présidente du jury, pour l'honneur qu'elle nous a fait en acceptant de présider la soutenance de ce mémoire et pour l'intérêt qu'elle a porté à notre travail.*

*Nos sincères remerciements vont aussi à **Dr. ZAAMOUCHI Ahlem**, Maître de Conférences à l'Université Frères Mentouri – Constantine, Examinaterice, pour avoir accepté d'évaluer ce mémoire et notre travail*

*Nous souhaitons également exprimer notre reconnaissance particulière à la doctorante **ZAHRI Khaoula**, dont l'aide précieuse, le soutien constant et les conseils avisés ont été déterminants tout au long de cette recherche.*

*Nos remerciements vont aux ingénieurs des laboratoires de Mycologie, Biotechnologie et Activité microbienne pour leur aide précieuse durant notre travail pratique.*



## Dédicace

*Je dédie ce travail à mes parents **SABRINA** et **AHCEN** pour leurs amour, leurs soutien, leurs prières, leurs encouragement et leurs confiance tout au long de mon parcour.*

 *A mes chers frères **Abdel Raouf**, **Abdel Moumen** pour leurs encouragements, et leurs amours*

 *A ma chère tante **Fatiha**, pour son soutien et ses prières.*

 *A ma meilleure amie **Nour** pour sa présence et ses encouragements dans les moments difficiles.*

 *A ma chère tante **Djamila**, Qu'Allah te donne le paradis*

 *A ma chère grand-mère **Aicha**, pour son amour ses prières pour ma réussite, qu'Allah te donne le paradis.*

 *A mon cher oncle **Salim**, l'homme généreux et respecté, Qu'Allah lui accorde le paradis.*

 *A mon chère binôme **Hanadi**, pour son sérieux travail et ses aides.*

 *A mon petit **Bichou**.*

*Meriem Malak*  




## Dédicace

*Je dédie ce travail à*

- *Ma chère mère Djamila, à mon cher père Ibrahim, source de vie, d'amour et d'affection. Pour leurs sacrifices et leurs encouragements tout au long de ma vie.*
- *À mon cher frère Sofiene, pour son soutien inestimable, son amour sincère et sa présence réconfortante qui m'ont accompagné tout au long de mon parcours.*
- *À mes chers frères Mohamed et Taher, pour leur soutien et leur présence réconfortante.*
- *À mes adorables neveux, source de joie et de bonheur dans ma vie, que ce travail soit aussi une fierté pour eux.*
- *À ma chère tante Baya pour son soutien, et à toute ma famille.*
- *À ma meilleure amie Belkis, pour son soutien et son amitié fidèle.*
- *À mon cher binôme Malak, pour son aide et son travail sérieux*
- *À toutes mes amies et à tous ceux que j'aime.*

*Hanadi*  
DESIGN



## Abstract

As part of the biological control of insect pests, this study focuses on evaluating the insecticidal potential of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* on the larvae of *Tenebrio molitor*, a harmful beetle to crops. The main objective of this work is to explore a sustainable alternative to chemical control by promoting a local strain of *M. anisopliae* isolated from agricultural soil in the Constantine region. The experiments were conducted under laboratory conditions to test the biological effectiveness of the fungus at different concentrations and to evaluate toxicological parameters such as LD<sub>50</sub> and LT<sub>50</sub>. The experimental results demonstrated the increasing effectiveness of the local strain of *Metarhizium anisopliae* against *Tenebrio molitor* larvae, depending on the dose and exposure time. The larvicidal effect was observed from the second day of treatment for the concentrations of 10<sup>7</sup>, 10<sup>8</sup>, and 10<sup>9</sup> spores/ml, with mortality reaching 100% by the 8th or 9th day at the highest doses. The lethal dose 50% (LD<sub>50</sub>), calculated by the Probit method, was estimated at  $1.26 \times 10^8$  spores/ml, confirming the high toxicity of the tested strain. The calculation of LT<sub>50</sub> (lethal time for 50% mortality) also showed that the speed of action increases with the dose. LT<sub>50</sub> values were 4.89 days for 10<sup>7</sup> spores/ml, 3.80 days for 10<sup>8</sup> spores/ml, and 3.00 days for 10<sup>9</sup> spores/ml. In parallel, a fungal culture filtrate was tested but did not show any visible fungal infection in the dead larvae, suggesting that mortality in this case was not due to direct pathogenicity. The extraction of secondary metabolites revealed, through thin-layer chromatography (TLC) and UV visualization, the presence of bioactive compounds produced by *M. anisopliae*. These results confirm the production of potentially insecticidal molecules such as destruxins.

**Keywords:** *Metarhizium anisopliae* – Biological control – *Tenebrio molitor* – Entomopathogenic fungi – Insect pests

## ملخص

في إطار مكافحة الحشرات الضارة بوسائل بيولوجية، تهدف هذه الدراسة إلى تقييم الفعالية الحشرية للفطر الممرض للحشرات ضد يرقات *Tenebrio molitor* *Metarhizium anisopliae*، وهو خنفساء ضارة بالمحاصيل الزراعية. الهدف الرئيسي من هذا العمل هو استكشاف بدائل مستدام للمبيدات الكيميائية، من خلال تثمين سلالة محلية من الفطر *M. anisopliae* تم عزلها من تربة زراعية بمنطقة قسنطينة. وقد تم إجراء التجارب تحت شروط مخبرية لاختبار الفعالية البيولوجية للفطر حسب تراكيز مختلفة، وتقييم المؤشرات السمية مثل الجرعة القاتلة المتوسطة (DL<sub>50</sub>) والوقت القاتل المتوسط (TL<sub>50</sub>). أظهرت النتائج التجريبية أن السلالة المحلية من *Metarhizium anisopliae* فعالة بشكل متزايد ضد يرقات *Tenebrio molitor* حسب الجرعة ومدة التعرض. تم تسجيل التأثير القاتل لليرقات ابتداءً من اليوم الثاني من المعالجة بالتراكيز 10<sup>7</sup>، 10<sup>8</sup>، و 10<sup>9</sup> بوغ/مل، مع معدل وفيات بلغ 100% في اليوم الثامن أو التاسع لأعلى التراكيز. من خلال تحليل الجرعة القاتلة المتوسطة DL<sub>50</sub> باستخدام طريقة بروبيت (Probits)، تم تقدير DL<sub>50</sub> بـ  $10^8 \times 1.26$  بوغ/مل، مما يؤكد السمية العالية للسلالة المختبرة. كما أظهر حساب TL<sub>50</sub> أن سرعة التأثير تزداد مع الجرعة، حيث بلغت 4.89 يومًا عند ترکیز 10<sup>7</sup> بوغ/مل، 3.80 يومًا عند ترکیز 10<sup>8</sup> بوغ/مل، وأيام 3.00 عند ترکیز 10<sup>9</sup> بوغ/مل. وفي تجربة موازية، تم اختبار راش مزارع الفطر، لكنه لم يُظهر أي إصابة فطرية مرئية في اليرقات الميتة، مما يشير إلى أن الوفاة قد لا تكون ناتجة عن تأثير مرضي مباشر. أما تحليل المستقلبات الثانوية المستخرجة، فقد أظهر بواسطة الكروماتوغرافيا على طبقة رقيقة (CCM) وتحت إضاءة UV وجود مركبات نشطة بيولوجياً ينبع منها الفطر *M. anisopliae*. تؤكد هذه النتائج إنتاج جزيئات قد تكون مسؤولة عن الفعالية الحشرية، مثل الدستروكسينات (Destruxins).

**الكلمات المفتاحية –** *Tenebrio molitor* – *Metarhizium anisopliae* – المكافحة الحيوية – الفطريات الممرضة  
**للحشرات –** الحشرات الضارة

## Résumé

Dans le cadre de la lutte biologique contre les insectes ravageurs, cette étude s'intéresse à l'évaluation du potentiel insecticide du champignon entomopathogène *Metarhizium anisopliae* sur les larves de *Tenebrio molitor*, un coléoptère nuisible des cultures. L'objectif principal de ce travail est d'explorer une alternative durable à la lutte chimique, en valorisant une souche locale de *M. anisopliae* isolée à partir d'un sol agricole dans la région de Constantine. Les expérimentations ont été menées en conditions de laboratoire afin de tester l'efficacité biologique du champignon selon différentes concentrations, et d'évaluer les paramètres toxicologiques tels que la DL<sub>50</sub> et la TL<sub>50</sub>. Les résultats expérimentaux ont démontré l'efficacité croissante de la souche locale de *Metarhizium anisopliae* contre les larves de *Tenebrio molitor*, en fonction des doses et du temps d'exposition. L'effet larvicide a été observé dès le 2<sup>e</sup> jour de traitement pour les concentrations de 10<sup>7</sup>, 10<sup>8</sup> et 10<sup>9</sup> spores/ml, avec une mortalité atteignant 100 % au 8<sup>e</sup> ou 9<sup>e</sup> jour pour les doses les plus élevées. L'analyse de la dose létale 50 % (DL<sub>50</sub>), calculée par la méthode des Probits, a permis d'estimer une DL<sub>50</sub> de  $1,26 \times 10^8$  spores/ml, ce qui confirme la forte toxicité de la souche testée. Le calcul des TL<sub>50</sub> (temps létal pour 50 % de mortalité) a également montré que la rapidité d'action augmente avec la dose. Les TL<sub>50</sub> étaient de 4,89 jours pour 10<sup>7</sup> spores/ml, 3,80 jours pour 10<sup>8</sup> spores/ml, et 3,00 jours pour 10<sup>9</sup> spores/ml. En parallèle, un filtrat de culture fongique a été testé, mais n'a montré aucune infection fongique visible chez les larves mortes, suggérant que la mortalité dans ce cas n'était pas liée à une pathogénicité directe. L'extraction des métabolites secondaires a révélé, par chromatographie sur couche mince (CCM) et visualisation UV, la présence de composés bioactifs produits par *M. anisopliae*. Ces résultats confirment la production de molécules potentiellement responsables de l'activité insecticide, telles que les destruxines.

# Table des matières

Résumé

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction ..... 1

## Revue bibliographique

### Chapitre 1 : Le champignon entomopathogène *Metarhizium anisopliae*

1.Généralité sur les champignons.....	3
2. Les champignons entomopathogènes .....	4
2.1 <i>Metarhizium anisopliae</i> .....	4
2.1.1 Taxonomie et classification .....	5
2.1.2 Caractères morphologiques et culturaux .....	6
2.1.2.1 Aspect macroscopique .....	6
2.1.2.2 Aspect microscopique.....	7
2.1.3 Ecologie.....	7
2.1.3.1 Facteur abiotiques .....	7
2.2 Importance de <i>Metarhizium anisopliae</i> en lutte biologique.....	8
2.3 Production des toxines.....	9
2.4 Mode d'infection .....	9
2.5 Facteurs affectant l'efficacité de <i>Metarhizium anisopliae</i> .....	12
2.5.1 Facteurs liés aux pathogènes.....	13
2.5.2 Facteurs dépendant à la cible.....	13
2.5.3 Facteurs de l'environnement.....	13
2.5.3.1 Effet du sol.....	13
2.5.3.2 Température .....	13
2.5.3.3 Humidité .....	14
2.5.3.4 Rayonnement solaire .....	14
2.6 Avantages de l'utilisation de <i>Metarhizium anisopliae</i> .....	15
3. Réponse immunitaire à l'infection microbienne chez l'insecte.....	15

## **Chapitre 2 : Les insectes ravageurs des cultures**

1. Généralités sur les cultures .....	16
2. Insectes ravageurs de cultures .....	16
2.1 Les ravageurs broyeurs .....	17
2.2 Les ravageurs piqueurs-suceurs.....	17
3. L'insecte ravageur <i>Ténébrio molitor (Alphitobium diaperinus)</i> .....	19
3.1 Description.....	19
3.2 Systématique.....	20
3.3 Cycle de vie.....	21
3.4 Comportement trophique .....	24
3.5 Régime alimentaire .....	24
3.6 Distributions des habitats .....	24
3.7 Les dégâts causé par les <i>Ténébrio</i> .....	25
4. Les méthodes de lutte.....	25
4.1 Lutte chimique.....	25
4.2 Lutte biologique.....	25

## **Partie expérimentale**

### **Matériel et méthodes**

#### **1. Isolement et identification du champignon entomopathogène**

##### ***Metarhizium anisopliae***

1. Prélèvement des échantillons.....	27
2. Milieux d'isolement .....	27
3. Méthodes d'isolement .....	28
4. Purification des souches isolées .....	29
5. Méthodes d'isolement .....	29
5.1 Identification macroscopique.....	29
5.2 Identification microscopique.....	30

## **II. Etude de l'activité larvicide de *Metarhizium anisopliae* sur les larves de *Ténébrio molitor***

1. Effet de <i>Metarhizium anisopliae</i> .....	31
1.1 Préparation de la suspension sporale du <i>Metarhizium anisopliae</i> .....	31
1.2 Test de pathogénicité.....	31
1.3 Analyse Probit.....	33
2. Effet du filtrat .....	33
2.1 Fermentation .....	33
2.2 Filtrat.....	33
2.3 Test de pathogénicité .....	34
2.4 Extraction.....	35
2.5 Détection des molécules bioactives par la chromatographie sur couche mince (CCM).....	36

### **Résultats**

#### **1. Isolement et identification du champignon entomopathogène**

##### ***Metarhizium anisopliae***

1. Isolement du champignon <i>Metarhizium anisopliae</i> .....	37
2. Identification des isolats .....	37
2.1 Aspect macroscopique .....	37
2.2 Aspect microscopique.....	39

## **II. Etude de l'activité larvicide de *Metarhizium anisopliae* sur les larves de *Ténébrio molitor***

1. Effet de champignons entomopathogène <i>Metarhizium anisopliae</i> .....	40
1.1 Taux de mortalités.....	41
1.2 Calcul de la DL50.....	43
1.3 Calcul des TL50 .....	44
2. Effet de filtrat .....	46
2.1 Fermentation .....	46

2.2 Test de pathogénicité .....	46
2.3 Extraction.....	47
2.4 Analyse des molécules bioactives élaborées par <i>Metarhizium anisopliae</i> par Chromatographie sur couche mince (CCM).....	48
<b>Discussion .....</b>	<b>50</b>
<b>Conclusion et perspectives.....</b>	<b>56</b>
<b>Références bibliographique.....</b>	<b>58</b>
<b>Annexe.....</b>	<b>66</b>

## Liste des abréviations

**AMPc** : Adenosine monophosphate cyclique

**AW** : Activité de l'eau

**CCM** : chromatographie sur couche mince

**CO<sub>2</sub>** : Dioxyde de carbone

**DL50** : Dose létale suffisante pour tuer 50% des individus

**DTX** : Dexotoxines

**HR** : Humidité Relative

**MS** : matières sèches

**OMS** : l'organisation mondiale de la santé

**P/P** : poids par poids

**PDA**: *Potato-dextrose-agar*

**PDB** : *Potato dextrose broth*

**PIB** : produit interieur brut

**R2** : coefficient de détermination

**Rf** : *retention factor*

**rpm** : Rotation par minute

**SDA**: Sabouraud dextrose Agar

**TL50** : Temps létal suffisant pour tuer 50% des individus

**UV-A** : *ultraviolet A radiation*

**UV-B** : *ultraviolet B radiation*

## Liste des figures

<b>Figure 1:</b> A, B, D- <i>Metarhizium anisopliae</i> C- <i>Metarhizium flavoviride</i> .....	6
<b>Figure 2 :</b> (a) <i>Metarhizium anisopliae</i> . (b, c) Morphologie fongique observée au microscope optique.....	7
<b>Figure 3 :</b> Pénétration de la cuticule par un champignon entomopathogène (D.Doucet and A.Rtnakaran).....	10
<b>Figure 4 :</b> Cycle biologique et mode d'infection des champignons entomopathogènes sur son hôte .....	12
<b>Figure 05 :</b> Vues dorsale et ventrale de l'adulte (à gauche) et de quelques stades larvaires (à droite) d' <i>Alphitobius diaperinus</i> , collectés dans des pigeonniers de la ville d'Ahvaz, province du Khouzistan, Iran. ....	20
<b>Figure 6 :</b> les œufs de <i>Tenebrio molitor</i> .....	21
<b>Figure 7 :</b> Vue dorsale (tête à gauche) d'une larve du petit ténébrion, <i>Alphitobius diaperinus</i> (Panzer) .....	22
<b>Figure 8 :</b> Nymphe du petit ténébrion, <i>Alphitobius diaperinus</i> (Panzer).....	23
<b>Figure 9 :</b> Cycle de développement simplifié de <i>Tenebrio molitor</i> (Derfouf 2021).....	23
<b>Figure 10 :</b> Prélèvement des trois différents échantillons du sol.....	27
<b>Figure 11 :</b> Dilution décimale des suspensions (SM, $10^{-1}$ , $10^{-2}$ , $10^{-3}$ ).....	28
<b>Figure 12 :</b> Boites de pétri contenant les larves de <i>Tenebrio molitor</i> immergées dans les concentrations des suspensions sporales.....	32
<b>Figure 13 :</b> Les larves de <i>Tenebrio molitor</i> immergées dans différentes concentrations de filtrat. ....	34
<b>Figure 14 :</b> Extraction des métabolites secondaires (A) Filtration du milieu de fermentation, (B) Décantation.....	35
<b>Figure 15 :</b> Evaporation sous vide a l'aide d'un rotavapeur.....	35
<b>Figure 16 :</b> Préparation de la plaque CCM.....	36
<b>Figure 17 :</b> Des cadavres larvaires de <i>Tenebrio molitor</i> infectées par <i>Metarhizium anisopliae</i> .....	40
<b>Figure 18 :</b> Observation microscopique des cadavres larvaires de Ténébrion infectées par <i>Metarhizium anisopliae</i> . A) Spores B) Mycélium, phialides, conidiophores.....	41
<b>Figure 19 :</b> Pourcentages de mortalité des larves de <i>Ténébrio molitor</i> après 10 jours de traitement par la souche <i>Metarhizium anisopliae</i> .....	42

<b>Figure 20</b> : Efficacité de <i>Metarhizium anisopliae</i> vis-à-vis des larves de <i>Ténébrio molitor</i> .....	44
<b>Figure 21</b> : Efficacité de <i>Metarhizium anisopliae</i> dans le temps vis-à-vis des larves de <i>Ténébrio molitor</i> traitées par les différentes concentrations.....	45
<b>Figure 22</b> : Développement morphologique de <i>Metarhizium anisopliae</i> sur milieu de fermentation.....	46
<b>Figure 23</b> : Test de pathogénicité des larves de <i>Ténébrio molitor</i> avec le filtrat de <i>Metarhizium anisopliae</i> .....	47
<b>Figure 24</b> : Extrait brut de <i>Métarhizium anisopliae</i> .....	47
<b>Figure 25</b> : chromatographie sur couche mine présente les métabolites secondaires (sous lampe UV) libérés par <i>Metarhizium anisopliae</i> .....	49

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1 :</b> Les principaux insectes ravageurs en Algérie.....	18
<b>Tableau 2 :</b> Les échantillons du sol est leurs lieux de prélèvement.....	37
<b>Tableau 3 :</b> Aspects macroscopiques de la souche isolée.....	38
<b>Tableau 4 :</b> Aspect microscopique de la souche isolée.....	39
<b>Tableau 5 :</b> Pourcentage moyen de mortalité des larves de <i>Tenebrio molitor</i> traitées par <i>Metarhizium anisopliae</i> .....	41
<b>Tableau 6 :</b> Logarithmes décimaux des concentrations et Probits des taux de mortalité au 4 <sup>ème</sup> jour.....	43
<b>Tableau 7 :</b> Transformation du temps en Logarithme décimal et les pourcentages de mortalité cumulés des larves en Probits.....	45
<b>Tableau 8 :</b> Équations des droites de régressions et valeurs des TL50 pour chaque concentration de Traitement utilisée.....	45

# *Introduction*

L'agriculture constitue la base de l'économie. Malheureusement celle-ci est soumise à plusieurs contraintes, essentiellement d'ordres abiotique et biotique. Les producteurs sont confrontés à diverses maladies qui s'attaquent aux cultures. De nombreuses cultures vivrières et de rente sont ravagées par des parasites. (Resche- Rigon, 2008).

La protection des cultures contre ces ravageurs constitue un enjeu majeur pour l'agriculture et l'industrie agroalimentaire. Les pertes les plus significatives sont causées par les ravageurs. Les ravageurs regroupent l'ensemble des animaux qui détruisent une partie de la culture avant ou après la récolte. Pour la majeure partie, il s'agit d'insectes ou d'acariens. Les insectes ravageurs mangent soit les plantes ou certaines parties de plantes, soit ils percent les plantes pour se nourrir de leurs sèves (Delobel, 1993 ; Fleurat-Lessard, 1994). La présence de ces ravageurs engendre une détérioration des grains, entraînant ainsi des pertes tant quantitatives que qualitatives (Gwinner *et al.*, 1996). Parmi ses insectes nuisibles les Coléoptères *Tenebrio molitor*.

Pour limiter ces pertes, la lutte chimique constitue encore aujourd'hui la méthode la plus couramment employée. Toutefois, de nombreux auteurs soulignent les effets néfastes de l'usage intensif de pesticides, tant sur la santé humaine que sur l'environnement (Carlos, 2006 ; Isman, 2006).

Les champignons entomopathogènes représentent des ennemis naturels fréquents des arthropodes, notamment des insectes. Ils représentent des agents microbiologiques prometteurs pour la lutte biologique ou intégrée contre les ravageurs, pouvant être employés aussi bien dans les écosystèmes agroforestiers que dans les environnements urbains (Lacey et Kaya, 2007).

Depuis environ 130 ans, les champignons entomopathogènes, et en particulier *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokin, sont utilisés pour la lutte biologique (Lacey et Undeen, 1986) contre les insectes nuisibles. *Metarhizium anisopliae* est un champignon entomopathogène capable d'infecter et de tuer une large gamme d'insectes (Veen, 1968 ; Samuels *et al.*, 1989), ce qui le rend efficace comme agent de lutte biologique.

C'est dans ce contexte qui s'inscrit notre travail dont l'objectif est d'étudier l'effet bio-insecticide du champignon entomopathogène *Métarhizium anisopliae* isolé à partir d'un sol agricole sur une population expérimentale des larves de *Tenebrio molitor*, dans des conditions de laboratoire

Le présent travail s'articule autour de cinq chapitres dont la premier rassemble des données bibliographiques sur les champignons entomopathogènes précisément l'espèce *Metarhizium anisopliae* qui est utilisée comme agent de lutte biologique contre les larves de *Ténébrio molitor*. La présentation de l'insecte ravageur *Ténébrio molitor* traitée dans le deuxième chapitre. Elle est suivie par la partie "Matériel et méthodes" correspondant au troisième chapitre. Les résultats sont rassemblés dans le quatrième chapitre, la discussion est développée. Cette étude s'achève par une conclusion et des perspectives.

# *Revue bibliographique*

## Chapitre 1 : Le champignon entomopathogène *Metarhizium anisopliae*

### 1. Généralités sur les champignons

Les champignons (fungi ou mycètes) représentent un ensemble d'organismes hétérotrophes ubiquistes. Avec environ 120 000 espèces, ces organismes affichent une grande diversité de structures et de caractéristiques biologiques, adaptées à des modes de vie saprophytes, parasites ou symbiotiques (Semal *et al.*, 1993 ; Kirk *et al.*, 2001).

Les champignons sont des micro-organismes eucaryotes, appartenant aux thallophytes, généralement filamentueux et strictement aérobies, (Mathew, 1995 ; Tortora *et al.*, 2003), et rarement anaérobies. Ils ont un métabolisme hétérotrophe, ce qui signifie qu'ils tirent leur énergie de la dégradation de matières organiques présentes dans leur environnement, par respiration ou fermentation. Les champignons ont une structure végétative appelée thalle, qui est composée de filaments appelés hyphes. (Hawksworth *et al.*, 1994). Ces hyphes forment un réseau complexe appelé mycélium (Mathew, 1995). Chez la plupart des champignons, les hyphes sont divisés en cellules distinctes par des cloisons appelées septes. Mais dans certains cas, les hyphes peuvent être des cellules longues et continues avec plusieurs noyaux, appelées cénotypes (Tortora *et al.*, 2003).

Les hyphes des mycètes sont des structures tubulaires fines et transparentes, entourées d'une paroi cellulaire rigide composée de chitine et de cellulose. Cette composition leur confère une grande rigidité et une résistance exceptionnelle aux conditions environnementales difficiles. Grâce à cette structure, les champignons peuvent prospérer dans des environnements variés, notamment dans des conditions légèrement acides (pH 3-7) et à des températures optimales comprises entre 20°C et 30°C. Certaines espèces de mycètes sont même capables de se développer à des températures très basses, parfois inférieures à 0°C (Botton *et al.*, 1990 ; Guiraud, 1998 ; Tortora *et al.*, 2003).

Les hyphes, qu'ils soient segmentés ou non, sont de fins tubes transparents entourés d'une paroi rigide composée principalement de chitine, et parfois aussi de cellulose. Cette structure leur donne une grande solidité, une longue durée de vie et une bonne résistance à la chaleur ainsi qu'à des pressions osmotiques élevées. C'est ce qui permet aux mycètes de survivre dans des conditions parfois très difficiles. En général, ils se développent dans des milieux légèrement acides, avec un pH entre 3 et 7, et préfèrent des températures comprises entre 20°C et 30°C.

Cela dit, certaines espèces sont capables de pousser à des températures beaucoup plus basses, parfois même en dessous de 0°C, ce qui montre à quel point ces organismes sont adaptables. La reproduction chez la majorité des champignons se fait selon deux modes : la reproduction sexuée et la reproduction asexuée (Semal *et al.*, 1993). Effectivement, la majorité des espèces ont la capacité de produire des spores, soit au sein de sporocystes chez les champignons inférieurs à thalle non cloisonné, soit sur des ramifications du mycélium qui sont différenciées (Davet, 1996).

## 2. Les champignons entomopathogènes

Les agents pathogènes sont des organismes vivants pouvant engendrer une maladie à leur hôte. Les pathogènes des insectes appelés entomopathogènes comprennent : les bactéries (ex : *Bacillus thuringiensis*, *B. sphaericus*), les protozoaires (ex : *Amoebidea*), les virus (ex : *Entomopox* virus) et les champignons qui font l'objet de notre étude.

Parmi les micro-organismes utilisés en lutte biologique, plus de 700 espèces de microchampignons sont entomopathogènes (Starnes *et al.*, 1993) et jouent un rôle important dans la régulation naturelle des populations d'insectes (Ferron, 1978 ; Wraight et Roberts, 1987). 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 Deuteromycètes (Fungi imperfecti). Ces derniers appartiennent aux champignons à hyphes septés, se multipliant de façon non sexuée. Les espèces des genres *Beauveria*, *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.

### 2.1 *Metarhizium anisopliae*

*Metarhizium anisopliae* était le premier pathogène utilisé délibérément pour le contrôle des insectes ravageurs par le Russe Eli Metchinnicoff (le père de la lutte microbiologique) dans les années 80. Il a été isolé et identifié sur la paille de céréale près d'Odessa en Ukraine sous le nom *Anisopliae austria* ou il l'a nommé *Entomophthora anisopliae*. En 1883 Sorokin assigna ce champignon à la muscardine verte au genre *Metarhizium*. Depuis il est connu sous le nom de *Metarhizium anisopliae*.

## 2.1.1 Taxonomie et Classification

La classification du genre *Metarhizium* a subi plusieurs révisions au cours des dernières années. Il est actuellement classé parmi les Hyphomycètes, dans le phylum des Deutéromycètes, également appelés champignons imparfaits. Cependant, des études basées sur l'homologie de l'ADN ont révélé que plusieurs espèces de ce genre, notamment *Metarhizium*, sont affiliées à la division des Ascomycota (Kouadio, 2019).

La plupart des mycologues rejettent la classification des Deutéromycètes comme un groupe taxonomique valide. Grâce à des analyses d'homologie de l'ADN, plusieurs espèces de champignons, dont *Metarhizium anisopliae* ont été reclassées parmi les Ascomycota. Ainsi, *M. anisopliae* appartient désormais au règne des Mycota, à la division des Ascomycota et à l'ordre des Hypocreales (Benserradj, 2014).

Les champignons entomopathogènes sont un groupe de micro-organismes eucaryotes, hétérotrophes et phylogénétiquement diversifiés. Ils peuvent être unicellulaires ou multicellulaires (sous forme de filaments) et se reproduisent par l'intermédiaire de spores sexuées ou asexuées.

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

**Règne :** *Fungi*

**Embranchement :** Dikarya

**Sous-embranchement :** *Ascomycota*

**Classe :** Pezizomycotina

**Ordre :** *Hypocreales*

**Famille :** *Clavicipitaceae*

**Genre :** *Metarhizium*

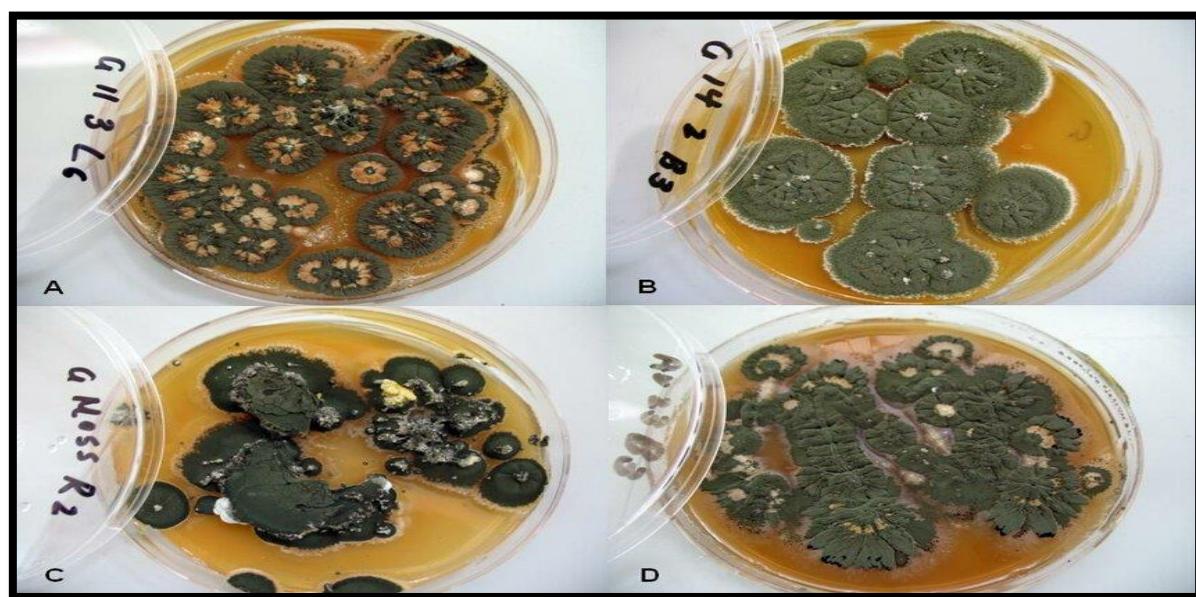
**Espèce :** *Metarhizium anisopliae*

## 2.1.2. Les caractères morphologiques et cultureaux

### 2.1.2.1. Aspect macroscopique

Pour identifier ces champignons, les principaux critères seront liés aux formes des structures de production de spores. L'identification du genre se fait en fonction de la disposition des phialides portant des chaînes et des colonnes de conidies sèches. Les conidies sont habituellement vertes, présentant une forme cylindrique ou légèrement ovale.

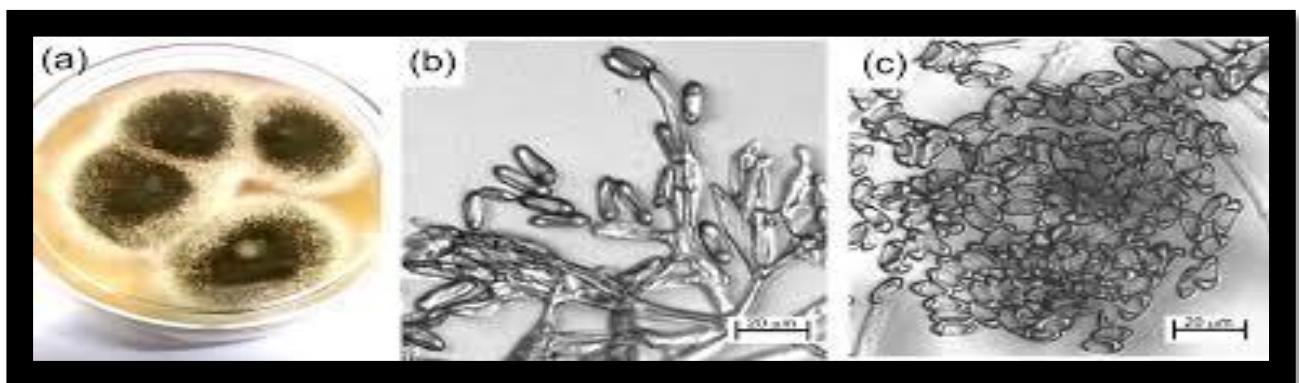
Les colonnes de conidies sont le produit de l'assemblage de chaînes de conidies. D'après Tulloch, il n'y a que deux espèces qui font partie du genre *Metarhizium*, *M. anisopliae* et *M. flavoviride* (Figure 01). Deux formes de *Metarhizium anisopliae* ont été identifiées en fonction de la dimension des conidies. (1) la forme à spores courtes *M. anisopliae* (Metsch.) Sorok. *M. anisopliae*, caractérisée par des conidies mesurant environ 5–8 µm de long, et (2) la forme à spores longues *M. anisopliae* (Metsch.) Sorok. Var. major (Johnston), avec des conidies généralement entre 10 et 14/16 µm de long, qui a ensuite été transformée en *M. anisopliae* var. *majus* (Johnson) Tulloch par Rombach et al. (1986).



**Figure 1:** A, B, D- *Metarhizium anisopliae* C- *Metarhizium flavoviride* (Goble, 2009).

### 2.1.2.2 Aspect microscopique

Au microscope, le champignon révèle un mycélium hyalin, cloisonné et ramifié. Les conidiophores présentent également une ramification. Les phialides présentent une forme cylindrique ou légèrement dilatée sur les côtés au niveau de la zone où s'insèrent les spores. Les conidies de forme ellipsoïdale sont unicellulaires (Figure 02).



**Figure 2 :** (a) *Metarhizium anisopliae*. (b, c) Morphologie fongique observée au microscope optique(Chaves *et al*, 2022).

### 2.1.3 Ecologie

D'après Fuxa (1995) l'écologie est l'étude scientifique de l'habitat et la densité des organismes, ces dernières sont largement conditionnés par des facteurs abiotiques tels : température, humidité, rayonnement solaire et facteurs biotiques tels : interaction entre espèce.

#### 2.1.3.1. Facteurs abiotiques

- **La température :** la température influe la capacité de stockage des champignons, en effet la vitalité des conidies sèches de *Metarhizium anisopliae* se réduit lors de l'augmentation de la température de stockage, variant de 8 à 25 C° et également affectée par l'exposition à la lumière (Clerk et Madelin, 1965).
- **L'humidité :** c'est un paramètre environnemental essentiel d'une part pour l'efficacité et d'autre part pour la survie des agents entomopathogènes. Une humidité relative (HV) élevé est requise pour la germination de *Metarhizium anisopliae* (Walstad *et al*, 1970).

- **Rayonnement solaire :** la radiation ultraviolette solaire (UV-A et UV-B) sont des facteurs influençant l'efficacité ou l'inefficacité de champignon entomopathogène *M.anisopliae*. Elle peut impacter la survie du champignon et joue ainsi un rôle essentiel dans la sécurité des résidus présents dans les cultures traitées (zimmermann, 2007).

## 2.2. Importance de *Metarhizium anisopliae* dans la lutte biologique

Le *Metarhizium* est un genre de champignons très abondant avec plusieurs identités. Ils sont surtout connus pour leur capacité à infecter et à tuer de nombreux arthropodes différents, mais la plupart sont également saprophytes, colonisateurs de la rhizosphère et endophytes racinaires bénéfiques, avec la capacité de passer d'un mode de vie à l'autre.

De plus, le *Metarhizium* forme un clade monophylétique avec le nématode pathogène *Pochonia chlamydosporia*, et des représentants du *Metarhizium* ont transité vers des hôtes fongiques et même des lézards. Outre leur rôle crucial dans les écosystèmes naturels (le règne fongique est responsable d'une grande partie des maladies des insectes), les espèces entomopathogènes de *Metarhizium* et *P. chlamydosporia* nématophages sont utilisées comme alternatives écologiques aux insecticides chimiques.

*Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokin fut l'un des premiers organismes sérieusement étudiés pour son utilisation contre les ravageurs agricoles. L'immunologue pionnier Elie Metchnickoff initia des essais de ce champignon contre le hanneton des céréales *Anisoplia austriaca* en 1879. Les produits formulés à base de *Metarhizium* sont actuellement utilisés dans le monde entier ; l'un des programmes de lutte biologique les plus réussis au monde consiste à traiter chaque année deux millions d'hectares de canne à sucre au Brésil avec *M. anisopliae* pour lutter contre les cicadelles. Les champignons entomopathogènes sont particulièrement bien adaptés au développement en tant que biopesticides car, contrairement aux bactéries et aux virus qui doivent être ingérés pour provoquer des maladies, les champignons infectent généralement les insectes par pénétration directe de la cuticule. Ces champignons sont capables de dégrader, de pénétrer et d'assimiler la cuticule des insectes en utilisant une combinaison d'enzymes dégradant la cuticule et de pression mécanique, tout en surmontant les stress rencontrés en cours de route. En atteignant l'hémocoèle, les champignons se multiplient en entrant en compétition avec succès pour les nutriments et en évitant les protéines antimicrobiennes et les cellules circulantes (hémocytes), qui sont capables de phagocytose et d'encapsulation des micro-organismes envahisseurs. Une fois l'hôte mort, le champignon perce la cuticule de l'intérieur vers l'extérieur, permettant la formation de spores

conidiennes qui, lors de leur dispersion, initient de nouvelles infections. Ainsi, la transmission ultérieure du *Metarhizium* nécessite la mort de l'hôte (Leger *et al.*, 2020).

### 2.3. Production des toxines

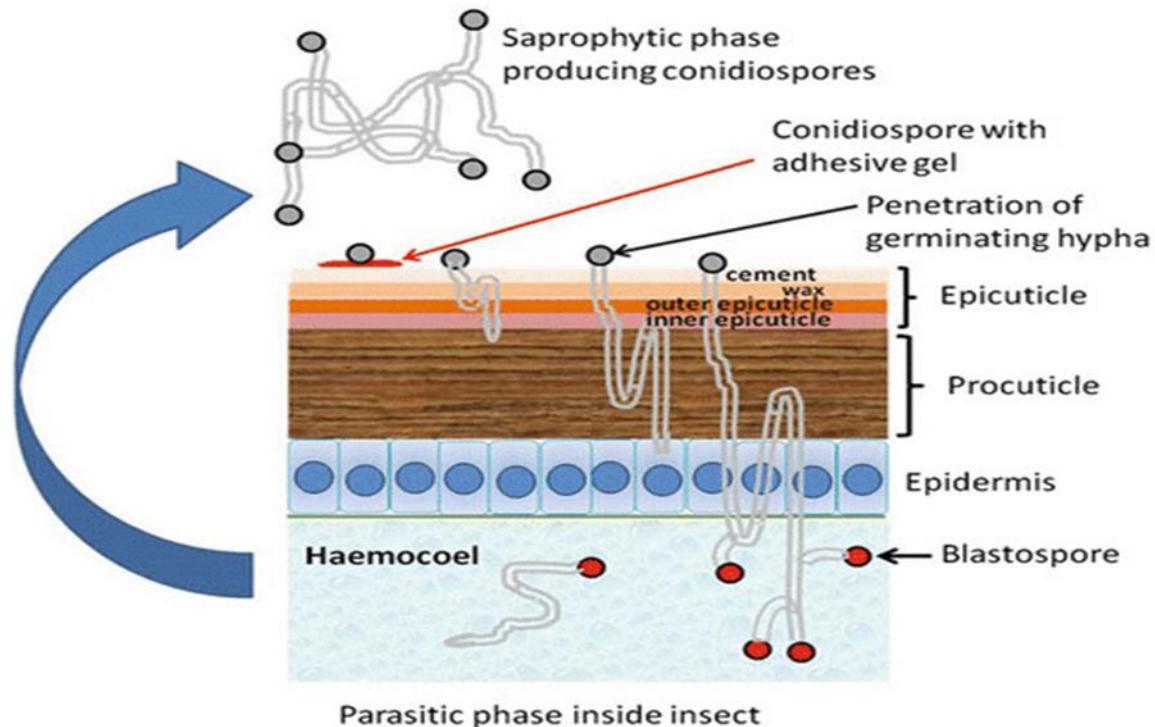
*Metarhizium.anisopliae* est un champignons entomopathogène qui synthétise un groupe de toxines cycliques connus sous le nom des destruxines (DTX). A ce stade près du 23 formes différentes découvertes dans ses cultures, ces composés présentent tous une structure similaire constitué de cinq acide aminé associés à un hydroxyacide (Kodaira, 1961 ; Suzuki *et al.*, 1970 ; Suzuki et Tamura, 1972 ; Pais *et al.*, 1981 ; Gupta *et al.*, 1989 ; Wahlman et Davidson, 1993 ; Chen *et al.*, 1995 ; Yeh *et al.*, 1996).

Les premières études clés sur les impacts des DTX sur les muscles des lépidoptères ont démontré que la paralysie résulte d'une dépolarisation de la membrane musculaire qui dépend du calcium (Samuels *et al.*, 1988b ; Bradfisch et Harmer, 1990).

Dans les conditions idéales l'insecte meurt habituellement entre 3 à 5 jours après l'infection. Après la mort l'espèce synthétise un antibiotique l'oosporine qui lui permet de surpasser la concurrence des bactéries saprophytes dans le tube intestinal de l'insecte (Inglis *et al.*, 2001).

### 2.4. Mode d'infection

Les champignons entomopathogènes infectent leurs hôtes en pénétrant directement l'exosquelette ou cuticule. Cette dernier est composé de deux couches tels : épicuticule est située à la surface qu'elle a une structure mince et complexe dépourvue de chitine mais riche en protéines stabilisées par des composées phénoliques, et la procuticule interne est formée de fibres de chitine insérées dans une matrice protéique, en plus de contenir des lipides et des quinones. Les protéines peuvent représenter jusqu'à 70 % de la masse de cette structure. Lorsque les conidies des champignons entomopathogènes entrent en contact avec la surface de l'hôte, elles germent et se différencient fréquemment en un appressorium. Une hyphe d'infection traverse la cuticule (Clarkson *et al.*, 1996). (Figure 03)



**Figure 3 :** Pénétration de la cuticule par un champignon entomopathogène (D.Doucet and A.Retnakaran)

Le champignon entomopathogène se développe rapidement dans l'hémocoèle de l'insecte.

Habituellement les insectes sensibles aux champignons meurent dans un délai de 3 à 10 jours après l'infection. Après la mort de l'insecte le champignon entre dans une phase hyphale et colonise les organes internes et commence à sporuler à la surface de cadavre (Ferron *et al.*, 1993).

Tous les champignons entomopathogènes ont le même cycle infectieux (Ferron *et al.*, 1993). Le mode d'infection de ces agents entomopathogènes est subdivisé en quatre étapes successives : L'adhésion, la germination, la pénétration et la dissémination (Figure 04).

- ❖ **Phase d'adhésion :** c'est la première phase du processus infectieux, débute par un contact passif des spores avec l'hôte, facilité par des agents environnementaux : l'air et l'eau. Cette étape est activée par un système de reconnaissance entre la surface des spores et le tégument de l'insecte (Khachatourians, 1991 ; Tanada et Kaya, 1993). L'infection commence principalement par la pénétration du tégument de l'insecte-hôte en tant que les spores peuvent pénétrer par d'autres voies tels que : le système respiratoire (Clark *et al.*, 1968), le tube

alimentaire (Miranpuri et Khachatourians, 1991) et la cavité buccale (Siebeneicher *et al.*, 1992). L'adhésion des spores à la cuticule est conditionnée par les forces hydrophobiques non spécifiques et les charges électrostatiques (Boucias *et al.*, 1988 ; Butt, 1990).

Des systèmes de reconnaissance spécifiques ont été détectés à la surface des spores et pourraient être impliqués dans leur mécanisme d'attachement tels que : des polysaccharides fongiques extracellulaires, des lactines et des enzymes extracellulaires (Napolitano et Juárez, 1997). Lorsque la spore est en contact avec la cuticule de l'insecte, elle génère un mucilage hygroscopique qui modifie l'épicuticule de l'insecte et facilitant la germination. Ce mucilage crée également un environnement favorable pour l'activité des enzymes sécrétés par la spore (Boucias et Pendland., 1991).

❖ **Phase de la germination :** c'est la deuxième phase du processus infectieux. Elle est influencée à la fois par l'état physiologique de l'hôte et par des conditions environnementales telles que la température et l'humidité (Butt et Becket, 1994 ; Butt *et al.*, 1994). Ce processus conduit à la formation d'appressoria qu'elle est l'attachement des structures terminales qui assurent l'ancrage à la cuticule et facilitent la pénétration du champignon. La composition nutritive de la cuticule joue un rôle déterminant dans la formation de ces structures (Magelhaes *et al.*, 1981 ; Ferron *et al.*, 1993).

Lors d'expérimentations *in vitro* la germination est déclenchée en présence de sources de carbone comme : le glucose, la glucosamine, la chitine, l'amidon et l'azote (St Leger *et al.*, 1986a, 1986b). Les acides gras et les lipides présents sur l'épicuticule peuvent également susceptibles d'affecter la germination (Lecuona *et al.*, 1997). Ce processus dépend aussi de la tolérance du champignon aux composés potentiellement toxiques présents à la surface de l'épicuticule, tels que : les acides gras à chaîne courte et les phénols (St Leger *et al.*, 1990), ainsi que de l'antagonisme provoqué par la flore saprophyte colonisant la cuticule de l'insecte (Charnley, 1989).

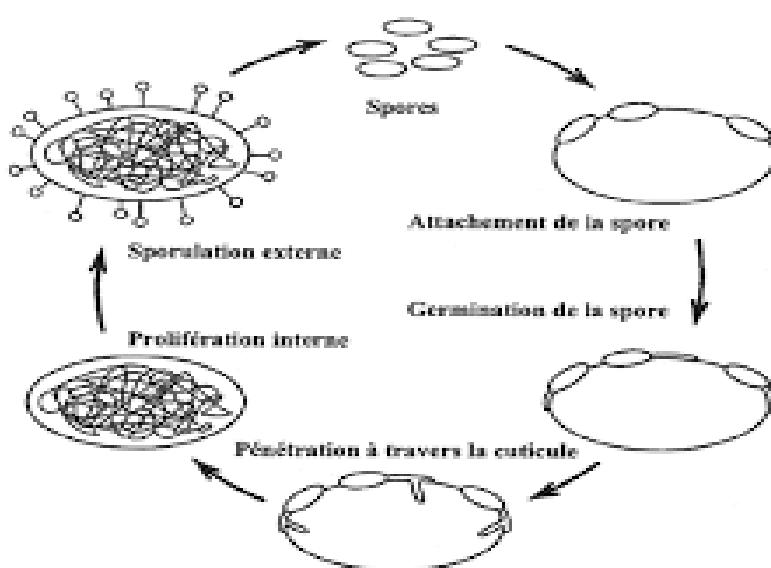
❖ **Phase de pénétration :** *Metarhizium anisopliae* pénètre l'insecte hôte par les ouvertures naturelles, les cuticules ou alors par ingestion. Lorsque le teneur en azote et en carbone est élevé le tube germinatif poursuit son développement et forme un hyphe (St Leger *et al.*, 1992). Chez tous les champignons filamentueux, la rigidité de la surface, l'hydrophobicité, la topographie et les nutriments affectent la structure infectieuse ou l'appressorium, la croissance de ce dernier nécessite l'activation de l'AMPc et la diffusion de Ca<sup>2+</sup> comme signaux moléculaire

intracellulaires (St Leger *et al.*, 1990). La pénétration est effectuée par pression mécanique et dégradation enzymatique (Goettel *et al.*, 1989).

Le filament mycélien génère des enzymes extracellulaires comme les protéases, les lipases et les chitinases qui dégradent et lysent la cuticule, ce qui facilite la pénétration des spores traversant la cuticule et se croître au sein de l'insecte (Hajek et St Leger, 1994). Les protéases sont les enzymes extracellulaires les plus importants dans la pénétration des champignons entomophagiques dans l'insecte hôte (Campos *et al.*, 2005).

- ❖ **Phase de dissémination :** après le réussi de champignon de traverser la cuticule et la couche épidermique, il pénètre dans le système circulatoire ouvert de l'insecte. Ensuite il se réplique et colonise progressivement l'insecte sous forme de blastospores, ce qui favorise la propagation et l'occupation de l'hémocoele et améliore l'absorption rapide des nutriments.

Le glucose est un élément clé dans le métabolisme de l'insecte, il est habituellement disponible à des teneurs faibles.



**Figure 4 :** Cycle biologique et mode d'infection des champignons entomopathogènes sur son hôte (Sources : Ferron *et al.* 1993)

## 2.5. Facteurs affectant l'efficacité de *Metarhizium anisopliae*

L'efficacité de l'activité des champignons entomopathogènes en tant qu'agent pathogène de lutte biologique est étroitement liée aux caractéristiques physiologiques des populations hôtes ainsi que les conditions environnementales (Ferron *et al.*, 1991).

### 2.5.1. Facteurs liés aux pathogènes

La virulence et la spécificité vis-à-vis de l'hôte représente deux éléments clés dans la sélection d'un bon candidat pour la lutte biologique. Des études ont montré que les insectes de la même population présentent une sensibilité variable en fonction des espèces du genre *Metarhizium* (Todorova et al., 1994). A l'échelle industrielle la mise en évidence des tests biologiques standardisés de laboratoire est nécessaire pour évaluer le potentiel insecticide des formulations produites et assurer le suivi de leur stabilité au cours de la conservation (Ferron et al., 1991).

### 2.5.2. Facteurs dépendant à la cible

Aujourd'hui il est établi que l'ensemble des étapes de développement de l'insecte de l'œuf à l'adulte présentent une sensibilité aux infections fongique.

### 2.5.3. Facteurs de l'environnement

#### 2.5.3.1. Effet du sol

Le sol représente l'environnement favorable pour la croissance de *Metarhizium anisopliae* car il réduit les effets nuisibles liés à la dessiccation, à l'exposition aux rayons ultraviolets et aux températures extrêmes. Il représente également une source des nutriments grâce aux insectes décédés et aux résidus végétaux. En général la présence de microflore est favorable à *M. anisopliae* (Lefort, 2018).

Le sol agit comme un réservoir naturel pour les insectes infectés par les champignons qui par la suite tombent au sol après l'infection (Keller et Zimmermann, 1989).

#### 2.5.3.2. Température

La température est un facteur important et déterminant pour la germination, la croissance et la viabilité des champignons entomopathogènes, tant en laboratoire qu'en environnement naturel.

*Metarhizium anisopliae* est un champignon mésophile se croît dans une température allant de 15 à 35 avec une germination et un développement optimal entre 25 et 30 °C (Müller-Kögler 1965 ; Walstad et al. 1970 ; Roberts & Campbell 1977 ; Alves et al. 1984 ; Hywel-Jones & Gillespie 1990 ; Welling et al. 1994 ; Ekesi et al. 1999a ; Milner et al. 2003a).

Les changements de température (hautes et basses) influencent la vitesse de l'infection de insectes par l'empêchement de la germination des spores fongiques ce qui impacte la création de tube germinatif et l'introduction à travers la cuticule de l'insecte (Mitsuaki, 2004).

D'après Walsted et al en 1970, le seuil de mortalité thermique des spores de *Metarhizium anisopliae* est près de 50 C° (49C° pendant une durée de 10min). Cependant, il est clairement démontré que la résistance des spores fongiques à la chaleur est fortement dépendante aux conditions d'humidité.

### 2.5.3.3 Humidité

L'humidité relative est un des facteurs majeurs pour la germination des spores, la croissance des champignons et la pathogénèse. Pour déterminer cette humidité consiste à utiliser un facteur qui est l'activité de l'eau désignée par le terme AW.

*Metarhizium anisopliae* atteint son taux de croissance optimal à une AW= 98-99% pour une température de 25C° en tant que dans une température entre 30 et 37C° son optimum de développement se trouve à une AW de 100% (Hallsworth, 1999).

En 2006, Lazzarini et al ont montré qu'à une activité de l'eau de 0,93, la germination des spores fongiques était ralentie, bien que la majorité des souches avaient germé après environ neuf jours d'incubation.

### 2.5.3.4 Rayonnement solaire

Outre la température et l'humidité relative, le rayonnement ultra-violet (UV-A et UV-B) issu du soleil fait partie des facteurs déterminants dans la performance de *Metarhizium anisopliae* en milieu naturel. Ce rayonnement peut altérer la viabilité du champignon. Plusieurs recherches ont examiné la sensibilité des conidies de *Metarhizium anisopliae* à la lumière du soleil qu'elle que soit naturelle ou artificielle avec ou sans protections solaire (Zimmermann 1982 ; Ignoffo & Garcia 1992 ; Moore et al. 1993, 1996b ; Hunt et al. 1994 ; Fargues et al. 1996 ; Alves et al. 1998 ; Shah et al. 1998 ; Braga et al. 2001a, b,c; Rangel et al. 2004).

L'ensemble des données indiquent que les rayonnement UV-B (280-320nm) et UV-A (320-400nm) sont les composants les plus préjudiciables du rayonnement solaire naturel entraînant l'inactivation des conidies en seulement quelques heures.

## 2.6. Avantages de l'utilisation de *Metarhizium anisopliae*

Vers la fin du 19<sup>eme</sup> siècle, Metchnikoff a été le premier à décrire les infections de *Metarhizium anisopliae* chez le hanneton des céréales, et il a proposé l'utilisation de ces champignons comme agent de lutte biologique contre les insectes (zimmermann *et al.* 1995).

Ce champignons entomopathogène est à un grand intérêt dans la lutte biologique, il est capable d'infecter une large gamme d'hôte soit des arachnides ou d'insectes allant des ravageurs agricoles aux vecteurs de maladies humaines. *Metarhizium anisopliae* est classé parmi les agents de lutte biologiques les plus utilisés dans le monde. Depuis les années 1970 cet agent entomopathogène est employé avec succès contre les ravageurs de la canne à sucre au Brésil (Yates *et al.*, 2014).

*M.anisopliae* a une action insecticide plus rapide que celle d'autres agents entomopathogènes plus sa longue durée de conservation et stabilisation. Son application se réalisé à l'aide des équipements standards, et son impact sur les insectes positifs et les organisme non ciblé sont minime à inexistant (Zimmermann 2007). L'infection de l'hôte par *M.anisopliae* est plus simple :soit par ingestion ou par un contact direct contrairement aux autres agents entomopathogenes ou l'infection dépend d'une ingestion préalable (Cloutier et Cloutier 1992).

## 3. Réponse immunitaire à l'infection microbienne chez l'insecte

Les insectes représentent un exemple spécifique d'immunité naturelle, appelée non spécifique qui ne fait pas intervenir aux lymphocytes ni aux antibiotiques qu'il est le cas des mammifères (Fugita, 2002 ; Hoffmann et Reichhart, 2002). Pour se protéger contre les agentspathogènes, les insectes mis en place pour leur évolution divers mécanismes de défenses. En effet l'envahissement de l'hémocoele dépend étroitement de la capacité de l'agent infectieux à contourner ces mécanismes immunitaires de défenses (Ferron *et al.*, 1993). Les stratégies de défense des insectes comprennent des barrières structurelles passives telles que la cuticule, le tegument chitineux de l'insecte sert donc comme une barrière primaire de défense efficace contre la plupart des microorganismes. En absence de blessures le tube digestif est le principal passage d'infection des insectes par les bactéries, les virus et les parasites. Toute fois comme il est mentionné précédemment, les champignons entomopathogènes ont la capacité de traverse la cuticule et débutent l'infection.

## Chapitre 2 : Les insectes ravageurs des cultures

### 1. Généralités sur les cultures en Algérie

L'Algérie, par sa vaste superficie et la diversité de ses zones agro-climatiques, possède un potentiel agricole important. Du littoral méditerranéen aux hauts plateaux, jusqu'aux régions sahariennes, le pays présente une variété d'écosystèmes favorables à une grande diversité de cultures. L'agriculture algérienne repose principalement sur les cultures céréaliers, maraîchères, arboricoles, ainsi que les cultures industrielles telles que la betterave sucrière ou le tournesol. Parmi les productions les plus répandues figurent le blé, l'orge, la tomate, la pomme de terre, l'olivier, les agrumes, ainsi que les dattes dans les zones sahariennes (Bedrani, 2008).

Cependant, ce secteur stratégique est confronté à de nombreux défis : conditions climatiques difficiles (sécheresses récurrentes), faible mécanisation, dépendance aux importations, et surtout, la pression croissante des ravageurs et maladies. Ces derniers représentent une menace majeure pour la productivité agricole et la sécurité alimentaire. Les pertes dues aux insectes sur les céréales et les légumineuses sont de l'ordre de 10% à 40% dans des pays où les technologies modernes de stockage n'ont pas été introduites (Hignar, 1985). Ainsi, une bonne connaissance des cultures pratiquées et de leurs principaux ennemis biologiques est indispensable pour adopter des stratégies de protection efficaces et durables (Bedrani, 2008).

### 2. Les insectes ravageurs de cultures

Les ravageurs désignent l'ensemble des organismes principalement les insectes qui provoquent des dégâts aux plantes cultivés en introduisant des pertes de rendement qu'elle soit liée à une altération qualitative ou quantitative de la production.

Les insectes appartenant de phylum arthropode caractérisées par la présence de six pattes et un corps composé de trois parties : la tête, le thorax et l'abdomen.

Environ un million d'espèces divers d'insecte ont été décrites à ce jour dans le monde, et on les retrouve dans la quasi-totalité des milieux naturels. Toutefois le nombre d'espèces pourrait être plus de dix fois supérieur.

Les insectes ravageurs dites se divisent selon leur mode d'alimentation ou d'action sur la plante en deux catégories fonctionnelles (Deguine, 2007, Rebihi et Chettouh 2024) :

### 2.1. Les ravageurs broyeurs

Ces insectes consomment directement les tissus végétaux, provoquant une perte visible des parties de la plante (feuilles, tiges, racines ou fruits). Leur appareil buccal est de type broyeur. Ce mode d'alimentation entraîne souvent :

- Des perforations ou déchirements sur les feuilles,
- La dévoration complète des jeunes pousses ou bourgeons,
- La chute prématurée des fruits ou des feuilles.

### 2.2 Les ravageurs piqueurs-suceurs

Ces insectes possèdent un appareil buccal de type piqueur-suceur, leur permettant de prélever la sève directement dans les tissus végétaux (phloème ou xylème). Les dégâts causés peuvent être de deux types:

- **Dégâts directs** : affaiblissement de la plante, flétrissement, déformation des organes végétaux.
- **Dégâts indirects** : ces ravageurs sont souvent vecteurs de pathogènes (virus, bactéries, champignons), entraînant des maladies graves pour les cultures.

Certains d'entre eux, comme les pucerons, sécrètent du miellat favorisant le développement de la fumagine, un champignon noir qui gêne la photosynthèse.

Près de la moitié des espèces d'insectes se nourrissent de différentes parties des plantes : les feuilles, les tiges, les racines, les fruits, les fleurs et aussi les graines (Nicolas, 2011). Ces insectes nuisibles représentent des menaces pour la récolte des pays.

On peut distinguer six principaux insectes ravageurs en Algérie : les pucerons verts de tomate, la teigne de la pomme de terre, Ténébrion ou vers fil de fer, Le psylle de l'olivier, Le charançon et la cératite ou mouche méditerranéenne des fruits. (Tableau 1)

**Tableau 1 :** Les principaux insectes ravageurs en Algérie (Web 1)

Insecte ravageur	Cultures	Dégâts
 <i>Macrosiphum euphorbiae</i>	Fève/féverole Tomate Pastèque/Melon Piment/Poivron Pêcher	Les larves ainsi que les adultes provoquent des déformations tissulaires des ponctuations chlorotiques, ils excrètent un miellat riche en sucres favorisant ainsi le développement de la fumagine.
 <i>Phthorimaea operculella</i> (La teigne de la pomme de terre)	La pomme de terre	La chenille ou la larve du papillon adulte peut se développer sur le plant de la pomme de terre et agit comme mineuse sur les feuilles ou comme foreuse des tiges et tubercules.
 <i>Ténébrio molitor</i> (Ver de fil de fer)	Blé Orge Lentille Pomme de terre Piment/Poivron Agrumes Pommier Pêcher Prunier La vigne Figuier Abricotier	Un affaiblissement des plantes Des racines rongées Un collet percé Un jaunissement de la feuille centrale  La femelle adulte pique les fruits encore immatures et pond ses œufs à l'intérieur. Les fruits parasités deviennent véreux et présentent un jaunissement accéléré puis tombent par terre dès le mois d'octobre.
 <i>Ceratitis capitata</i> (La cératite ou mouche méditerranéenne des fruits)		
 <i>Euphyllura olivina</i>	Olivier	Les larves et les adultes perturbent la fécondation des grappes florales en suçant la sève des organes affectés, induisant ainsi l'avortement des fleurs. Les larves âgées sécrètent une grande quantité de miellat, qu'elle est une substance cotonneuse et

<b>(Le psylle de l'olivier)</b>		gluante, sur laquelle se développe la fumagine.
	Blé Orge Pois-chiche	Le charançon se développe aux dépens des graines de céréales stockées ainsi que de certaines légumineuses sèches La larve traverse quatre stades de développement, creuse une galerie dans l'albumen de la graine, en consommant à la fois le contenu nutritif et le germe.

### 3. L'insecte ravageur *Ténébrio molitor* (*Alphitobium diaperinus*)

#### 3.1 Description

*Alphitobium diaperinus* aussi appelé le petit ténébrion (*Ténébrio molitor*) est un insecte ravageur à répartition mondiale lié généralement aux denrées stockées, il représente un problème majeur pour l'agriculture car il agit comme un vecteur et réservoirs efficace de nombreux agents pathogènes et parasites affectant les volailles, plus son rôle dans la transmission des maladies, cet insecte peut aussi endommager les structures de l'installation d'élevage.

Le petit ténébrion est un coléoptère originaire de la région subsaharienne de l'Afrique (Geden et Hogsette 1994, Lambkin 2001). Selon Renault (2015), le *Ténébrio Molitor* a été observé pour la première fois en Bretagne en 1977.

La larve a une morphologie vermicelle avec une coloration variant du beige au brun. La phase larvaire comporte entre 6 et 11 stade, en fonction des conditions thermiques. Dans le dernier stade de développement, la larve atteindra une longueur maximale d'environ 10mm, l'adulte a une forme ovale et présente une couleur brune à noir caractérisée par un aspect brillant, sa taille varie de 5,8 à 6,3 mm (figure 5), les femelles peuvent pondre jusqu'à 2000 œufs sur l'ensemble de sa vie adulte (Van et Moneret, 2014 ; Cloutier, 2015).



**Figure 5 :** Vues dorsale et ventrale de l'adulte (A) et de quelques stades larvaires (B) d'*Alphitobius diaperinus*, collectés dans des pigeonniers de la ville d'Ahvaz, province du Khouzistan, Iran (Alborzi., 2012).

Le petit ténébrion présente un risque pour la santé humaine en particulier en cas de contact avec les larves ou les adultes peuvent devenir envahissants lorsqu'ils se déplacent en masse vers les lumières artificielles notamment dans les zones résidentielles proches des champs ou des fumiers contaminés de coléoptères (Axtell, 1999).

### 3.2 Systématique

*Tenebrio molitor*, communément appelé le ténébrion meunier ou le ver de farine est une espèce prometteuse pour les élevages de grande envergure (Yang *et al.* 2018).

- ❖ Règne : Animalia
- ❖ Embranchement : Arthropoda
- ❖ Classe : Insecta
- ❖ Ordre : Coleoptera
- ❖ Famille : Tenebrionidae
- ❖ Sous-famille : Tenebrioninae
- ❖ Genre : *Tenebrio*
- ❖ Espèce : *Tenebrio molitor*

### 3.3. Cycle de vie

*Tenebrio Molitor*, connu sous le nom de ver de farine, est un coléoptère qui appartient à la famille des Ténébrionidae. Dans la nature, il habite les écorces d'arbres et les larves se développent à proximité de bois en décomposition. On le trouve également dans les réserves de céréales, ce qui lui a valu son nom commun de ver de farine ou ténébrion meunier.

Dans leur habitat naturel, les adultes émergent au début de l'été et s'accouplent rapidement. La femelle pond environ 400 à 500 œufs, qu'elle dépose individuellement ou en petits groupes. Les œufs, de couleur blanche et luisante, éclosent après une période de 4 à 18 jours (Figure 6). (Jacobs et Calvin 1988).



**Figure 6 :** les œufs de *Tenebrio molitor* (Web 3)

Les larves qui émergent des œufs mesurent environ 2 millimètres de longueur. Au début, elles sont de couleur blanche, mais à mesure qu'elles grandissent et se développent, elles prennent une teinte jaune doré caractéristique (Figure 7). La durée du stade larvaire varie considérablement en fonction des conditions environnementales. Dans un environnement sans chauffage, cette phase peut durer de six à neuf mois, et dans certains cas, elle peut même

s'étendre jusqu'à une année entière (Hill, 2003). Durant cette période, l'insecte est particulièrement résistant et c'est sous cette forme larvaire qu'il passe l'hiver, attendant les conditions favorables pour poursuivre son développement. Plus il y a de nourriture disponible, plus les larves grandissent rapidement (Triplehorn et Johnson 2005).



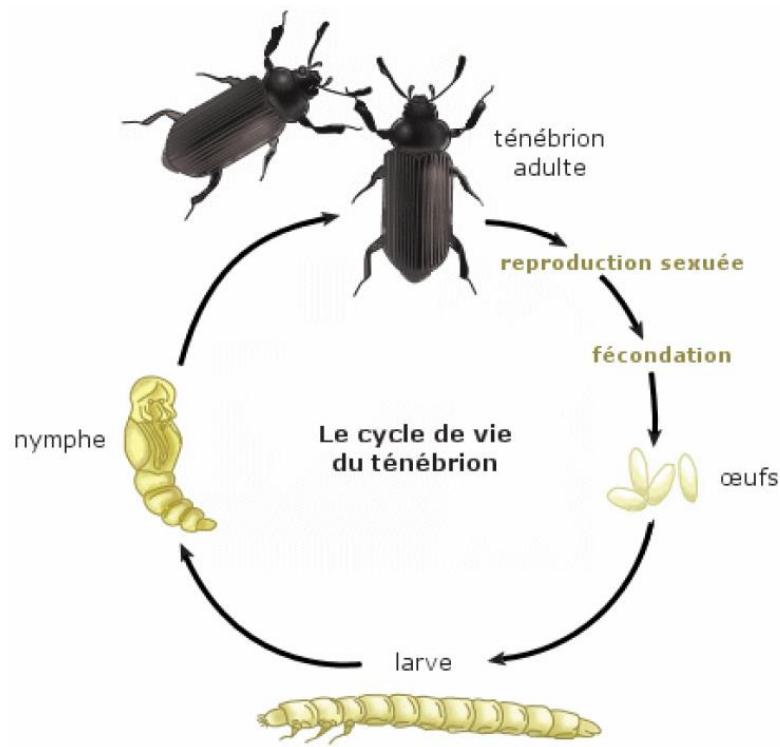
**Figure 7 :** Vue dorsale (tête à gauche) d'une larve du petit ténébrion, *Alphitobius diaperinus* (James *et al.*, 2006)

Les larves se transforment en nymphe mesure environ 16 mm (Figure 8). Elle reste à ce stade pendant 1 à 3 semaines, les pupes se transforment en adultes (Jacobs et Calvin, 1988).

Le ténébrion adulte a l'apparence d'un coléoptère noir. Il est également appelé imago. Contrairement aux criquets, il ne peut pas voler, ce qui facilite son élevage. La durée de vie moyenne d'un adulte est de 8 à 10 semaines (Hill 2003). (Figure 9)



**Figure 8 :** Nymphe du petit ténébrion, *Alphitobius diaperinus* (James *et al.*, 2006)



**Figure 9 :** Cycle de développement simplifié de *Tenebrio molitor* (Derfouf 2021)

### 3.4 Comportement trophique

Les vers de farine prospèrent dans un environnement chaud et humide, mais ils sont capables de s'adapter à des températures ambiantes plus basses. Cependant, leur développement sera ralenti. Pour éviter les chocs thermiques, il est recommandé de laisser les vers de farine s'acclimater à leur nouvel environnement avant de les manipuler. Vous pouvez les stocker au réfrigérateur à une température de 6-7°C pour ralentir leur métabolisme, ou les placer dans un endroit frais comme un garage ou un sous-sol non chauffé, à condition que la température reste au-dessus de 6-7°C.(Web 2)

### 3.5. Régime alimentaire

Les vers de farine sont omnivores et peuvent consommer toutes sortes de matières végétales ainsi que des produits animaux comme la viande et les plumes (Ramos-Elorduy et Coll., 2002). Ils sont généralement nourris avec du son ou de la farine de céréales (blé, avoine, maïs) complétée avec des fruits et légumes frais (carottes, pommes de terre, laitue) pour l'humidité avec des sources de protéines telles que la farine de soja, poudre de lait écrémé ou levure (Aguilar-Miranda et Coll, 2002 ; Hardouin et Coll, 2003). L'alimentation doit être équilibrée pour contenir environ 20 % de protéines (base de MS) (Ramos-Elorduy et Coll., 2002)

Les vers de farine peuvent utiliser les petites quantités d'eau contenues dans les aliments secs, mais la productivité des vers de farine privés d'eau est faible (une génération par an). Il est préférable de leur fournir une source d'eau pour une meilleure productivité (jusqu'à 6 générations par an) et pour prévenir le cannibalisme. L'humidité relative est liée positivement à la fertilité et à l'activité des adultes. Il est nécessaire de surveiller les aliments frais, car ils peuvent devenir moisiss (Hardouin *et al.*, 2003).

### 3.6. Distribution et habitats

Les vers de farine se trouvent dans la majeure partie du monde dans les régions tempérées, mais principalement dans l'hémisphère nord. Ils se nourrissent de céréales et de farine et vivent généralement près des habitations humaines où leurs sources de nourriture sont facilement accessibles. Ils préfèrent les endroits sombres, frais et humides, comme sous les bûches et les feuilles en décomposition. Lorsqu'on les trouve à l'intérieur des maisons, on les trouve là où sont stockés les céréales et les grains. (Defouf 2021)

### 3.7 Les dégâts causés par les *Ténébrio*

Ce sont les insectes nuisibles qui causent d'importantes pertes économiques au niveau du stockage des céréales, sont à l'origine de la plupart des dommages subis dans les réserves des denrées stockées et sont susceptibles de causer des dégâts aux grains stockés (Karahakane, 2015). Les dégâts qu'ils occasionnent incluent la perte de poids et une diminution de la qualité des grains et le rendent impropre à la consommation. Et quelque fois une perte du pouvoir germinatif. L'activité métabolique des insectes crée un milieu favorable au développement des micro-organismes produisant des toxines à l'instar des champignons aflatoxinogènes du genre *Aspergillus* (Waingo *et al.*, 2013).

## 4 Les Méthodes de lutte

La protection des cultures contre les insectes et les acariens pose de nombreux problèmes et doit impliquer de multiples technologies qui doivent être appliquées judicieusement. La principale préoccupation de l'entrepreneur est de garder son grain intact. Ensemble de mesures préventives et thérapeutiques, toutes ces technologies sont conçues pour réduire les perturbations sur le terrain au début du stockage et pendant le stockage. (Korti et Kheddam, 2018).

### 4.1. La lutte Chimique

La lutte chimique se révèle efficace pour protéger les cultures des attaques des ravageurs (Fleurat-Leussard, 1978), Malheureusement son utilisation est limitée par de nombreuses contraintes telles que : Les pesticides posent un problème de contamination de la biosphère à court ou à long terme, selon la nature de la molécule utilisée dans les traitements et selon la manière avec laquelle ils sont appliqués. Les études consacrées à la dispersion des pesticides dans l'environnement ont prouvé la présence de ces produits dans plusieurs points de la biosphère qui n'ont subi aucun traitement (Tunçw et Sahinkaya, 1998). L'utilisation des insecticides chimiques conduit aussi à un désordre éco toxicologique qui est accompagné d'une augmentation spectaculaire du nombre d'espèces devenues résistantes aux insecticides chimiques (Isman, 2000)

### 4.2 La lutte biologique

L'utilisation de micro-organismes comme agents de contrôle biologique est la méthode alternative la plus attrayante et non dangereuse pour la gestion des insectes nuisibles

(Nicholson, 2007). Ces agents provoquent des ravages dans les populations de ravageurs sans présenter de risques pour la santé humaine. De plus, le mode d'action complexe de ce pathogène réduit les chances de développement de résistance. Le terme entomopathogène désigne les micro-organismes (bactéries, virus, champignons et nématodes) capables d'attaquer les insectes en les utilisant comme hôtes pour développer une partie de leur cycle de vie (Delgado et Murcia, 2011), ceux qui réduisent les populations d'insectes nuisibles à des niveaux qui ne causent pas de dommages économiques aux cultures, ou ceux qui sont un moyen de contrôle pour réduire les vecteurs de maladies (Scholte *et al.*, 2004).

Actuellement, les méthodes de lutte biologique sont intégrées dans les stratégies de protection des cultures dans tous les systèmes agricoles (Waage, 1997). La lutte biologique contre les insectes nuisibles aux cultures offre une alternative économique et environnementale attrayante à la lutte chimique (Malausa, 2000)

## *Partie expérimentale*

## I. Isolement et identification du champignon entomopathogène

### *Metarhizium anisopliae*

#### 1. Prélèvement des échantillons

Les échantillons du sol utilisés pour ce travail proviennent de trois sols agricoles Céréaliers (Blé, Mais et Orge) de la région de Constantine : (Eleifour- Zouaghi Slimen). Ils ont été prélevés par la technique de Pochon et Tradieux (1962). Après avoir écarté les cinq premiers centimètres de sol, une quantité suffisante de terre est prélevée du sol, jusqu'à 10 centimètres de profondeur, puis déposée à l'aide d'une spatule sur une feuille d'aluminium stérile. Après un premier tri, écartant les pierres et les débris végétaux, l'échantillon est récupéré dans un flacon stérile. Les échantillons ont été ensuite transportés au Laboratoire de Mycologie, Biotechnologie et de l'Activité Microbienne et traités immédiatement.



**Figure 10 :** Prélèvement des trois différents échantillons du sol.

#### 2. Milieux d'isolement

Deux milieux synthétiques ont été utilisés pour l'isolement du champignon entomopathogène *Metarhizium anisopliae*:

- SDAY (Sabouraud dextrose agar yeast)

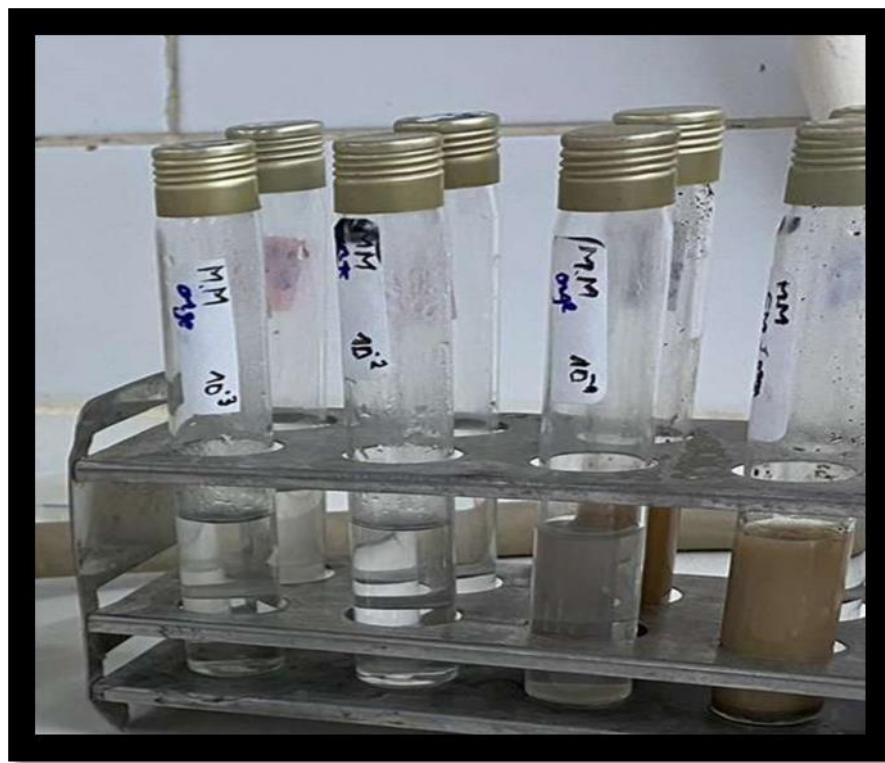
- PDAY (Potato dextrose agar yeast) (Annexe)

La croissance des champignons saprophytes tels que *Aspergillus* et *Penicillium* a été inhibée par l'ajout de Dodine au milieu de culture, à une concentration de 150 µg/mL, permettant une meilleure sélectivité en faveur de champignons entomopathogènes tels que *Metarhizium anisopliae*.

Le milieu Sabouraud Dextrose Agar a été supplémenté avec du Thiabendazole à une concentration de 4 à 20 mg/L pour inhiber la croissance des champignons saprophytes rapides.

### **3. Méthode d'isolement**

Les suspensions du sol collectés (les suspensions mère) ont été réalisés comme suit : 1g du sol de chaque échantillon a été pesé puis a été dilué dans un tube de 9ml d'eau distillée stérile (Clark *et al.*, 1985 ; Ulacio *et al.*, 1997) après une agitation vigoureuse les suspensions ont été bien homogénéisées, une série des dilutions décimales a été effectuée ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ , $10^{-3}$ ) pour chaque échantillon du sol, 1ml a été transféré de la suspension précédente dans des tubes contenant 9ml d'eau distillée stérile (Figure 11).



**Figure 11 :** Dilution décimale des suspensions (SM,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ , $10^{-3}$ ).

Les milieux d'isolement ont été mis en boîtes de pétri stériles puisensemencés par 0.5 ml de chaque suspension mère et de chaque dilution puis étaler à l'aide des pipettes pasteur stériles

(Ikasari et Mitchell, 1994) Les boites de pétri ont été incubées à 28C° pendant quatre semaine à l'obscurité et ont été surveiller jusqu'à l'apparition du mycélium fongique.

#### **4. Purification**

L'objectif de la purification est d'isoler et d'obtenir une souche fongique, dépourvue de toute contamination microbienne, notamment bactérienne ou fongique. La purification réalisée à partir des colonies initialement isolées sur PDAY et SDAY a permis d'obtenir des souches pures de *Metarhizium anisopliae* (Bilgo *et al.*, 2024).

À l'aide d'une anse stérile, un fragment de chaque colonie isolée a été prélevé, puis transféré individuellement sur un nouveau milieu SDAY stérile en boîte de Pétri. Le milieu SDAY est reconnu comme favorable au développement rapide des champignons, ainsi qu'à la production de spores (Botton *et al.*, 1990). Cette étape visait à obtenir une croissance pure et exempte de toute contamination. Les boîtes ont été incubées à 28 °C pendant 7 jours. (Ikasari et Mitchell, 1994)

#### **5. Méthode d'identification**

L'identification des isolats fongiques a été réalisé sur la base des caractères culturaux (identification macroscopique) suit par des caractères morphologiques (identification microscopique).

##### **5.1 Identification macroscopique**

Les souches pures ont été ensemencées sur des milieux de culture spécifiques, préparés dans des boites de Pétri. Une petite quantité de spores ou une bouture mycélienne a été prélevée à l'aide d'une anse de platine stérile et déposée au centre de la boite, permettant ainsi de déterminer les caractéristiques morphologiques et culturelles.

La caractérisation macroscopique des isolats a été effectuée selon la méthode de Benserradj (2014), en observant à l'œil nu les caractéristiques suivantes : la couleur du mycélium aérien et son évolution temporelle, la couleur du revers de la boite, la production de pigments diffusibles, ainsi que la présence ou l'absence de gouttelettes sur le mycélium et sur le revers de la boite.

## **5.2 Identification microscopique**

L'identification des champignons nécessite l'observation au microscope optique. Elle est basée sur les critères d'identification microscopique réalisés par Breton (1990) et Roquebert (1998) quand c'est possible à identifier.

L'identification microscopique a été réalisé selon deux techniques : technique du ruban adhésif transparent (scotch transparent) et la technique de lamelle.

### ➤ **La technique du ruban adhésif transparent**

Une technique utilisée en mycologie très rapide et facile a réalisé et a observer les structures fongiques *in situ* sans altérer les colonies des souches.

Selon la technique utilisée par (Hanif *et al.* 2012), un morceau de scotch transparent a été pressé doucement sur une colonie clair est jeune après il a été monté sur une lame propre contient une goutte de bleu de méthylène on a évité la création des bulles d'air, puis placé la lame au microscope et observer à un objectif de grossissement 40×. L'observation est donc basée les caractéristiques morphologiques de la culture notamment la morphologie des spores, conidiophores et des phialides (forme, longueur, largeur).

### ➤ **La technique de lamelle**

Les observations ont été portées sur les critères morphologiques de classification des champignons entomopathogènes. Proposés par (Fernandez *et al.*, 2010), et (Benserradj, 2014). Un fragment de la culture (*Metarhizium anisopliae*) est prélevé superficiellement à l'aide d'une anse de platine stérile, puis déposé sur une lame contient le bleu de méthylène. La lame est ensuite recouverte d'une lamelle et examinée au microscope optique avec un grossissement de 40x. L'observation porte sur les caractéristiques morphologiques de la culture notamment la morphologie des spores, conidiophores et des phialides (forme, longueur, largeur).

## II. Etude de l'activité larvicide de *Metarhizium anisopliae* sur les larves de *Ténébrio molitor*

### 1. Effet du champignon *Metarhizium anisopliae*

#### 1.1 Préparation de la suspension sporale du *Metarhizium anisopliae*

Les suspensions de spores de *Metarhizium anisopliae* ont été préparées à partir de cultures matures âgées de 10 à 15 jours, cultivées sur milieu gélosé Sabouraud (Annexe).

Deux méthodes ont été utilisées :

- Dans la première méthode, les spores ont été collectées directement à l'aide d'une anse de platine stérile, puis mises en suspension dans 0,9 mL d'eau stérile distillée pour former une solution homogène.
- Dans la seconde méthode, 0,9 mL d'eau stérile distillée ont été déposés directement sur la surface de la boîte de culture. La surface a ensuite été grattée doucement avec une anse de platine stérile pour libérer les spores, qui ont ensuite été récupérées à l'aide d'une micropipette. La précision de la manipulation a été cruciale pour éviter la contamination par des fragments de mycélium.

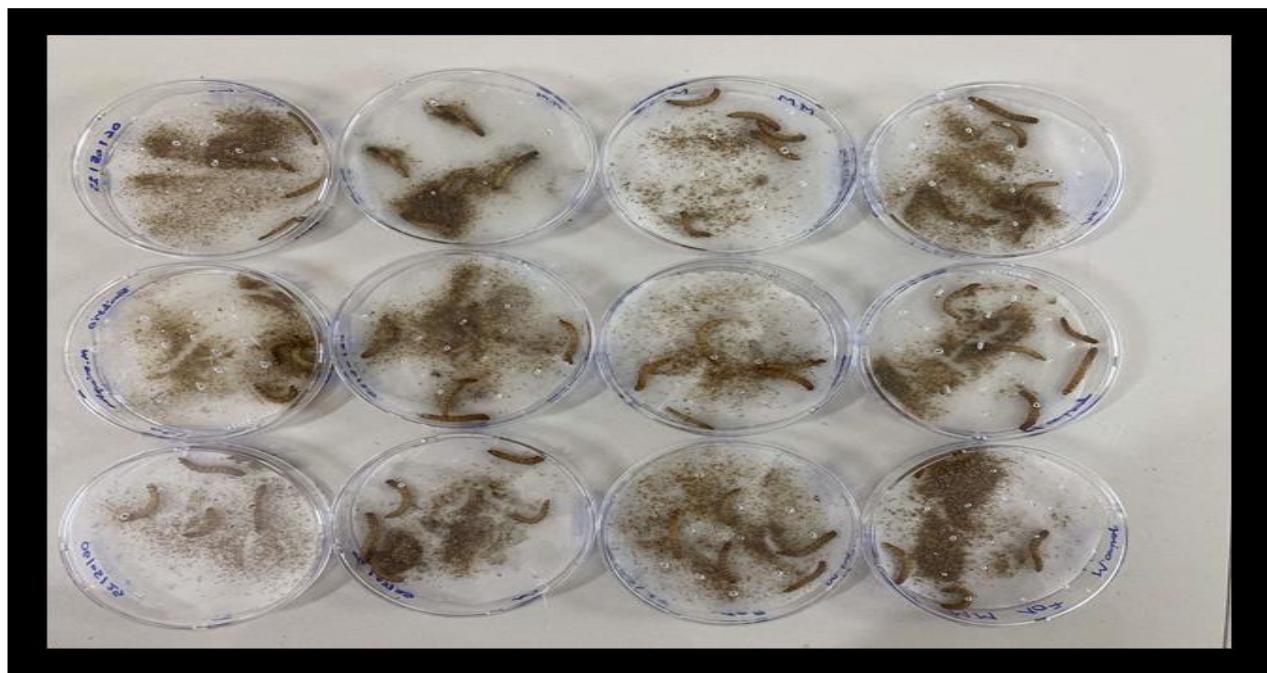
Après préparation des suspensions sporales, leur concentration a été déterminée séparément à l'aide d'une cellule de Thomas. Un petit volume de suspension a été déposé sur la lame de la cellule, puis observé au microscope optique. Les spores présentes dans les carrés du quadrillage ont été comptées afin de calculer la concentration en spores par millilitre. Cette méthode permet d'ajuster précisément les suspensions aux concentrations souhaitées ( $10^9$ ,  $10^8$  et  $10^7$  spores/mL) pour le test de pathogénicité. (Rezende, 2009).

#### 1.2. Test de pathogénicité

Pour évaluer l'effet de *Metarhizium anisopliae* sur *Ténébrio molitor*, on a effectué un test de pathogénicité appliqué selon le protocole de (Rezende, 2009). Les larves de *Ténébrio molitor* ont été immersés dans 1ml de suspension sporale de *M.anisopliae* ( $10^9$ ,  $10^8$ ,  $10^7$  spores/ml ) pendant 10 secondes, Pour les larves témoins elles ont été immersés dans 1ml d'eau distillée stérile. Les larves ont été placés dans des boites de pétri tapissés de papier filtre wahtman stérile humidifié à l'eau distillée stérile et nourris avec leur alimentation habituelle (Déchets des

végétaux). Pour chacune des 3 concentrations de la solution entomopathogène ainsi que pour le témoin, trois répétitions ont été effectuées

Les boites de pétri contenant les larves ont été fermées puis perforées, et ont été incubées dans l'étuve à 26C° avec un contrôle quotidien jusqu'à la mort de toutes les larves. Chaque larve morte est retirée avant la formation des spores de *Metarhizium anisopliae*. (Figure 12)



**Figure 12 :** Boites de pétri contenant les larves de *Tenebrio molitor* immergées dans les concentrations des suspensions sporales

Selon les recommandations de l'OMS (1963), Le pourcentage de mortalité a été calculé en utilisant la formule (1)

$$(1) \text{ Pourcentage de mortalité} = \frac{\text{Nombre des larves mortes}}{\text{Nombre des larves introduites}} \times 100$$

### 1.3. Analyse Probit

Pour estimer la DL50 (dose nécessaire et suffisante pour tuer la moitié d'une population) et le TL50 (temps létal au bout duquel on obtient 50% de mortalité) nous avons utilisé pour chaque dose la transformation en Probit des pourcentages de mortalités corrigées (Cavalier, 1976). Notons que les valeurs sont tabulées. A partir des équations de droites de régression « Probit-logarithme » nous pouvons calculer la DL50 et le TL50 en remplaçant Y par le probit 5. Ces transformations permettent d'établir les droites de régression de type :

$$Y = ax + b$$

Y : probit des mortalités corrigées

x : logarithmes de la dose ou des temps

a : la pente

## 2. Effet du Filtrat de *Metarhizium anisopliae*

### 2.1 Fermentation

Le milieu liquide **PDB** (Potato Dextrose Broth) a été choisi pour la fermentation de *Metarhizium anisopliae* en raison de sa composition (Annexe) riche en glucides et en nutriments favorables pour la croissance et la production des métabolites secondaires des champignons entomopathogènes.

Dix disques mycéliens de *Metarhizium anisopliae* ont été introduits de manière aseptique dans chaque Erlenmeyer contenant 200 ml de milieu de fermentation PDB stérile puis ils ont été incubés à 28°C pendant 21 jours sous agitation à 240 rpm. Les expérimentations ont été réalisées en triple (Hu *et al.*, 2006 ; Ting-Yan *et al.*, 2016).

### 2.2 Filtration

Après une durée d'incubation de 21 jours à 28°C, le contenu de chaque Erlenmeyer est filtré sur papier Whatman n°1, et par filtre seringue afin d'éliminer les spores et le mycélium, conformément aux protocoles décrits par (El Basyouni and Vining, 1966 ; Kershaw *et al.*, 1999 ; Hsiao and Ko, 2001 ; Hu *et al.*, 2006 ; Ting-Yan *et al.*, 2016).

Le filtrat obtenu a été utilisé pour le test de pathogénicité contre les larves de *Ténébrio molitor*

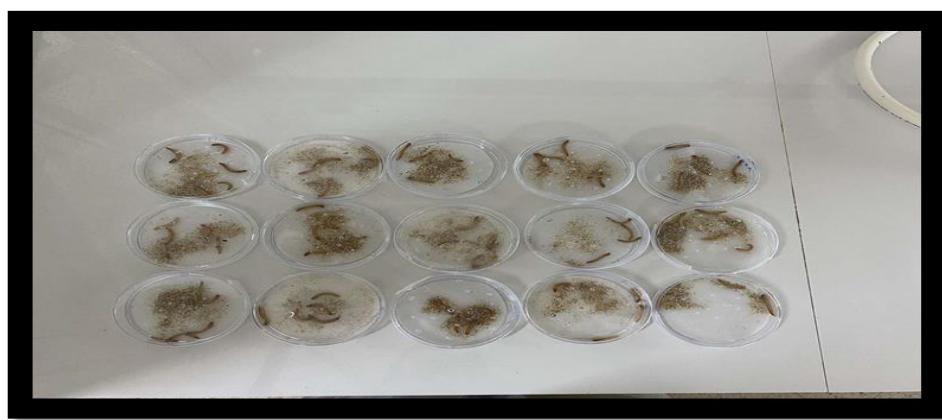
### **2.3 Test de pathogénicité**

Selon le protocole de Ali *et al.* (2020), quatre concentrations de filtrat ont été préparées pour évaluer leur impact sur les larves de *Tenebrio molitor* :

- **100 %** (filtrat non dilué)
- **75 %** (trois parts de filtrat pour une part d'eau distillée stérile)
- **50 %** (parts égales de filtrat et d'eau distillée stérile)
- **25 %** (une part de filtrat pour trois parts d'eau distillée stérile)

Chaque groupe expérimental a été constitué en immergeant cinq larves dans la solution correspondante, selon le protocole de Rezende (2009). Trois répétitions ont été effectuées pour chaque concentration. Pour le témoin les larves ont été immergées dans l'eau distillée stérile.

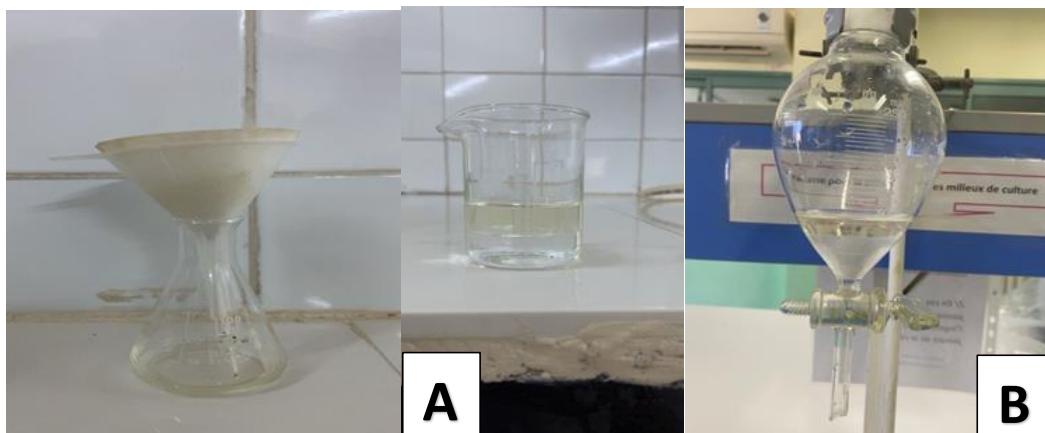
Les larves ont été placées dans des boîtes de Pétri contenant du papier filtre Whatman stérile, humidifié avec de l'eau distillée stérile, et ont été nourries avec leur alimentation habituelle (Déchets des végétaux). Les boîtes ont été fermées, perforées pour assurer une aération adéquate, puis incubées à 26 °C avec un contrôle quotidien jusqu'à la mort de toutes les larves (Figure 13). Chaque larve morte a été retirée avant la formation des spores de *Metarhizium anisopliae*.



**Figure 13 :** Les larves de *Tenebrio molitor* immergées dans différentes concentrations de filtrat.

## 2.4 Extraction

Les 100 ml du filtrat obtenu ont été additionnés à 100 ml de dichlorométhane. Le mélange a été rigoureusement agité pendant 10 min puis laissé décanter en utilisant une ampoule à décantation (figure 14). Cette opération a été répétée en additionnant successivement 50 et 30 ml du solvant à la phase aqueuse récupérée à chaque séparation.



**Figure 14 :** Extraction des métabolites secondaires (A) Filtration du milieu de fermentation, (B) Décantation

En phase aqueuse, le dichlorométhane a été concentré par évaporation sous vide à l'aide d'un rotavapor dans des ballons à fond conique de 50 ml baignant dans un bain marie à 45 °C (Figure 15). Une fois sec, l'extrait a été remis en suspension dans 500 µl de méthanol et placé dans un flacon en verre parafilmé pour des analyses ultérieures par CCM (Benserradj 2014).



**Figure 15 :** Evaporation sous vide à l'aide d'un rotavapeur

## **2.5 Détection des molécules bioactives par la chromatographie sur couche mince (CCM)**

La chromatographie sur couche mince constitue la méthode de base qui permet une séparation efficace des mycotoxines et leur identification avec une bonne précision. Elle a été faite sur une plaque de silicagel (gel de silice 60 F254) sur laquelle est déposé un spot de 20µl de chaque extrait chloroformique concentré. La plaque a été ensuite placée dans une cuve chromatographique et trempée dans un mélange de solvant d'élution constitué de toluène, acétate d'éthyle et l'acide formique de volume (40/32/8 v/v/v) respectivement (Figure 16) (Multon, 1982)



**Figure 16 :** Préparation de la plaque CCM

Après migration et évaporation du produit d'élution à sec, la plaque a été examinée sous une lampe à UV à une longueur d'onde de 365 nm. La présence des mycotoxines se traduit par des fluorescences caractéristiques.

# *Résultats*

## I. Isolement et Identification du champignon entomopathogénés

### *Metarhizium anisopliae*

#### 1 Isolement

L'isolement de champignon entomopathogène *Metarhizium anisopliae* a été effectué selon trois types du sols agricoles (Blé, Orge, Maïs).

Une souche de champignon entomopathogène a été isolée. Au bout de 21 jours d'incubation à 28°C, le champignon apparaît et se développe lentement. Il a été repéré d'après son aspect macroscopique caractéristique et purifiés afin d'obtenir des cultures pures.

L'isolement à partir des trois échantillons de sols agricoles sur les deux milieux de Culture (SDAY et PDAY) a conduit aux résultats rassemblés dans le tableau ci-dessous.

**Tableau 2 :** Les échantillons du sol est leurs lieux de prélèvement

<b>Type de sols</b>	<b>Lieu de prélèvement</b>	<b>Nombre d'isolats</b>	
		<b>SDAY</b>	<b>PDAY</b>
Blé	ELeifour	0	1
Orge	Eleifour	0	0
Maïs	Eleifour	0	0

Sur l'ensemble des deux milieux sélectifs testés enrichi en antibiotiques et en dodine, seul le milieu PDAY a montré une efficacité d'isoler le champignons entomopathogène en conditions naturelles.

#### 2. Identification du champignon entomopathogène isolé

##### 2.1. Aspect macroscopique

En se basant sur les clés de détermination des genres fongiques à savoir les caractères culturaux et morphologie microscopique (la taille, la forme et l'arrangement des conidies sur le

conidiophore) établies par Bischoff *et al.*, (2009), il s'est avéré que l'isolat fongique appartiendra au genre ***Metarhizium***.

Après ensemencement de la souche isolée *Metarhizium* sp sur les milieux de culture SAB (Sabouraud Dextrose Agar) et PDA (Potato Dextrose Agar), l'observation macroscopique a montré des différences notables selon le milieu utilisé. Les colonies ont commencé à apparaître après 7 jours d'incubation à 28 °C dans l'obscurité, avec un développement complet observé au bout de 21 jours. (Tableau 3)

**Tableau 3 :** Aspects macroscopiques de la souche isolée

Les milieux	La souche isolée <b><i>Metarhizium</i> sp</b>	
PDA		
SAB		

Sur les milieux PDA et SAB, la souche unique cultivée sur plusieurs boîtes de Pétri a développé des colonies de texture poudreuse, de couleur initialement blanche. Au fur et à mesure de la croissance et de la maturation, ces colonies ont progressivement viré au vert foncé. Les contours des colonies étaient bien délimités, formant des bords réguliers et distincts sur l'ensemble des boîtes.

Au 21<sup>eme</sup> jour d'incubation, la maturation des cultures est marquée par la pigmentation des souches et l'apparition de gouttelettes jaunes à la surface des colonies. Ces exsudats, spécifiques au mycélium aérien, se distinguent des gouttelettes de condensation par leur pigmentation et leur localisation exclusive sur les structures fongiques matures.

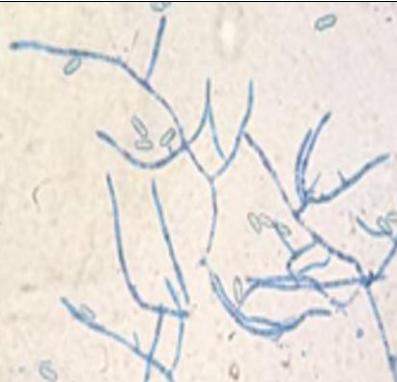
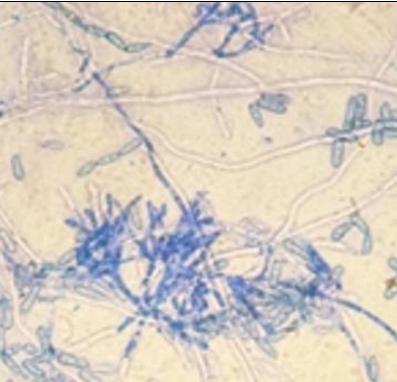
## 2.2. Aspect microscopique

Après la croissance des colonies fongiques, à l'aide d'un scotch transparent et par la technique du ruban adhésif un morceau du scotch a été pressé doucement sur une colonie clair et jeune, prélevant des spores et de mycélium, puis le scotch a été déposé sur une lame propre contenant une goutte de bleu de méthylène puis a observé au microscope optique.

L'aspect microscopique de la souche *Metarhizium sp* a été caractérisé par un mycélium hyalin, cloisonné et ramifié. Les *conidiophores* ont été développés à partir du mycélium avec une ramification irrégulière dirigé vers le bas. Les *phialides* groupés en verticilles de forme cylindrique renflée à leur base et leur extrémité effilée, ou ils produisent des conidies. Ces dernières typiquement sont formées en chaînes basipètes, unicellulaires à une forme cylindrique. (Tableau 4).

**Tableau 4 :** Aspect microscopique de la souche isolée

Ces caractéristiques morphologiques sont spécifiques à espèce *Metarhizium anisopliae*.

Souche	Mycélium	Phialides	Conidies
<i>Metarhizium</i> <i>sp</i>			

## II. Etude de l'activité larvicide de *Metarhizium anisopliae* sur les larves de *Ténébrio molitor*

Cette partie a été consacrée à l'étude de l'effet larvicide du champignon entomopathogène *Metarhizium anisopliae* contre les larves de *Ténébrio molitor*

Ces dernières sont connues comme étant une espèce ayant développé une résistance aux insecticides notamment les organophosphorés, les pyréthrinoïdes et les carbamates (Kim, J et al., 2022)., d'où l'intérêt de s'orienter vers les méthodes de lutte biologique.

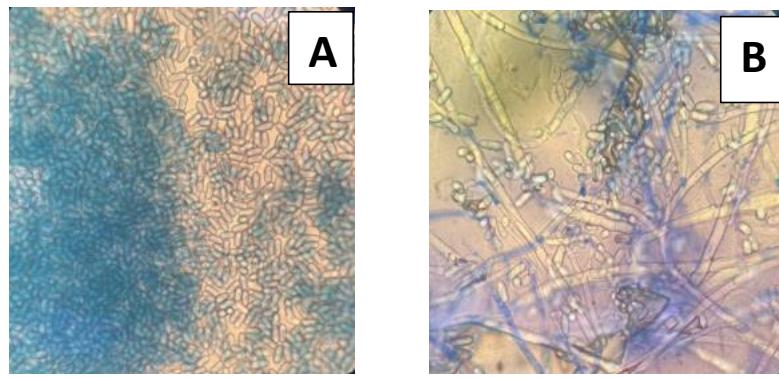
### 1. Effet du champignon *Metarhizium anisopliae*

Après 7 jours d'incubation à 28°C, les cadavres des larves de *Tenebrio* ont montré des signes morphologiques caractéristiques identiques de celle de *Metarhizium anisopliae*. Les cadavres larvaires ont été colonisées par un mycélium initialement de couleur blanche, qui devient vert foncé sous l'effet d'une sporulation conidienne abondante et une texture poudreuse qui recouvert les cadavres. (Figure 17)



**Figure 17 :** Des cadavres larvaires de *Tenebrio molitor* infectées par *Metarhizium anisopliae*

Une observation microscopique a été réalisé par la technique de ruban adhésif transparent pour confirmer l'identité de *Metarhizium anisopliae*. L'analyse microscopique a révélé une colonisation fongique intense à la surface de la cuticule le mycélium apparaît hyalin septé et ramifié, les conidies sont portées en chaînes basipètes et sont de forme cylindrique à ellipsoïdale, des phialides de forme cylindrique. (Figure 18)



**Figure 18 :** Observation microscopique des cadavres larvaires de *Ténébrion* infectées par *Metarhizium anisopliae*. A) Spores B) Mycélium, phialides, conidiophores

### 1.1. Taux de mortalité

Pendant 10 jours de traitement, nous avons noté quotidiennement le nombre de larves mortes. Les résultats ont été constatés à partir du 2ème jour de traitement.

Par ailleurs, le taux de mortalité a été noté quotidiennement pour chacune des doses appliquées et par l'ensemble des répétitions. La moyenne des mortalités cumulées a été réalisée et illustrée dans le tableau 5.

**Tableau 5 :** Pourcentage moyen de mortalité des larves de *Tenebrio molitor* traitées par *Metarhizium anisopliae*

Doses (spore/ml)	Témoin	$10^9$	$10^8$	$10^7$
Temps (Jours)				
1	0	0	0	0
2	0	33,33	13,33	13,33
3	0	46,66	26,66	26,66
4	0	66,66	46,66	33,33
5	0	80	66,66	46,66
6	0	86,66	73,33	46,66
7	0	93,33	80	66,66
8	0	100	93,33	73,33
9	0	100	100	86,66
10	0	100	100	93,33

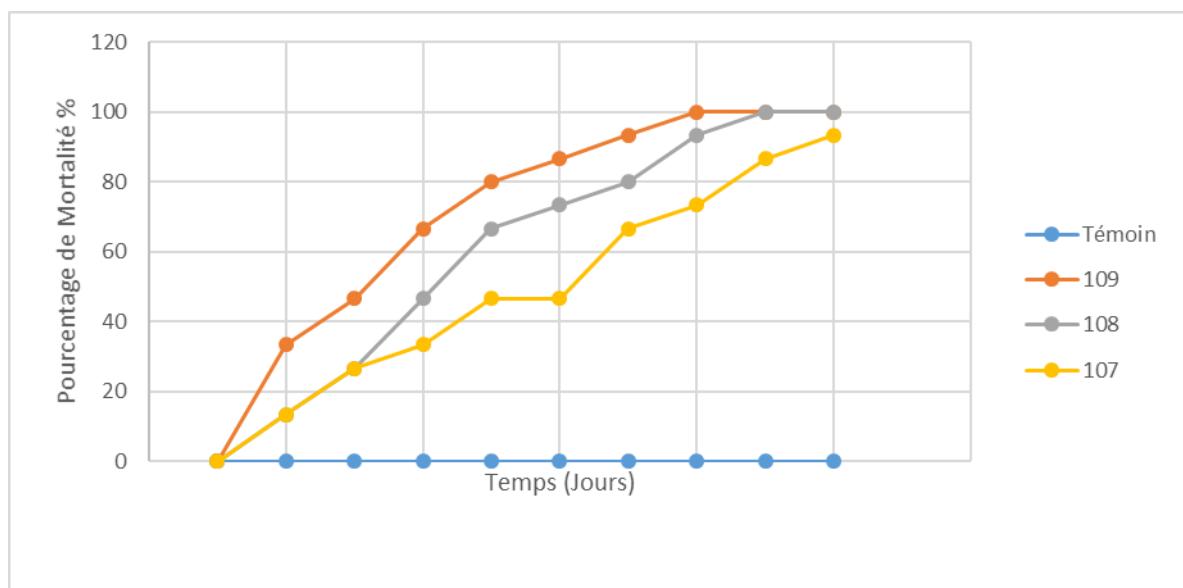
Les résultats portés sur le tableau montrent que la mortalité chez les témoins est nulle.

Le tableau 5 montre que l'effet du traitement de *Metarhizium anisopliae* a commencé à partir du 2<sup>ème</sup> jour pour les trois concentrations (Doses) testées. Nous avons observé une augmentation du taux de mortalité à la fois avec l'augmentation des doses et au fil du temps.

Il varie de 13,33 % au 2<sup>ème</sup> jour pour les doses de  $10^7$  et  $10^8$  spores/ml, à 33,33 % pour une dose de  $10^9$  spores/ml.

Cet effet larvicide devient de plus en plus marqué avec le temps. Les taux de mortalité atteignent 100 % au 8<sup>ème</sup> ou 9<sup>ème</sup> jour pour les doses les plus élevées ( $10^9$  et  $10^8$  spores/ml)

Pour une meilleure visualisation de cette évolution, les résultats ont été représentés sous forme de courbes (Figure 19), illustrant clairement les niveaux de mortalité selon les doses et le temps.



**Figure 19 :** Pourcentages de mortalité des larves de *Ténébrio molitor* après 10 jours de traitement par la souche *Metarhizium anisopliae*

La courbe illustre la progression des taux de mortalité chez les larves de *Ténébrio molitor* exposées à la souche de *Metarhizium anisopliae*. Pour la concentration  $10^7$  spore/ml, l'effet commence à partir du deuxième jour avec 13,33 % de mortalité, suivi de 26,66 % au troisième jour, atteignant 66,66 % au septième jour, puis 93,33 % au dixième jour.

Pour la concentration  $10^8$  spores/ml, la mortalité observée à partir du deuxième jour est de 13,33 %. Cette valeur augmente significativement au cinquième jour, atteignant 66,66 %. Cette concentration entraîne une mortalité totale (100 %) au neuvième jour.

La concentration  $10^9$  spores/ml présente l'effet le plus rapide et le plus intense : 80 % de mortalité dès le cinquième jour et 100 % dès le huitième jour de traitement. Cette courbe témoigne d'une efficacité marquée de *M. anisopliae* à forte concentration.

## 1.2. Calcul de la DL50

Afin de déterminer la DL50 (Dose létale suffisante pour tuer 50% des individus) nous avons transformé les pourcentages de mortalité enregistrés après le 4<sup>ème</sup> jour de traitement en Probits et les concentrations de *Metarhizium anisopliae* en logarithme népérien (Tableau 6).

Nous avons, ensuite tracé la droite de régression avec son coefficient de détermination (Figure 20). Cette droite a permis d'estimer la DL50 relative à la mortalité de 50% des larves de *Ténébrio molitor*.

**Tableau 6 :** Logarithmes décimaux des concentrations et Probits des taux de mortalité au 4<sup>ème</sup> jour

Concentrations (spores/ml)	<b><math>10^7</math></b>	<b><math>10^8</math></b>	<b><math>10^9</math></b>
Logarithme décimal des doses	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>
Pourcentages de mortalité	<b>33,33</b>	<b>46,66</b>	<b>66,66</b>
Probits des pourcentages de mortalité	<b>4,56</b>	<b>4,90</b>	<b>5,41</b>

A partir de la droite de régression qui suit nous avons déterminé la DL50 chez les larves de *Ténébrio molitor* :

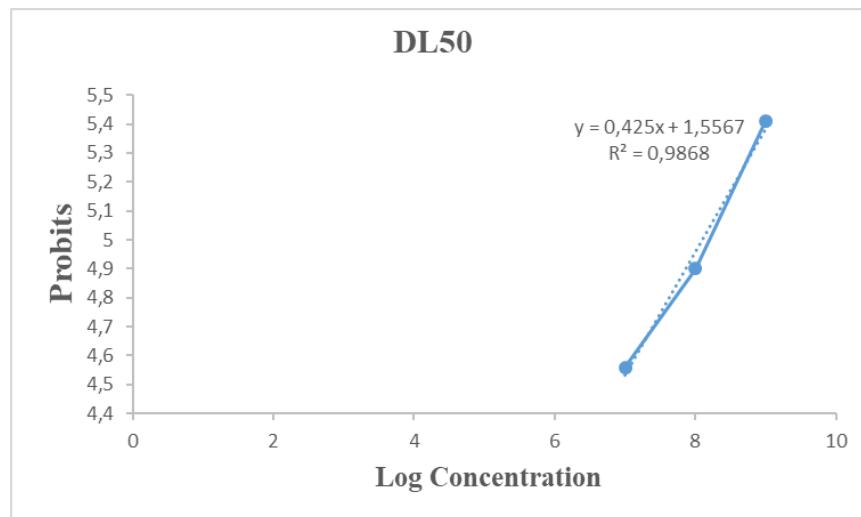
$$Y = 0,425x + 1,5567 \text{ avec } R^2 = 0,9868$$

Pour une mortalité de 50%, Y est égale à 5 (Probit)

$$x = 5 - 1,5567 / 0,425 \quad x = 8,10$$

Antilog x = 1,2589. 10<sup>8</sup>

Cette concentration a été arrondie à 1,26.10<sup>8</sup> spores/ml



**Figure 20 :** Efficacité de *Metarhizium anisopliae* vis-à-vis des larves de *Ténébrio molitor*

### 1.3. Calcul des TL50

Pour calculer les TL50, nous avons transformé les pourcentages des mortalités en probit et le temps en log décimal (Tableau 7).

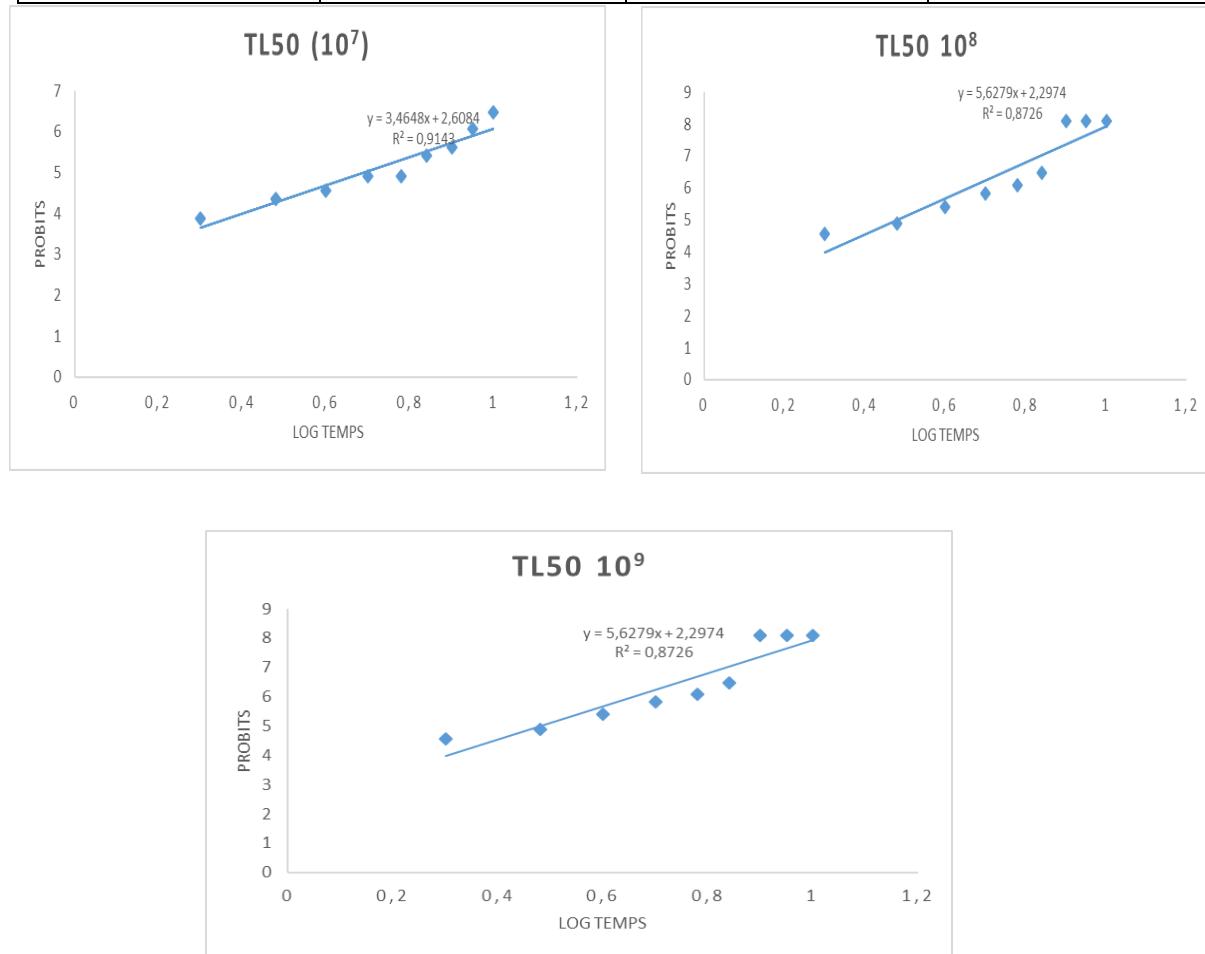
**Tableau 7 :** Transformation du temps en Logarithme décimal et les pourcentages de mortalité cumulés des larves en Probits

		10 <sup>7</sup> spores/ml		10 <sup>8</sup> spores/ml		10 <sup>9</sup> spores/ml	
Temps (Jours)	Log temps	Mortalité corrigée%	Probit	Mortalité corrigée%	Probit	Mortalité corrigée%	Probit
1	0	0	0	0	0	0	0
2	0,30	13,33	3,87	13,33	3,87	33,33	4,56
3	0,48	26,66	4,36	26,66	4,36	46,66	4,90
4	0,6	33,33	4,56	46,66	4,90	66,66	5,41
5	0,7	46,66	4,90	66,66	5,41	80	5,84
6	0,78	46,66	4,90	73,33	5,61	86,66	6,08
7	0,84	33,33	5,41	80	5,84	93,33	6,48
8	0,9	46,66	5,61	93,33	6,48	100	8,09
9	0,95	86,66	6,08	100	8,09	100	8,09
10	1	93,33	6,48	100	8,09	100	8,09

A partir des équations des droites de régressions (Figure 21) nous avons calculé les valeurs des TL50 portées sur le tableau 8 pour chaque concentration.

**Tableau 8 :** Équations des droites de régressions et valeurs des TL50 pour chaque concentration de traitement utilisée.

Concentration (Spores/ml)	Equations	R <sup>2</sup>	TL50 ( Jours)
<b>10<sup>7</sup></b>	$Y = 3,4648x + 2,6084$	0,9143	4,89
<b>10<sup>8</sup></b>	$Y = 5,936x + 1,5299$	0,8546	3,80
<b>10<sup>9</sup></b>	$Y = 5,6279x + 2,2974$	0,8726	3,00



**Figure 21 :** Efficacité de *Metarhizium anisopliae* dans le temps vis-à-vis des larves de *Ténébrio molitor* traitées par les différentes concentrations

## 2. Effet du filtrat de *Metarhizium anisopliae* sur les larves de *Ténébrio molitor*

### 2.1 Fermentation

Après 21 jours d'incubation sous agitation à 240rpm, une croissance progressive du mycélium de la souche *Metarhizium anisopliae* a été observée, s'accompagnant d'une légère modification de la couleur du milieu (Figure 22), signe d'une activité métabolique.

Pendant les 21 jours d'incubation, les Erlens ont été contrôlés hebdomadairement pour confirmer l'absence de contamination par d'autres espèces fongiques.



**Figure 22 :** Développement morphologique de *Metarhizium anisopliae* sur milieu de fermentation

### 2.2 Test de pathogénicité avec le filtrat de *Metarhizium anisopliae*

Les résultats du traitement des larves de *Ténébrio molitor* avec le filtrat de *Metarhizium anisopliae* montrent une mortalité élevée des larves de *Tenebrio molitor* aussi bien dans les groupes traités par *Metarhizium anisopliae* que dans les groupes témoins. Toutes fois aucun signe d'infection fongique n'a été détecté chez les larves mortes (Figure 23). Ces résultats indiquent que la mortalité observée n'est pas imputable à l'activité entomopathogène de *Metarhizium anisopliae*, mais probablement à des conditions environnementales défavorables ou à une contamination externe.



**Figure 23 :** Test de pathogénicité des larves de *Ténébrio molitor* avec le filtrat de *Metarhizium anisopliae*

### 2.3 Extraction

Après les 21 jours de fermentation, nous avons procédé à l'extraction des métabolites secondaires à l'aide d'un solvant organique (Dichlorométhane) pour séparer la phase aqueuse de la phase organique. La phase organique ainsi obtenue est récupérée et concentrée sous pression à l'aide d'un ROTAVAP à 40°C afin d'éliminer le solvant volatil. L'extrait obtenu est illustré dans (Figure 24).



**Figure 24 :** Extrait brut des métabolites secondaires libérées par *Metarhizium anisopliae*

## 2.4 Analyse des molécules bioactives élaborées par *Metarhizium anisopliae* par Chromatographie sur couche mince

Pour une meilleure séparation chromatographique des différents composés éventuellement présents dans l'extrait de *Metarhizium anisopliae*, il faut utiliser le système d'éluant Toluène/Ethyl d'acétate/ Acide formique (40/32/8 ; V/V/V). La plaque CCM a été disposée en position verticale dans la cuve, avec le front de la phase mobile située à environ 1 cm de l'extrémité supérieure de la plaque. Ensuite, la plaque a été retirée et séchée à l'air libre, puis placée sous une lampe à ultraviolet (365 nm) pour élucider les composés chimiques invisibles à l'oeil nu, les différentes taches correspondant aux constituants du mélange. Par la suite, la position du front doit être dessinée au crayon. La détection a été effectuée sous l'effet du rayon ultraviolet et le rapport frontal.

Une fois que l'échantillon est déposé sur le support, les composés se déplacent principalement par capillarité. Les forces électrostatiques qui retiennent le composant sur la phase stationnaire ainsi que sa solubilité dans la phase mobile influencent sa vitesse de déplacement. Les composés passent alternativement de la phase stationnaire à la phase mobile. En chromatographie sur couche mince (CCM), les composés de faible polarité ont tendance à se déplacer plus rapidement que les composés polaires (Vivekananda *et al.*, 2018).

La chromatographie sur couche mince de l'extrait de *Metarhizium anisopliae* a permis de séparer deux spots, apparus sous formes de taches colorées après révélation sous lumière UV. Les spots correspondant donnent une fluorescence bleue avec un  $R_f=0,50$  ; une fluorescence verte avec un  $R_f=0,70$  (Figure 25)



**Figure 25 :** chromatographie sur couche mince présente les métabolites secondaires (sous lampe UV) libérés par *Metarhizium anisopliae*.

# *Discussion*

Les champignons entomopathogènes sont naturellement présents dans divers compartiments de l'environnement, tels que le sol, l'air et l'eau. Ils infectent généralement leurs hôtes par ingestion, par pénétration à travers la cuticule ou via les orifices naturels. Le genre *Metarhizium* regroupe un grand nombre de champignons entomopathogènes fréquemment isolés aussi bien à partir d'insectes (Poprawski et Yule, 1991 ; Pedro et Condido, 1997) que de sols (Roddam et Rath, 1997 ; Tarasco et al., 1997). Dans le cadre du présent travail, l'analyse des échantillons collectés sur différents sites a permis l'isolement de quatre souches distinctes appartenant au genre *Metarhizium*.

Le sol agricole, en particulier celui cultivé en céréales, a déjà fait l'objet de plusieurs études visant à isoler des champignons entomopathogènes, notamment *Metarhizium anisopliae*. Mietkiewski et al. (1992) ont ainsi isolé dix souches de champignons entomopathogènes à partir de sols céréaliers, parmi lesquelles deux appartenaient à l'espèce *Metarhizium anisopliae*. De même, Benserradj et Mihoubi (2014) ont exploré des sols cultivés en céréales dans le but d'isoler *M. anisopliae* et d'évaluer leur potentiel insecticide.

L'isolement de *Metarhizium anisopliae* à partir de divers sols agricoles dans la présente étude est donc en parfaite cohérence avec les observations de Meyling et Eilenberg (2007), qui suggèrent que les sols céréaliers favorisent particulièrement l'établissement de champignons du genre *Metarhizium*, au détriment d'autres champignons entomopathogènes.

Les deux milieux de culture utilisés au cours de cette étude ont été décrits dans la littérature pour l'isolement de champignons entomopathogènes à partir d'échantillons de sol (Veen et al., 1966 ; Beilharz et al., 1982). Les milieux SDAY et PDAY, ont été employés pour l'isolement de *Metarhizium anisopliae*. Bien qu'il permette également la croissance de *Beauveria bassiana* en présence d'autres champignons telluriques, sa sélectivité reste limitée. Pour pallier cette faiblesse, divers agents antifongiques ont été incorporés afin d'inhiber le développement des

champignons saprophytes à croissance rapide. Parmi ces agents, la dodine (N-dodécylguanidine monoacétate), préconisée par Beilharz (1982), a été ajoutée aux milieux de culture à une concentration de 50 µg/l, dans le but de favoriser spécifiquement la croissance de *M. anisopliae*. Suivant cette approche, ce fongicide a été incorporé dans les deux milieux utilisés dans la présente étude, ce qui a permis l'isolement d'une souche fongique entomopathogène.

L'identification du champignon isolé a été réalisée en se basant sur les critères morphologiques décrits par Weiser et Briggs (1971), Tulloch (1976) ainsi que Samson *et al.* (1988). L'isolat cultivé sur les milieux PDAY et SDAY ont donné naissance à de grandes colonies circulaires, présentant des textures variables et des teintes allant du jaune-vert au vert olive, dominées par une masse sporale abondante. Ces caractéristiques morphologiques sont en parfaite concordance avec les descriptions rapportées par Luz *et al.* (1994), Hallsworth et Magan (1996) et Goettel et Inglis (1997).

L'isolat, attribué dans un premier temps au genre *Metarhizium*, se distinguent par la présence d'hyphes lisses et cloisonnés, de conidiophores de forme cylindrique, ainsi que de conidies unicellulaires, cylindriques à légèrement renflées sur les côtés. D'après les travaux de Tulloch (1976) et Goettel et Inglis (1997), ces caractéristiques morphologiques sont spécifiques à l'espèce *Metarhizium anisopliae*.

Dans cette étude nous avons testé la souche entomopathogène de *Metarhizium anisopliae* contre les larves *Tenebrio molitor*. Des études antérieures ont évalué la pathogénicité et la virulence des champignons entomopathogènes isolés de différents habitats, tels que les sols agricoles et forestiers ou encore d'insectes, sur *Tenebrio molitor* (Batta *et al.*, 2010 ; Mora *et al.*, 2016 ; Altahawi *et al.*, 2020).

Des tests réalisés à différentes concentrations ( $10^9$ ,  $10^8$ ,  $10^7$ ) ont mis en évidence un effet marqué sur la mortalité des larves .En effet aucune mortalité n'a été observée chez les larves du groupe témoin (0 %) au cours des 10 jours d'expérimentation, contrairement à celle rapportée par Altahawi *et al.* (2020), où la mortalité du groupe

témoin restait inférieure à 5 %. ce qui est cohérent avec les observations de (Rezende et al. 2009), où aucune mortalité n'a été enregistrée dans les groupes témoins pour toutes les concentrations testées

Nos observations ont mis en évidence l'activité fongique de *Metarhizium anisopliae* sur les larves de *Tenebrio molitor* dès le deuxième jour suivant l'application du traitement. À la dose la plus élevée ( $10^9$  spores/ml), le taux de mortalité atteignait 33,33 % au 2<sup>e</sup> jour, pour ensuite augmenter rapidement jusqu'à 100 % dès le 8<sup>e</sup> jour. À une dose intermédiaire de  $10^8$  spores/ml, la mortalité a également débuté au 2<sup>e</sup> jour (13,33 %) mais a progressé plus lentement pour atteindre 100 % au 9<sup>e</sup> jour. Enfin, à la dose la plus faible ( $10^7$  spores/ml), le même taux initial de mortalité (13,33 %) a été observé au 2<sup>e</sup> jour, culminant à 93,33 % au 10<sup>e</sup> jour. Nos résultats vont dans le même sens que ceux obtenus par Fofana *et al.* (2023) où ils ont enregistré un début de mortalité des larves de *Galleria mellonella* traitées par les champignons entomopathogènes *Metarhizium anisopliae* et *Beauveria bassiana* à partir du 2<sup>ème</sup> jour de traitement. Les taux de mortalité larvaire variaient de 3,33 % à 100 %. Les isolats de *B. bassiana* (A211, A214a, A214b) ainsi que l'isolat T331 de *Metarhizium anisopliae* ont induit une mortalité totale (100 %) des larves de *G. mellonella*. L'isolat T35 de *M. anisopliae* et les isolats de *Metarhizium sp.* (T34, T121, T313, T141 et T132) ont provoqué respectivement des mortalités de 93,33 %, 90 %, 90 %, 86,67 %, 80 % et 70 %.

Ces résultats contrastent avec ceux rapportés par Altahawi *et al.* (2020), qui ont observé l'apparition de la mortalité larvaire à partir du 4<sup>e</sup> jour, pour les différentes souches de *M. anisopliae* (M1 à M9). À la dose de  $10^8$  spores/g, la souche M1 a induit une mortalité maximale d'environ 71 % au 10<sup>e</sup> jour, suivie par M9 (64 %). Les autres isolats ont généré des mortalités plus faibles : M2 (56 %), M6 (52 %), M3 (47 %), M8 (46 %), M7 (41 %), M5 (37 %) et M4 (31 %).

Les résultats obtenus dans notre étude sur l'efficacité de *Metarhizium anisopliae* contre les larves de *Tenebrio molitor* montrent une DL50 de  $1,26 \times 10^8$  spores/ml après 4 jours, indiquant que cette concentration permet de tuer 50 % des larves dans ce délai.

Par ailleurs, le TL<sub>50</sub> diminue clairement avec l'augmentation de la dose, passant de 4,89 jours à 10<sup>7</sup> spores/ml à 3 jours à 10<sup>9</sup> spores/ml. Ces résultats confirment une relation dose-dépendante classique entre la concentration fongique et l'efficacité létale, où des doses plus élevées accélèrent la mortalité.

Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par Garcia et al. (2011), qui ont évalué l'activité insecticide de huit souches de *B. bassiana* et quatre de *M. anisopliae* sur les larves de *Spodoptera frugiperda* et *Epilachna varivestis*, à six concentrations (de 10<sup>4</sup> à 10<sup>9</sup> conidies/mL). La souche BB18 de *B. bassiana* s'est révélée la plus virulente pour *E. varivestis*, avec une mortalité de 93,3 %, une CL<sub>50</sub> de 1,20×10<sup>6</sup> conidies/mL et un LT<sub>50</sub> de 5,1 jours. La souche Bb42 a montré la plus forte mortalité chez *S. frugiperda* (96,6 %, CL<sub>50</sub> = 5,92×10<sup>3</sup> conidies/mL, LT<sub>50</sub> = 3,6 jours). Les différences de temps létal sont largement utilisées dans la sélection des souches, car il est souhaitable que le champignon élimine rapidement son hôte (Lohmeyer et Miller, 2006).

D'après Zhioua et al., (1997) une interaction significative a été observée entre la concentration de conidies et le temps. Les concentrations les plus élevées en conidies nécessitent moins de temps pour induire une mortalité de 100 % des insectes. La quantité de conidies utilisée doit permettre d'atteindre une concentration suffisante pour assurer une pénétration efficace du champignon à travers la cuticule de l'insecte et provoquer la mort de l'hôte

Cependant, les résultats de cette étude ont montré une relation directement proportionnelle entre la quantité de conidies appliquées sur les larves et leur taux de mortalité. Ainsi, plus les suspensions étaient diluées, moins la virulence et la pathogénicité étaient marquées, ce qui se traduisait par une mortalité plus faible sur une période plus longue comparée aux concentrations élevées. Ce phénomène a également été observé par d'autres auteurs travaillant sur *M. anisopliae* et *B. bassiana* sur différentes espèces d'insectes (Filho et al., 2002 ; Silva et al., 2003 ; Cunha et al., 2008).

En revanche, contrairement à l'efficacité marquée de *Metarhizium anisopliae*

observée ici, les autres champignons testés par( Rezende et al.,2009) à savoir *Trichoderma sp.* et *Cladosporium sp.*, ont montré une faible activité entomopathogène, avec des mortalités respectives de seulement 7,5 % et 2,5 % chez les larves. Ainsi, les résultats de notre étude confirment la supériorité de *M. anisopliae* par rapport à d'autres genres dans le contrôle des stades larvaires.

Selon Neves et Alves (2000), plus le nombre de conidies pénétrant est élevé, plus la libération de toxines ou d'enzymes est importante, augmentant ainsi la mortalité de l'insecte. Toutefois, la rapidité d'action du champignon dépend non seulement de la concentration, mais aussi de l'espèce hôte impliquée (Sosa-Gomez et Moscardi, 1992). D'après Paccola-Meirelles et Azevedo (1990), St. Leger (1991) et Kleespies et Zimmermann (1998), les variations de virulence des souches entomopathogènes s'expliquent par des différences dans la production d'enzymes et de toxines, la vitesse de germination des conidies, l'activité mécanique de pénétration cuticulaire, la capacité de colonisation et la composition chimique de la cuticule de l'hôte.

Les champignons entomopathogènes sécrètent des métabolites secondaires toxiques pour les insectes. Les destruxines sont des métabolites insecticides produits par le champignon *Metarhizium anisopliae*. Ces métabolites sont généralement sécrétés dans le milieu de culture pendant la croissance. Plus de 35 types différents de destruxines ont été caractérisés, avec un large éventail d'activités insecticides (Kershaw *et al.*, 1999 ; Liu *et al.*, 2004).

Dans la présente étude, l'objectif était de fournir des données permettant d'améliorer la virulence des champignons entomopathogènes et la production de substances insecticides macromoléculaires toxiques à partir de la souche isolée *Metarhizium anisopliae*. Le traitement des larves de *Tenebrio molitor* avec le filtrat de *Metarhizium anisopliae* a entraîné une mortalité élevée, observée aussi bien chez les larves traitées que dans les témoins. Cependant, aucune preuve d'infection fongique n'a été détectée chez les larves mortes. Ces résultats indiquent que la mortalité constatée n'est pas liée à l'activité entomopathogène de *M. anisopliae*, mais est

vraisemblablement due à des conditions environnementales défavorables ou à une contamination externe.

Les résultats obtenus par chromatographie sur couche mince (CCM), après la séparation des molécules biologiques par le système de solvant (Toluène/Acétate d'éthyl/Acide formique), montrent deux types de molécules bioactives avec des rapports frontaux de 0,70 et 0,51. ces valeurs sont similaire à celles obtenue par (Amiri-Besheli *et al.* 2000), qui ont trouvé des Rf de 0,5 ; 0,68 en utilisant le même système. Une certaine similitude a également été observée avec les résultats de (Kershaw *et al.* 1999), qui ont trouvé des Rf de 0,41 ; 0,6 . Ils ont conclu qu'il s'agissait de mycotoxines (Destruxine A et Destruxine B) produites par *Metarhizium anisopliae* bien qu'ils aient utilisé un système de solvants différent (Chloroforme/Methanol)). Les résultats ont montré une légère différence dans les valeurs de Rf par rapport aux études précédentes en raison des différents systèmes de solvants utilisés. Cette variation peut être attribuée à plusieurs facteurs, notamment la quantité de matériau déposé, la, le type de solvant et la nature chimique de l'adsorbant. La température, l'équilibre entre les phases liquide et vapeur dans le réservoir, ainsi que les impuretés présentes dans l'échantillon, sont des éléments clés influençant les valeurs élevées de Rf (Al-Ani et Mohammed, 2020).

## *Conclusion et perspectives*

Dans le présent travail, nous avons tenté d'évaluer la bio efficacité du champignon entomopathogène *Metarhizium anisopliae* à l'égard des larves de *Tenebrio molitor*. Compte tenu des résultats obtenus, nous pouvons conclure que le champignon entomopathogène testé exerce une toxicité importante sur *Tenebrio molitor*.

La première partie de ce travail a porté sur l'isolement de *Metarhizium anisopliae* à partir de différents sols agricoles. Cet isolement a été réalisé à l'aide de milieux de culture sélectifs. Les résultats de l'étude montrent que l'utilisation de substances antibactériennes et antifongiques facilite l'isolement sélectif de ce champignon entomopathogène à partir de sols agricoles algériens. En particulier, l'ajout de dodine à une concentration de 50 µg/mL permet de limiter la croissance des champignons contaminants, favorisant ainsi le développement spécifique des champignons entomopathogènes. Une souche fongique a été isolée à partir du sol ; elle subit une identification morphologique. Les résultats d'identification obtenus suggèrent que la souche isolée appartient à l'espèce *Metarhizium anisopliae*.

Dans la deuxième partie de ce travail de recherche, l'attention a été portée sur la réalisation de bioessais utilisant la souche de *Metarhizium anisopliae* afin d'évaluer son efficacité entomopathogène contre les larves de *Ténébrio molitor*.

L'étude de l'effet de la souche de *Metarhizium anisopliae* a révélé que le taux de mortalité des larves de *Ténébrio molitor* augmente en fonction du temps et de la concentration en spores appliquée. La mortalité larvaire a débuté dès le deuxième jour suivant le traitement et ce, à travers les trois concentrations testées : (10<sup>7</sup> spores/mL), (10<sup>8</sup> spores/mL) et (10<sup>9</sup> spores/mL). En revanche, aucun cas de mortalité n'a été enregistré dans les lots témoins.

Nous avons également déterminé la valeur de DL<sub>50</sub> (dose létale 50) et de TL<sub>50</sub> (temps létal 50) pour la souche de *Metarhizium anisopliae*. La DL<sub>50</sub> estimée, correspondant à la concentration nécessaire pour tuer 50 % des larves de *Ténébrio molitor* était 1;26 × 10<sup>8</sup> spores/mL .

Concernant les TL<sub>50</sub>, les résultats montrent que le temps nécessaire pour atteindre 50 % de mortalité varie en fonction de la concentration de l'inoculum, indiquant que la sensibilité des larves augmente avec des doses plus élevées.

Les tests effectués sur les larves de *Tenebrio molitor* traitées par le filtrat de culture de *Metarhizium anisopliae* ont révélé une mortalité importante aussi bien dans les groupes traités que dans les groupes témoins. L'absence de signes d'infection fongique visibles chez les larves mortes suggère que cette mortalité ne résulte pas de l'activité entomopathogène du champignon. Il est donc possible qu'une contamination externe soit à l'origine de ces résultats.

La troisième partie de cette étude a été consacrée à produire les molécules bioactives élaborées par le champignon *Metarhizium anisopliae*. Les résultats de nos expériences sont plutôt positifs et prometteurs. Après la fermentation de notre échantillon de *Metarhizium anisopliae*, nous avons pu extraire efficacement les molécules bioactives. Leur présence a été vérifiée à l'aide de la technique de chromatographie sur couche mince (CCM), mettant en évidence plusieurs composés bioactifs. Ces résultats soulignent le potentiel significatif de *Metarhizium* en tant que source prometteuse de molécules bioactives pour la lutte biologique contre les ravageurs agricoles.

Cependant, il est important de noter que cette étude ne constitue qu'une première étape dans l'exploration de ce potentiel. Pour aller plus loin, plusieurs perspectives de recherche peuvent être envisagées :

- Caractérisation des métabolites bioactifs : Une analyse plus poussée (par HPLC, GC-MS ou RMN) permettrait d'identifier la nature chimique exacte des composés extraits, et d'évaluer leur activité biologique spécifique.
- Tester l'efficacité de la souche isolée sur d'autres espèces nuisibles majeures renforcerait son intérêt en tant qu'agent de biocontrôle polyvalent.
- Optimisation des conditions de culture : Des recherches sur l'optimisation des milieux de culture et des conditions de fermentation pourraient permettre une production plus efficace des spores et des métabolites bioactifs.

## *Les références bibliographiques*

1. Aguilar-Miranda, E.D., Lopez, M.G., Escamilla-Santana, C. and De La Rosa B.A.P. (2002). Characteristics of maize flour tortilla supplemented with ground *Tenebrio molitor* larvae. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 50. pp: 192-195.
2. AL-Ani, E. M. A. (2020). The Role of the Investment Portfolio in Achieving Financial Sustainability for the Central Bank of Iraq (2008-2018). *Tikrit Journal of Administrative and Economic Sciences*, 16(52 part 3).
3. Altahawi, A. G., Ibrahim, A. A., Eid, F. M., Ahmed, S. A., & Mahfouz, H. M. (2020). *Efficacy of new isolates of entomopathogenic fungus, Metarhizium anisopliae (Metsch.) from Sinai Peninsula against yellow mealworm Tenebrio molitor L. (Coleoptera: Tenebrionidae) under laboratory conditions*. *Journal of Plant Protection and Pathology*, 11(12), 687–691.  
anisopliae and Beauveria bassiana from Subantarctic Macquarie Island. *J. Invertebr. Pathol.* 69 (3): 285-288.
4. Battaglia, A., & Rousset, N. (n.d.). Petit ténébrion : quels moyens complémentaires et/ou alternatifs aux insecticides de synthèse. Institut Technique de l'Aviculture (ITAVI).
5. Beilharz V.C., Parbery D.G et Swart H.J. (1982). Dodine: A selective agent for certain fungi. *T. Br. Mycol. Soc.* 79 (3): 507-511
6. Benserradj O et Mihoubi I. (2014). Larvicidal activity of entomopathogenic fungi
7. Bidochka M.J et Small C. (2005). Phylogeography of *Metarhizium*, an insect pathogenic fungus.
8. Boucias D.G et Pendland J.C. (1991). Attachment of mycopathogens to cuticle. In: The Fungal Spore and Disease Initiation in Plants and Animals. (Cole GT, Hoch HC (Editors). Plenum Press, New York.
9. Boucias D.G., Pendland J.C et Latge J.P. (1988). Nonspecific factors involved in attachment of entomopathogenic Deuteromycetes to host insect cuticle. *Appl. Environ. Microbiol.* 54 :1795-1805.
10. Boudjelida, H., & Soltani, N. (2002). Lutte biologique avec un champignon entomopathogène *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) à l'égard de *Cydia pomonella* (L.). *Travaux de l'Institut Scientifique, Série Zoologie (Rabat)*, 47, 113–116.

11. Butt T.M. et Becket A. (1994). Pathogenicity of entomogenous fungi *Metharizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* against crucifer pests and the honey bee. *Biocontr.Sci.Techn.* 4 :207-214.
12. Butt T.M., Ibrahim L., Ball B.V et Clark S.J. (1994). Pathogenicity of the entomogenous fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* against crucifer pests and the honey bee. *Biocontr. Sci. Technol.* 4 :207-214
13. Campos R.A., Arruda W., Boldo J.T, da Silva M.V., de Barros N.M., de Azevedo J.L., Schrank A et Vainstein M.H. (2005). *Boophilus microplus* infection by *Beauveria amorpha* and *Beauveria bassiana*: SEM analysis and regulation of subtilisin-like protease and chitinases. *Cur. Genet.* 50:257-261.
14. Carlos J.S., 2006- Exposition humaine aux pesticides : Un facteur de risque pour le
15. Carruthers, RI and Soper RS. 1987. Fungal diseases. In *Epizootiology of Insect*
16. Charnley A.K. (1989). Mechanisms of fungal pathogenesis in insects. In: *Biotechnology of fungi for improving plant growth*. Whipps JM, Lumsden RD (eds), Cambridge Univ .Press ,UK .p.85-123
17. Clark T.B., Kellen W.R., Fukuda R et Lindegren, J. E. (1968). Field and laboratory studies on the pathogenicity of the fungus *Beauveria bassiana* to three genera of mosquito. *J. Invertebr. Pathol.* 11: 1-8.
18. Clarkson J.M. et Charnley A.K. (1996). New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects, *Trends Microbiol.* 4 :197-204.
19. Cloutier C et Cloutier C. (1992). Les solutions biologiques de lutte pour la répression des insectes et acariens ravageurs des cultures. Dans : *La lutte biologique*, Tech & Doc Lavoisier (Vincent, c., Coderre, D.) 671p.
20. Cunha F, Depieri RA, Neves PMOJ, Vida JB, Menezes-Junior AO (2008). Patogenicidade dos fungos *Beauveria bassiana* (bals.) vuill. (cg 432) e *Metarhizium anisopliae* (metsch.) sorok (uel50) em larvas de *Coraliomela brunnea* thumb. (coleoptera: chrysomelidae). *Arq. Inst. Biol.* 75(3):293-300.
21. Davet P. 1996. Vie microbienne du sol et production végétales, (edn) INRA.Paris.
22. Delgado PAM, Murcia-Ordoñez B. Entomopathogenic fungi as an alternative for biological pest control. *Ambi-Aqua*, Taubaté. 2011; 6:77- 90.
23. Delobel A. et Tran M., 1993- Les coléoptères des denrées alimentaires entreposées dans les régions chaudes. ORSTOMICTA, Paris : 425 p.
24. Derfouf, W. (2019). Effet bio-insecticides de l'huile d'argan (*Argania spinosa* L. Skeels) sur une population expérimentale de *Tenebrio molitor* (L.) (Coleoptera:

- Tenebrionidae) [Mémoire de master, Université Abou Bekr Belkaïd – Tlemcen]. DSpace Université de Tlemcen.
25. Diseases, J. R. Fuxa and Y. Tanada, eds.; New York: John Wiley and Sons.
  26. Dunford, J. C., & Kaufman, P. E. (2006). Lesser Mealworm, Litter Beetle, *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Insecta: Coleoptera: Tenebrionidae). EDIS, 2006.
  27. Ferron P. (1978). Biological control of insect pests by entomopathogenic fungi. Ann Rev Entomol. 23 :409-442
  28. Ferron P., Fargues J et Riba G. (1991). Fungi as microbial insecticides against pests. In: Arora D.K., Ajello L., Mukerji K.G (eds) Handbook of Applied Mycology. Volume 2: Humans, Animals, and Insects.18: 665–706. Marcel Dekker, Inc, New York.
  29. Ferron P., Fargues J et Riba G. (1993). Les champignons agents de lutte microbiologique contre les ravageurs D5, 65-92. (Handbook of applied mycology, vol. 2, Humans, Animals and Insects, 1991).
  30. Filho E, Marques E, Barros R (2002). Selection of *Metarhizium anisoplia* (METSCH.) and *Beauveria bassiana* (BALS.) isolates to control Alabama argillacea (HUEBNER) caterpillars. Sci. Agric. 59(3):457-462.
  31. Fleurrat – Leussard., 1978. Autres méthodes de lutte contre les insectes et acariens des denrées stockées. Coed. AFNOR. I.T.C.F. Paris pp: 67 – 81.
  32. Fugita T. (2002). Evolution of lectin-complement pathway and its role in innate immunity. Nature Rev. Immunol. 2 :346-353
  33. 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
  34. Goettel M.S., St Leger R.J., Rizzo N.W., Staples R.C et Roberts D.W. (1989). Ultrastructural localization of a cuticle-degrading protease produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* during penetration of host (*Manduca sexta*) cuticle. J. General. Microbiol. 135 :2233-2239.
  35. Guiraud J. (1998). Microbiologie alimentaire. Edition Dunod, Paris. P : 8-101.
  36. Gwinner J., Harnisch R. et Muck O., 1996- Manuel sur la manutention et la consommation des graines après récolte. Ed.GTZ. Eschborn. R.F.A, pp : 159-183.
  37. Hajek A.E et St Leger. (1994). Interaction between fungal pathogens and insect host. Ann.Rev. Entomol.39 :293-322.

38. 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.
39. HARDOUIN, J. ; MAHOUX, G., 2003. Zootechnie d'insectes – Elevage et utilisation au bénéfice de l'homme et de certains animaux. Bureau pour l'Echange et la Distribution de l'Information sur le Mini-élevage (BEDIM), 164 p
40. Hawksworth D.L., Kirk P.M., Sutton B.C. and Pegler D.N. 1994. Ainsworth and Bysby's dictionary of the fungi, 8 th ed. International Mycological Institute, Egham. Unitted Kingdom. HILL DS., 2003. Pests of stored foodstuffs and their control. Dordrecht: Kluwer Academic Publisher.
41. Hignar., 1985. Importances des pertes du aux insectes des légumineuses alimentaires. Source de protéines végétales. UACNRS, 340 : pp 193-204.Ed. INRA, Alger, 56-64.
42. 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.
43. Isman M. B., 2000. Plant essential oils for pest and disease management. Crop protection. 19: pp. 603-608.
44. Jacobs S, Calvin D., 1988. Dark and yellow mealworms. Entomological Notes. Penn State College of Agricultural Sciences. Department of Entomology (online). [accessed 2017 Jan 3]. Kakrahaçane T., 2015. Activité insecticide des extraits de quelques plantes cultivées et spontanées sur les insectes du blé en post récolte. Thèse. Doctorat. Ecole Nationale Supérieure Agronomique, El Harrach, 136.
45. Keller Set Zimmermann G.J.(1989). Mycopathogens of soil insects. [n Wilding, N., N. Collins, N. M.Hammond, P. M. Webber, and 1. F. Webber (eds.), Insect-Fungus Interactions. Academie Press, London, p. 240-269.
46. Khachatourians G.G. (1991). Physiology and genetic of entomopathogenic fungi. In: Handbook of applied mycology. Mukeji DK, Drouhet E (eds). Marcel Dekker Inc., New York, USA. 613-663.
47. Kirk P.M., Cannon P.F., David J.C., Egham U.K. and Stophes J.A. (2001). Ainsworth and Bysby's Dictionnaire of fungi, 9 th edn. CABI. Bioscience.UK. Center and central Bureau Voie. Ultrech. The Net
48. Korti Abdelhamid, Kheddam Abdennour., 2018. Impact des insectes ravageurs de stocks de blés dur sur la qualité marchande au niveau de la CCLS de Tlemcen.

Mémoire de master en Agroalimentaire et contrôle de la qualité université de Tlemcen. Pp 39-40

49. Kouadio, D. L. M. (2019). *Développement et évaluation d'un biopesticide à base de Metarhizium sp. Pour la lutte contre le charançon noir du bananier (Cosmopolites sordidus Germar 1824)* [Thèse de doctorat, Institut National Polytechnique Félix Houphouët-Boigny]. CEA VALOPRO.
50. Lacey L. A et Undeen, A.H. (1986). Microbial control of flies and mosquitoes. Ann. Rev. Entomol. 25 :265-296
51. Lefort, A. (2018). La lutte microbiologique sera au nombre des alternatives aux pesticides de synthèse, en raison de son innocuité pour l'environnement.
52. Luz C., Fargues J., Romaña C.A., Moreno J., Goujet R., Rougier et Grunewald J. (1994). Potential of entomopathogenic hyphomycetes for the control of the triatomine vectors of Chagas' disease. Proc6 Int Coll Invertebr Path Microbiol Control. 1 :272- 276.
53. Magelhas B.P., Lord J.C., Wraight S.P., Daoust R.A et Roberts D.W. (1981). Pathogenicity of Beauveria bassiana and Zoophthora radicans to the coccinellid predators Coleomegilla maculata and Eriopis connexa. J.Invertebr.Pathol. 52:471-473
54. Malausa, J. C. (2000). Les introductions d'insectes exotiques comme agents de lutte biologique contre les ravageurs des cultures. Revue d'Écologie, 71-84.
55. Mathieu R. 1995. Biologie Campbell, (edn) ISBN Canada. Metarhizium anisopliae against Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci.3 (1): 54-62. mosquito larvae in Algeria.
56. Meyling N.V et Eilenberg J. (2007). Ecology of the entomopathogenic fungi Beauveria bassiana and Metarhizium anisopliae in temperate agroecosystems: Potential for conservation boil. contr .43 :145-155.
57. Miranpuri G.Set Khachatourians G.G. (1991).Infection sites of entomopathogenic fungus Beauveria bassiana in the larvae of the mosquito Aedes aegypti. Entomol. 16 :215 234.
58. Mitsuaki S. (2004). Effect of temperature on growth of Beauveria bassiana F-263, a strain highly virulent to the Japanese pine sawyer, Monochamus alternatus, especially tolerance to high temperatures. Appl Entomol Zool. 39: 469-475.
59. Nicholson GM. Fighting the global pest problem: preface to the special Toxicon issue on insecticidal toxins and their potential for insect pest control. Toxicon. 2007; 49:413-422.

60. Pedro H.C et Candido S.A. (1997). Entomopathogenic fungi associated with natural populations of the Moroccan Locust *Dociostaurus maroccanus* (Thunberg) (Orthoptera: Gomphocerinae) and other Acridoidea in Spain. *Biocontrol Sci. Technol.* 7 (3): 357-364.
- 207- Pochon J. et Tradieux P. (1962). Techniques d'analyse en microbiologie du sol. Tourelle, St Mandré. 110-111.
- Phyllophaga spp. and susceptibility of Phyllophaga anxia (LeConte) (Col., Scarabidae) to Beauveria bassiana and Metarhizium anisopliae (Deuteromycotina). *J. Appl. Entomol.* 112 (3): 359-365.
61. Poprawiski T.J et Yule W.N. (1991). Incidence of fungi in natural populations of
62. Ramos-Elorduy, J. ; Avila Gonzalez, E. ; Rocha Hernandez, A. ; Pino, J. M., 2002. Use of *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) to recycle organic wastes and as feed for broiler chickens. *J. Econ. Entomol.*, 95 (1): 214-220
63. 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.
64. Rezende, 2009; « Control of the *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae) with entomopathogenic fungi » *Brazilian Journal of Poultry Science*
65. Roddam L.F et Rath A.C. (1997). Isolation and characterization of *Metarhizium*
66. Samuels K.D.Z., Heale J.B. et Llewellyn M. (1989). Characteristics relating to the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* toward *Nilaparvata lugens*. *J. Invertebr. Pathol.* 53 : 25-31.
67. Scholte EJ, Knols BGJ, Samson RA, Takken W. Entomopathogenic fungi for mosquito control: a review. *Journal of Insect Science*. 2004; 4:19-24.
68. Senal J., Fraselle J., Impens R., Kummert J., Lepoivre Ph., Meulmans M., Seilleur P., Vandevenken J., et Viseur J. 1993. *Traité de pathologie végétale*. Gembloux. Belgique.
69. Silva VCA, Barros R, Marques EJ, Torres JB (2003). Suscetibilidade de *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) aos fungos *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. *Neotrop. Entomol.* 32(4):653-658.
70. St Leger R.J., Allee L.L., May B., Staples R.C et Roberts D.W. (1992). World-wide distribution of genetic variation among isolates of *Beauveria* spp. *Mycol.Res.* 96: 1007-1015.
71. St Leger RJ. (1986a). Cuticle- degrading enzymes of entomothogenic fungi: Synthesis in culture on cuticle. *J. Inverbr.Pathol.* 48 :85-95

72. St Leger RJ. (1986b). Cuticule- degrading enzymes of entomothogenic fungi: cuticule degradation in vitro by enzymes from entomothogens. *J. Inverbr.Pathol.* 47 :167-177.
73. St. Leger, R. J., & Wang, J. B. (2020). Metarhizium: jack of all trades, master of many. *Open Biology*, 10(12), 200307.
74. Starnes R.L., Liu C.L et Marone P.G. (1993). History, use and future of microbial insecticides. *Amer. Entomol.* 39 :83-91.  
Suicide au brésil. Ed. Vertigo. Rev. Scienc de l'environ. Brésil. 18 p.
75. Tanada Y et Kaya H.K. (1993). Insect pathology. Academic Press Inc., San Diego, USA, 666 p.
76. Tarasco E., Bievre C.D et Papierok B. (1997). Occurrence of entomopathogenic fungi in soils in Southern Italy. *Entomol.* 31 :157-166
77. Todorova S.J., Côté L.C., Martel P et Coderre D. (1994). Heterogeneity of two *Beauveria bassiana* strains revealed by biochemical tests, protein profiles and bioassays on *Leptinotarsa decemlineata* (Col: Coccinellidae) larvae. *Entomophaga*. 39 :159-169.
78. Tortora J., Funk B.F. and Case Ch.l. 2003. Introduction à la microbiologie, (edn) ISBN.Canada.
79. Triplehorn CA, Johnson NF., 2005. Borror and Delong's introduction to the study of insects.7th ed. Toronto: Thomson Brooks/Cole
80. Tunçw, I., Sahinkaya, S., 1998. Sensibilité de deux parasites à effet de serre à des vapeurs des huiles essentielles. *Entomologie expérimentale*. Appl. 86 :183-187.
81. Vander Brempt, X., Monert-Vautrin, D. A., 2014. Le risque allergique de *Tenebrio molitor* pour la consommation humaine. *Revue Française*
82. Veen K.H. (1968). Recherches sur la maladie due à *Metarhizium anisopliae* chez le criquet pèlerin. Meded. Land bouwhoge school, Wageningen. 68 :1-77.
83. Veen K.H. et Ferron P. (1966). A selective medium for the isolation of *Beauveria tenella* and of *Metarhizium anisopliae*. *J. Invertebr.Pathol.* 8 :268–269.
84. WAAGE, J. (1997). - Global developments in biological control and the implications for Europe. *Bulletin OEPPIEPPO*, 27: 5- 13
85. WAINGO, A; YAMKOULGA, M; DABIR-BINSO C.L., BA M.N., nSANON A., 2013. Conservation post récolte des céréales en zone sud-saoudienne du Burkina Faso : Perception paysanne et évaluation des stocks, P1157-1167

86. Weiser J., Bridggs J.D. (1971). Identification of pathogens, In H.D. BURGER y N.W. HUSSEY (eds). Microbial control of insects and mites. Academic Press. New York . 13-66.
87. Wraight R.J et Roberts D.W. (1987). Insect control effort with fungi. *Devel. Industr. Microbiol.* 28 :77-87.
88. Wraight S.P., Jackson M.A et de Kock S.L. (2001). Production, stabilization and formulation of fungal biocontrol agents. In: Butt TM, Jackson CW, Magan N (eds) *Fungi as Biocontrol Agents, Progress, Problems and Potential.* 253–288. CABI Publishing, New York.
89. Yang S. S., Brandon A. M., Flanagan J. C. A., Yang J., Ning, D., Cai S. Y., Ren N. Q. 2018. Biodegradation of polystyrene wastes in yellow mealworms (larvae of *Tenebrio molitor* Linnaeus): Factors affecting biodegradation rates and the ability of polystyrene-fed larvae to complete their life cycle. *Chemosphere* 191 :979-989
90. Zimmermann, G. (2007). Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Biocontrol Science and technology*, 17(9), 879-920.

## **Site web**

1. <https://agrichem.dz/fleaux/4/insectes-ravageurs/> consulté le 9/05/2025
2. <https://tricycle.eco/vers-de-farine-vivants/> consulté le 11/05/2025
3. <https://www.insecterra.com/t17303-fiche-elevage-tenebrio-molitor> consulté le 14/06/2025

## *Annexe*

## 1. Milieu PDAY (Potato Dextrose Agar yeast)

### ❖ Composition

<b>Pomme de terre</b>	<b>200g</b>
<b>Glucose (dextrose)</b>	<b>20g</b>
<b>Agar</b>	<b>20g</b>
<b>Extrait de levure</b>	<b>2g</b>
<b>Eau distillé</b>	<b>1000ml</b>
<b>Dodine</b>	<b>50µg</b>

### ❖ Préparation

- Découper la pomme de terre en petits morceaux et la bouillir dans 500ml d'eau distillé pendant 30min.
- Filtrer la pomme de terre a l'aide d'une mousseline ou d'un papier filtre, pour recueillir l'extrait de la pomme de terre.
- Mette l'Agar dans 500ml d'eau distillé doucement, puis ajouter l'extrait de pomme de terre.
- Ajouter le dextrose.
- Ajouter l'extrait de levure.
- Ajuster le volume jusqu'à 1000ml.
- Ajouter de dodine.

## 2. Milieu SDAY (Sabouraud Dextrose Agar Yeast)

### ❖ Composition

<b>Peptone</b>	<b>10g</b>
<b>Agar</b>	<b>15g</b>
<b>Dextrose (Glucose)</b>	<b>20g</b>
<b>Eau distillé</b>	<b>1000ml</b>

<b>Extrait de levure</b>	<b>2g</b>
<b>Dodine</b>	<b>50µg</b>

### **3. Milieu de fermentation PDB (Potato Dextrose Broth)**

#### **❖ Composition**

<b>Pomme de terre</b>	<b>200g</b> a été bouillé en 500ml d'eau distillée pendant 30min, puis filtrer)
<b>Glucose</b>	<b>20g</b>
<b>Eau distillée</b>	<b>1000ml</b>

**Evaluation de *Metarhizium anisopliae* à titre d'agent de lutte biologique contre les insectes ravageurs des cultures céréalières les larves de *Ténébrio molitor*.****Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en Mycologie et Biotechnologie Fongique**

Dans le cadre de la lutte biologique contre les insectes ravageurs, cette étude s'intéresse à l'évaluation du potentiel insecticide du champignon entomopathogène *Metarhizium anisopliae* sur les larves de *Tenebrio molitor*, un coléoptère nuisible des cultures. L'objectif principal de ce travail est d'explorer une alternative durable à la lutte chimique, en valorisant une souche locale de *M. anisopliae* isolée à partir d'un sol agricole dans la région de Constantine. Les expérimentations ont été menées en conditions de laboratoire afin de tester l'efficacité biologique du champignon selon différentes concentrations, et d'évaluer les paramètres toxicologiques tels que la DL<sub>50</sub> et la TL<sub>50</sub>. Les résultats expérimentaux ont démontré l'efficacité croissante de la souche locale de *Metarhizium anisopliae* contre les larves de *Tenebrio molitor*, en fonction des doses et du temps d'exposition. L'effet larvicide a été observé dès le 2<sup>e</sup> jour de traitement pour les concentrations de 10<sup>7</sup>, 10<sup>8</sup> et 10<sup>9</sup> spores/ml, avec une mortalité atteignant 100 % au 8<sup>e</sup> ou 9<sup>e</sup> jour pour les doses les plus élevées. L'analyse de la dose létale 50 % (DL<sub>50</sub>), calculée par la méthode des Probits, a permis d'estimer une DL<sub>50</sub> de 1,26 × 10<sup>8</sup> spores/ml, ce qui confirme la forte toxicité de la souche testée. Le calcul des TL<sub>50</sub> (temps létal pour 50 % de mortalité) a également montré que la rapidité d'action augmente avec la dose. Les TL<sub>50</sub> étaient de 4,89 jours pour 10<sup>7</sup> spores/ml, 3,80 jours pour 10<sup>8</sup> spores/ml, et 3,00 jours pour 10<sup>9</sup> spores/ml. En parallèle, un filtrat de culture fongique a été testé, mais n'a montré aucune infection fongique visible chez les larves mortes, suggérant que la mortalité dans ce cas n'était pas liée à une pathogénicité directe. L'extraction des métabolites secondaires a révélé, par chromatographie sur couche mince (CCM) et visualisation UV, la présence de composés bioactifs produits par *M. anisopliae*. Ces résultats confirment la production de molécules potentiellement responsables de l'activité insecticide, telles que les destruxines.

**Mots clés :** *Metarhizium anisopliae*- Lutte biologique- *Ténébrio molitor* - Champignons entomopathogènes - Insectes ravageurs

**Laboratoires de recherche :** Laboratoire de Mycologie, Biotechnologie et de l'activité Microbienne (LaMyBAM) (U Constantine 1 Frères Mentouri).

**Président du jury :** Dr GHORRI Sana (MCA – Université Frères Mentouri, Constantine 1).

**Encadrant :** Dr BEN SERRADJ Ouafa (MCA – Université Frères Mentouri, Constantine 1).

**Examinateur(s) :** Dr ZAAMOUCHI Ahlem (MCB – Université Frères Mentouri, Constantine 1).