



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
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة قسنطينة 1 الإخوة منتوري
كلية علوم الطبيعة والحياة

Département : Microbiologie قسم :

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Biotechnologies

Spécialité : Mycologie et Biotechnologie Fongique

N° d'ordre :

N° de série :

Intitulé :

Évaluation du potentiel des champignons entomopathogènes en biocontrôle pour la lutte contre le mildiou de la tomate causé par *Phytophthora infestans*

Présenté par : MATARFI Youcef
KOUZRITE Mohammed

Le : 28/06/2025

Jury d'évaluation :

Président : ABDELAZIZ Wided (MCB - U. Constantine 1 Frères Mentouri).

Encadrant : MIHOUBI Ilhem (Prof. - U. Constantine 1 Frères Mentouri).

Examinateur: BENSERRADJ Ouafa (MCA - U. Constantine 1 Frères Mentouri).

Année universitaire
2024 - 2025

Dédicaces

Avant tout, je rends humblement grâce à Dieu, Lui qui, par Sa miséricorde et Sa lumière, m'a guidé, soutenu et ouvert les portes, même lorsque tout semblait fermé. Sans Sa bienveillance, aucun de ces pas n'aurait été possible.

À toi, ma mère...

Tu es partie bien trop tôt, laissant derrière toi un vide que rien ne peut combler.

En ce jour que j'aurais tant voulu partager avec toi, je n'entends que ton silence, mais je sens encore ton amour, comme une chaleur douce au creux de l'absence.

J'ai tant imaginé ce moment avec toi, te voir sourire, entendre ta voix, sentir ta fierté dans ton regard... Mais la vie en a décidé autrement.

Alors je t'écris d'ici, le cœur plein, les yeux humides, et je te dédie ce travail, comme on dépose une fleur sur une tombe : avec tendresse, avec douleur, avec tout l'amour du monde.

Tu n'es plus là, maman, mais chaque ligne de ce mémoire porte ton nom dans le silence.

À mes sœurs, Meriem et Khaoula, présentes dans les tempêtes comme dans les éclaircies.

Vous avez été mes piliers, ma force discrète et précieuse. Merci d'avoir cru en moi, soutenu mes pas, et essuyé mes silences.

Je ne pourrai jamais oublier ce que vous avez fait pour moi.

À moi-même, Je sais ce que tu as traversé, les luttes invisibles, la fatigue, le doute, et malgré tout, tu as continué, jour après jour, blessure après blessure. Tout semblait contre nous... et pourtant, par la grâce de Dieu, nous y sommes arrivés. Sois fier.

À ceux qui m'ont aimé sincèrement, à ceux qui m'ont tendu la main sans rien attendre,

A mon bras mon binôme Mohammed

à ceux qui ont cru en moi, parfois plus que moi-même, merci d'avoir été là, à votre manière.

Ce travail est aussi un peu le vôtre

Youcef

Dédicaces

Je dédie ce travail à l'âme des mes parents tous mes pensées sont avec vous en ce moment sans vous je ne serai pas là aujourd'hui, que DIEU vous ouvre les portes du paradis et prend bien soin de vos âmes.

A mes très chères frères MOUSSA et AHMED dans ce monde et les autres dans l'au delà
mes bras droits dans tous les moments

A ma femme bien aimée et mon fils IBRAHIM

A tous mes professeures qui ont cru en moi

A toute ma famille et tous mes amis spécialement mon binôme YOUCF

Mohammed

Remerciements

Nous remercions LE GRAND DIEU tout puissant et miséricordieux de toutes ses bénédictions qui nous a accordées dans notre vie et spécialement dans la réalisation de ce travail.

Un très grand remerciement à notre chère encadreur Madame MIHOUBI ILHEM Professeur à l'université Constantine1 qui nous a fait confiance ainsi, elle nous a dirigé dans ce travail avec beaucoup de patience et de compréhension et surtout sa rigueur et ses encouragements à aller le plus loin possible dans ce modeste travail. Elle nous a permis de bénéficier de ses compétences scientifiques inégalables, que LE GRAND DIEU vous récompense pour votre présence, votre aide et votre soutien.

Un grand merci à Madame ABDELAZIZ Wided maître de conférences à l'université Constantine 1 qui accepté de présider les jurys.

On tient aussi à remercier infiniment Madame BENSERRADJ Ouafa maître de conférences à l'université Constantine 1 qui a codirigé ce travail. Nous la remercions pour son aide bien précieuse dans la partie expérimentale, pour sa disponibilité et sa gentillesse remarquable.

Nous tenons également à remercier les doctorants et l'ingénieur du Laboratoire de Mycologie, Biotechnologie et de l'Activité Microbienne pour leur aide et leur soutien.

Merci à l'ensemble des personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Table des matières

Résumés

Liste des abréviations	i
Liste des figures	ii
Liste des tableaux	iii

Introduction.....	1
--------------------------	---

Revue bibliographique

Chapitre I: Généralité sur le biocontrôle	3
--	---

1. Définition du biocontrôle	3
2. Principaux agents de biocontrôle	5
2.1. Types d'agents de lutte	5
2.2. Caractéristiques des agents biologiques	6
2.3. Mécanismes employés par les agents de lutte biologique.....	6

Chapitre II: Les champignons entomopathogènes: caractéristiques et utilisation en biocontrôle	8
--	---

1. Généralités	8
1.1 . Définition des champignons entomopathogènes.....	8
1.2 . Importance des champignons entomopathogènes dans la lutte biologique.....	8
2. Caractéristiques biologiques des champignons entomopathogènes	8
2.1 . Morphologie générale	8
2.2 . Cycle de vie.....	10
2.3 . Mécanismes d'infection des insectes.....	10
2.3.1 . Les adhésines	11
2.3.2 . Enzymes lytiques et processus infectieux.....	11
2.3.3 . Métabolites secondaires : rôle dans l'infection et applications possibles..	12
3. Diversité des champignons entomopathogènes.....	14
3.1. <i>Beauveria bassiana</i>	15
3.1.1. Classification de <i>Beauveria bassiana</i>	15
3.2. <i>Metarhizium anisopliae</i>	16
3.2.1. Classification de <i>Metarhizium anisopliae</i>	16
4. Utilisation des champignons entomopathogènes en biocontrôle	17

4.1. Modes d'application.....	18
4.2. Cibles principales.....	18
Chapitre III: Le mildiou de la tomate à <i>Phytophthora infestans</i>	20
1. Biologie et écologie de l'agent pathogène	20
1.1. Classification et taxonomie	20
1.2. Morphologie et cycle de vie	21
1.3. Mécanismes d'infection	23
1.4. Épidémiologie	23
1.4.1. Facteurs climatiques	24
1.4.2. Facteurs liés au sol	24
1.4.3. Prédisposition de l'hôte	24
2. Symptômes et diagnostic du mildiou sur tomate	25
2.1. Symptômes foliaires, tiges, fruits	25
2.2. Confusion possible avec d'autres maladies	26
3. Conditions favorables au développement de la maladie	26
3.1. Facteurs climatiques	26
3.2. Pratiques culturales aggravantes	26
3.3. Période de sensibilité de la culture	27
4. Méthodes de lutte contre le mildiou	27
4.1. Lutte chimique	27
4.2. La lutte agronomique	28
Chapitre IV: Potentiel des champignons entomopathogènes pour la gestion du mildiou	29
1. Mécanismes d'action des champignons entomopathogènes contre <i>Phytophthora infestans</i>	29
1.1 . Activité antifongique des champignons entomopathogènes	29
1.2 . Interactions entre les champignons entomopathogènes et <i>P. infestans</i>	30
2. Facteurs influençant l'efficacité des champignons entomopathogènes	30
2.1 . Conditions environnementales	30
2.1.1. La température	30
2.1.2. L'humidité	31
2.1.3. Soleil – lumière	31
2.2 . Propriétés spécifiques des souches de champignons utilisées	32

Etude expérimentale

1. Isolement et identification du champignon entomopathogène	33
1.1 . Prélèvement des échantillons	33
1.2 . Milieux d'isolement	33
1.3 . Méthode d'isolement	34
1.4 . Purification des souches	34

1.5 . Méthode d'identification	34
1.5.1 . Identification macroscopique	35
1.5.2 . Identification microscopique	35
2. Culture de <i>Phytophthora infestans</i>	36
2.1 Obtention de la souche.....	36
2.2 Isolement et purification.....	37
2.3 Identification	37
2.3.1 . Identification macroscopique.....	37
2.3.2 . Identification microscopique	38
3. Interaction entre les champignons entomopathogènes et <i>P. infestans</i>	39
3.1 Production des métabolites secondaires par fermentation en milieu liquide.....	39
3.2 Test d'antagonisme <i>in vitro</i>	39
3.2.1 Méthode de confrontation directe	39
3.2.2 Bio-essai de confrontation indirecte.....	40
3.2.2.1 . Effet des composés volatils.....	40
3.2.2.2 . Effet des composés non volatils.....	41
3.3 Bio-test sur plantules de tomate.....	41
3.3.1 . Application des spores des champignons antagonistes.....	42
3.3.1.1 . Préparation des suspensions sporales.....	42
3.3.1.2 . Application.....	42
3.3.2 Application des produits de fermentation des champignons antagonistes.....	43
3.3.3 . Évaluation des symptômes.....	44

Résultats et discussion

1. Isolement et identification des champignons entomopathogènes	45
1.1. Isolement	45
1.2. Identification des isolats de <i>Beauveria bassiana</i> et <i>Metarhizium anisopliae</i>	45
1.3. Purification	47
2. Culture de <i>Phytophthora infestans</i>	48
2.1. Isolement	48
2.2. Purification	50
3. Interaction entre les champignons entomopathogènes et <i>P. infestans</i>	52
3.1. Production des métabolites secondaires par fermentation en milieu liquide....	52
3.2. Test d'antagonisme <i>in vitro</i>	52
3.2.1. Méthode de confrontation directe.....	52
3.2.2. Bio-essai de confrontation indirecte.....	54
3.2.2.1 . Effet des composés volatils.....	54
3.2.2.2 . Effet des composés non volatils	56

3.3 Bio-test sur plantules de tomate	61
3.3.1. Résultats de l'évaluation des symptômes.....	61
3.4. Caractérisation des métabolites secondaires.....	64
Conclusion.....	66
Références bibliographiques	69
Annexe	

Résumé

Ce mémoire a pour objectif d'évaluer le potentiel de certains champignons entomopathogènes (*Beauveria bassiana* et *Metarhizium anisopliae*) en tant qu'agents de biocontrôle contre le mildiou de la tomate, causé par *Phytophthora infestans*. Dans le contexte de l'agriculture algérienne, la tomate occupe une place stratégique, mais elle est gravement affectée par le mildiou, ce qui nécessite le recours excessif aux fongicides chimiques, avec des conséquences néfastes sur l'environnement, la santé des consommateurs et le développement de souches pathogènes résistantes. Au cours de cette étude, des souches de *B. bassiana* et *M. anisopliae* ont été isolées à partir de différents sites à Constantine, identifiées morphologiquement et purifiées, puis utilisées afin d'évaluer leur activité antagoniste *in vitro* contre *P. infestans*. Les confrontations directes ont montré des taux d'inhibition de 55 % (B1 et M) et de 66 % (B5), tandis que les métabolites secondaires diffusibles de *B. bassiana* (B1) ont inhibé jusqu'à 80 % de la croissance de *P. infestans*. En revanche, les composés volatils n'ont pas manifesté d'efficacité antifongique. Des tests complémentaires *in vivo* sur plantules ont confirmé leur effet protecteur, notamment pour les isolats B1 et M. Par ailleurs, l'analyse des métabolites secondaires par CCM a révélé la présence probable de composés antifongiques tels que la beauvéricine, la bassianolide et la destruxine A. Ces résultats mettent en valeur le potentiel de *Beauveria bassiana* et *Metarhizium anisopliae* en tant que moyens de lutte biologique, pouvant s'intégrer dans une stratégie de gestion durable des maladies de la tomate. Ainsi, l'étude souligne l'intérêt d'explorer plus en détail le rôle de certains métabolites fongiques dans le biocontrôle afin de proposer des solutions alternatives, respectueuses de l'environnement et de la santé humaine.

Mots clés: Champignons entomopathogènes, *P. infestans*, Mildiou, Tomates, Biocontrôle.

Abstract

The aim of this work is to evaluate the potential of certain entomopathogenic fungi (*Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*) as biocontrol agents against tomato late blight, caused by *Phytophthora infestans*. In the context of Algerian agriculture, tomato cultivation holds strategic importance but is severely affected by late blight, often leading to the excessive use of chemical fungicides. This overuse has detrimental consequences for the environment, consumer health, and contributes to the emergence of resistant pathogenic strains. During this study, strains of *B. bassiana* and *M. anisopliae* were isolated from various sites in Constantine, morphologically identified, purified, and subsequently tested for their in vitro antagonistic activity against *P. infestans*. Direct confrontation assays showed inhibition rates of 55% (B1 and M) and 66% (B5), while diffusible secondary metabolites from *B. bassiana* (B1) inhibited up to 80% of *P. infestans* growth. In contrast, volatile compounds exhibited no antifungal activity. Complementary *in vivo* tests on tomato seedlings confirmed the protective effect of these fungi, particularly for isolates B1 and M. Furthermore, thin-layer chromatography (TLC) analysis of fungal fermentation extracts revealed the likely presence of antifungal compounds such as beauvericin, bassianolide, and destruxin A. These findings highlight the potential of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* as biological control agents, which could be integrated into a sustainable strategy for managing tomato diseases. The study also emphasizes the importance of further investigating the role of fungal secondary metabolites in biocontrol, in order to develop environmentally friendly and health-conscious alternatives to chemical fungicides.

Keywords: Entomopathogenic Fungi, *P. infestans*, Late Blight, Tomatoes, Biocontrol.

الملخص

تهدف هذه الدراسة إلى تقييم الفعالية التثبيطية لبعض فطريات الحشرات *Beauveria* و *Metarhizium anisopliae* كعامل حيوي في المكافحة البيولوجية ضد الفطر الممرض للنبات *Phytophthora infestans* المسبب لمرض اللحفة المتأخرة للطماطم. تحتل زراعة الطماطم في الجزائر مكانة هامة سواء من حيث التغذية أو الاقتصاد، ومرض اللحفة المتأخرة للطماطم يشكل تهديدا خطيرا لهذه الزراعة، ويدفع إلى الاستعمال المفرط لمضادات الفطريات الكيميائية التي تشكل خطا على البيئة وصحة المستهلكين كما ينبع عنها اكتساب بعض السلالات الممرضة للمقاومة ضدها. في هذه الدراسة ثُعد تم عزل السلالات *M. anisopliae* و *B. bassiana* من عدة نواحي بقسنطينة وتم تحديدها مورفولوجيًّا وتقييتما، ثم استُخدمت لتقييم فعاليتها في تثبيط *P. infestans*. أظهرت المواجهات المباشرة معدلات تثبيط بلغت 55 % للسلالات (M1 و B1) و حققت السلالة (B5) نسبة 66 % بينما بلغ معدل تثبيط المستقبلات الثانوية لفطر *B. bassiana* نمو فطر *P. infestans* بنسبة تصل إلى 80 %. في المقابل، لم تُظهر المركبات المتطرافية فعالية مضادة. وقد أكدت اختبارات إضافية أجريت على الشتلات تأثيرها الوقائي، وخاصة السلالتين (M1 و B1) كما استُخدمت تقنية التحليل الكروماتوغرافي (CCM) لتحديد المركبات النشطة بيولوجيًّا (bassianolide, beauvericine, destruxine A). ثُبِرَت هذه النتائج إمكانات *Beauveria* و *Metarhizium anisopliae* كوسائل مكافحة بيولوجية، والتي يمكن دمجها في استراتيجية إدارة مستدامة لأمراض الطماطم. وبالتالي، ثُبِرَت الدراسة أهمية استكشاف دور بعض المستقبلات الفطرية في المكافحة البيولوجية بمزيد من التفصيل، بهدف اقتراح حلول بديلة ثراعي البيئة وصحة الإنسان.

الكلمات المفتاحية: فطريات الحشرات, *P. infestans*, مرض اللحفة المتأخرة, الطماطم, المكافحة البيولوجية

Liste des abréviations

IPM: Integrated Pest Management (lutte intégrée contre les ravageurs)

EPV: Entomopoxvirus

EPF: Entomopathogenic fungi (champignon entomopathogène)

MAD1: Metarhizium adhesin-like protein 1

MAD2: Metarhizium adhesin-like protein 2

DTX: Destruxine

HR: humidité relative

SDAY: Sabouraud Dextrose Agar enrichi en levure

PDAY: Potato Dextrose Agar enrichi en levure

PP: Milieu de culture à base de petit pois

PDB: Potato Dextrose Broth

PIRG: Pourcentage d'inhibition de la croissance radiale

LaMyBAM : Laboratoire de Mycologie, Biotechnologie et de l'Activité Microbienne

NV : Nouvelle ville Ali Mendjeli Constantine

SM : solution mère

ATB : antibiotique

B : souches de *Beauveria bassiana*

M : souche de *Metarhizium anisopliae*

COVs : composés organiques volatils

B5-R : souche de *Beauveria* 5 à (extrait de fermentation rouge)

B5-J : souche de *Beauveria* 5 à (extrait de fermentation jaune).

CCM : chromatographie sur couche mince

Rf : rapport frontal

HPLC : chromatographie liquide à haute performance

Liste des figures

Figure 1: Impact de la lutte biologique dans l'approche de one Health	4
Figure 2: Différents types de lutte biologique et leurs agents	5
Figure 3: Mécanisme d'actions mises en œuvre par les agents de lutte biologique pour la gestion des maladies des plantes.....	7
Figure 4 : Morphologie de <i>B. bassiana</i> : colonies sur milieu de Czapecz et Hyphes et conidies sous microscopie, ×40	15
Figure 5: Aspect morphologique de <i>Metarhizium anisopliae</i>	16
Figure 6: Aspect macroscopique de <i>Phytophthora infestans</i>	21
Figure 7 : Aspect microscopique de <i>Phytophthora infestans</i>	22
Figure 8 : Cycle de vie de <i>Phytophthora infestans</i>	23
Figure 9 : Symptômes du mildiou (<i>Phytophthora infestans</i>) sur les feuilles, tiges et fruits de la tomate.....	25
Figure 10 : Photos illustrant les fruits de tomates infectées concernées par l'étude	36
Figure 11 : Photos illustrant des feuilles de tomates infectées investiguées	36
Figure 12 : Schéma représentant la technique de la confrontation directe	40
Figure 13: Application des suspensions sporales sur les plats de tomates	43
Figure 14 : Aspect macroscopique des différents isolats fongiques	45
Figure 15: Aspect morphologique et microscopique de <i>B. bassiana</i>	46
Figure 16: Aspect morphologique et microscopique de <i>M. anisopliae</i>	46
Figure 17 : Souches purifiées de <i>Beauveria bassiana</i> (A) et <i>Metarhizium anisopliae</i> (B)	47
Figure 18: Exemples de colonies fongiques indésirables sur boîtes de Pétri pendant l'isolement de <i>Phytophthora infestans</i>	49
Figure 19: Feuille de tomate manifestant des symptômes de maladie	49

Figure 20 : Visualisation microscopique de <i>Phytophthora infestans</i> à partir d'un échantillon de feuilles de tomates.....	50
Figure 21 : Aspects macroscopiques (A) et microscopiques (B) de <i>Phytophthora infestans</i> utilisés dans notre étude.....	51
Figure 22 : Effet des composés volatils	55
Figure 23 : Différents aspects visuels des extraits métaboliques obtenus après fermentation fongique	58
Figure 24 : Graphique représentant les pourcentages d'inhibition de <i>Phytophthora infestans</i> selon le volume de filtrat de métabolites secondaires appliqué	59
Figure 26 : Comparaison de la sévérité des symptômes du mildiou de la tomate selon les différents traitements biologiques appliqués	63
Figure 25 : Visualisation des spots de métabolites après CCM (UV 254 nm)	65

Liste des tableaux

Tableau 1: Classification des genres de champignons entomopathogènes.....	9
Tableau 2: Classification de <i>B. bassiana</i>	16
Tableau 3: Classification de l'espèce <i>M. anisopliae</i>	17
Tableau 4: Classification systématique de <i>P. infestans</i>	20
Tableau 5: Caractéristiques des souches isolées de <i>Beauveria bassiana</i> et <i>Metarhizium anisopliae</i> selon les conditions de prélèvement et d'isolement.....	48
Tableau 6 : Résultats de la confrontation directe entre <i>Phytophthora infestans</i> et les champignons entomopathogènes <i>Beauveria bassiana</i> et <i>Metarhizium anisopliae</i>	53
Tableau 7 : Taux d'inhibition (%) de <i>Phytophthora infestans</i> par les métabolites non volatils	57
Tableau 8 : Évaluation des symptômes du mildiou selon les traitements biologiques appliqués	61

INTRODUCTION

La tomate (*Solanum lycopersicum*) est l'une des cultures maraîchères les plus importantes au monde, tant sur le plan économique qu'alimentaire. Toutefois, sa production est sévèrement compromise par de nombreuses maladies phytopathogènes, au premier rang desquelles figure le mildiou, causé par *Phytophthora infestans*. Ce pathogène redoutable est responsable de pertes considérables, en particulier dans les systèmes de culture intensifs, et sa gestion repose encore largement sur l'utilisation de fongicides chimiques. Cette dépendance soulève des préoccupations majeures en matière d'impact environnemental, de résidus sur les denrées alimentaires, ainsi que de développement de résistances chez le pathogène (Loreti Silva *et al.*, 2020)

En Algérie, la culture de la tomate occupe une place stratégique dans l'économie agricole, notamment dans les régions littorales et les zones sous serre du nord du pays. Toutefois, le mildiou constitue une menace récurrente, particulièrement lors des périodes humides et fraîches favorables à la prolifération de *P. infestans*. Les producteurs locaux sont souvent contraints d'intensifier l'usage de produits phytosanitaires, ce qui entraîne des coûts de production élevés et pose des risques pour la santé humaine et l'environnement. Ce contexte souligne l'urgence de développer des stratégies de protection des cultures plus durables et écologiquement responsables.

Parmi les alternatives envisagées, le biocontrôle s'impose comme une solution prometteuse. Il repose sur l'utilisation d'organismes vivants ou de substances naturelles pour limiter les dégâts causés par les pathogènes et ravageurs. Dans ce cadre, les champignons entomopathogènes, généralement connus pour leur capacité à infecter les insectes nuisibles, suscitent un intérêt croissant en tant qu'agents potentiels de lutte contre certains agents pathogènes des plantes, grâce à leurs propriétés antagonistes ou indirectes. Par exemple, des études ont montré que *Beauveria bassiana* peut coloniser les tissus de la tomate de manière endophyte, offrant ainsi une protection contre des insectes nuisibles tels que *Tuta absoluta*. (Loreti Silva *et al.*, 2020)

Ce mémoire s'inscrit dans cette perspective innovante. Il vise à évaluer le potentiel de certains champignons entomopathogènes dans la lutte contre le mildiou de la tomate, en explorant leurs interactions avec *Phytophthora infestans* et les mécanismes sous-jacents à leur activité antagoniste. À travers une approche expérimentale rigoureuse adaptée au contexte agroécologique algérien, cette étude ambitionne de contribuer à l'élargissement

du champ d'application des champignons entomopathogènes, et de proposer de nouvelles pistes pour une gestion intégrée, efficace et durable du mildiou de la tomate.
<https://agrichem.dz/#/>.

L'Objectif principal de cette étude réside dans l'évaluation du potentiel de certains champignons entomopathogènes en tant qu'agents de biocontrôle contre *Phytophthora infestans*, agent du mildiou de la tomate. Quant aux objectifs spécifiques, ils ont axé sur:

- L'isolement et identification des souches de champignons entomopathogènes à partir de sols ou d'insectes dans des zones de culture de tomate.
- Évaluation in vitro de l'effet antagoniste de ces champignons sur la croissance de *P. infestans*.
- Extraction des métabolites secondaires des souches entomopathogènes.
- Tester l'efficacité in vivo des souches les plus prometteuses sur des plants de tomate infectés.

REVUE

BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I: Généralités sur le biocontrôle

1. Définition du biocontrôle

Tout organisme vivant, à un moment de sa vie, se trouvera comme cible d'un ou plusieurs ennemis, c'est la loi de la nature. Compromettant sa survie en tant qu'individu, population et/ou espèce. D'une manière simple, la lutte biologique est une manière d'utiliser les ennemis des espèces, considérées comme nuisibles, pour contrôler la population en dessous d'un seuil acceptable (Suty, 2010).

Il existe différentes définitions de la lutte biologique et du biocontrôle. Selon le Ministère de l'Agriculture (France), le biocontrôle repose sur des mécanismes naturels incluant les substances naturelles biocides, les médiateurs chimiques, les macro-organismes auxiliaires et les micro-organismes (Herth, 2011). La lutte biologique dite biocontrôle ou encore bioprotection a été utilisée dans plusieurs domaines de la biologie. En pratique, elle a été utilisée contre presque tous les types de ravageurs: les insectes ravageurs et pathogènes des cultures, les mauvaises herbes, les moustiques, et les rongeurs. La demande de solutions de lutte biologique a rapidement augmenté ces dernières années, parallèlement à l'adoption mondiale de la lutte intégrée contre les ravageurs (IPM) comme futur paradigme de la protection des cultures (Stenberg, 2017). Cela a créé des divergences dans la définition et l'utilisation du terme (lutte biologique). Par exemple, en phytopathologie le terme s'applique à l'utilisation d'antagonistes microbiens pour contrôler les populations de ravageurs ou leurs impacts sur la récolte (Cook, 1993). Dans son évolution le concept de lutte biologique intègre toutes les formes non chimiques de contrôle des ravageurs des récoltes, des mauvaises herbes et toutes les phytopathologies. Cette définition large permet d'intégrer à l'utilisation des biocides inertes, les méthodes physiques de lutte, la résistance variétale, les méthodes culturales, les insecticides botaniques, les phéromones et juvénoides. Cependant il faut mentionner que la lutte biologique dans sa définition large ne fait pas l'unanimité chez les spécialistes (Mathias, 2001). Certains auteurs limitent la notion de "biocontrol" à l'utilisation d'organismes vivants pour réduire l'impact d'un bioagresseur sur une culture (Eilenberg *et al.*, 2001).

D'autres préfèrent la séparation entre les deux termes en les attribuant à deux concepts très proches mais différents : la lutte biologique est définie par des stratégies mais le biocontrôle est souvent défini par les produits, soit des agents vivants (macro-organismes, micro-organismes), ou des substances non vivantes (médiateurs chimiques, substances naturelles tel que les extraits de plantes) (Deguine, 2023).

Suite à la Révolution verte dans la seconde moitié du XXe siècle, la lutte biologique a refait surface avec des recherches accentuées, notamment après l'adoption de programmes de lutte intégrée contre les ravageurs (IPM) mis en œuvre suite à l'utilisation abusives de produits agrochimiques, qui a engendré de nombreux problèmes, tels que la contamination de l'environnement, la résistance des insectes et des acariens aux insecticides, ainsi que l'impact des résidus de ces produits sur la santé humaine et animale (Figure 1) (Zerihun *et al.*, 2018).

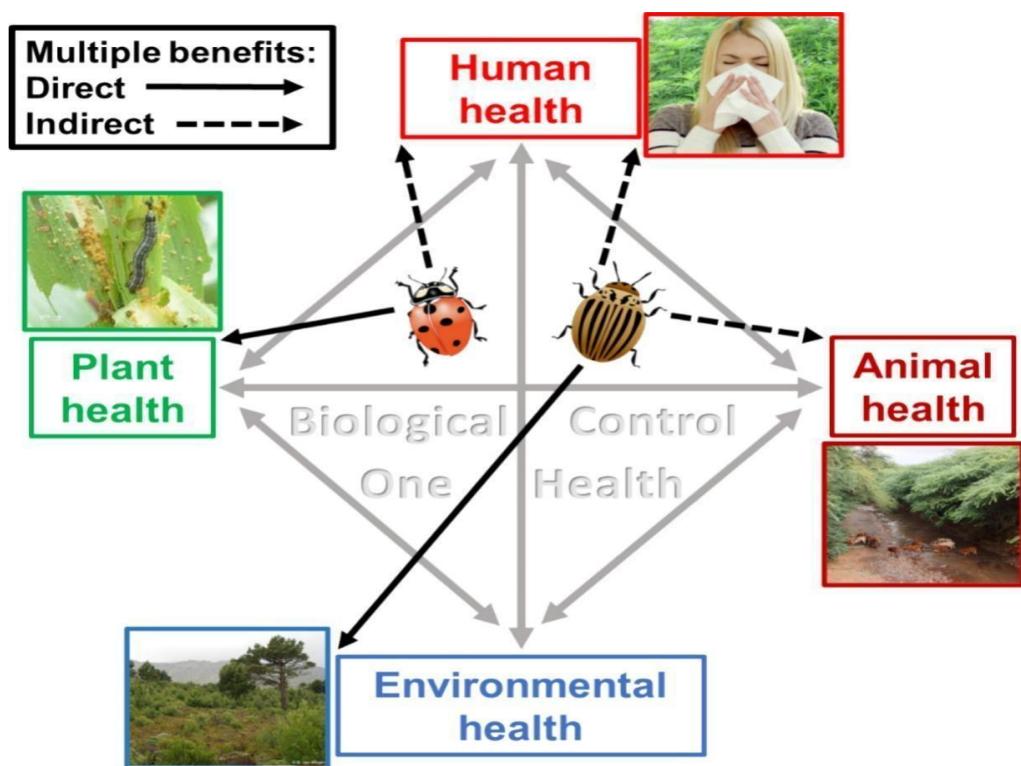


Figure 1: Impact de la lutte biologique dans l'approche de one Health (Schaffner *et al.*, 2024).

Hormis la lutte naturelle on peut partager le biocontrôle en trois types : la lutte biologique classique, la lutte biologique d'augmentation et la lutte biologique de conservation. Divers agents de lutte biologique naturels attaquent les phytopathogènes supprimant ainsi les maladies par plusieurs modes d'action (Figure 2). Ces activités de lutte biologique s'exercent soit directement par antagonisme des agents pathogènes du sol, soit indirectement en suscitant une réponse de résistance acquis par les plantes (Zerihun *et al.*, 2018).

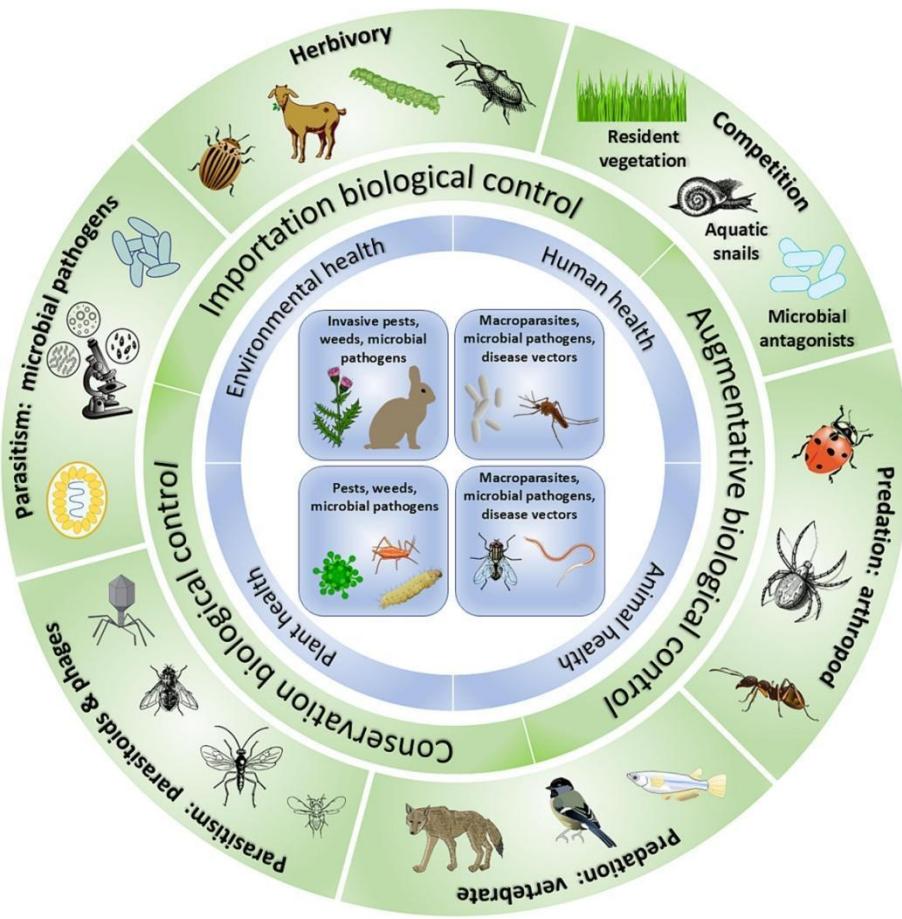


Figure 2: Différents types de lutte biologique et leurs agents (Schaffner *et al.*, 2024).

2. Principaux agents de biocontrôle

Un agent de biocontrôle appelé aussi auxiliaire désigne tout organisme vivant utilisé dans la lutte biologique : ennemi naturel ou antagoniste, il peut être des bactéries, des virus, des champignons ou des nématodes. Les agents de lutte biologique sont des organismes qui luttent contre les agents pathogènes et les maladies (Zerihun *et al.*, 2018).

2.1 Types d'agents de lutte

- Les insectes prédateurs : Plus de 30 familles d'insectes sont prédatrices, les plus importantes étant : Anthocoridae, Nabidae, Reduviidae
- Les bactéries : par exemple *Coccobacillus a cridiorum* d'Herelle pour la lutte antiacridienne
- Les virus notamment entomopoxvirus (EPV) utilisés contre les insectes

- Les champignons : comme exemple les quatre genres de Deutéromycètes et de Phycomycètes sont impliqués dans la lutte contre les ravageurs : *Beauveria*, *Metarhizium*, *Entomophthora* et *Coelomomyces*
- Les Rickettsies (Microtobiotes : Rickettsiales) sont souvent comparées aux virus en raison de leur petite taille ($0,2\text{--}0,3 \times 0,3\text{--}3,0 \mu\text{m}$) et de leur développement intracellulaire obligatoire. Cependant, leur sensibilité aux antibiotiques suggère des similitudes avec les bactéries (Kalpana, 2014).

2.2. Caractéristiques des agents biologiques

Les agents de lutte biologique hautement efficaces doivent répondre aux critères suivants :

- compétitifs et survivre plus longtemps dans le sol et les tissus hôtes
- capables de coloniser et de proliférer
- non pathogènes pour la plante hôte et l'environnement
- productifs d'une biomasse avec une excellente durée de conservation
- peu coûteux
- productible en grandes quantités
- Être sûrs que les agents se développeront et atteindront leur objectif.

2.3. Mécanismes employés par les agents de lutte biologique

L'activité de lutte biologique s'exerce soit directement par antagonisme des agents pathogènes telluriques, soit indirectement par le déclenchement d'une réponse de résistance déclenchée chez les plantes. L'antagonisme microbien des agents phytopathogènes se manifeste de plusieurs façons : la compétition pour les nutriments ou l'espace, la préation, le parasitisme et la production d'enzymes lytiques, la production de substances antimicrobiennes, ainsi que la résistance induite (Zerihun *et al.*, 2018). L'antagonisme direct implique un contact physique et/ou une forte sélectivité pour l'agent pathogène par le(s) mécanisme(s) adopté(s) par les agents de lutte, par contre dans l'antagonisme indirect les agents de lutte biologique ne ciblent pas directement l'agent pathogène par exemple : La stimulation des voies de défense de la plante hôte par des agents de lutte biologique non pathogènes (Figure 3).

Comprendre le mécanisme d'action d'un agent de lutte biologique peut améliorer la régularité de la lutte, soit en améliorant le mécanisme, soit en utilisant les agents de lutte biologique dans des conditions où leur efficacité est attendue (Zerihun *et al.*, 2018).

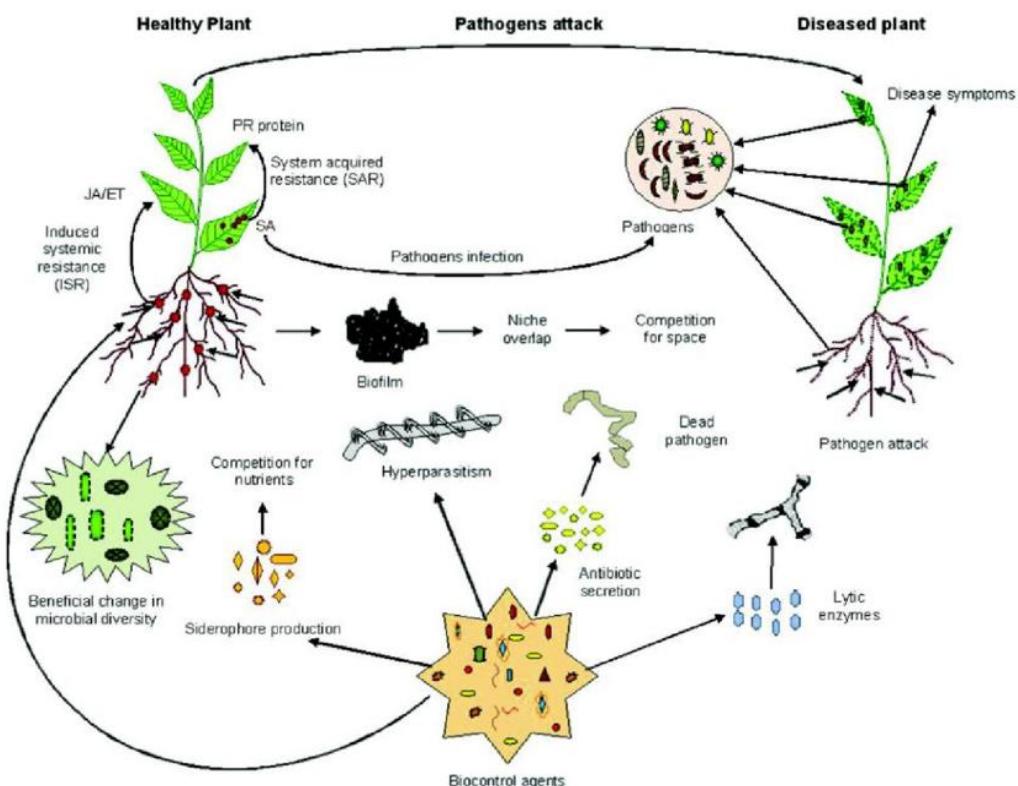


Figure 3: Mécanisme d'actions mises en œuvre par les agents de lutte biologique pour la gestion des maladies des plantes (Zerihun *et al.*, 2018).

Chapitre II: Les champignons entomopathogènes:caractéristiques et utilisation en biocontrôle

1. Généralités

1.1. Définition des champignons entomopathogènes

Les champignons entomopathogènes, comme leur nom l'indique, sont des champignons microscopiques pathogènes des insectes, et jouent un rôle important dans la régulation naturelle des populations d'insectes (Ferron, 1978; Wraight et Roberts, 1987) (cité par Benserradj, 2014). Ils appartiennent au sous-taxon des *Mastigomycotina*, *Zygomycota*, *Ascomycota*, et *Deuteromycotina*. Le plus grand nombre des pathogènes se trouve dans la classe des Zygomycètes, mais en biocontrôle, les plus utilisés proviennent des Deutéromycètes (*Fungi imperfecti*). Ces champignons ont des hyphes septés et un mode de multiplication asexuée. Les espèces du genre *Beauveria* et *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 des cultures (Benserradj, 2014).

1.2. Importance des champignons entomopathogènes dans la lutte biologique

Les champignons entomopathogènes, comme d'autres ennemis naturels des insectes, peuvent être utilisés dans le cadre de trois grandes stratégies de lutte biologique :

- la lutte biologique classique: lutte contre une espèce nuisible par l'introduction d'ennemis naturels
- augmentation des ennemis naturels: action visant à accroître les populations ou à obtenir des effets bénéfiques des ennemis naturels.
- conservation des ennemis naturels: actions délibérées visant à protéger et à maintenir les populations d'ennemis naturels (Shah et Pell, 2003).

2. Caractéristiques biologiques des champignons entomopathogènes

2.1. Morphologie générale

Les champignons entomopathogènes sont des organismes eucaryotes dotés d'un noyau, d'organites bien définis et d'une paroi cellulaire composée de chitine. Ils peuvent exister sous forme de cellules isolées, mais adoptent le plus souvent une structure filamentueuse constituée d'hyphes, formant ainsi un réseau mycélien où les cellules sont organisées.

Ces organismes se multiplient de manière végétative et/ou par la production de spores, qu'elles soient sexuées ou asexuées ; et leur mode de reproduction sexuée demeure inconnu, ce qui leur vaut l'appellation de champignons imparfaits (Humber, 1997 ; Tzean *et al.*, 1997). La plupart des espèces appartiennent aux divisions fongiques *Ascomycota* et *Zygomycota* (Tableau 1). Les ascomycètes étaient auparavant divisés en deux groupes: les *Ascomycota* et les *Deuteromycota*. Ces derniers étant connus sous le nom de champignons imparfaits car leur mode de reproduction sexué demeure inconnu (Roy *et al.*, 2006).

Tableau 1: Classification des genres de champignons entomopathogènes (Roy *et al.*, 2006).

Division	Classe	Ordre	Famille	Genre
Zygomycota	Zygomycetes	Entomophthorales	Entomophthoraceae Neozygitaceae	<i>Entomophaga</i> <i>Entomophthora</i> <i>Erynia</i> <i>Eryniopsis</i> <i>Furia</i> <i>Massospora</i> <i>Strongwellsea</i> <i>Pandora</i> <i>Tarichium</i> <i>Zoophthora</i> <i>Neozygites</i>
Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Cordycipitaceae	<i>Beauveria</i> <i>Cordyceps</i> <i>Cordycepioides</i> <i>Lecanicillium</i> <i>Metarhizium</i> <i>Nomuraea</i>

Les hyphomycètes regroupent environ 500 espèces (Starnes *et al.*, 1993), parmi lesquelles certains genres comme *Beauveria*, *Metarhizium*, *Tolypocladium*, *Verticillium* et *Paecilomyces* sont largement exploités en lutte biologique (Kamp et Bidochka, 2002). Chaque genre est caractérisé par un mode spécifique de conidiogénèse. La couleur des spores constitue un premier critère d'identification.

L'identification de l'espèce repose sur l'examen de la morphologie des spores et des conidiophores (Campos *et al.*, 2005). Dans le cas du genre *Beauveria*, les spores se

développent individuellement le long de cellules sporogènes adoptant une disposition en zigzag.

Certains genres comme *Hirsutella*, *Fusarium* et *Verticillium* produisent des spores recouvertes d'une substance visqueuse. Il est également possible de différencier les espèces au sein d'un même genre. À titre d'exemple, *Beauveria bassiana* et *Beauveria brongniartii* se distinguent par la forme de leurs spores : celles de *B. bassiana* sont globuleuses, tandis que celles de *B. brongniartii* sont ovales.

2.2. Cycle de vie

Le cycle est constitué de spores qui germent en mycélium et le mycélium à son tour produit des spores. La plupart des champignons entomopathogènes suivent deux phases dans leur cycle de vie: à l'extérieur du corps de l'hôte adoptent une croissance mycélienne normale et une phase de bourgeonnement principalement dans l'hémocèle de l'hôte. Par exemple : *Beauveria bassiana* en l'absence d'insecte hôte spécifique se développe selon un cycle végétatif asexué comprenant la germination, la croissance filamentueuse et la formation de sympoduloconidies . En présence de son insecte hôte, les conidiospores de *Beauveria* germent à la surface de la cuticule de l'hôte et pénètrent le tégument de l'insecte par les tubes hyphaux germés. Le champignon modifie alors sa morphologie de croissance pour adopter une phase levurienne et produit des corps hyphaux par bourgeonnement, lorsqu'ils circulent dans l'hémolymphé , entraînant la mort de l'hôte. La croissance fongique revient ensuite à la forme hyphienne typique (stade saprotrophe). La capacité de passer à la phase levurienne pourrait être une condition préalable à la pathogénicité (Sehroon *et al.*, 2012).

2.3. Mécanismes d'infection des insectes

Les champignons entomopathogènes infectent les insectes en traversant directement leur cuticule, contrairement aux bactéries et virus qui nécessitent une ingestion pour provoquer une infection (Bilgo *et al.*, 2018). Le processus débute par l'adhésion des spores à la surface de l'insecte, ce qui se fait en deux étapes. D'abord, des forces hydrophobes et électrostatiques facilitent cette adhésion, puis des enzymes et des protéines spécifiques à faible poids moléculaire, appelées hydrophobines, interviennent pour renforcer l'ancrage (Skinner *et al.*, 2014). Une fois fixées sur la cuticule, les spores commencent à germer en présence de sources de carbone et d'énergie, à condition que l'humidité et la température

soient favorables. La température optimale pour leur développement se situe généralement entre 20 et 30 °C, bien que certaines souches puissent survivre et germer en dehors de cette plage (Skinner *et al.*, 2014). Après la germination, les champignons forment des appressoria, structures spécialisées qui exercent une pression mécanique sur la cuticule de l'insecte. En parallèle, ils sécrètent des enzymes dégradant les constituants de la cuticule, notamment des protéases, lipases et chitinases, facilitant ainsi la pénétration du champignon (Skinner *et al.*, 2014; Lacey *et al.*, 2015).

Une fois dans la cavité interne de l'insecte (hémocèle), les hyphes fongiques se développent activement. Certains champignons entomopathogènes produisent des blastospores qui circulent dans l'hémolymphe et génèrent des hyphes secondaires colonisant les tissus de l'hôte. Cette invasion s'accompagne de la libération de métabolites secondaires aux effets toxiques, entraînant une paralysie et perturbant les fonctions physiologiques, notamment les réponses immunitaires de l'insecte (Donzelli *et al.*, 2015).

Le processus pathogène induit par les EPF repose sur plusieurs facteurs clés, notamment les adhésines, les enzymes lytiques et les métabolites secondaires, qui jouent un rôle crucial dans l'infection et la colonisation de l'hôte.

2.3.1. Les adhésines

L'infection fongique des arthropodes commence par l'adhésion des spores à leur cuticule. Cette première étape repose sur la production de deux types de protéines : les hydrophobines, qui se désintègrent lors de la sporulation des spores, et les adhésines (MAD1 et MAD2). Ces dernières permettent une fixation étroite du champignon à la cuticule de l'insecte et facilitent la reconnaissance de l'hôte par le pathogène (Wang & Leger, 2007 ; Greenfield *et al.*, 2014).

2.3.2. Enzymes lytiques et processus infectieux

Les enzymes lytiques jouent un rôle central dans l'infection des insectes par les champignons entomopathogènes (EPF). Ce processus repose sur l'action combinée de plusieurs enzymes lytiques :

- ***Les lipases*** : Ces enzymes sont les premières à être produites. Elles hydrolysent les lipides et lipoprotéines de l'épicuticule, libérant des acides gras, des mono- et diacylglycérols ainsi que

du glycérol (Silva *et al.*, 2009). Elles jouent aussi un rôle dans l'adhésion des spores en favorisant les interactions hydrophobes avec la cuticule de l'insecte (Santi *et al.*, 2010).

- **Les protéases** : Ces enzymes hydrolysent les protéines cuticulaires, exposant ainsi les fibrilles de chitine et facilitant la pénétration du champignon. L'une des plus connues est la subtilisine (Pr1), une endoprotéase à sérine qui dégrade les protéines cuticulaires et modifie la surface de la cuticule pour améliorer l'adhésion des spores. Elle est présente chez plusieurs EPF, notamment *Metarhizium anisopliae* (Shah *et al.*, 2005), *Ophiocordyceps sinensis* (Zhang *et al.*, 2008) et *Beauveria bassiana* (Donatti *et al.*, 2008).
- **Les chitinases** : Ces enzymes dégradent la chitine, composant principal de l'exosquelette des insectes. Elles se divisent en deux catégories : les endochitinases, qui hydrolysent les liaisons β -1,4-glycosidiques à l'intérieur de la molécule de chitine, et les exochitinases, qui libèrent des oligomères de N-acétylglucosamine. L'action combinée de ces enzymes est essentielle pour une dégradation complète de la chitine (Duo-Chuan, 2006).
- **La tréhalase acide (ATM1)** : Cette enzyme hydrolyse le tréhalose, principal disaccharide circulant dans l'hémolymphé des insectes, libérant ainsi du glucose qui sert de source d'énergie au champignon. L'inactivation du gène ATM1 chez *Metarhizium acridum* entraîne une diminution significative de sa virulence, l'empêchant de se développer efficacement dans l'organisme de son hôte (Jin *et al.*, 2015).

2.3.3. Métabolites secondaires : rôle dans l'infection et applications possibles

Les champignons entomopathogènes sécrètent d'abondants composés organiques de faible poids moléculaire appelés métabolites secondaires, notamment en réponse aux conditions environnementales. Le nombre de composés produits suggère qu'ils sont nécessaires à la fois au maintien des fonctions vitales des hôtes et à l'infection efficace des agents pathogènes en endommageant le système nerveux ou en réduisant la résistance des insectes (Donzelli et Krasnoff, 2016). Sur la base de leur structure chimique, ils peuvent être divisés en plusieurs groupes :

- Depsipeptides cycliques (tétradepsipeptides et hexadepsipeptides cycliques)
- Peptides (octadepsipeptides, dipeptides et depsipeptides)
- Dérivés d'acides aminés
- Polycétides

- Hybrides peptidiques
- Terpénoïdes (Donzelli et Krasnoff, 2016 ; Wang *et al.*, 2018b)

Les Destruxines (DTX)

Les destruxines sont des hexadepsipeptides cycliques principalement isolés de *Metarhizium* sp. Plus de 40 types de DTX ont été décrits, les plus importants étant DTX A, B et E dans le processus de pathogénèse (Arroyo-Manzanares *et al.*, 2017). Les DTX sont réputées pour leur activité insecticide et leur phytotoxicité. Elles possèdent également diverses propriétés biologiques :

- Antimicrobiennes
- Antivirales
- Antiprolifératives
- Cytotoxiques
- Immunosuppressives

Les Beauvericines et les Bassianolides

Les beauvericines sont produites par *Beauveria bassiana*, *Isaria tenuipes* et *Isaria fumosorosea* (Wang et Xu, 2012 ; Weng *et al.*, 2019).

Les bassianolides, présents dans diverses cultures, s'accumulent dans différents tissus et pénètrent dans la chaîne alimentaire, provoquant : Apoptose, Production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), Dommages mitochondriaux (Olleik *et al.*, 2019)

La Cordycépine

La cordycépine est un octadepsipeptide issu de *Cordyceps militaris* et *Isaria cicadae*. Utilisée en médecine chinoise, elle possède des propriétés :

- Antioxydantes
- Anti-inflammatoires
- Antitumorales
- Neuroprotectrices (Wang *et al.*, 2019b)

□ L'Oosporéine

L'oosporéine est un métabolite secondaire hautement réactif, isolé de *Beauveria bassiana* et *B. brongniartii*. Elle possède une activité insecticide et antivirale, et agit comme antibiotique contre les bactéries à Gram positif (Feng *et al.*, 2015). Son effet insecticide repose sur la stimulation de l'infection plutôt que sur une action directe sur les insectes (Keswani *et al.*, 2019).

□ Les Polycétides

M. robertsii produit des polycétides NG-391 et NG-393, similaires aux fusarines. La NG-391 présente un effet mutagène important sur les cellules hépatiques et altère l'intégrité de la biosynthèse des acides nucléiques (Donzelli *et al.*, 2010). De nouvelles études sont nécessaires pour comprendre leur bioactivité et leur potentiel thérapeutique.

3. Diversité des champignons entomopathogènes

Avec des gammes d'hôtes plus ou moins étendues, les champignons entomopathogènes sont largement répandus. Les EPF ont été parmi les premiers organismes à être utilisés pour la lutte biologique contre les ravageurs : les arthropodes, les insectes et les champignons phytopathogènes. Plus de 700 espèces de champignons appartenant à environ 90 genres sont pathogènes pour les insectes (Khachatourians et Sohail, 2008). La plupart des espèces d'EPF appartiennent aux divisions fongiques Ascomycota et Zygomycota (Sehroon *et al.*, 2012).

Certains champignons entomopathogènes ont une gamme d'hôtes restreinte, par exemple *Aschersonia aleurodes* qui infecte uniquement les cochenilles et les aleurodes, tandis que d'autres espèces fongiques ont une large gamme d'hôtes, certains isolats étant plus spécifiques aux ravageurs ciblés. Des entomopathogènes tels que *M. anisopliae* et *B. bassiana* sont bien caractérisés quant à leur pathogénicité pour plusieurs insectes et ont été utilisés comme agents de lutte biologique contre les ravageurs agricoles dans le monde entier. Environ 11 entreprises proposent au moins 16 produits à base de champignons entomopathogènes *B. bassiana*. Ces produits sont utilisés non seulement pour la culture du café, mais aussi pour d'autres cultures telles que le haricot, le chou, le maïs, la pomme de terre et la tomate. Ils sont également utilisés pour lutter contre les insectes nuisibles hématophages et les vecteurs de maladies comme les moustiques et les mouches selon (Florez, 2002; cité par Sardul *et al.*, 2012).

Contrairement aux pesticides chimiques, les biopesticides ont un mode d'action très complexe, ce qui empêche le développement de résistances chez les ravageurs (Sardul *et al.*, 2012). Les champignons entomopathogènes, *Verticillium lecanii*, *Beauveria bassiana* et *Metarhizium anisopliae* sont étudiés de manière intensive en tant qu'ennemis naturels de pucerons et d'autres ravageurs agricoles.

3.1. *Beauveria bassiana*

Le genre *Beauveria* Vuill. a été appelé par Vuillemin (1912) en l'honneur de Beauverie, qui est le premier à avoir démontré les caractéristiques morphologiques de ce groupe de champignons (Amang *et al.*, 2012). C'est un champignon entomopathogène très répandu dans l'environnement, considéré comme l'un des plus omniprésents. Il a la capacité d'infecter un large éventail d'insectes appartenant à différents ordres (Guo *et al.*, 2020).

À ce jour, les essais biologiques réalisés en Afrique avec *B. bassiana* (Figure 4) pour lutter contre *Spodoptera frugiperda* ont majoritairement utilisé des souches prélevées dans le sol ou sur d'autres insectes et conservées dans des collections (Akutse *et al.*, 2020).



Figure 4 : Morphologie de *B. bassiana* : colonies sur milieu de Czapecck et Hyphes et conidies sous microscopie, ×40.

(https://assets.cureus.com/uploads/figure/file/219069/article_river_caac0da0b98e11ebbae9cd8950562b94-fig-1.png).

3.1.1. Classification de *Beauveria bassiana*

La classification la plus détaillée de *Beauveria bassiana* (Tableau 2), basée sur des analyses morphologiques et des tests enzymatiques, a été établie par Mugnai *et al.* (1989).

Tableau 2: Classification de *B. bassiana* (Zimmermann, 2007).

Règne	Fungi
Division	Ascomycota
Ordre	Hypocreales
Famille	Cordycipitaceae
Genre	Beauveria
Espèce	<i>Beauveria bassiana</i> Vuillemin (1912)

3.2. *Metarhizium anisopliae*

Selon Donald *et al.* (2004), la muscardine verte *Metarhizium anisopliae* a été isolée et identifiée en Ukraine sur de la paille de céréales sous le nom *Anisopliae austriaca*, également désigné *Entomophthora anisopliae*. Dans les années 1980, ce champignon a été utilisé pour la première fois comme agent pathogène dans la lutte contre les insectes ravageurs (Figure 5)



Figure 5: Aspect morphologique de *Metarhizium anisopliae* (Bich *et al.*, 2021).

3.2.1. Classification de *Metarhizium anisopliae*

La classification du genre *Metarhizium* (Tableau 3) repose sur les caractéristiques morphologiques des cellules et des conidies. Toutefois, la portée limitée de ces critères a rendu la taxonomie plus complexe.

Tableau 3: Classification de l'espèce *M. anisopliae* (Zimmermann, 2007)

Règne	Fungi
Embranchement	Dikarya
division	Ascomycota
Classe	Sordariomycetes
Ordre	Hypocreales
Famille	Cordycipitaceae
Genre	Metarhizium
Espèce	<i>Metarhizium anisopliae</i> (Sorokin, 1883)

4. Utilisation des champignons entomopathogènes en biocontrôle

Les champignons entomopathogènes sont utilisés dans différentes stratégies de lutte biologique : lutte biologique classique, lutte biologique par inondation, lutte biologique par inoculation, lutte biologique par conservation (Eilenberg *et al.*, 2001).

➤ *Lutte biologique classique*

La lutte biologique classique repose sur l'introduction d'un organisme exotique pour contrôler un ravageur sur le long terme (Eilenberg *et al.*, 2001). Cette stratégie est particulièrement efficace pour contrôler un ravageur invasif en introduisant un ennemi naturel issu de sa région d'origine (Hajek et Delalibera, 2010). Parmi les espèces introduites, les Hypocreales (Ascomycota) sont les plus représentées (Hajek *et al.*, 2016).

➤ *Lutte biologique par inoculation et inondation*

La lutte biologique par inoculation repose sur le relâcher d'un agent biologique afin qu'il se multiplie et contrôle le ravageur sur une longue période, mais sans permanence (Eilenberg *et al.*, 2001). La lutte biologique par inondation implique l'application massive d'un organisme pour contrôler immédiatement le ravageur, sans infection secondaire attendue (Eilenberg *et al.*, 2001). Cette approche est comparable à l'utilisation d'un insecticide chimique et est souvent qualifiée de myco-insecticide (Shah et Pell, 2003).

➤ *Lutte biologique par conservation*

La lutte biologique par conservation repose sur des modifications des pratiques agronomiques et de l'environnement afin d'améliorer l'efficacité d'un agent biologique existant (Eilenberg *et al.*, 2001). Cette approche n'implique pas d'introduction d'un nouvel organisme mais vise à protéger et favoriser les populations naturelles d'ennemis des ravageurs. Les pratiques

agronomiques susceptibles d'améliorer la présence de champignons entomopathogènes incluent :

- Augmenter l'humidité (ex. irrigation)
- Réduire l'utilisation de pesticides
- Modifier les pratiques de labour
- Aménager des habitats semi-naturels pour favoriser les hôtes alternatifs (Pell *et al.*, 2010).

4.1. Modes d'application

La réussite de l'application des champignons entomopathogènes en biocontrôle dépend non seulement de la quantité de conidies produites, mais aussi de leur stabilité (résistance à la dessiccation, longévité, etc.) et de leur efficacité. La méthode de production et la formulation du produit sont étroitement liées. Deux techniques de formulation sont couramment utilisées: l'enrobage des spores déjà récoltées, et leur culture sporulation directe sur un support granulé. Bien que la première méthode soit facilement industrialisable, elle reste encore peu éprouvée au champ pour ces champignons (Leland et Behie, 2005).

L'ajout de composants comme des protecteurs UV, des huiles, des humectants et des nutriments peut améliorer significativement la performance des formulations (Wraight *et al.*, 2001; Goettel *et al.*, 2000; Burges, 1998, Bateman, 1994). Par exemple, les huiles facilitent l'adhésion des spores sur les insectes et assurent une meilleure couverture (Ibrahim *et al.*, 1999). En outre, les conidies formulées avec les huiles et adjuvants présentent une meilleure résistance aux UV que les spores non formulées (Alves *et al.*, 1998; Moore *et al.*, 1993).

4.2. Cibles principales

Les champignons entomopathogènes constituent une alternative biologique efficace pour la gestion des ravageurs agricoles et forestiers. Leur efficacité a été démontrée contre divers insectes nuisibles. Par exemple, *Beauveria bassiana* a provoqué jusqu'à 80% de mortalité chez les adultes de *Ceratitis capitata* en conditions expérimentales (Rohrlich, 2018). Dans les systèmes maraîchers, *Metarhizium anisopliae* a permis de réduire de 70% les populations de chenilles ravageuses de la tomate après trois pulvérisations successives (Touré, 2018). Concernant les coléoptères comme *Cosmopolites sordidus*, *B. bassiana* a démontré une efficacité prolongée, protégeant des plants jusqu'à six semaines après application (Trudel,

2005). En milieu forestier, son emploi contre les scolytes des conifères en Europe centrale a permis de limiter les infestations de 60% comparativement aux zones non traitées (INRAE, 2020). Par ailleurs, des avancées technologiques telles que l'encapsulation des spores dans les nanoparticules ont amélioré leur stabilité et leur action contre les acariens en serres (Boulard *et al.*, 2002). L'ensemble de ces études met en lumière le potentiel des champignons entomopathogènes comme solution durable aux pesticides chimiques, contribuant à préserver les rendements agricoles (Poncet *et al.*, 2015).

Chapitre III: Le mildiou de la tomate à *Phytophthora infestans*

1. Biologie et écologie de l'agent pathogène

1.1. Classification et taxonomie

Phytophthora infestans (Mont.) de Bary appartient aux oomycètes, un groupe classé dans la famille des Perenosporaceae (Tableau 4). Ces organismes se distinguent par un mycélium non cloisonné et la production de zoospores biflagellées, l'une portant un flagelle orienté vers l'avant et cilié, l'autre dirigé vers l'arrière et dépourvu de cils (Agrios, 2005). Leur thalle est diploïde, et la méiose intervient au niveau des gamétanges, aboutissant à la formation de spores sexuées appelées oospores (Lepoivre, 2003).

Les oomycètes sont souvent qualifiés de pseudo-champignons, car ils diffèrent des véritables champignons par plusieurs caractéristiques : leur paroi cellulaire est composée principalement de glucanes, enrichie de cellulose et de faibles quantités d'hydroxyproline, sans chitine (Hackett *et al.*, 2007). Par ailleurs, leur membrane plasmique contient du fucostérol (et non de l'ergostérol) et leurs réserves énergétiques sont constituées de mycolaminarine au lieu du glycogène (Martens *et al.*, 2008).

Le genre *Phytophthora* est organisé en six groupes morphologiques distincts. Parmi eux, *Phytophthora infestans* qui se distingue par ses caractéristiques propres et appartient au groupe IV (Agrios, 2005).

Tableau 4: Classification systématique de *P. infestans* (Erwin et Ribeiro, 1966; index Fungorum, 2025).

Règne	Chromista (ou Stramenopila)
Embranchement	Oomycota
Classe	Peronospora
Ordre	Péronosporales
Famille	Perenosporaceae
Genre	<i>Phytophthora</i>
Espèce	<i>Phytophthora infestans</i> (Mont.) de Bary

Sur le plan phylogénétique, les Oomycota forment un groupe homogène basé sur la similarité des séquences d'ARN ribosomal (sous-unités petites) (Judelson et Blanco, 2005). L'analyse de l'arbre phylogénétique révèle que les oomycètes sont plus étroitement apparentés aux chrysophytes, diatomées et algues brunes, notamment en raison de leur métabolisme, de la composition de leur paroi cellulaire et des séquences d'ARNr (Björn, 2007).

Bien qu'ils présentent une croissance filamentueuse rappelant celle des champignons véritables comme les ascomycètes et basidiomycètes, les données moléculaires montrent qu'ils en sont éloignés (Kroon *et al.*, 2004).

1.2. Morphologie et cycle de vie

Le champignon *P. infestans* apparaît sous forme de colonies claires qui poussent de façon radiale, compacte, sans marge nette. Elles sont duveteuses et présentent de courts hyphes aériens (Figure 6) (Alaoui *et al.*, 2022). Microscopiquement, *P. infestans* présente un mycélium coenocytique hyalin et à développement endogène (intercellulaire et intracellulaire) via la formation de haustoria. Les sporangiophores émergent souvent à travers les stomates. Le caractère morphologique principal de ce pathogène est la présence de renflements au niveau des sites de ramification, en particulier aux points de la formation des sporocystes. Ces derniers en position terminale ont une forme souvent citronnée et possèdent une papille apicale (Figure 7). Leur paroi est mince et leurs dimensions sont de 21-38 x 12-23 μ m (Alaoui *et al.*, 2022).

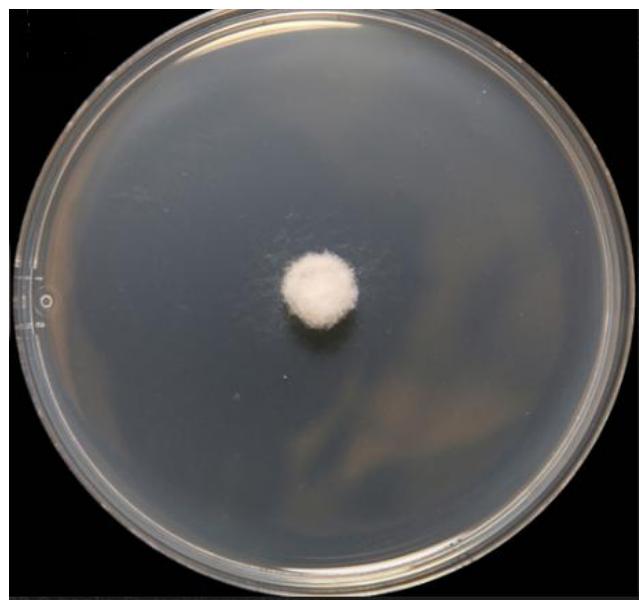


Figure 6: Aspect macroscopique de *Phytophthora infestans* (<https://idtools.org>)

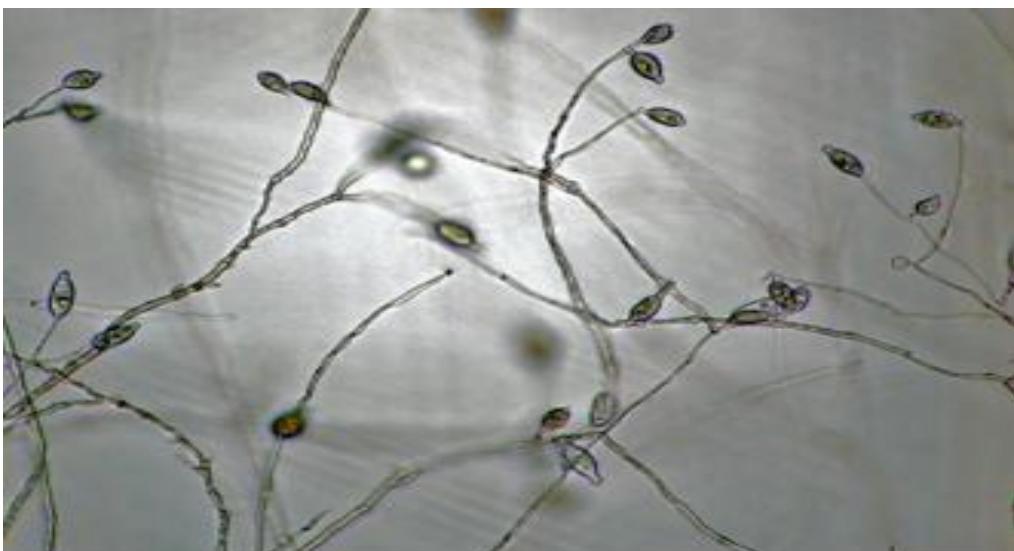


Figure 7 : Aspect microscopique de *Phytophthora infestans* (<https://idtools.org>).

Le cycle de développement de *Phytophthora infestans* comporte deux grandes phases : l'une asexuée, l'autre sexuée (Figure 8). Lors de la reproduction asexuée, les sporocystes jouent un rôle clé. Ceux-ci se détachent facilement des sporangiophores, qui forment une sorte de duvet blanc autour des lésions. La germination des sporocystes peut se faire de deux manières : soit par émission directe d'un ou plusieurs tubes germinatifs, soit indirectement via la production de zoospores (Harrison, 1990). Ces structures propagent l'infection secondaire. Concernant les tubercules, l'infection est principalement provoquée par les zoospores transportées par l'eau d'irrigation ou les précipitations. Le pathogène pénètre à travers des ouvertures naturelles comme les lenticelles, les yeux, les stolons, ou par des blessures, mais il est incapable de traverser un péridème intact (Walmsley Woodward et Lewis, 1977 ; Pathak et Clarke, 1987). L'importance relative de chacune de ces voies d'entrée varie selon les conditions de culture et le type de cultivar utilisé (Swizynsky et Zimnoch Guzowska, 2001).

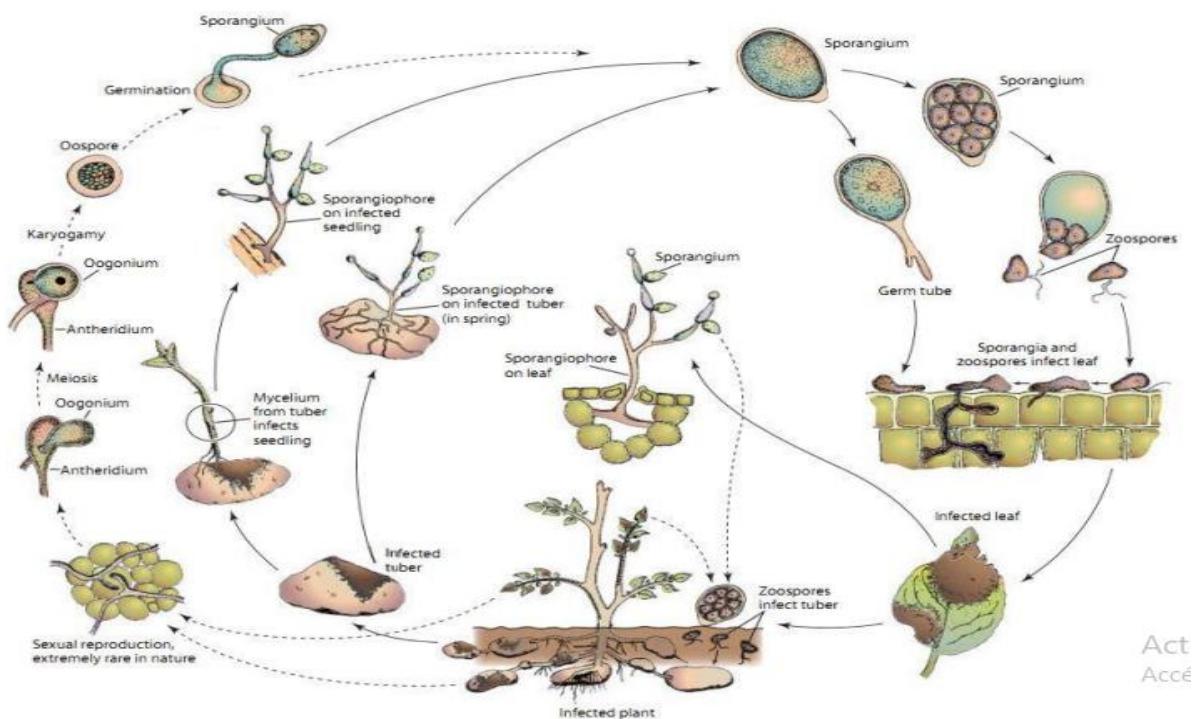


Figure 8 : Cycle de vie de *Phytophthora infestans* (Agrios, 2005).

1.3. Mécanismes d'infection

La phase épidémique du cycle de vie de *Phytophthora infestans* débute par la germination des sporanges lorsqu'ils entrent en contact avec la plante hôte (Judelson et Blanco, 2005). Cette germination peut se faire soit directement, soit par la libération de zoospores biflagellées (généralement entre 6 et 10 par sporange selon les conditions climatiques (Clément, 2011; Danies *et al.*, 2013)). Une fois enkystés (qu'il s'agisse de sporanges ou de zoospores), ils forment un tube germinatif qui facilite leur pénétration dans l'hôte, soit à travers les ouvertures naturelles comme les stomates et les lenticelles, soit en traversant directement les parois cellulaires grâce à la formation d'un appressorium. Si la plante est réceptive à l'infection, un haustorium se développe, permettant la colonisation des tissus par un réseau d'hyphes intra- et intercellulaires (Coffey et Gees, 1991).

1.4. Épidémiologie

Lorsque les conditions environnementales deviennent favorables, le développement de l'épidémie est influencé par l'agressivité de *Phytophthora infestans* ainsi que par les capacités de défense de l'hôte végétal (Drenth *et al.*, 1995).

1.4.1. Facteurs climatiques

À l'instar de nombreux agents responsables du mildiou, *P. infestans* sévit principalement dans les zones de culture exposées à des périodes prolongées d'humidité (pluies fréquentes, irrigation par aspersion, brouillard, rosée...) combinées à des températures fraîches (Platt, 2008). La durée de latence et la vitesse d'extension des lésions dépendent essentiellement de la température, tandis que l'intensité des infections est liée au niveau d'humidité. Les conditions optimales pour la sporulation se situent entre 16 °C et 22 °C, et celle-ci est fortement ralentie lors des périodes sèches et chaudes (Dominique, 2009). La production maximale de sporanges est observée autour de 18 °C, tandis qu'elle devient inexisteante à 28 °C. Sous des températures comprises entre 12 °C et 15 °C, les sporanges libèrent entre cinq et dix zoospores. Lorsque la température dépasse 15 °C, les sporanges germent directement par émission de tubes germinatifs (Agrios, 2005). La formation d'oospores est favorisée dans une fourchette thermique de 8 °C à 15 °C, nécessitant une humidité constante et élevée (Grünwald *et al.*, 2006).

la lumière inhibe le processus de reproduction sexuée chez les espèces du genre *Phytophthora*, notamment lors de la phase d'induction précédant la formation des gamétocystes, sensibles à la lumière (Ribeiro, 1983b).

1.4.2. Facteurs liés au sol

La survie de *P. infestans* dans le sol est limitée en raison de sa faible aptitude saprophytique, le mycélium et les sporocystes étant rapidement dégradés par la microflore tellurique (bactéries, autres champignons, protozoaires) naturellement présents dans le sol. Ces micro-organismes saprophytes sont très efficaces pour décomposer la matière organique et entrent en compétition avec *P. infestans* pour les ressources, ou peuvent même le parasiter. (Fernandez-Pavía *et al.*, 2004).

1.4.3. Prédisposition de l'hôte

La nutrition, la durée d'exposition à la lumière, l'intensité lumineuse ainsi que la présence d'autres agents pathogènes influencent la sensibilité des cultivars face au mildiou (Dominique, 2009). La nutrition azotée, en particulier, impacte la croissance des lésions et la

quantité de spores produites (Erwin, 1983). La vulnérabilité de la plante varie aussi en fonction de son âge et de l'état de ses feuilles (Rousselle *et al.*, 1996).

2. Symptômes et diagnostic du mildiou sur la tomate

Le mildiou de la tomate, causé par *Phytophthora infestans*, représente une menace sérieuse, particulièrement en culture de plein champ. Bien que sa fréquence soit généralement plus faible en milieu protégé, des cas d'infections ont tout de même été signalés, notamment sous tunnels plastiques ou en serres vitrées. L'apparition récente de nouvelles souches, couplée à une variabilité génétique croissante, laisse craindre une évolution vers une plus grande agressivité, une virulence renforcée ou encore une résistance accrue aux traitements phytosanitaires couramment utilisés.

2.1. Symptômes foliaires, tiges, fruits

Les dégâts causés par ce pathogène sont multiples. Sur les tiges, il provoque l'apparition de taches brunâtres qui peuvent finir par les entourer complètement. Sur les feuilles, on observe une sporulation sous forme d'un duvet blanc sur la face inférieure, tandis que sur les fruits, la maladie se manifeste par des zones marbrées de brun, présentant un aspect bosselé (Figure 9). Bien que certains fruits partiellement atteints puissent mûrir, les zones infectées conservent une coloration verte brunâtre ou jaune mêlée de taches brunes



Figure 9 : Symptômes du mildiou (*Phytophthora infestans*) sur les feuilles, tiges et fruits de la tomate (<https://usablight.org>).

2.2. Confusion possible avec d'autres maladies

Le mildiou de la tomate présente des symptômes pouvant être difficilement distingués de ceux d'autres pathologies affectant également les feuilles et les fruits. Cette similitude symptomatique constitue un véritable défi pour un diagnostic fiable sur le terrain. Plusieurs maladies peuvent ainsi prêter à confusion avec le mildiou, notamment:

- Alternariose (*Alternaria solani*)
- Cladosporiose (*Fulvia fulva*)
- Pourriture grise (*Botrytis cinerea*)
- Oïdium (*Leveillula taurica*, *Oidium neolyopersici*).

3. Conditions favorables au développement de la maladie

3.1. Facteurs climatiques

Le développement du mildiou de la tomate est fortement influencé par les conditions environnementales. Parmi les plus déterminants, les facteurs climatiques jouent un rôle essentiel dans l'apparition et la gravité des épidémies. En effet, ce développement repose sur deux facteurs. Des températures diurnes comprises entre 15,6 et 21,1°C, des températures nocturnes comprises entre 10 et 15,6°C et une humidité relative proche de 100 % sont les conditions idéales pour l'infection et la propagation du mildiou. Les facteurs prédisposants comprennent un temps frais et humide, une humidité relative élevée et de grandes cultures de tomates densément plantées (Nelson, 2008).

3.2. Pratiques culturales aggravantes

Le développement du mildiou est favorisé par des systèmes agricoles traditionnels tels que l'utilisation de cultivars sensibles (Sako et Demissie, 2023). La monoculture prolongée ainsi que l'absence de rotation culturelle favorisent l'accumulation des inoculum de *Phytophthora infestans* dans le sol et sur les résidus végétaux, augmentant ainsi la pression de la maladie. Par ailleurs, certaines pratiques comme l'irrigation par aspersion maintiennent une humidité prolongée sur le feuillage, créant des conditions idéales à la germination des spores et à la pénétration du pathogène (Arinaitwe *et al.*, 2023).

3.3. Période de sensibilité de la culture

La période de sensibilité de la culture de la tomate au mildiou est influencée par divers facteurs ; les maladies affectent la culture à différents stades de croissance au champ. Le développement du mildiou est lié à la virulence du pathogène, aux conditions environnementales favorables et aux systèmes agricoles traditionnels, comme l'utilisation de cultivars sensibles. En effet, le mildiou, causé par *Phytophthora infestans*, est la maladie la plus dommageable de cette culture. De plus, la culture de tomates tout au long de l'année crée des conditions propices à l'accumulation de nombreuses maladies. Ainsi, sous des conditions météorologiques favorables, le pathogène peut détruire le feuillage de la tomate en 10 à 15 jours, et le rendement potentiel peut être réduit de 50 à 70 %.

4. Méthodes de lutte contre le mildiou

4.1. Lutte chimique

Divers fongicides sont couramment utilisés pour lutter contre le mildiou de la tomate, notamment ceux à base de mancozèbe seul ou en association avec le métalaxyl, tels que Ridomil Gold, Agro Laxly, Mancolaxyl et Unizeb. Ces formulations, contenant principalement du mancozèbe et du métalaxyl, ont démontré une efficacité notable dans le contrôle de la maladie. Par exemple, des produits comme Ridomil Gold 68 WP (Métalaxyl-M 4 % + Mancozèbe 64 %, à raison de 350 g/100 L), Fungomil (250 g/100 L) et Mancolaxyl 72 % (250 g/100 L) ont permis de réduire significativement l'incidence du mildiou et d'augmenter les rendements commercialisables de 40 à 66 % (Padmaja et al., 2015). Malgré cela, la lutte biologique émerge comme une alternative prometteuse, compatible avec les objectifs d'une agriculture durable (Haverkort et al., 2012).

Concernant les stratégies d'application, la gestion du mildiou repose essentiellement sur l'application judicieuse de fongicides et le respect de mesures d'hygiène culturale, particulièrement en période de conditions climatiques propices à la propagation de la maladie. Dans de nombreux pays en développement, l'absence de systèmes de prévision fiables complique l'optimisation des traitements (Fry et Godwin, 1997 ; Ojiewo et al., 2010). De plus, l'utilisation régulière de fongicides dans la culture de la tomate peut représenter jusqu'à 20 % des coûts de production (Mizubuti et al., 2006).

4.2. La lutte agronomique

- La rotation culturale constitue une approche validée scientifiquement pour limiter le développement du mildiou dans les cultures de tomates sous serre. Étant donné que l'agent pathogène responsable peut persister dans le sol et affecter les cultures suivantes. L'introduction de cultures non solanacées, telles que la laitue, le concombre, les haricots, le maïs, ou certaines herbes aromatiques comme le basilic, le thym ou la menthe – permet de freiner la progression de la maladie. En effet, le mildiou étant un pathogène spécifique à l'hôte, l'absence de cultures hôtes limite sa survie. Ce procédé offre également au sol une période de repos, réduisant ainsi la charge pathogène. Alterner la culture de la tomate avec des plantes non sensibles comme les haricots, les brassicacées ou le maïs contribue ainsi à limiter l'accumulation du pathogène en serre (Chowdappa *et al.*, 2015).
- Il est essentiel de réguler la quantité d'eau apportée afin de satisfaire les besoins hydriques normaux des cultures tout en évitant une humidité excessive et prolongée au niveau des feuilles et du sol. L'évapotranspiration de référence constitue un outil précieux pour évaluer ces besoins, notamment en environnement sous serre où elle doit être ajustée à l'aide de capteurs d'humidité. Pour la tomate, le coefficient cultural (K_c) commence autour de 0,6 durant les quatre premières semaines, atteint environ 0,9 à la neuvième semaine, puis augmente jusqu'à 1,15 à maturité vers la dixième semaine. L'irrigation localisée, comme le goutte-à-goutte, est fortement recommandée car elle permet de cibler les racines tout en réduisant l'humidité sur le feuillage, limitant ainsi les risques de maladies. À l'inverse, l'irrigation par aspersion, notamment en période humide ou pluvieuse, doit être évitée. L'usage de capteurs et l'ajustement des apports en fonction des stades phénologiques et des conditions climatiques contribuent à maintenir un équilibre hydrique optimal et une production saine (Chowdappa *et al.*, 2015).
- Une gestion optimale de l'humidité dans les serres et les tunnels passe par un renouvellement régulier de l'air grâce à une ventilation efficace. En effet, une humidité excessive favorise l'apparition de nombreuses maladies, notamment le mildiou. Pour y remédier, l'utilisation continue de systèmes de ventilation par jets ou flux d'air horizontal est recommandée, surtout durant les nuits humides ou les journées pluvieuses. Par ailleurs, un espacement trop réduit entre les plants et un recouvrement excessif du feuillage peuvent entraîner la formation de microclimats très humides, constituant des foyers propices à l'initiation des infections.

Chapitre IV: Potentiel des champignons entomopathogènes pour la gestion du mildiou

Souvent considérés uniquement comme des agents pathogènes d'insectes, les entomopathogènes fongiques sont étudiés depuis plus d'un siècle sans atteindre leur plein potentiel en tant qu'agents de biocontrôle. De plus en plus d'études suggèrent que nous avons négligé le potentiel important des EPF dans le but de développer ces micro-organismes comme biopesticides. Selon plusieurs études, les champignons entomopathogènes jouent d'autres rôles dans la nature, notamment l'endophytisme, l'antagonisme des maladies des plantes, la promotion de la croissance des plantes et la colonisation de la rhizosphère. Ces rôles écologiques, récemment émergents, mais encore mal compris, offrent des opportunités pour une utilisation multiple des entomopathogènes fongiques dans les stratégies de lutte intégrée (LAI) (Vega *et al.*, 2009, Lacey *et al.*, 2015). Il existe désormais des preuves que certains champignons entomopathogènes endophytes, notamment *B. bassiana* et *Lecanicillium* spp. (anciennement *Verticillium lecanii*), pourraient également démontrer une activité antagoniste contre les phytopathogènes, en plus de leur activité bien connue de lutte biologique contre les insectes ravageurs, et donc protéger leur plante hôte contre les agents pathogènes ou limiter leurs effets néfastes par plusieurs mécanismes (Bonnie, 2018).

1. Mécanismes d'action des champignons entomopathogènes contre *Phytophthora infestans*

1.1. Activité antifongique des champignons entomopathogènes

Sous forme d'endophytes une grande diversité de champignons entomopathogènes, abondants dans les espèces végétales notamment agricoles. Les champignons endophytes jouent un double rôle : ils protègent les plantes hôtes contre les agents pathogènes et favorisent leur croissance; ils colonisent et se développent au sein des plantes de manière systémique, assurant ainsi une protection continue et une persistance prolongée. La colonisation des tissus végétaux par les champignons endophytes réduit également les dommages causés par les herbivores et les maladies fongiques (Bahadur, 2023). A titre d'exemple, *Beauveria bassiana* présente également un potentiel de lutte biologique contre les agents pathogènes des plantes (Wang et Zheng, 2012). Il génère une variété de 23 métabolites bioactifs, dont certains se sont avérés inhiber *in vitro* la croissance de phytopathogènes fongiques. De nombreux métabolites secondaires produits par *B. bassiana* sont connus pour

leurs propriétés antifongiques, antibactériennes, insecticides et cytotoxiques. Parmi ces métabolites, on peut citer les beauvérolides, les bassianolides, la beauvéricine, l'oosporéine, la cyclosporine A et l'acide oxalique (Bonnie, 2009).

Rhizoctonia solani et *Pythium myriotylum*, deux agents pathogènes des plantes transmis par le sol, sont réprimés par la souche 11-98 de *Beauveria bassiana* (Zhang et Li., 2011). L'antagonisme *in vitro* de *Beauveria bassiana* a également été testé contre *Fusarium oxysporum sp. vasinfectum*, agent pathogène du flétrissement du coton, et *F. verticillioides*, agent pathogène de la pourriture rouge du coton. En double culture, *B. bassiana* a montré une inhibition évidente de la croissance des deux agents pathogènes. (Zhang et Li., 2011).

1.2. Interactions entre les champignons entomopathogènes et *P. infestans*

Les entomopathogènes ont suscité un grand intérêt dans le biocontrôle, cependant quelques études sont portées sur l'action des EPF sur *P. infestans*. Işılay et al. (2023) a étudié l'activité antifongique de 24 isolats de deux champignons entomopathogènes, *Beauveria sp.* et *Metarhizium sp.* contre *P. infestans* *in vitro*. Leurs résultats suggèrent que deux isolats les plus efficaces parmi les 24 identifiés dans leur étude peuvent être utilisés simultanément pour lutter contre *P. infestans*. En effet, dans la double culture avec *P. infestans*, une zone d'inhibition très nette a été observée. *B. bassiana* a fortement inhibé la croissance de *P. infestans*, même si le taux de croissance était considérablement lent par rapport à celui de *P. infestans*. *In vivo* *B. bassiana* a efficacement réduit la taille des surfaces foliaires nécrotiques et chlorotiques (jeptoo, 2023).

2. Facteurs influençant l'efficacité des champignons entomopathogènes

2.1 Conditions environnementales

Les variations des conditions environnementales influencent de manière significative l'efficacité des EPF dans la lutte contre les ravageurs. En effet, ces changements peuvent entraîner une diminution du stock de conidies, une inactivation progressive des spores ainsi qu'une altération de leur virulence et de leur capacité infectieuse.

2.1.1. La température

La température joue un rôle clé dans l'efficacité des champignons entomopathogènes dans la lutte contre les ravageurs, car le stress thermique affecte leur cycle d'infection (Paixão

et al., 2019). Généralement, ces micro-organismes mésophiles se développent entre 10 et 40 °C, avec une croissance optimale située entre 25 et 35 °C. De plus, l'origine géographique d'une souche influence fortement sa capacité à tolérer des températures extrêmes, qu'elles soient élevées ou basses (López-Plantey *et al.*, 2019 ; Membang *et al.*, 2021 ; Onsongo *et al.*, 2019 ; Paixão *et al.*, 2019 ; Quesada-Moraga et Santiago-Álvarez, 2008 ; Seid *et al.*, 2019).

Certaines protéines fongiques sont régulées par la température, et des différences ont été observées entre les souches actives à basse température cultivées à 8 °C et celles cultivées à 25 °C, alors qu'aucun changement n'a été noté chez les souches non adaptées au froid (De Croos *et al.*, 2001). L'expression différentielle de ces protéines pourrait influencer la virulence des champignons. De plus, certaines souches pourraient posséder des gènes conférant une tolérance thermique, influençant ainsi leur capacité infectieuse (Zhang *et al.*, 2011).

2.1.2. L'humidité

Une humidité relative (HR) comprise entre 93 et 96,5 % est essentielle au développement des champignons entomopathogènes, tandis qu'une HR de 96,5 à 98,5 % est nécessaire pour assurer une production élevée de conidies sur des granulés ou des boulettes. L'humidité influence directement la germination des conidies, la croissance saprobique sur les cadavres d'insectes ainsi que la sporulation (Fernández-Bravo *et al.*, 2016 ; Jaronski, 2010 ; Vega *et al.*, 2012). La plupart de ces champignons présentent un développement optimal lorsque l'HR est supérieure à 90-97 %, avec une activité de l'eau critique (aw) pour la germination des conidies située entre 0,90 et 0,92 aw (Fernández-Bravo *et al.*, 2016 ; Jaronski, 2010 ; Vidal et Fargues, 2007).

2.1.3. Soleil – lumière

Exposition aux rayons solaires, notamment aux UV-B, constitue un élément clé dans l'inactivation des propagules fongiques sur les surfaces exposées comme le phylloplan des plantes. Une des premières approches visant à atténuer les effets des UV-B a consisté à intégrer des agents protecteurs contre ces rayonnements dans les formulations de conidies. Toutefois, cette stratégie s'est révélée souvent inefficace (Jaronski, 2010).

Les méthodes de production de masse et de formulation influencent également la résistance aux UV-B des agents de biocontrôle fongiques. Il a été observé que les EPF présentaient une tolérance accrue au stress lorsqu'ils étaient cultivés sous lumière blanche, comparativement à une production dans l'obscurité (Dias *et al.*, 2021). Des études menées sur *Metarhizium robertsii* ont révélé que la lumière (bleue, verte, rouge et blanche) affectait à la fois la tolérance au stress des conidies et l'expression des gènes (Dias *et al.*, 2020). De plus, des conditions de culture spécifiques, comme une croissance en obscurité combinée à un stress nutritionnel, entraînent la production de conidies plus résistantes que celles obtenues sous lumière blanche (Dias *et al.*, 2021).

2.2. Propriétés spécifiques des souches de champignons utilisées

Étant donné que les agents de biocontrol fongiques proviennent de sources biologiques, leur durée de conservation est toujours limitée. Les spores fongiques si elles sont mal conservées peuvent perdre leur capacité à infecter et à contrôler les ravageurs. Difficultés de leur distribution. Également ils sont plus complexes et coûteux que les pesticides chimiques.

Les agents fongiques nécessitent des milieux de croissance, des conditions et un temps de développement spécifiques, ce qui augmente les coûts. Il reste difficile d'augmenter la production pour répondre aux besoins de. Deux aspects cruciales sont nécessaires pour garantir une large utilisation : réduire les coûts de production, améliorer l'efficacité de la production à grande échelle d'agents fongiques.

Les agents de biocontrol, avant d'être approuvés, doivent faire l'objet d'évaluations réglementaires rigoureuses. Garantir l'impact environnemental, la sécurité et l'efficacité des produits de biocontrol, impose l'adoption de processus d'évaluation qui sont hélas coûteux et long (Shabrin *et al.*, 2025).

ETUDE

EXPERIMENTALE

Le présent travail a été réalisé au niveau du Laboratoire de Mycologie, Biotechnologie et de l'Activité Microbienne (LaMyBAM). Il porte sur l'évaluation du potentiel des champignons entomopathogènes en biocontrôle pour la lutte contre le mildiou de la tomate causé par *Phytophthora infestans*.

1. Isolement et identification du champignon entomopathogène

1.1. Prélèvement des échantillons

Les échantillons de sol ont été collectés à partir de trois sites situés dans deux localités de la wilaya de Constantine. Tous les prélèvements ont été effectués dans des champs agricoles : du maïs et du blé dans la nouvelle ville de Constantine, et de l'orge à Aïn El Bey (El Aïfour).

Le prélèvement des 4 échantillons a été réalisé selon les techniques décrites par Pochon et Tardieu (1962), en choisissant les parcelles de manière aléatoire à l'intérieur de chaque champ. Le sol a été recueilli à une profondeur variant entre 5 et 10 cm, tout en évitant les zones compactées ou récemment traitées chimiquement. Chaque prélèvement a été effectué à l'aide d'une spatule stérile, puis transféré soigneusement dans des flacons stériles. Durant cette opération, les résidus de végétaux, cailloux et autres impuretés visibles ont été éliminés afin d'obtenir un échantillon propre et représentatif. Les échantillons ainsi collectés ont été immédiatement acheminés au Laboratoire de mycologie, biotechnologie et de l'activité microbienne pour être traités en vue de l'isolement des champignons entomopathogènes. Ce traitement visait à préparer le sol pour la mise en évidence d'espèces fongiques pathogènes pour les insectes, à travers des techniques d'appâtage spécifiques.

1.2. Milieux d'isolement

Pour isoler les champignons entomopathogènes *Metarhizium anisopliae* et *Beauveria bassiana*, deux milieux de culture synthétiques ont été employés (Annexe) :

- SDAY (Sabouraud Dextrose Agar enrichi en levure)
- PDAY (Potato Dextrose Agar enrichi en levure).

Afin de limiter la contamination bactérienne, de l'amoxicilline a été ajoutée aux milieux à une concentration de 50 µg/l, conformément à la méthode décrite par Botton *et al.* (1999) (cité par Benserradj, 2014). Par ailleurs, un antifongique “le dodine” a été ajouté à une concentration

de 50 µg/ml au milieu de culture afin d'inhiber la croissance des champignons saprophytes non désirés et de favoriser uniquement l'isolement des champignons entomopathogènes (Shin *et al.*, 2010).

1.3. Méthode d'isolement

La préparation des suspensions de sol a été réalisée en diluant 1g de chaque échantillon dans 9 ml d'eau distillée stérile, conformément aux méthodes décrites par Clark *et al.* (1985) et Ulacio *et al.* (1997) (citées par Benserradj, 2014). Des dilutions décimales successives ont ensuite été effectuées pour chacun des trois types d'échantillons. Afin d'assurer une homogénéisation optimale, chaque solution a été soumise à une agitation vigoureuse à l'aide d'un vortex. Un code spécifique a été attribué à chaque suspension, indiquant à la fois la provenance de l'échantillon et le niveau de dilution correspondant.

Par la suite, les milieux de culture ont été ensemencés en étalant 1 ml de chaque dilution sur des boîtes de Pétri, selon le protocole décrit par Ikasari et Mitchell (1994). L'incubation s'est déroulée dans l'obscurité à une température constante de 28°C, et les cultures ont été observées chaque jour pendant une durée de trois semaines afin de suivre l'apparition des colonies fongiques.

1.4. Purification des souches

Les colonies fongiques isolées ont été purifiées par repiquages successifs sur gélose PDA, un milieu nutritif reconnu pour favoriser une croissance rapide et abondante des champignons, ainsi que pour stimuler la sporulation. Chaque colonie isolée a été transférée individuellement sur une nouvelle boîte de Pétri contenant ce milieu. La pureté des cultures a été confirmée par observation microscopique. L'incubation a été effectuée à 25°C pendant une durée de 4 à 6 jours, conformément aux recommandations de Botton *et al.* (1990).

1.5. Méthode d'identification

L'identification des champignons repose principalement sur l'analyse de leurs caractéristiques de croissance en culture (identification macroscopique) ainsi que sur l'observation de leur morphologie au microscope (identification microscopique).

1.5.1. Identification macroscopique

L'identification macroscopique des champignons a été réalisée par l'observation directe des colonies cultivées sur milieu solide, à l'œil nu et à l'aide d'une loupe binoculaire. Les critères évalués comprenaient :

- la couleur de la face supérieure et du revers des colonies ;
- la texture de la surface (duveteuse, cotonneuse, veloutée, poudreuse, granuleuse ou glabre)
- le relief de la colonie (plat, plissé, cratéiforme)
- l'aspect des bordures (régulières ou irrégulières)
- la présence éventuelle de gouttelettes sur le mycélium
- la production de pigments diffusibles dans le milieu
- la vitesse de croissance, estimée par la mesure du diamètre des colonies.

Ces caractéristiques sont essentielles pour différencier les genres fongiques et ont été décrites dans les travaux de Moutassem (2019) et Dufresne et St-Germain (2014).

1.5.2. Identification microscopique

L'identification microscopique a été effectuée en préparant des lames à partir de fragments de colonies prélevés à l'aide d'une anse stérile. Ces fragments ont été montés dans une solution de bleu de coton lactique, puis recouverts d'une lamelle. Les observations ont été réalisées au microscope optique à un grossissement de (40 X G).

Les critères morphologiques examinés comprenaient :

- la structure des hyphes (septés ou non)
- la présence et la morphologie des conidiophores (simples, ramifiés)
- la nature des cellules conidiogènes (phialides, annélides)
- la forme, la taille et la disposition des conidies (uni- ou pluricellulaires, isolées, en chaînes ou en amas)
- la présence éventuelle d'organes de fructification tels que périthèces, cléistothèces ou pycnides

Cette approche s'appuie sur les méthodes décrites par Breton (1990) et Roquebert (1998), ainsi que sur les protocoles détaillés dans les travaux de Dufresne et St-Germain (2014).

2. Culture de *Phytophthora infestans*

2.1. Obtention de la souche

Des échantillons de tomates fruits (Figure 10) et feuilles (Figure 11), présentant des symptômes visibles de la maladie, ont été collectés. Afin de maximiser nos chances d'isoler l'espèce ciblée, *Phytophthora infestans*, nous avons également collecté des échantillons de pommes de terre et de pois infectés. Ces deux cultures étant également reconnues comme hôtes de ce pathogène.



Figure 10 : Photos illustrant les fruits de tomates infectées concernées par l'étude



Figure 11 : Photos illustrant des feuilles de tomates infectées investiguées.

2.2. Isolement et purification

Pour isoler *Phytophthora infestans*, nous avons utilisé deux milieux de culture : le milieu à base de petits pois (PP) et le Potato Dextrose Agar (PDA) (Annexe). Ces milieux ont été choisis en raison de leur efficacité démontrée pour la croissance et la conservation de ce pathogène, comme le rapportent Alaoui *et al.* (2022). Afin de prévenir la contamination bactérienne et de favoriser l'isolement sélectif de *P. infestans*, nous avons enrichi les milieux avec de l'amoxicilline à une concentration de 50 mg/L. L'utilisation d'antibiotiques tels que l'amoxicilline dans les milieux de culture pour l'isolement de *P. infestans* est également documentée dans la littérature scientifique, notamment dans l'étude de Parlindo *et al.* (2023).

Les échantillons infectés ont été prélevés sur des tissus de tomates, de pommes de terre et de pois présentant des symptômes caractéristiques du mildiou. Les fragments de tissus ont été déposés sur les milieux préparés et incubés à 20°C à l'obscurité pendant 7 à 10 jours. La croissance mycélienne est surveillée quotidiennement. Les colonies présentant des caractéristiques morphologiques typiques de *P. infestans* ont été sélectionnées pour des repiquages successifs sur milieu PDA afin d'obtenir des cultures pures.

2.3. Identification

L'identification morphologique de *Phytophthora infestans* a été réalisée selon la même méthodologie appliquée aux champignons entomopathogènes, mais en se basant sur des critères spécifiques à l'agent pathogène.

2.3.1. Identification macroscopique

L'identification macroscopique de la souche a été réalisée par l'observation directe des colonies cultivées, à l'œil nu et à l'aide d'une loupe binoculaire. Les critères retenus comprenaient :

- Colonies de couleur blanche à grisâtre
- Texture cotonneuse ou duveteuse, dense
- Croissance généralement rapide sur milieu PDA
- Revers de la boîte de Pétri souvent incolore à légèrement foncé.

2.3.2. Identification microscopique

L'identification microscopique a été réalisée selon la même méthode décrite précédemment. Les critères retenus étaient:

- Hyphes non cloisonnés (coenocytiques), typiques des Oomycètes.
- Sporangiophores ramifiés de manière dichotomique.
- Sporanges citroides (en forme de citron), avec une papille apicale.
- Production de zoospores biflagellées (deux flagelles de types différents).

3. Interaction entre les champignons entomopathogènes et *P. infestans*

Dans le cadre de la lutte biologique, l'interaction entre différents agents pathogènes peut influencer l'efficacité des stratégies de contrôle. Pour ce faire, nous avons essayé d'explorer les éventuelles relations entre les champignons entomopathogènes et *Phytophthora infestans*, agent responsable du mildiou de la tomate, afin d'évaluer leur potentiel d'interaction positive ou négative.

3.1. Production des métabolites secondaires par fermentation en milieu liquide

La production des métabolites secondaires de nos souches entomopathogènes a été réalisée en utilisant le milieu liquide PDB (Potato Dextrose Broth) (Annexe), connu pour sa capacité à soutenir la croissance fongique et la synthèse de composés bioactifs. Des volumes de 90 mL de ce milieu ont été distribués dans des flacons Erlenmeyer stériles de 250 mL, puis inoculés par 10 disques gélosés prélevés de cultures sur gélose PDA à l'aide d'un outil stérile. Les cultures ont été incubées sans agitation à une température constante de 28 °C pendant 14 jours, ce qui correspond à la durée optimale rapportée pour l'accumulation des métabolites secondaires chez ces espèces fongiques (Benserradj, 2014). Chaque traitement a été effectué en triplicat pour assurer la reproductibilité.

À l'issue de la fermentation, le contenu des flacons a été filtré à travers du papier filtre Whatman N°1, puis. L'extraction des métabolites a été réalisée à l'aide du chloroforme comme solvant organique, en mélangeant le surnageant avec un volume équivalent de solvant. La phase organique a ensuite été concentrée par évaporation sous vide à 40°C à l'aide d'un rotavapor (ROTAVAP), permettant de récupérer les extraits secs sous forme de résidu. Ce dernier a été dissous dans du méthanol pur afin d'obtenir des solutions homogènes contenant les métabolites d'intérêt (Benserradj, 2014).

3.2. Test d'antagonisme *in vitro*

3.2.1. Méthode de confrontation directe

L'activité antifongique des champignons entomopathogènes isolés, *Métarhizium sp.* et *Beauveria sp.*, contre la souche phytopathogène *Phytophthora sp.* a été déterminée par la technique de double culture, appelée aussi la technique de confrontation directe. Un agent antagoniste et un agent pathogène sont inoculés dans la même boîte de Pétri à la même distance du centre de la boîte. Des cylindres d'agar de 5 mm de diamètre ont été prélevés des

cultures âgées de 7 jours et déposés sur la boîte de Pétri. De l'autre côté, un cylindre d'agar de 5mm de diamètre de l'agent phytopathogène âgé de 7 jours a été déposé du côté opposé du premier cylindre à une distance de 30 mm. Les boîtes sont ensuite mises à incuber à 30°C pendant 7 jours. Par ailleurs, des boîtes inoculées uniquement avec l'agent pathogène ont été utilisées comme témoins. Chaque test biologique en double culture agent antagoniste/pathogène a été mis en place en triple exemplaire (Pellan *et al.*, 2020 ; Gao *et al.*, 2020) (Figure 12). D'autre part, le taux d'inhibition radiale (pourcentage), a été mesuré.

Le pourcentage d'inhibition de la croissance radiale (PIRG) a été calculé après sept jours de croissance en utilisant la formule de **Skidmore et Dickinson (1976)** :

$$PIRG = (R_1 - R_2) / R_1 \times 100.$$

- R1 : diamètre de phytopathogène en absence de l'antagoniste.
- R2 : diamètre de phytopathogène en présence de l'antagoniste.

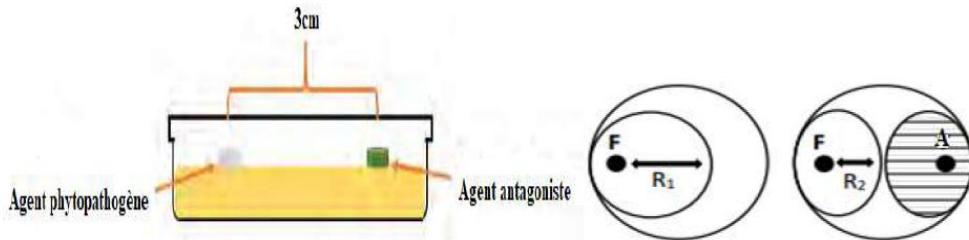


Figure 12. Schéma représentant la technique de la confrontation directe (Rahman *et al.*, 2009).

Les pourcentages d'inhibition de la croissance radiale étaient classés de faible à très élevée activité antifongique selon les limites suivantes : 30% : faible activité antifongique ; 30 – 50% : activité antifongique modérée ; 50 – 70% : activité antifongique élevée ; ≥70% : activité antifongique très élevée.

3.2.2. Méthodes de confrontation indirecte

3.2.2.1. Effet des composés volatils

Afin d'évaluer l'effet des composés volatils émis par *B. bassiana* et *M. anisopliae* sur *Phytophthora infestans*, une confrontation indirecte sans contact physique a été réalisée en double boîte de Petri. Un disque de 5 mm de *P. infestans* en croissance active a été placé au centre d'une boîte contenant de la gélose PDA. Dans une seconde boîte, un disque de même taille de l'antagoniste fongique a été déposé également au centre sur le même milieu. Les deux moitiés ont ensuite été placées l'une au-dessus de l'autre, faces opposées, de manière à former

une chambre scellée à l'aide de parafilm. Les systèmes ont été incubés à 25°C pendant 7 jours. La croissance radiale du pathogène a été mesurée quotidiennement, et les résultats ont été comparés à ceux des témoins (plaques inoculées uniquement avec *P. infestans*). Le pourcentage d'inhibition a été calculé selon la formule (Suprapta, 2012) :

$$\text{% Inhibition} = [(R \text{ témoin} - R \text{ traité}) / R \text{ témoin}] \times 100$$

3.2.2.2. Effet des composés non volatils

Les composés non volatils ont été étudiés à partir des filtrats de cultures liquides de *B. bassiana* et *M. anisopliae*. Chaque souche a été cultivée pendant 14 jours dans du bouillon PDB (Potato Dextrose Broth). Le liquide de culture a ensuite été filtré à travers du papier filtre Whatman N°1 et stérilisé par filtration sur membrane millipore de 0,22 mm et conservé à 4°C pour une utilisation ultérieure (Li *et al.*, 2015). Les filtrats de culture des antagonistes ont été dilués et mélangés aux milieux gélosés PDA de manière à avoir un traitement de différentes concentrations (10%, 20 % et 40%). Les milieux additionnés de filtrat sont ensuite versés dans des boîtes de Pétri. Après solidification, les boîtes ont été soigneusement inoculées avec des disques de 5 mm de l'agent pathogène *Phytophthora sp.*, prélevé à partir d'une culture de quatre jours (Rahman *et al.*, 2020; Tlemsani *et al.*, 2020). Ces dernières ont ensuite été incubées à 30°C. Trois répétitions ont été maintenues pour chaque traitement. Des observations périodiques sur la croissance radiale du mycélium ont été enregistrées après 4 à 5 jours d'inoculation. Le pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne du pathogène testé a été calculé par la formule suivante :

$$I = (C-T) / C \times 100$$

Où **I** est le pourcentage d'inhibition de la croissance du pathogène *Phytophthora*, **C** est la croissance radiale du pathogène (mm) pour le contrôle, **T** est la croissance radiale de l'agent pathogène (mm) dans le traitement (Rahman *et al.*, 2020 ; Tlemsani *et al.*, 2020).

3.3. Bio-test sur plantules de tomate

Les bio-tests sur plantules de tomate visent à évaluer le potentiel de certains champignons entomopathogènes comme agents de biocontrôle, en observant leur capacité à induire une résistance ou à limiter le développement de *P. infestans* chez la plante hôte.

3.3.1. Application des spores des champignons antagonistes

Avant de procéder aux tests proprement dits, des suspensions sporales doivent être préparées aussi bien pour l'agent causal que pour les champignons antagonistes.

3.3.1.1. Préparation des suspensions sporales

- *Préparation des suspensions sporales antagonistes*

Pour réaliser les suspensions sporales, les isolats *Beauveria bassiana* (B1 et B5) et *Metarhizium anisopliae* (M1) ont été cultivés pendant 9 jours sur gélose PDA à 25°C. Les spores ont ensuite été récoltées par rinçage des boîtes de Pétri à l'eau distillée stérile, suivi d'un léger grattage à l'aide d'une tige de verre. La suspension obtenue a été filtrée à travers un tissu de coton stérile puis un papier filtre afin d'éliminer les fragments mycéliens. Conformément au protocole décrit par Ephrem *et al.* (2011) et Ajith et Lakshmidevi (2010), la concentration sporale recommandée est de à 3×10^8 conidies/mL. Toutefois, dans notre cas, cette concentration a été volontairement réduite à 3×10^7 conidies/mL, pour des raisons d'optimisation expérimentale et de faisabilité. Cette modification a été effectuée tout en respectant les conditions de préparation et de manipulation aseptique afin de garantir la fiabilité des suspensions utilisées pour les traitements.

- *Préparation de la suspension sporale du pathogène*

Des suspensions sporales de *Phytophthora infestans* ont été préparées à partir de cultures âgées de 9 jours sur milieu PDA, incubées à 20°C. Le rinçage des boîtes de Pétri avec de l'eau distillée stérile, suivi d'un grattage doux du mycélium, a permis de récupérer les sporanges. Après filtration à travers plusieurs couches de coton stérile, une suspension limpide a été obtenue. La concentration finale des sporanges a été ajustée à 1×10^3 sporanges/mL, conformément au protocole d'Ephrem *et al.* (2011), et a servi comme inoculum pour les tests d'infection des plantules de tomate.

3.3.1.2. Application

Avant l'application des suspensions sporales, toutes les plantules de tomate ont été soigneusement rincées à l'eau distillée stérile pour éliminer toute contamination superficielle. Par la suite, les plants ont été placés dans un environnement favorable, et afin de maintenir une humidité relative élevée, indispensable à la germination des spores et au développement de l'infection, l'ensemble des plantules a été recouvert d'une structure en plastique

transparent simulant un microclimat humide. Cette technique, largement utilisée dans les essais biologiques, permet de garantir des conditions homogènes et favorables à l'expérimentation (Ajith et Lakshmidevi, 2010 ; Ephrem *et al.*, 2011).

Les suspensions sporales des champignons *Beauveria bassiana* (B1, B5) et *Metarhizium anisopliae* (M1), préparées à une concentration de 3×10^7 conidies/mL, ont été appliquées par pulvérisation foliaire sur les plantules de tomate âgées de 25 jours (Figure 13). Trois jours après ce premier traitement, les plantules ont été inoculées par une suspension de *Phytophthora infestans* ajustée à 1×10^3 sporanges/mL. Chaque plant traité a été soigneusement recouvert d'un sac en polyéthylène transparent pendant trois jours consécutifs afin de maintenir une humidité élevée favorable à l'établissement des micro-organismes.

Cette approche nous a permis d'évaluer l'effet préventif et curatif des champignons entomopathogènes appliqués avant ou après l'infection par *P. infestans*, selon le protocole adapté de Ajith et Lakshmidevi (2010) et Ephrem *et al.* (2011).



Figure 13: Application des suspensions sporales sur les plats de tomates (LaMyBAM).

3.3.2. Application des produits de fermentation des champignons antagonistes

L'application des produits issus de la fermentation de *Beauveria bassiana* et *Metarhizium anisopliae* représente une stratégie prometteuse dans la lutte biologique contre *Phytophthora infestans*. Après la fermentation en milieu liquide (PDB), les filtrats contenant

les métabolites secondaires ont été appliqués directement sur des milieux de culture inoculés par le pathogène ou pulvérisés sur des plantules de tomate pour évaluer leur activité antifongique. Ces produits peuvent inhiber la croissance mycélienne de *P. infestans* par l'action de composés toxiques naturels produits par les champignons entomopathogènes, tels que la bassianolide ou la beauvéricine, connus pour leurs propriétés antimicrobiennes (Benserradj, 2014 ; Ephrem *et al.*, 2011).

3.4. Évaluation des symptômes

Le suivi des symptômes a été réalisé pendant un mois. Chaque semaine, une feuille malade par plant a été sélectionnée pour évaluer le pourcentage de surface nécrosée à l'aide de la méthode du papier millimétré (Pandey et Hema, 2011). Les symptômes du mildiou ont été notés sur une échelle de 0 à 9, selon la méthode proposée par Honeburg et Becker (2011). Cette approche a permis d'estimer l'impact des traitements biologiques sur la sévérité de la maladie.

RESULTS

&

DISCUSSION

Le but de cette étude était d'évaluer le potentiel des champignons entomopathogènes en biocontrôle pour la lutte contre une maladie qui détruit les cultures des tomates et ce, en agissant sur l'agent causal qui est *Phytophthora infestans*.

1. Isolement et identification des champignons entomopathogènes

1.1. Isolement

Dans notre tentative d'isoler des champignons entomopathogènes et après plusieurs isolements, deux isolats correspondant aux espèces bien connues *Beauveria bassiana* et *Metarhizium anisopliae* ont été retenus. Par ailleurs, il est à noter qu'un certain nombre d'autres isolats fongiques ont été obtenus à partir de différents échantillons analysés (Tableau 3). L'aspect macroscopique corresponde à aux espèces *Fusarium graminearum*, *Aspergillus niger*, spp....etc) (Figure 14).

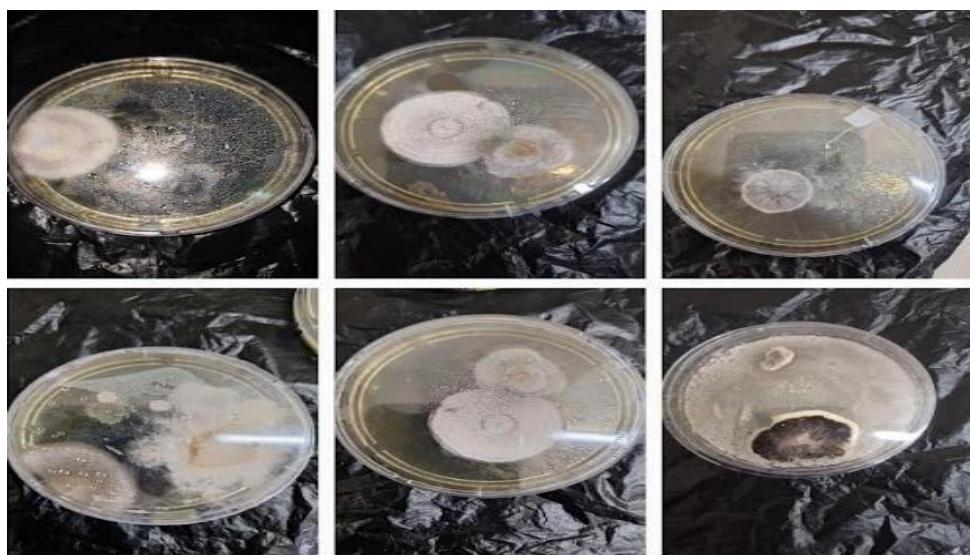


Figure 14 : Aspect macroscopique des différents isolats fongiques obtenus sur milieux PDA et Sabouraud.

1.2. Identification des isolats de *Beauveria bassiana* et *Metarhizium anisopliae*

Sur le plan morphologique, les deux espèces retenues présentaient des caractéristiques distinctes permettant leur identification. L'identification est fondée sur l'observation à la fois macroscopique et microscopique (Botton *et al.*, 1990). Macroscopiquement, *Beauveria bassiana* forme des colonies blanches, poudreuses, devenant crème à mesure de leur

développement (Figure 15). Selon Zimmermann (2007), sur la plan microscopique, cette espèce est caractérisée par des conidiophores courts et des phialides produisant des conidies globuleuses disposées en chaînes radiales..

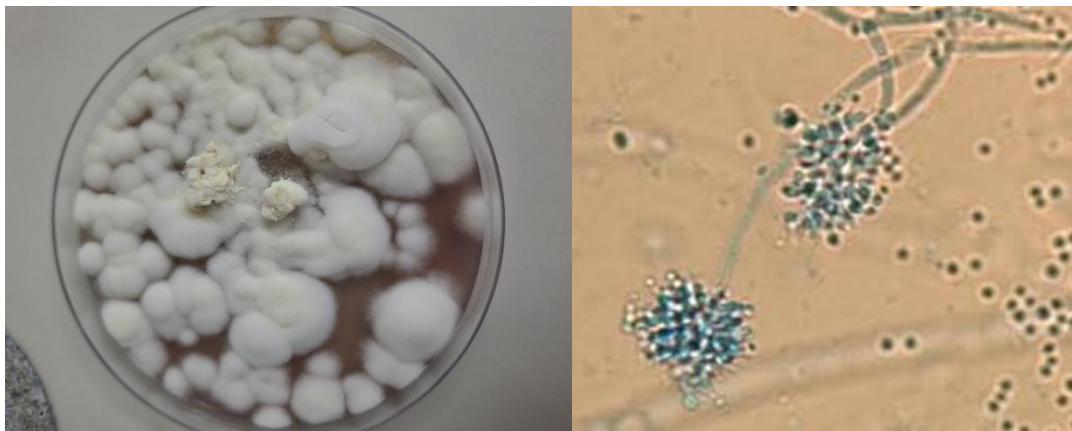


Figure 15: Aspect morphologique et microscopique de *B. bassiana* (LaMyBAM).

D'après les travaux de Halouane en 1997 (Halouane, 2008), cette espèce génère des conidies courbées, de couleur blanche à jaunâtre. Les conidies ou spores sont portées par de longs filaments en zigzag, constitués d'hyphes transparents et septés, avec un diamètre variant de 2,5 à 25 µm. Par ailleurs, les résultats de notre étude concordent avec ceux obtenus par Benzina *et al.* (2018).

En revanche, *Metarhizium anisopliae* produit des colonies vert foncé à texture veloutée. Ses conidies, en forme de fuseau à extrémités arrondies, sont organisées en chaînes portées par des phialides étagées (Zimmermann, 2007). Ces critères, tant macroscopiques que microscopiques, ont permis de confirmer l'identité des deux souches isolées (Figure 16).

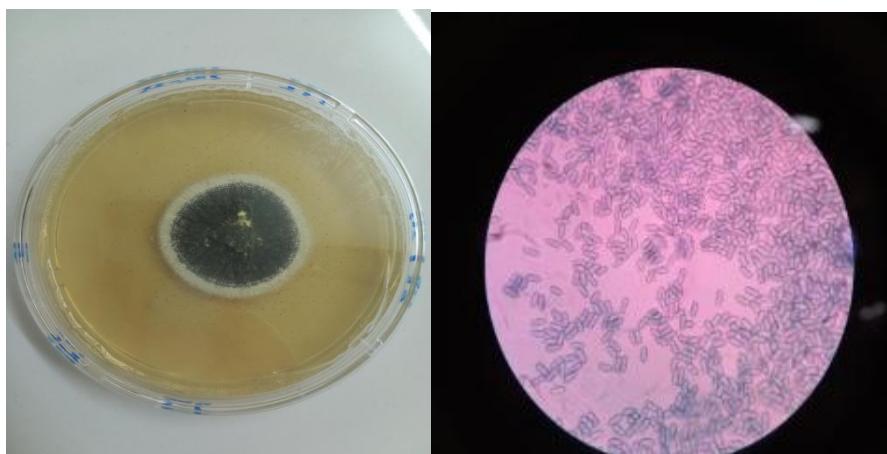


Figure 16: Aspect morphologique et microscopique de *M. anisopliae* (LaMyBAM).

1.3. Purification

Après identification préliminaire des isolats correspondant morphologiquement à *Beauveria bassiana* *Metarhizium anisopliae*, une purification a été entreprise afin d'obtenir des souches pures et exemptes de contaminations. Cette opération a été réalisée par repiquages successifs sur milieu PDA, en transférant des fragments de mycélium provenant des zones périphériques des colonies vers de nouvelles boîtes stériles. Les cultures ont ensuite été incubées à une température de 25–28 °C pendant 5 à 7 jours, conformément à la méthode décrite par Goettel *et al.* (2001). L'objectif de cette étape était d'isoler des colonies homogènes, stables et bien développées, en vue de leur utilisation dans les tests antifongiques ultérieurs.

À l'issue du processus de purification, nous avons obtenu des souches pures de *Metarhizium anisopliae* et *Beauveria bassiana* (Figure 17).



Figure 17 : Souches purifiées de *Beauveria bassiana* (A) et *Metarhizium anisopliae* (B) (LaMyBAM).

Il est important de noter que plusieurs isolats appartenant à ces deux espèces ont été récupérés à partir d'échantillons différents et dans des conditions de culture variées (Tableau 5).

Tableau 5 : Caractéristiques des souches isolées de *Beauveria bassiana* et *Metarhizium anisopliae* selon les conditions de prélèvement et d'isolement.

Type de sol	Site de prélèvement	Wilaya de prélèvement	Date de l'isolement	Milieu de culture	Concentration de la Dodine	Ajout de l'ATB	Dilution	Référence de la souche
Blé	NV	25	26/02/25	PDA	0.01g/L	+	SM	B1
Blé	NV	25	26/02/25	PDA	0.01g/L	+	SM	M1
Blé	NV	25	26/02/25	PDA	0.01g/l	+	SM	B2
Orge	Laifour NV	25	26/02/25	SAB	0.01g/l	+	10-1	B3
Orge	Laifour NV	25	26/02/25	SAB	0.01g/l	+	10-1	M2
Orge	Laifour NV	25	26/02/25	PDA	0.01g/l	+	10-1	B4
Orge	Laifour NV	25	26/02/25	PDA	0.01g/l	+	10-1	B5
Orge	Laifour NV	25	26/02/25	PDA	0.01g/l	+	SM	B6

2. Culture de *Phytophthora infestans*

2.1. Isolement

Lors de l'isolement de *Phytophthora infestans*, nous avons réalisé une série de d'isolements sur quatre échantillons différents provenant de plantes susceptibles d'être infectées par le mildiou, notamment les petits pois, les pommes de terre et les feuilles de tomates. Malheureusement, toutes nos tentatives ont été infructueuses à chaque fois, nous n'avons pas réussi à isoler *Phytophthora infestans* par cette méthode. En revanche, plusieurs champignons contaminants indésirables tels que *Fusarium*, *Alternaria* et d'autres ont prolifié dans nos milieux de culture (Figure 18).

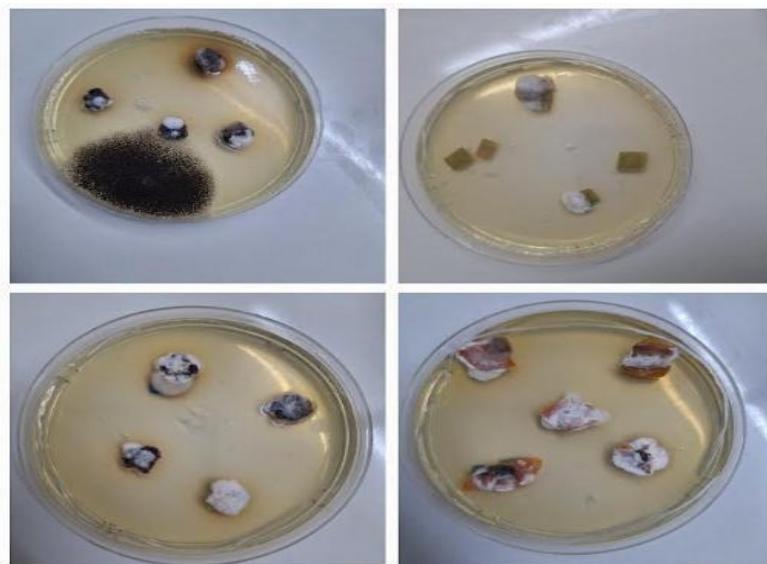


Figure 18 : Exemples de colonies fongiques indésirables sur boîtes de Pétri pendant l'isolement de *Phytophthora infestans* (LaMyBAM).

Par la suite, nous avons incubé en laboratoire des feuilles de tomates manifestant les symptômes du mildiou, ce qui a permis une forte progression de la maladie (Figure 19). Pour confirmer la présence de *Phytophthora infestans*, nous avons procédé à une observation microscopique directe sur les feuilles malades, sans passer par un isolement en milieu de culture.

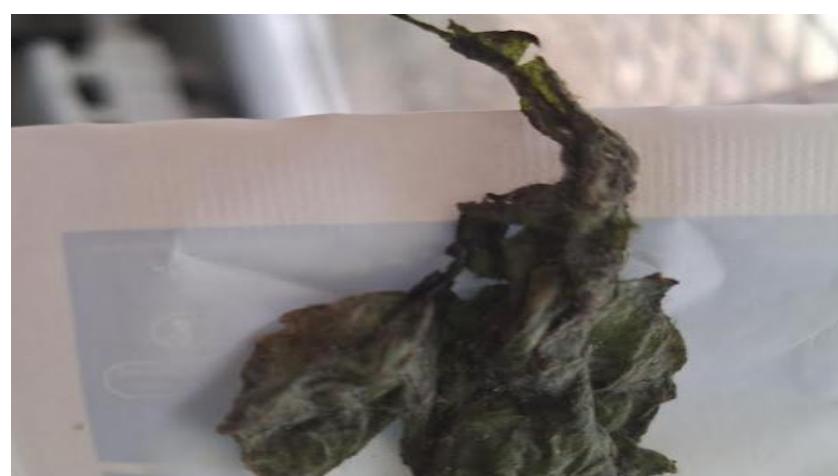


Figure 19 : Feuille de tomate manifestant des symptômes de la maladie

Cette observation a été réalisée en utilisant un ruban adhésif appliqué sur la surface des feuilles infectées, puis en déposant ce ruban sur une lame de microscope colorée au bleu de méthylène. L'examen microscopique a révélé toutes les caractéristiques typiques de *Phytophthora infestans* (Figure 20), confirmant ainsi la présence du pathogène.

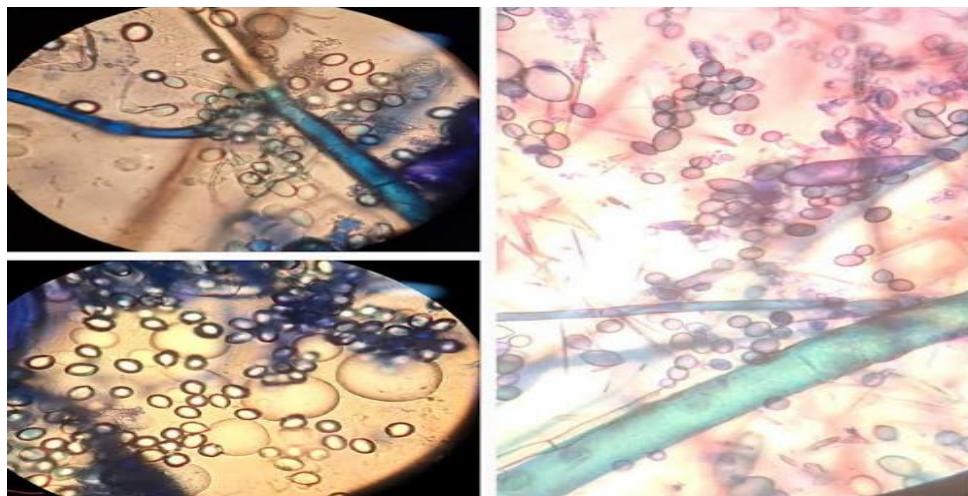


Figure 20 : Visualisation microscopique de *Phytophthora infestans* à partir d'un échantillon de feuilles de tomates (LaMyBAM).

2.3. Purification

Au cours de nos tentatives d'isolement et de purification de *Phytophthora infestans*, nous avons été confrontés à un problème majeur de contaminations, notamment par *Rhizopus* spp. Plusieurs essais successifs de purification (environ quatre tentatives) ont été réalisés, mais sans succès, en raison de la vitesse de croissance des contaminants et du temps prolongé que nécessitait chaque cycle, ce qui a duré presque un mois. Face à ces contraintes, nous avons finalement opté pour l'utilisation d'une souche pure de *P. infestans* qui nous a été fournie gracieusement par un membre de l'équipe du laboratoire. Cette souche a été réactivée sur milieu PDA, puis purifiée et confirmée à la fois macroscopiquement et microscopiquement (Figure 21) avant d'être utilisée dans nos expérimentations

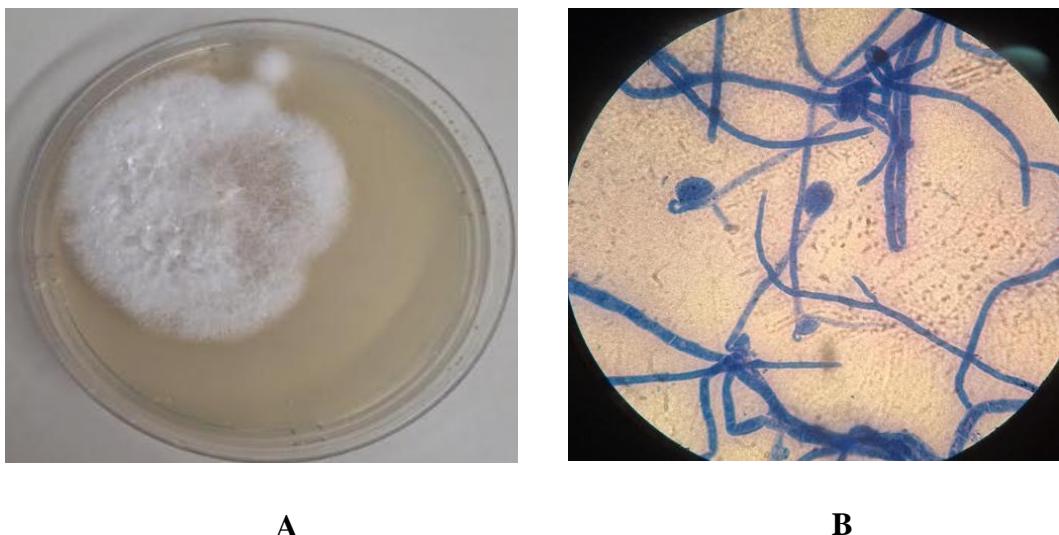


Figure 21 : Aspects macroscopique (A) et microscopique (B) de *Phytophthora infestans* utilisés dans notre étude (LaMyBAM).

En effet, l'aspect macroscopique nuageux et cotonneux du mycélium ainsi que la couleur blanche du champignon ont également été mis en évidence sur milieu PDA, par d'autres auteurs notamment Alaoui *et al.*, (2022).

3. Interaction entre les champignons entomopathogènes et *P. infestans*

Ce deuxième volet expérimental vise à étudier les effets de nos deux souches entomopathogènes sur *P. infestans* à travers différents tests *in vitro* et *in vivo*, incluant des bio-essais sur plantules de tomate, des confrontations fongiques sur milieu solide, ainsi que l'évaluation de leurs métabolites secondaires. L'objectif est d'essayer de comprendre les mécanismes d'interaction et d'évaluer leur efficacité dans un contexte de gestion intégrée de la maladie.

3.1. Production des métabolites secondaires par fermentation en milieu liquide

La fermentation en milieu liquide (PDB) a permis une bonne croissance des champignons entomopathogènes *Beauveria bassiana* et *Metarhizium anisopliae*. Après une période d'incubation de 14 jours à 28 °C, une production visible de biomasse mycélienne a été observée dans les Erlenmeyers. L'aspect trouble et l'apparition de masses mycéliennes compactes au fond du flacon indiquent une activité fongique active, confirmant ainsi que le PDB est un milieu favorable à la synthèse de métabolites secondaires. Ce résultat est en accord avec les travaux de Benserradj (2014), qui a souligné l'efficacité du milieu PDB pour la production de composés bioactifs par ces deux espèces. L'absence d'agitation, bien qu'elle puisse réduire légèrement l'aération, n'a pas empêché la croissance et suggère que la production de métabolites peut être maintenue même dans des conditions statiques, ce qui pourrait représenter un avantage pratique dans certaines applications.

3.2. Test d'antagonisme *in vitro*

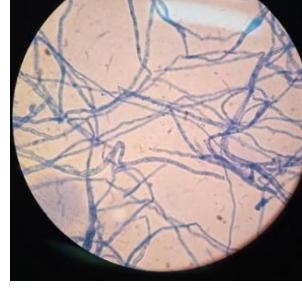
Afin d'évaluer le potentiel antagoniste des isolats fongiques sélectionnés contre *Phytophthora infestans*, des tests *in vitro* ont été réalisés. Ces tests permettent d'observer directement l'interaction entre les agents fongiques et le pathogène cible dans des conditions contrôlées. Parmi les différentes approches utilisées, la méthode de confrontation directe a été privilégiée pour sa simplicité et son efficacité à révéler un éventuel effet inhibiteur.

3.2.1. Méthode de confrontation directe

Les résultats obtenus suite à la confrontation directe entre *Phytophthora infestans* et les champignons entomopathogènes, *Beauveria bassiana* et *Metarhizium anisopliae*, ont permis d'évaluer visuellement et quantitativement l'effet antagoniste exercé par ces souches.

Le tableau ci-dessous présente les observations macroscopiques sur milieu PDA, les images microscopiques des zones d'inhibition, ainsi que les taux d'inhibition mesurés.

Tableau 6 : Résultats de la confrontation directe entre *Phytophthora infestans* et les champignons entomopathogènes *Beauveria bassiana* et *Metarhizium anisopliae*.

Isolats	Boite de confrontation	Zone d'inhibition (microscopie)	Taux d'inhibition (%)
Témoin PI			—
B1			55%
M1			55%
B5			66%

Les résultats issus du test de confrontation directe *in vitro* révèlent une activité antifongique notable des isolats de *Beauveria bassiana* (B1 et B5) et *Metarhizium anisopliae* (M1) contre *Phytophthora infestans*.

L'isolat B5 de *Beauveria bassiana* a affiché la meilleure inhibition avec un taux de 66 %, ce qui le classe dans la catégorie d'activité antifongique très élevée ($\geq 66\%$). Ce taux élevé pourrait être dû à une forte production de composés antifongiques secondaires ou à une meilleure capacité à coloniser le substrat de culture.

Les isolats B1 de *Beauveria bassiana* et de *Metarhizium anisopliae* (M1) ont chacun montré un taux d'inhibition de 55 %, classé comme activité antifongique élevée (50–70 %). Ce résultat indique que ces deux souches exercent une pression significative sur la croissance de *P. infestans*, mais de manière légèrement moins marquée que B5. Cela peut s'expliquer par des différences dans la composition ou la quantité de métabolites libérés, ou encore dans la vitesse de croissance du mycélium (Wakil *et al.* 2024)

Le fait que deux espèces différentes présentent le même taux d'inhibition (55 %) montre que malgré leurs différences génétiques, ils peuvent déployer des mécanismes d'action comparables, comme l'émission de composés volatils ou l'induction d'un stress compétitif sur *P. infestans*. Cette hypothèse est corroborée par les travaux de Rahman *et al.* (2020) et Tlemsani *et al.* (2020) qui ont mis en évidence l'efficacité de certaines souches de champignons entomopathogènes en tant qu'agents de biocontrôle indirects contre des agents phytopathogènes.

En résumé, ces résultats indiquent que *B. bassiana* (surtout B5) et *M. anisopliae* présentent un potentiel réel dans la lutte biologique contre le mildiou, même si une variabilité d'efficacité entre les isolats est à considérer dans le choix de la souche à utiliser.

3.2.2. Bio-essai de confrontation indirecte

3.2.2.1. Effet des composés volatils

Dans le but de tester l'effet des composés volatils émis par *Beauveria bassiana* et *Metarhizium anisopliae* sur la croissance de *Phytophthora infestans*, une méthode de confrontation sans contact direct a été mise en œuvre. Les résultats ont été documentés par des observations visuelles et microscopiques. Les photos ci-dessous illustrent l'aspect des cultures et les interactions éventuelles entre les champignons testés.

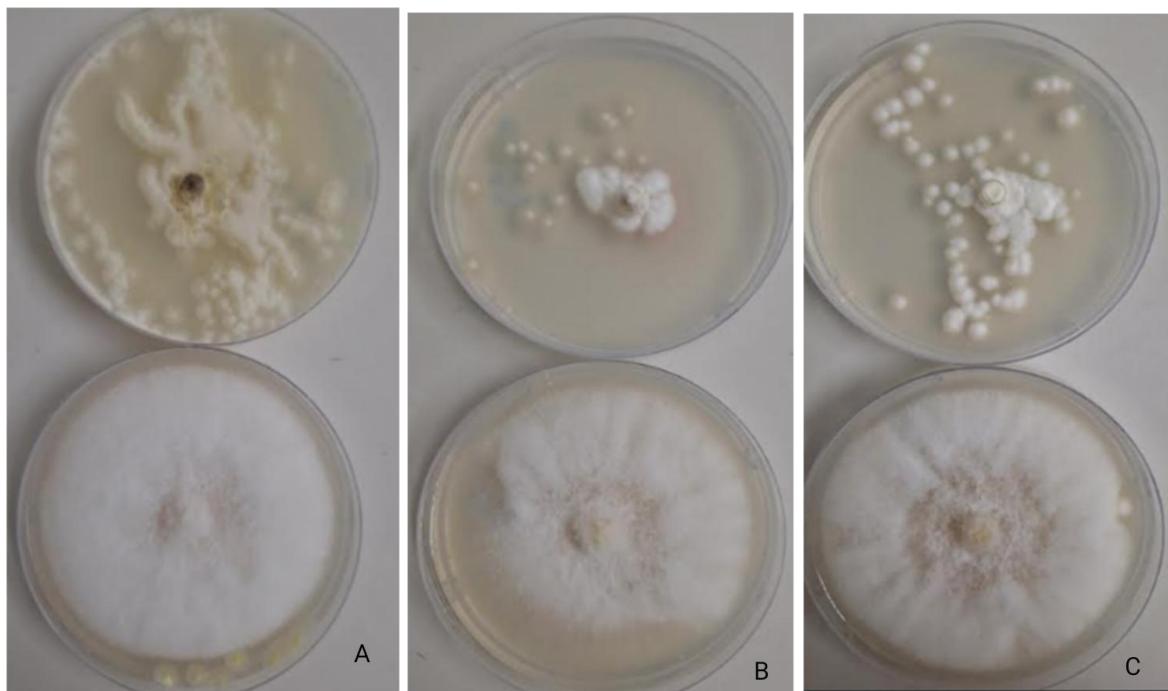


Figure 22. Effet des composés volatils émis par *Metarhizium anisopliae* et *Beauveria bassiana* (isolats B1 et B5) sur la croissance de *Phytophthora infestans* en double boîte de Pétri (**A** : *M. anisopliae* vs *P. infestans* ; **B** : *B. bassiana* (B1) vs *P. infestans* ; **C** : *B. bassiana* (B5) vs *P. infestans*).

Dans notre étude, aucun effet inhibiteur notable des composés volatils émis par *Beauveria bassiana* (B1 et B5) et *Metarhizium anisopliae* sur la croissance de *Phytophthora infestans* n'a été observé. Le pathogène a maintenu une croissance normale dans toutes les boîtes confrontées, suggérant une absence d'activité antifongique via des composés volatils dans les conditions expérimentales utilisées. Des résultats similaires ont été rapportés par Jaber *et al.* (2016), qui ont indiqué que certains isolats de champignons entomopathogènes ne libèrent pas de composés volatils antifongiques actifs ou que leur production dépend fortement du type de milieu de culture, de la température, de l'aération et du temps d'incubation. Par ailleurs, Zhao *et al.* (2021) ont souligné que *B. bassiana* peut exprimer un pouvoir antagoniste via ses métabolites diffusibles, mais que son activité via les COVs (composés organiques volatils) reste limitée, notamment contre les oomycètes comme *P. infestans*.

L'absence d'inhibition peut également s'expliquer par la faible volatilité ou la concentration insuffisante des métabolites volatils dans la configuration expérimentale utilisée. En effet, la double boîte de Pétri ne permet pas toujours une diffusion optimale des COVs, comme noté par Suprapta (2012), rendant difficile leur interaction efficace avec le pathogène cible.

D'autre part, *P. infestans* possède des mécanismes adaptatifs robustes lui permettant de tolérer certains stress chimiques ou métaboliques, comme l'ont démontré Judelson et Blanco (2005), ce qui pourrait réduire l'impact potentiel de certaines substances volatiles d'origine fongique. En somme, bien que les champignons entomopathogènes présentent un fort potentiel de biocontrôle, leur efficacité via les composés volatils reste variable et dépendante probablement de multiples facteurs.

3.2.2.2. Effet des composés non volatils

Afin d'évaluer l'activité antifongique des composés non volatils (principalement les métabolites secondaires diffusibles) produits par *Beauveria bassiana* et *Metarrhizium anisopliae*, des filtrats de culture ont été incorporés dans le milieu PDA à différentes concentrations. L'effet inhibiteur sur la croissance mycélienne de *Phytophthora infestans* a été mesuré afin d'apprécier le potentiel de ces champignons comme agents de biocontrôle par voie indirecte (Tableau 5)

Tableau 7 : Taux d'inhibition (%) de *Phytophthora infestans* par les métabolites non volatils.

Espèce	Volume (ml)	Taux d'inhibition (%)	Illustration (Figure)
Témoin PI	-	-	
<i>Metarhizium</i>	5 ml	38%	
	10 ml	50%	
	20 ml	72%	
<i>Beauveria B1</i>	5 ml	50%	
	10 ml	72%	
	20 ml	80%	
<i>Beauveria B5 J</i>	5 ml	14%	
	10 ml	29%	
	20 ml	42%	
<i>Beauveria B5 R</i>	5 ml	19%	
	10 ml	27%	
	20 ml	44%	

Remarque : Certaines boîtes de Pétri n'ont pas été photographiées, car après le calcul du pourcentage d'inhibition, nous avons constaté ultérieurement une croissance anarchique de spores de *P. infestans* sur l'ensemble de la surface, rendant les images non représentatives du test initial.

Lors de la fermentation des isolats *Beauveria bassiana* B1 et B5 dans un bouillon PDB, une différence de couleur des extraits a été observée pour l'isolat B5 : une fermentation a produit un extrait de couleur rougeâtre (noté B5-R), tandis que l'autre a donné un extrait jaune (noté B5-J) (Figure 23). Cette hétérogénéité de couleurs pourrait être liée à une variabilité physiologique ou métabolique au sein de la même souche.

Afin de mieux comprendre l'effet potentiel de chacun de ces métabolites, les deux extraits ont été testés séparément dans les bioessais antifongiques contre *Phytophthora infestans*, sous les appellations B5-R (extrait rouge) et B5-J (extrait jaune).

La séparation des deux fractions métaboliques de l'isolat *B. bassiana* B5 a permis de mettre en évidence une diversité dans la composition bioactive. En effet, les pigments fongiques sont souvent associés à des métabolites secondaires spécifiques, parfois antifongiques, comme la beauvéricine ou les bassianolides. Selon Vey *et al.* (2001), la production de ces composés peut varier selon les conditions de culture, même au sein d'un même isolat. Ainsi, la décision de tester séparément les deux fractions colorées visait à identifier un éventuel effet différentiel sur *P. infestans*.

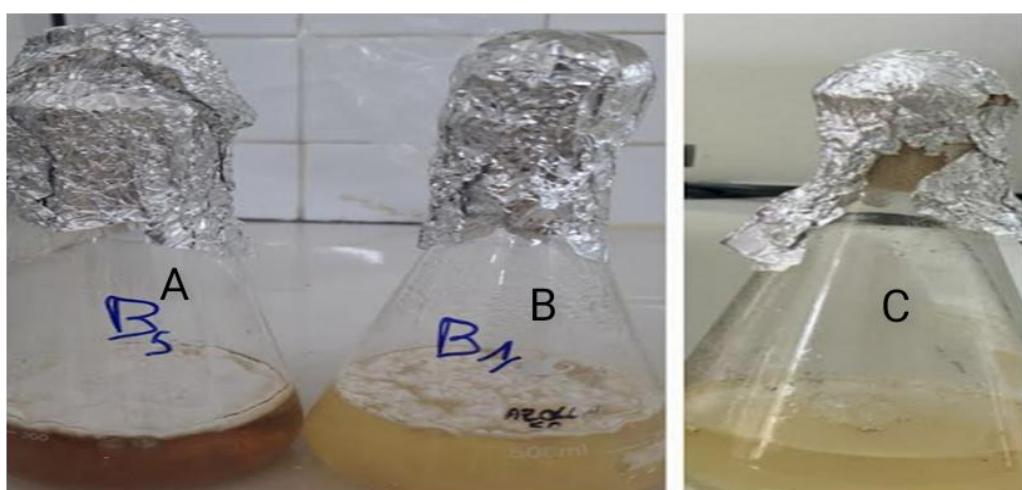


Figure 23 : Différents aspects visuels des extraits métaboliques obtenus après fermentation fongique : A : Beauveria bassiana B5 (extrait rouge), B : Beauveria bassiana B1, C : Metarrhizium anisopliae (extrait clair).

Les résultats obtenus dans ce travail ont montré que les extraits de fermentation des champignons entomopathogènes, notamment *Beauveria bassiana* B1 et *Metarhizium anisopliae*, ont exercé un effet antifongique significatif contre *Phytophthora infestans*, surtout à des concentrations élevées (72 à 80 % d'inhibition pour B1 à 20 mL). En revanche, les extraits issus de *B. bassiana* B5, en particulier la fraction jaune, ont montré une faible activité antifongique (14 à 42 %) (Figure 24), ce qui suggère une variabilité intraclonale probable dans la production de métabolites bioactifs.

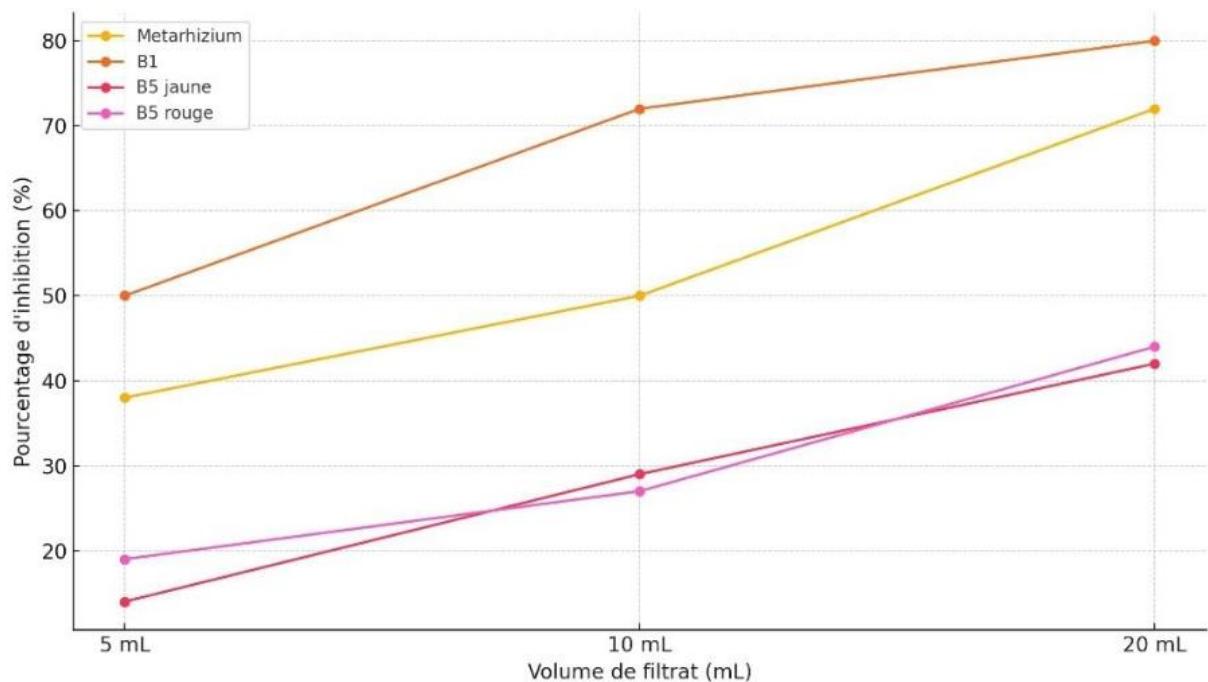


Figure 24 : Graphique représentant les pourcentages d'inhibition de *Phytophthora infestans* selon le volume de filtrat de métabolites secondaires appliqués, pour chaque souche testée (*Metarhizium*, *B1*, *B5 jaune*, *B5 rouge*).

Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par Quesada-Moraga *et al.* (2006), qui ont démontré que les métabolites secondaires produits par *Beauveria bassiana* pouvaient inhiber la croissance de pathogènes phytopathogènes grâce à la production de composés comme la beauvericine, connus pour leur activité antifongique. De même, *Metarhizium anisopliae* est reconnu pour sécréter des métabolites comme la destruxine, qui interfèrent avec la croissance cellulaire de plusieurs champignons phytopathogènes (Ownley *et al.*, 2008).

La performance accrue observée chez *B. bassiana* B1 peut être attribuée à une production plus importante ou plus efficace de composés actifs, ce qui corrobore les observations de Marciulionis *et al.* (2014), qui ont signalé une forte variabilité entre souches en termes de profils métaboliques.

La différence d'intensité colorimétrique entre les extraits de B5 (rouge et jaune) reflète probablement une composition chimique différente. Cette hétérogénéité pourrait expliquer la variabilité d'activité antifongique, comme cela a été également observé par Sabbahi *et al.* (2010), qui ont noté une corrélation entre la couleur des extraits fongiques et leur teneur en métabolites actifs.

Enfin, l'augmentation du pourcentage d'inhibition avec la concentration du filtrat, notamment pour *Metarhizium anisopliae* et *Beauveria bassiana* B1, renforce l'hypothèse d'une activité dose-dépendante des composés non volatils, ce qui est soutenu par les travaux de Rahman *et al.* (2020) et Ajith et Lakshmi Devi (2010), qui ont utilisé la même méthode pour tester des filtrats fongiques sur *Phytophthora* spp. et ont également observé une inhibition croissante avec la concentration.

3.3. Bio-test sur plantules de tomate

Dans cette partie de notre étude, nous avons évalué l'efficacité des champignons entomopathogènes *Beauveria bassiana* et *Metarhizium anisopliae* sur de jeunes plants de tomates. Différentes étapes ont été réalisées pour préparer et appliquer les traitements fongiques, puis observer leur effet sur la pathogénicité de *Phytophthora infestans*.

3.3.1. Résultats de l'évaluation des symptômes

Afin de déterminer l'effet protecteur des traitements biologiques appliqués, une évaluation visuelle des symptômes du mildiou a été réalisée sur les plantules de tomate traitées. L'observation s'est principalement portée sur le développement des lésions nécrotiques sur les feuilles, et la sévérité de la maladie a été comparée entre les différentes modalités : traitements par suspensions sporales et par filtrats issus de la fermentation. Les résultats obtenus sont synthétisés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 8 : Évaluation des symptômes du mildiou selon les traitements biologiques appliqués

TR : traitement		SO : symptômes observés	ILL : illustration
Témoin			
TR	Témoin-	Témoin+	
SO		Forte infection, développement généralisé du mildiou	
III	   		

Application des suspensions sporales			
TR	SP B1	SP B5	SP M1
SO	Faibles lésions, nécroses localisées	Lésions modérées avec début de propagation	Faibles lésions, nécroses localisées
III			
Application des filtrats de fermentation			
TR	F B1	F B5	F M1
SO	Tâches limitées, développement du mildiou fortement	Tâches légères, protection modérée	Lésions visibles, effet partiellement inhibiteur
III			

Remarque : Les symptômes ont été évalués 14 jours après inoculation du pathogène *Phytophthora infestans*. Les figures citées représentent des photographies illustratives des symptômes visibles sur les feuilles de tomate traitées.

Les résultats issus des applications sporales montrent un effet nettement plus marqué sur la réduction des symptômes du mildiou causé par *Phytophthora infestans*. En particulier, les isolats B1 et M1 ont démontré une inhibition significative, avec des feuilles peu nécrosées et une progression de la maladie très limitée.

Les résultats obtenus corroborent ceux de Wakil *et al.* (2024), qui ont observé une colonisation endophyte efficace des isolats de *B. bassiana* et *M. anisopliae* appliqués sur des plantules de tomate, entraînant une amélioration de la résistance systémique induite (ISR). De même, Greenfield *et al.* (2016) ont démontré que l'inoculation foliaire avec ces champignons permettait de renforcer les défenses des plantes contre divers pathogènes.

Par ailleurs, la concentration ajustée à 3×10^7 spores/mL (au lieu de 10^8 comme dans certains protocoles classiques) a tout de même suffi pour induire une réponse protectrice efficace, ce qui suggère une bonne viabilité et activité des spores utilisées.

Contrairement aux suspensions sporales, les produits issus de la fermentation (filtrats) ont montré une efficacité plus variable (Figure 26). Seul le filtrat de B1 a présenté une inhibition modérée, tandis que les autres (B5, M1) ont affiché une faible capacité à limiter les symptômes de la maladie.

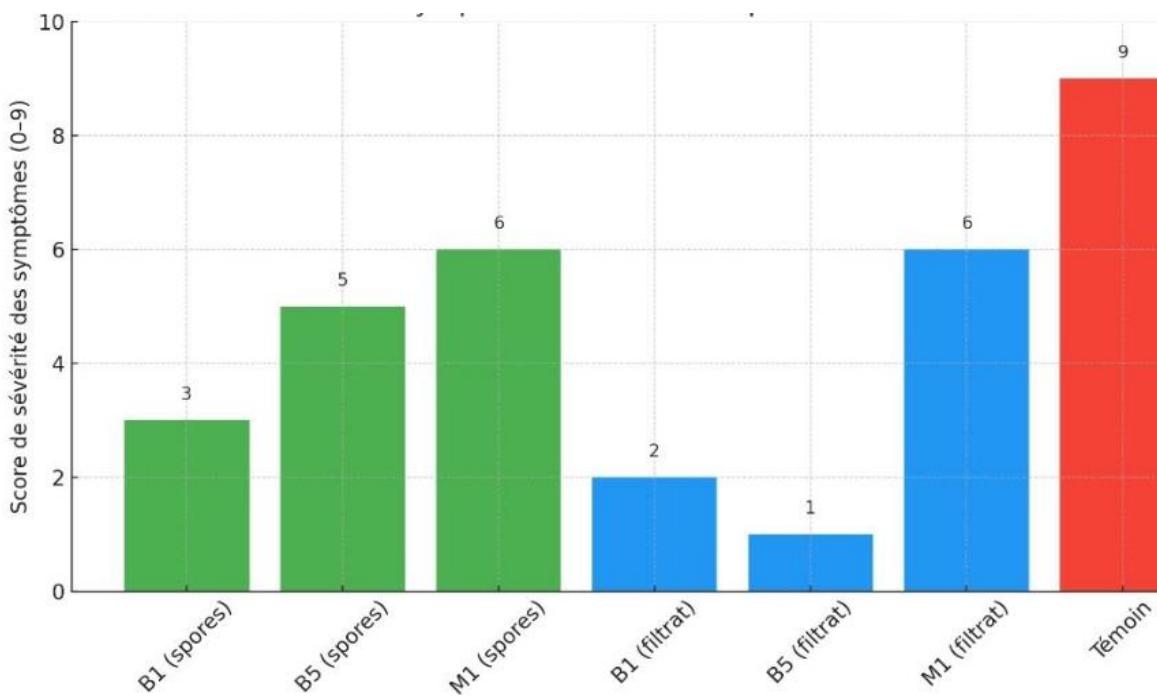


Figure 26 : Comparaison de la sévérité des symptômes du mildiou de la tomate selon les différents traitements biologiques appliqués (LaMyBAM).

Cette différence pourrait s'expliquer par plusieurs facteurs :

- Les métabolites antifongiques comme la bassianolide ou la beauvéricine, bien que présents, peuvent être instables ou inactifs une fois appliqués seuls sans spores vivants (Benserradj, 2014).
- Les concentrations obtenues en fermentation statique sans agitation peuvent être sous-optimales pour générer des niveaux suffisants de composés actifs (Faria et Wraight, 2007).

Ces observations sont soutenues par les travaux de El Hossiny *et al.* (2020), qui ont noté que l'activité antifongique des extraits fongiques dépend non seulement de la souche mais aussi du milieu de culture, des conditions de fermentation et de la stabilité des molécules.

3.4. Caractérisation des métabolites secondaires

L'analyse des extraits issus de la fermentation de *Beauveria bassiana* et *Metarhizium anisopliae* par chromatographie sur couche mince (CCM) (figure 25) a permis de séparer plusieurs fractions révélant la présence potentielle de métabolites secondaires bioactifs.

Remarque : la chromatographie sur couche mince (CCM) est une méthode de séparation et non une méthode d'identification. L'attribution des métabolites ici mentionnés repose sur une comparaison des valeurs des rapports frontaux (Rf) obtenues avec celles déjà décrites dans la littérature scientifique. Seules des techniques analytiques comme la spectrométrie de masse (MS) ou la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) permettent une identification plus formelle.

L'isolat B1 a révélé deux tâches avec des valeurs de Rf de 0,12 et 0,46. La première (Rf = 0,12) pourrait correspondre à la beauvéricine, une cyclodépsipeptide connue pour son activité antifongique, souvent produite par *B. bassiana* (Benserradj, 2014). La seconde (Rf = 0,46) est probablement attribuable à la bassianolide, également décrite chez la même espèce fongique (Zhou *et al.*, 2016).

Concernant *Metarhizium anisopliae*, deux tâches ont été observées avec des Rf = 0,07 et 0,46. La bande à 0,07 pourrait indiquer la présence de destruxine A, un métabolite cyclique bien caractérisé chez cette espèce et connu pour son rôle dans l'inhibition de champignons phytopathogènes (Amiri-Besheli *et al.*, 2000 ; Hu *et al.*, 2020), tandis que la bande à 0,46

confirmerait également la présence de bassianolide, également détectée chez certaines souches de *Metarhizium* selon certaines études croisées (Chen *et al.*, 2018).

Ces résultats, bien que préliminaires, sont en accord avec les profils métaboliques rapportés dans plusieurs travaux, cités précédemment, portant sur la production de composés bioactifs par ces entomopathogènes. Toutefois, il est important de souligner que la CCM ne permet pas une identification définitive, et une confirmation par des techniques plus avancées telles que la HPLC ou la spectrométrie de masse serait nécessaire pour valider l'identité exacte des composés détectés.

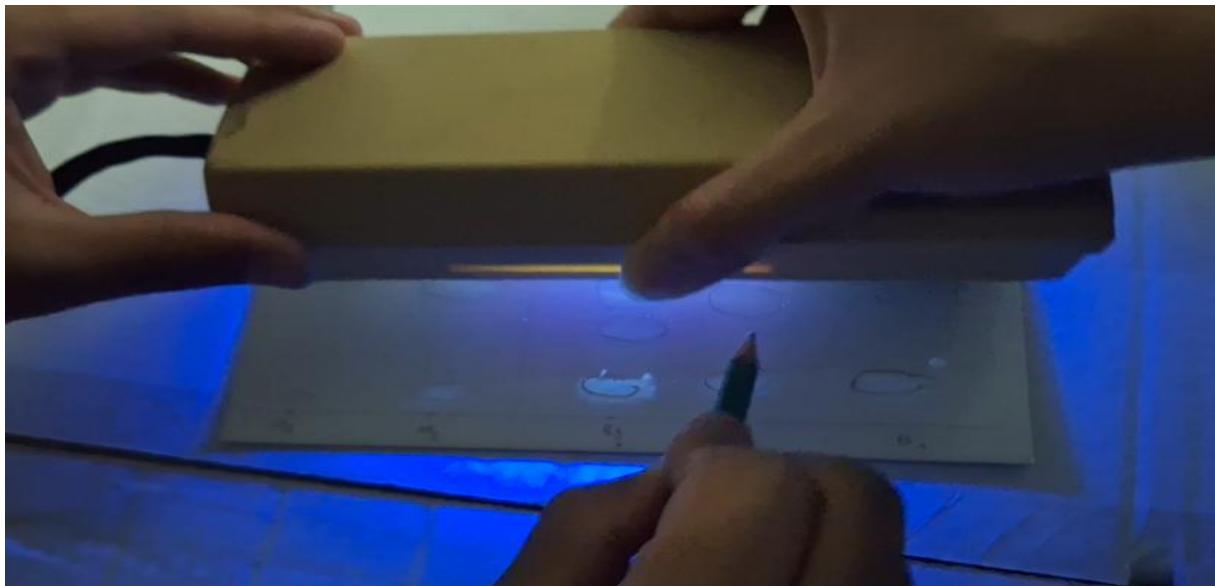


Figure 25 : Visualisation des spots de métabolites après CCM (UV 254 nm) (LaMyBAM).

conclusion

Les expérimentations entreprises dans le présent travail mettent en évidence le potentiel de *Beauveria bassiana* et *Metarhizium anisopliae* en tant qu'agents de biocontrôle contre le mildiou de la tomate causé par *Phytophthora infestans*.

Au cours de cette étude, les deux souches entomopathogènes ont été isolées, identifiées morphologiquement et purifiées avec succès, tandis que le pathogène *P. infestans* a été détecté par observation microscopique des tissus infectés et une souche pure a été obtenue afin de conduire les expérimentations *in vitro*.

Les confrontations directes sur milieux de culture ont révélé une activité antagoniste significative de *B. bassiana* (jusqu'à 66 % d'inhibition) et de *M. anisopliae* (55 % d'inhibition) sur la croissance de *P. infestans*. Cette activité antifongique a été principalement associée à la production de métabolites secondaires diffusibles, tandis que les composés volatils n'ont pas manifesté d'efficacité inhibitrice notable dans les conditions expérimentales utilisées.

Les filtrats de culture, concentrant les métabolites non volatils, ont présenté une activité inhibitrice importante, pouvant atteindre 80 % d'inhibition de la croissance de *P. infestans*, en particulier avec la souche *B. bassiana* B1. Cette activité s'est renforcée avec l'augmentation de la concentration en filtrat, ce qui souligne le rôle de certains métabolites secondaires, potentiellement des beauvéricines ou des destruxines, dans le mécanisme d'inhibition. Par ailleurs, une certaine variabilité intraspécifique a été observée, notamment entre les deux fractions de l'isolat B5 de *B. bassiana* (rouge et jaune), ce qui souligne l'influence des conditions de culture sur le profil métabolitique et l'efficacité antifongique.

Des tests complémentaires *in vivo* ont été menés sur des plantules de tomate, confirmant l'effet protecteur des traitements biologiques. Les suspensions sporales ont montré une réduction notable des symptômes du mildiou, avec des lésions limitées pour les isolats B1 et M. En comparaison, les filtrats issus de la fermentation ont présenté une efficacité plus variable, seul le filtrat de B1 montrant un effet modéré. Ces résultats soulignent l'importance de la présence de spores vivantes dans l'efficacité du traitement, suggérant un rôle potentiel de la colonisation endophyte et de la résistance systémique induite (ISR).

Par ailleurs, une caractérisation des métabolites secondaires a été réalisée par chromatographie sur couche mince (CCM), révélant la présence probable de composés bioactifs. Chez *B. bassiana*, les tâches détectées ($R_f = 0,12$ et $0,46$) pourraient correspondre respectivement à la beauvéricine et à la bassianolide. Pour *M. anisopliae*, deux fractions ont été observées ($R_f = 0,07$ et $0,46$), suggérant la présence de destruxine A et de bassianolide. Ces composés sont connus pour leur activité antifongique, mais leur identification reste à confirmer par des techniques analytiques plus poussées.

Ces résultats mettent en valeur le potentiel de *Beauveria bassiana* et *Metarhizium anisopliae* en tant que moyens de lutte biologique, pouvant s'intégrer dans une stratégie de gestion durable des maladies de la tomate. Ainsi, l'étude souligne l'intérêt d'explorer plus en détail le rôle des spores, des métabolites fongiques et des mécanismes de résistance induite, afin de proposer des solutions alternatives, respectueuses de l'environnement et de la santé humaine. Cette alternative biologique offre donc une perspective intéressante en termes de maîtrise des maladies fongiques, de réduction de l'emploi de pesticides chimiques et de promotion d'une agriculture durable.

Au vu des résultats prometteurs obtenus dans cette étude, plusieurs perspectives de recherches peuvent être envisagées afin d'en approfondir l'efficacité et d'en assurer l'application en conditions réelles :

- Évaluation *in vivo* en serre ou en champ : réaliser des expérimentations sur plants de tomate afin de valider l'efficacité des souches de *Beauveria bassiana* et *Metarhizium anisopliae* dans des conditions naturelles, et d'évaluer leur capacité à assurer une protection durable contre le mildiou.
- Formulation de biopesticides : étudier la formulation de produits à base de spores ou de métabolites de ces champignons (poudres, suspensions concentrées, microcapsules) afin d'améliorer leur conservation, leur facilité d'application, leur persistance sur le feuillage, et leur activité antifongique en conditions de champ.
- Synergie avec d'autres méthodes de lutte : tester l'efficacité de combinaisons de *B. bassiana* et/ou *M. anisopliae* avec d'autres méthodes de maîtrise, par exemple l'utilisation de fongicides chimiques à faibles doses, de bactéries antagonistes, ou d'agents de biocontrôle complémentaires, afin d'envisager une stratégie de lutte intégrée.

- Identification des métabolites actifs : réaliser des études chimiques afin d'identifier et de caractériser les principales molécules antifongiques produites par les souches les plus performantes, ce qui permettra de mieux comprendre leur mode d'action et d'envisager leur production en grande quantité.
- Évaluation de la variabilité intraspécifique : approfondir l'étude de la variabilité des souches de *B. bassiana* afin de sélectionner les isolats les plus actifs, les plus stables, et les mieux adaptés aux conditions locales de culture.
- Biosécurité et impact sur l'environnement: évaluer l'impact de l'application de ces agents de biocontrôle sur l'entomofaune non-cible, le microbiote du sol, et l'environnement en général afin de s'assurer de leur innocuité.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIES

- **Abderrahmane, O.** (2023). *Le mildiou de la pomme de terre: facteurs épidémiologiques et caractérisation des populations de Phytophthora infestans* [Thèse de doctorat, Université de Mostaganem].
- **Agrios, G. N.** (2005). *Plant pathology* (5e éd.). Elsevier Academic Press.
- **Akça, İ., Acar, Ş., Tarakçı, Z. Ç., & Sevim, A.** (2023). In vitro antagonistic activity of entomopathogenic fungi against *Phytophthora infestans*. *Journal of Fungal Biology*, *14*(2), 112–125.
- **Arinaitwe, U., Rideout, S., & Langston, D.** (2023). Cultural management of late blight (*Phytophthora infestans*) in greenhouse tomato production. *Plant Health Progress*, *24*(1), 45–53.
- **Bahadur, A.** (2023). The potential of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* to manage insect pests and diseases. *Natural Resources Conservation and Research*, *6*(2), 1–15.
- **Bassi, A.** (1835). *Del mal del segno, calcinaccio o moscardino, malattia che affligge i bachi da seta*. Tipografia Oreesi.
- **Benserradj, O.** (2014). *Évaluation de Metarrhizium anisopliae à titre d'agent de lutte biologique contre les larves de moustiques* [Thèse de Doctorat, Université Frères Mentouri Constantine 1].
- **Björn, A.** (2007). *Sexual reproduction in Phytophthora infestans: Epidemiological consequences* [Doctoral thesis, Swedish University of Agricultural Sciences].
- **Boccas, B.** (1979). Sexual reproduction in *Phytophthora*: Its pathways and some of its genetic consequences. *Annales de Phytopathologie*, *11*(3), 189–201.
- **Bonnie, H., Gwinn, K. D., & Vega, F. E.** (2009). Champignons entomopathogènes endophytes contre les pathogènes végétaux. *BioControl*, *55*(1), 113–128.
- **Clement, J. A. J.** (2011). *Reproductive strategies of the heterothallic oomycete Phytophthora infestans in response to multiple infections and partial resistance of its host Solanum tuberosum* [Thèse de doctorat, Agrocampus Ouest].
- **Coffey, M., & Gees, R.** (1991). The cytology of development. Dans D. S. Ingram & P. H. Williams (Éds.), *Advances in plant pathology* (p. 31–47). Academic Press.
- **Cook, R. J.** (1993). Making greater use of introduced microorganisms for biological control of plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, *31*(1), 53–80.
- **Danies, G., Small, I. M., Myers, K. L., Childers, R., & Fry, W. E.** (2013). Phenotypic characterization of recent clonal lineages of *Phytophthora infestans* in the United States. *Plant Disease*, *97*(7), 873–881.
- **Deguine, J.-P.** (2023). Lutte biologique et biocontrôle : Un besoin de clarification. *Cahiers Agricultures*, *32*, 11. <https://doi.org/10.1051/cagri/2023004>
- **Dominique, B.** (2009). *Tomato diseases: Identify, know, control*. Éditions Quae.
- **Duniway, J. M.** (1983). Role of physical factors in the development of *Phytophthora infestans*. Dans D. C. Erwin, S. Bartnicki-Garcia, & P. H. Tsao (Éds.), *Phytophthora, its biology, taxonomy, ecology, and pathology* (p. 175–179). American Phytopathological Society.

- **Eilenberg, J., Hajek, A. E., & Lomer, C.** (2001). Suggestions for unifying the terminology in biological control. *BioControl*, *46*(4), 387–400.
- **Erwin, D. C.** (1983). *Phytophthora: Its biology, taxonomy, ecology, and pathology*. American Phytopathological Society Press.
- **Faria, M. R., & Wraight, S. P.** (2007). Mycoinsecticides and mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage. *Biological Control*, *43*(3), 237–256.
- **Fernandez-Pavía, S. P., Grünwald, N. J., Díaz-Valasis, M., Cadena-Hinojosa, M., & Fry, W. E.** (2004). Soilborne oospores of *Phytophthora infestans* in central Mexico survive winter fall and infect potato plants. *Plant Disease*, *88*(1), 29–33.
- **Getachew, G., Hussien, T., Dejene, M., & Biazin, B.** (2023). Integrated management of tomato late blight through host plant resistance in Arba Minch, Ethiopia. *African Journal of Agricultural Research*, *18*(3), 214–225.
- **Grünwald, N. J., Sturbaum, A. K., Montes, G. R., Serrano, E. G., Lozoya-Saldaña, H., & Fry, W. E.** (2006). Selection for fungicide resistance within a growing season in field populations of *Phytophthora infestans*. *Phytopathology*, *96*(12), 1397–1403.
- **Guedider, H.** (2020). *Le ver blanc dans le Nord-Ouest Algérien : étude bioécologique, moyens et méthodes de lutte* [Thèse de doctorat, Université d'Oran].
- **Hackett, J. D., Yoon, H. S., Li, S., Reyes-Prieto, A., Rümmele, S. E., & Bhattacharya, D.** (2007). Phylogenomic analysis supports the monophyly of cryptophytes and haptophytes. *Molecular Biology and Evolution*, *24*(8), 1702–1713.
- **Hajek, A. E., & Delalibera, I., Jr.** (2010). Fungal pathogens as classical biological control agents against insects. *BioControl*, *55*(1), 147–158.
- **Hammi, A.** (2003). *Caractérisation de populations de Phytophthora infestans (Mont.) de Bary dans la région de Saïs* [Thèse de doctorat, Université Sidi Mohammed Ben Abdallah].
- **Harper, J. T., Waanders, E., & Keeling, P. J.** (2005). On the monophyly of chromalveolates using a six-protein phylogeny of eukaryotes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *55*(1), 487–496.
- **Herth, A.** (2011). *Le biocontrôle pour la protection des cultures, 15 recommandations pour soutenir les technologies vertes*. Rapport au Premier ministre. <https://www.vie-publique.fr/rapport/31733>
- **Islam, S. M. N., Chowdhury, M. Z. H., Mim, M. F., Momtaz, M. B., & Islam, T.** (2023). Biocontrol potential of native isolates of *Beauveria bassiana* against cotton leafworm *Spodoptera litura* (Fabricius). *Journal of Applied Entomology*, *147*(5), 332–341.
- **Jaber, L. R., & Ownley, B. H.** (2018). Can we use entomopathogenic fungi as endophytes for dual biological control? *Biological Control*, *116*, 36–45.
- **Judelson, H. S., & Blanco, F. A.** (2005). The spores of *Phytophthora*: Weapons of the plant destroyer. *Nature Reviews Microbiology*, *3*(1), 47–58.
- **Kroon, L. P. N. M.** (2004). *Diversité génétique des populations européennes de Phytophthora infestans*. *European Journal of Plant Pathology*, *110*(3), 241–256.
- **Kroon, L. P. N. M., Bakker, F. T., van den Bosch, G. B. M., Bonants, P. J. M., & Flier, W. G.** (2004). Phylogenetic analysis of *Phytophthora* species based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Fungal Genetics and Biology*, *41*(8), 766–782.

- **Lacey, L. A., Grzywacz, D., Shapiro-Ilan, D. I., Frutos, R., Brownbridge, M., & Goettel, M. S.** (2015). Insect pathogens as biological control agents: Back to the future. *Journal of Invertebrate Pathology*, *132*, 1–41.
- **Lepoivre, P.** (2003). *Phytopathologie*. De Boeck Supérieur.
- **Litwin, A., Nowak, M., & Różalska, S.** (2023). Entomopathogenic fungi: Unconventional applications. *Biocontrol Science and Technology*, *33*(2), 101–115.
- **Mamode Ally, N., Neetoo, H., Ranghoo-Sanmukhiya, V. M., Hardowar, S., Vally, V., Gungoosinh-Bunwaree, A., Maudarboccus, F., Coutinho, T. A., Vojvodić, M., & Bulajić, A.** (2021). First report of *Botrytis cinerea* causing gray mold on greenhouse tomatoes in Mauritius. *Plant Disease*, *105*(6), 1860.
- **Martens, C., Vandepoele, K., & Van de Peer, Y.** (2008). Whole-genome analysis reveals molecular innovations and evolutionary transitions in chromalveolate species. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(9), 3427–3432.
- **Missouri Botanical Garden.** (s. d.). *Plant diseases: Tomato late blight*. Consulté le 15 juin 2024, sur <https://www.missouribotanicalgarden.org>
- **Nelson, S. C.** (2008). *Late blight of tomato (*Phytophthora infestans*)*. University of Hawaii Cooperative Extension Service Publication PD-45.
- **Ownley, B. H., Gwinn, K. D., & Vega, F. E.** (2010). Endophytic fungal entomopathogens with activity against plant pathogens: Ecology and evolution. *BioControl*, *55*(1), 113–128.
- **Pacific Northwest Pest Management Handbooks.** (2023). *Tomato (*Solanum lycopersicum*) - Late blight*. Oregon State University. <https://pnwhandbooks.org>
- **Pell, J. K., Hannam, J. J., & Steinkraus, D. C.** (2010). Conservation biological control using fungal entomopathogens. *BioControl*, *55*(1), 159–167.
- **Platt, R. G.** (2008). Potato diseases caused by oomycetes. *Cahiers Agricultures*, *17*(4), 361–367.
- **Quesada-Moraga, E., González-Mas, N., Yousef-Yousef, M., Garrido-Jurado, I., & Fernández-Bravo, M.** (2023). Key role of environmental competence in successful use of entomopathogenic fungi. *BioControl*, *68*(2), 89–101.
- **Ribeiro, O. K.** (1983). Physiology of asexual sporulation and spore germination in *Phytophthora*. Dans D. C. Erwin, S. Bartnicki-Garcia, & P. H. Tsao (Éds.), *Phytophthora: Its biology, taxonomy, ecology, and pathology* (p. 55–70). American Phytopathological Society.
- **Ribero, O. K.** (1983b). *Physiologie de la sporulation asexuée chez Phytophthora*. Monographie de la Société de Phytopathologie.
- **Rousselle, P., Robert, Y., & Crosnier, J. C.** (1996). *La pomme de terre: Production, amélioration, ennemis et maladies, utilisations*. Éditions Quae.
- **Sako, A. K., & Demissie, Y. T.** (2023). Overview of management practices of tomato late blight (*Phytophthora infestans* Mont.) disease. *International Journal of Research in Agricultural Sciences*, *10*(4), 52–60.
- **Schaffner, U., Heimpel, G. E., Mills, N. J., Muriithi, B. W., Thomas, M. B., GC, Y. D., & Wyckhuys, K. A. G.** (2024). Biological control for One Health. *Science of the Total Environment*, *951*, 175800.

- Schöller, M., Prozell, S., Al-Kirshi, A. G., & Reichmuth, C. (1997). Towards biological control as a major component of integrated pest management in stored product protection. *Journal of Stored Products Research*, *33*(1), 81–97.
- Shah, P. A., & Pell, J. K. (2003). Entomopathogenic fungi as biological control agents. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *61*(5–6), 413–423.
- Singh, K. (2014). Biocontrol: An overview. *International Journal of Scientific and Innovative Research*, *2*(1), 83–89.
- Stenberg, J. A., Sundh, I., Becher, P. G., Björkman, C., Dubey, M., Egan, P. A., Friberg, H., Gil, J. F., Jensen, D. F., Jonsson, M., Karlsson, M., Khalil, S., Ninkovic, V., Rehermann, G., Vutukuri, R. R., & Viketoft, M. (2021). When is it biological control? A framework of definitions, mechanisms, and classifications. *Journal of Pest Science*, *94*(3), 665–676.
- Suty, L. (2010). *La lutte biologique : Vers de nouveaux équilibres écologiques*. Éditions Quae.
- Tsegaye, Z., Assefa, F., Tefera, G., Alemu, T., Gizaw, B., & Abatenh, E. (2018). Concept, principle and application of biological control and their role in sustainable plant diseases management strategies. *International Journal of Research Studies in Biosciences*, *6*(4), 18–34.
- Wang, J., & Zheng, C. (2012). Characterization of a newly discovered *Beauveria bassiana* isolate to *Frankliniella occidentalis* Perganda. *Microbiological Research*, *167*(2), 116–120.
- Zhang, S. L., & Li, Z. Z. (2011). Antagonism of *B. bassiana* against two *Fusarium* spp. pathogenic to cotton. *Chinese Journal of Biological Control*, *27*(3), 325–330.
- Zimmermann G. (2007). Review on safety of the entomopathogenic fungi Beauveria bassiana and Beauveria brongniartii. *Biocontrol Science and Technology*, 17(5/6), p: 553-596.

ANEXE

Composition des Milieux de culture

➤ SDAY (Sabouraud dextrose agar yeast)

Peptone.....	10g
Glucose.....	20g
Agar.....	15g
Extrait de levure.....	2g
Dodine.....	50µg
Eau distillée.....	1000ml

PH 5,6

➤ PDAY (Potato dextrose agar yeast)

Pomme de terre.....	200g
Glucose	15g
Agar.....	20g
Extrait de levure.....	2g
Dodine.....	50µg
Eau distillée.....	1000ml

PH 5,6

➤ PP (gélose au petit pois)

Petit pois.....	140g
Agar.....	15g
Eau distillée.....	500ml

PH 5,6

➤ PDB (Potato dextrose broth)

Pomme de terre.....	200g
Glucose	15g
Eau distillée.....	1000ml

PH 5,6

Année universitaire : 2024-2025	Présenté par : MATARFI Youcef KOUZRITE Mohamed
--	---

Évaluation du potentiel des champignons entomopathogènes en biocontrôle pour la lutte contre le mildiou de la tomate causé par *Phytophthora infestans*

Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en Mycologie et Biotechnologie Fongique

Ce mémoire a pour objectif d'évaluer le potentiel de certains champignons entomopathogènes (*Beauveria bassiana* et *Metarhizium anisopliae*) en tant qu'agents de biocontrôle contre le mildiou de la tomate, causé par *Phytophthora infestans*. Dans le contexte de l'agriculture algérienne, la tomate occupe une place stratégique, mais elle est gravement affectée par le mildiou, ce qui nécessite le recours excessif aux fongicides chimiques, avec des conséquences néfastes sur l'environnement, la santé des consommateurs et le développement de souches pathogènes résistantes. Au cours de cette étude, des souches de *B. bassiana* et *M. anisopliae* ont été isolées à partir de différents sites à Constantine, identifiées morphologiquement et purifiées, puis utilisées afin d'évaluer leur activité antagoniste *in vitro* contre *P. infestans*. Les confrontations directes ont montré des taux d'inhibition de 55 % (B1 et M) et de 66 % (B5), tandis que les métabolites secondaires diffusibles de *B. bassiana* (B1) ont inhibé jusqu'à 80 % de la croissance de *P. infestans*. En revanche, les composés volatils n'ont pas manifesté d'efficacité antifongique. Des tests complémentaires *in vivo* sur plantules ont confirmé leur effet protecteur, notamment pour les isolats B1 et M. Par ailleurs, l'analyse des métabolites secondaires par CCM a révélé la présence probable de composés antifongiques tels que la beauvérarine, la bassianolide et la destruxine A. Ces résultats mettent en valeur le potentiel de *Beauveria bassiana* et *Metarhizium anisopliae* en tant que moyens de lutte biologique, pouvant s'intégrer dans une stratégie de gestion durable des maladies de la tomate. Ainsi, l'étude souligne l'intérêt d'explorer plus en détail le rôle de certains métabolites fongiques dans le biocontrôle afin de proposer des solutions alternatives, respectueuses de l'environnement et de la santé humaine.

Mots-clés : Champignons entomopathogènes, Mildiou, *Phytophthora infestans*, Tomate.

Laboratoires de recherche : Mycologie, Biotechnologie et de l'Activité Microbienne (U.Constantine 1 FM).

Président du jury : Dr ABDELAZIZ Wided MC (B) - U. Constantine 1 Frères Mentouri.

Encadrant : Pr MIHOUBI Ilhem Professeur - U. Constantine 1 Frères Mentouri.

Examinateur : Dr BENSERRADJ Ouafa MC (A) - U. Constantine 1 Frères Mentouri.