



République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la  
Recherche Scientifique  
Université de Batna I



Institut des Sciences vétérinaires et sciences agronomiques  
Département d'Agronomie

En Vue de l'obtention du Diplôme de Magister

En Sciences Agronomiques

Spécialité: Protection des végétaux

Option : Entomologie agricole et forestière

Présenté par: Laïb Djamel Eddine

Thème

**Bioprospection des activités insecticides des champignons endophytes  
isolés à partir du laurier rose *Nerium oleander* L.  
(*Apocynaceae*, *Gentianales*) vis-à-vis des  
Coléoptères des denrées entreposées.**

Soutenue devant le jury:

Président: Pr. LAAMARI M.

Rapporteur : Pr. LOMBARKIA N.

Examineur : Pr. BENHALIMA-KAMEL M.

Examineur : MEBARKIA A.

Invité : BENSACI O.A.

Université de Batna I

Université de Batna I

Institut Supérieur Agronomique ISA  
Chott Meriem (Université de Sousse,  
Tunisie)

M.C.A. Université de Sétif

M.A.A. Université de Batna I

Année Universitaire 2015 - 2016

# *Dédicaces*

*À ma mère, mon père, ma sœur Imène, mon frère Zine Elabidine et à tous ceux qui me sont chers, Je dédie ce travail.*

*Laïb Djamel Eddine*

# Remerciements

*Je remercie tout d'abord Dieu tout puissant et miséricordieux de m'avoir donné santé, force, courage, volonté et patience pour réaliser ce travail.*

*J'adresse mes plus vifs remerciements à **M<sup>me</sup> Lombarkia N.** qui m'a proposé cet intéressant thème de travail. J'ai beaucoup apprécié ses qualités scientifiques, humaines et surtout son optimisme tout le long du parcours. Je la remercie pour son aide, sa disponibilité, ses précieux conseils. Ce fut un plaisir et une chance de travailler avec elle.*

*Je tiens également à exprimer ma reconnaissance aux membres de jury qui ont accepté la lourde charge d'être examinateurs de ce travail : **M<sup>me</sup> BENHALIMA-KAMEL M.** et **Mr MEBARKIA A.** et à **M<sup>r</sup> LAAMARI M.** qui nous a fait l'honneur de présider le jury de la soutenance.*

## Liste des tableaux

	<b>Pages</b>
<b>Tableau 1.</b> Composition générale de la mycoflore endophyte détectée chez <i>N. oleander</i> .....	44

## Liste des figures

	<b>Pages</b>
<b>Figure 1.</b> Différentes parties de <i>N. oleander</i> L.....	15
<b>Figure 2.</b> <i>R. dominica</i> .....	18
<b>Figure 3.</b> Dégâts causés par <i>R. dominica</i> sur des graines d'orge.....	20
<b>Figure 4.</b> <i>S. granarius</i> .....	21
<b>Figure 5.</b> Dégâts causés par <i>S. granarius</i> sur des graines de blé dur.....	23
<b>Figure 6.</b> <i>S. zeamais</i> .....	24
<b>Figure 7.</b> Dégâts causés par <i>S. zeamais</i> sur des graines de maïs .....	26
<b>Figure 8.</b> Elevage de masse des insectes.....	33
<b>Figure 9.</b> Isolement des champignons endophytes de <i>N. oleander</i> L.....	34
<b>Figure 10.</b> Coupeaux des carapaces des crevettes.....	36
<b>Figure 11.</b> Déminéralisation avec de l'acide chlorhydrique.....	37
<b>Figure 12.</b> Déprotéinisation avec de l'hydroxyde de sodium aqueux.....	37
<b>Figure 13.</b> Elimination des lipides et des pigments .....	38
<b>Figure 14.</b> Chitine colloïdale en poudre.....	39
<b>Figure 15.</b> Les agitations pour homogénéiser le milieu et la biomasse fongique.....	40
<b>Figure 16.</b> Filtration des milieux des cultures fongiques.....	41
<b>Figure 17.</b> Unité VCE.....	41
<b>Figure 18.</b> Dispositif expérimental.....	42
<b>Figure 19.</b> Fréquence de colonisation des champignons endophytes de <i>Nerium oleander</i> .....	43
<b>Figure 20.</b> Souches fongiques endophytes dotées d'une activité protéolytique présentée par un halo translucide entourant les colonies fongiques.....	48
<b>Figure 21.</b> Représentation graphique de l'activité protéolytique des souches fongiques sélectionnées illustrée par l'index protéolytique calculé sur 12 jours successifs.....	49
<b>Figure 22.</b> Souches fongiques endophytes dotées d'une activité chitinolytique présentée par un halo translucide entourant les colonies fongiques.....	51
<b>Figure 23.</b> Représentation graphique de l'activité chitinolytique des souches fongiques sélectionnées illustrée par l'index protéolytique calculé sur 12 jours successifs.....	52
<b>Figure 24.</b> Evolution de la croissance radiale des colonies fongiques sélectionnées sur une période de 12 jours dans le milieu d'activité protéolytique.....	54

<b>Figure 25.</b> Evolution de la croissance radiale des colonies fongiques sélectionnées sur une période de 12 jours dans le milieu d'activité chitinolytique.....	55
<b>Figure 26.</b> Des doubles graphes montrant la relation entre le diamètre de la colonie et l'activité protéolytique des champignons endophytes sélectionnés.....	57
<b>Figure 27.</b> Droites de la régression linéaire montrant la relation entre la croissance radiale et l'activité protéolytique des champignons endophytes sélectionnés.....	58
<b>Figure 28.</b> Des doubles graphes montrant la relation entre le diamètre de la colonie et l'activité chitinolytique des champignons endophytes sélectionnés.....	60
<b>Figure 29.</b> Droites de la régression linéaire montrant la relation entre la croissance radiale et l'activité chitinolytique des champignons endophytes sélectionnés.....	61
<b>Figure 30.</b> Mortalité en (%) des insectes traités avec différentes concentrations du filtrat d'activité protéolytique d' <i>Alternaria</i> sp5.....	63
<b>Figure 31.</b> Mortalité en (%) des insectes traités avec différentes concentrations du filtrat d'activité protéolytique de <i>Cladosporium</i> sp.....	67
<b>Figure 32.</b> Mortalité en (%) des insectes traités avec différentes concentrations du filtrat d'activité protéolytique de <i>Curvularia</i> sp.....	70
<b>Figure 33.</b> Mortalité en (%) des insectes traités avec différentes concentrations du filtrat d'activité chitinolytique de <i>Curvularia</i> sp.....	71
<b>Figure 34.</b> Mortalité en (%) des insectes traités avec différentes concentrations du filtrat d'activité protéolytique de <i>Fusarium</i> sp1.....	74
<b>Figure 35.</b> Mortalité en (%) des insectes traités avec différentes concentrations du filtrat d'activité chitinolytique de <i>Fusarium</i> sp1.....	75
<b>Figure 36.</b> Mortalité en (%) des insectes traités avec différentes concentrations du filtrat d'activité chitinolytique de <i>Fusarium</i> sp2.....	76
<b>Figure 37.</b> Mortalité en (%) des insectes traités avec différents concentrations du filtrat d'activité protéolytique de <i>Fusarium</i> sp3.....	77
<b>Figure 38.</b> Mortalité en (%) des insectes traité avec différentes concentrations du filtrat d'activité chitinolytique de <i>Fusarium</i> sp3.....	78
<b>Figure 39.</b> Mortalité en (%) des insectes traité avec différentes concentrations du filtrat d'activité chitinolytique de <i>Fusarium</i> sp4.....	79
<b>Figure 40.</b> Mortalité en (%) des insectes traités avec différentes concentrations du filtrat d'activité chitinolytique de <i>Fusarium</i> sp5.....	80
<b>Figure 41.</b> Mortalité en (%) des insectes traités avec différentes concentrations du filtrat d'activité chitinolytique de <i>Fusarium</i> sp6.....	81
<b>Figure 42.</b> Droites de régression linéaire montrant la relation entre l'activité protéolytique et insecticide contre <i>Rhyzopertha dominica</i> pour le filtrat d'activité protéolytique d' <i>Alternaria</i> sp5.....	86

<b>Figure 43.</b> Droites de régression linéaire montrant la relation entre l'activité protéolytique et insecticide contre <i>Sitophilus granarius</i> pour le filtrat d'activité protéolytique d' <i>Alternaria</i> sp5.....	86
<b>Figure 44.</b> Droites de régression linéaire montrant la relation entre l'activité protéolytique et insecticide contre <i>Sitophilus zeamais</i> pour le filtrat d'activité protéolytique d' <i>Alternaria</i> sp5.....	87
<b>Figure 45.</b> Droites de régression linéaire montrant la relation entre l'activité protéolytique et insecticide contre <i>Rhizopertha dominica</i> pour le filtrat d'activité protéolytique de <i>Curvularia</i> sp.....	88
<b>Figure 46.</b> Droite de régression linéaire montrant la relation entre l'activité protéolytique et insecticide contre <i>Sitophilus granarius</i> pour le filtrat d'activité protéolytique de <i>Curvularia</i> sp.....	88
<b>Figure 47.</b> Droites de régression linéaire montrant la relation entre l'activité protéolytique et insecticide contre <i>Sitophilus zeamais</i> pour le filtrat d'activité protéolytique de <i>Curvularia</i> sp.....	89
<b>Figure 48.</b> Droites de régression linéaire montrant la relation entre l'activité protéolytique et insecticide contre <i>Rhizopertha dominica</i> pour le filtrat d'activité protéolytique de <i>Fusarium</i> sp3.....	90
<b>Figure 49.</b> Droites de régression linéaire montrant la relation entre l'activité protéolytique et insecticide contre <i>Sitophilus granarius</i> pour le filtrat d'activité protéolytique de <i>Fusarium</i> sp3.....	90
<b>Figure 50.</b> Droites de régression linéaire montrant la relation entre l'activité protéolytique et insecticide contre <i>Sitophilus zeamais</i> pour le filtrat d'activité protéolytique de <i>Fusarium</i> sp3.....	91
<b>Figure 51.</b> ACP montrant la relation entre l'activité protéolytique et insecticide contre <i>R.dominica</i> pour les différentes filtrats des champignons endophytes sélectionnées.....	92
<b>Figure 52.</b> ACP montrant la relation entre l'activité protéolytique et insecticide contre <i>S.granarius</i> pour les différentes filtrats des champignons endophytes sélectionnées.....	92
<b>Figure 53 .</b> ACP montrant la relation entre l'activité protéolytique et insecticide contre <i>S.zeamais</i> pour les différentes filtrats des champignons endophytes sélectionnées.....	93
<b>Figure 54.</b> Droites de régression linéaire montrant la relation entre l'activité chitinolytique et insecticide contre <i>Rhizopertha dominica</i> pour le filtrat d'activité chitinolytique de <i>Curvularia</i> sp....	94
<b>Figure 55.</b> Droites de régression linéaire montrant la relation entre l'activité chitinolytique et insecticide contre <i>Sitophilus granarius</i> pour le filtrat d'activité chitinolytique de <i>Curvularia</i> sp.....	95
<b>Figure 56.</b> Droites de régression linéaire montrant la relation entre l'activité chitinolytique et insecticide contre <i>Sitophilus zeamais</i> pour le filtrat d'activité chitinolytique de <i>Curvularia</i> sp.....	95
<b>Figure 57.</b> Droites de régression linéaire montrant la relation entre l'activité chitinolytique et insecticide contre <i>Rhizopertha dominica</i> pour le filtrat d'activité chitinolytique de <i>Fusarium</i> sp2....	96
<b>Figure 58.</b> Droites de régression linéaire montrant la relation entre l'activité chitinolytique et insecticide contre <i>Sitophilus granarius</i> pour le filtrat d'activité chitinolytique de <i>Fusarium</i> sp2.....	96
<b>Figure 59.</b> Droite de régression linéaire montrant la relation entre l'activité chitinolytique et insecticide contre <i>Sitophilus zeamais</i> pour le filtrat d'activité chitinolytique de <i>Fusarium</i> sp2.....	97
<b>Figure 60.</b> Un double graphe montrant la relation entre l'activité chitinolytique et insecticide contre <i>Rhizopertha dominica</i> pour <i>Fusarium</i> sp3.....	98

<b>Figure 61.</b> Droite de régression linéaire montrant la relation entre l'activité chitinolytique et insecticide contre <i>Rhizopertha dominica</i> pour le filtrat d'activité chitinolytique de <i>Fusarium</i> sp3.....	98
<b>Figure 62.</b> Droites de régression linéaire montrant la relation entre l'activité chitinolytique et insecticide contre <i>Sitophilus granarius</i> pour le filtrat d'activité chitinolytique de <i>Fusarium</i> sp3.....	99
<b>Figure 63.</b> Droite de régression linéaire montrant la relation entre l'activité chitinolytique et insecticide contre <i>Sitophilus zeamais</i> pour le filtrat d'activité chitinolytique de <i>Fusarium</i> sp3.....	100
<b>Figure 64.</b> Droites de régression linéaire montrant la relation entre l'activité chitinolytique et insecticide contre <i>Rhizopertha dominica</i> pour le filtrat d'activité chitinolytique de <i>Fusarium</i> sp6...100	100
<b>Figure 65.</b> Droites de régression linéaire montrant la relation entre l'activité chitinolytique et insecticide contre <i>Sitophilus granarius</i> pour le filtrat d'activité chitinolytique de <i>Fusarium</i> sp6.....	101
<b>Figure 66.</b> ACP montrant la relation entre l'activité chitinolytique et insecticide contre <i>R. dominica</i> pour les différentes filtrats des champignons endophytes sélectionnées.....	102
<b>Figure 67.</b> ACP montrant la relation entre l'activité chitinolytique et insecticide contre <i>S.granarius</i> pour les différentes filtrats des champignons endophytes sélectionnées.....	103
<b>Figure 68.</b> ACP montrant la relation entre l'activité chitinolytique et insecticide contre <i>S.zeamais</i> pour les différentes filtrats des champignons endophytes sélectionnées.....	103

## Table de matières

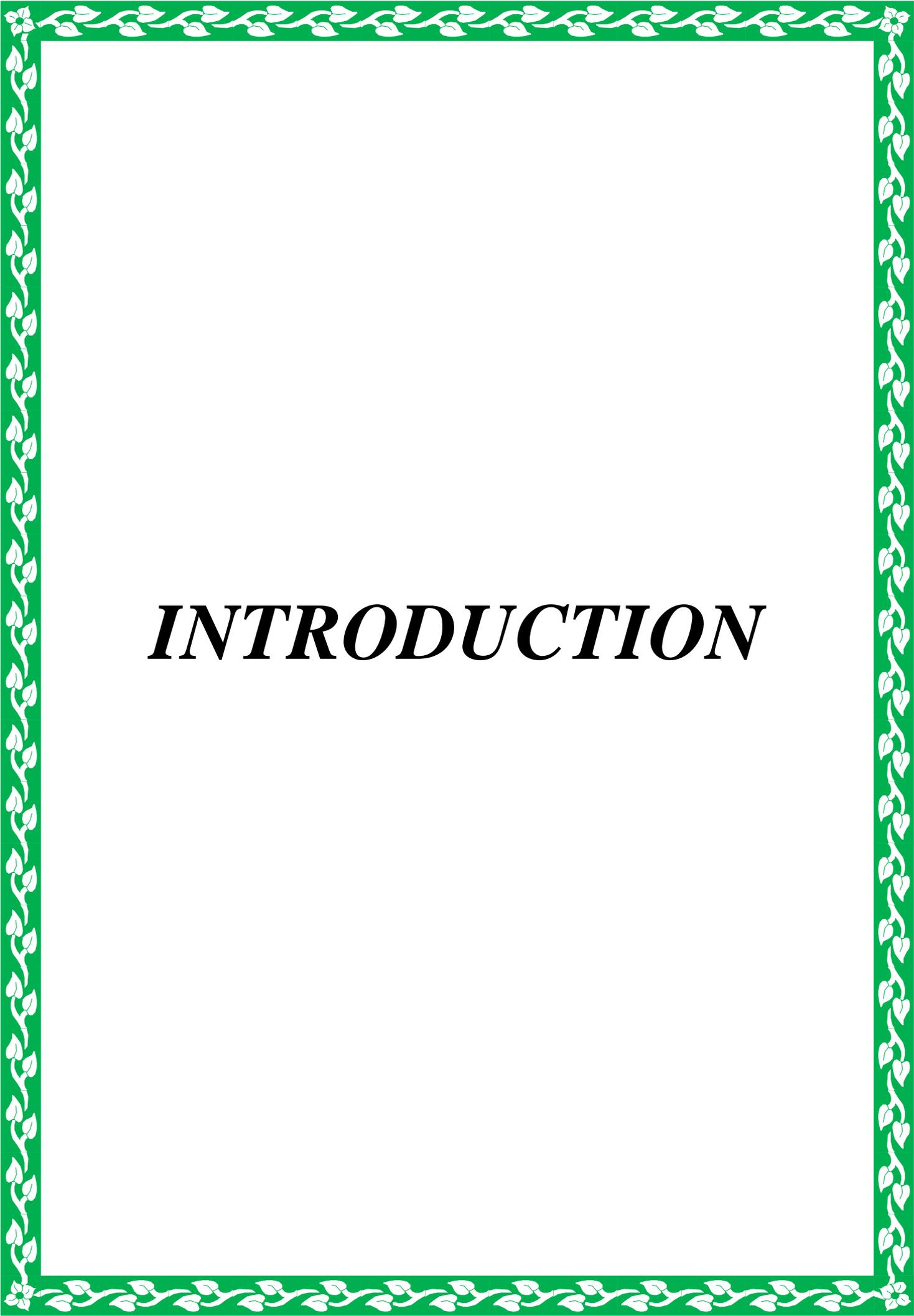
	Pages
I. Introduction.....	1
II. Synthèse bibliographique.....	3
II.1.Les champignons endophytes.....	3
II.1.1.Définition .....	3
II.1.2.L'interaction endophyte-plante hôte.....	3
II.1.3.Principaux rôles physiologiques.....	4
II.1.3.1.Contribution dans la tolérance au stress abiotique par la plante.....	4
II.1.3.1.1.Contribution dans la tolérance de la pollution par des métaux lourds .....	4
II.1.3.1.2.Contribution dans la tolérance de la sécheresse.....	5
II.1.3.1.3.Contribution dans la tolérance de la salinité.....	6
II.1.3.1.4.Contribution dans la tolérance à la chaleur et au froid.....	6
II.1.3.2.Contribution dans la tolérance au stress biotique par la plante.....	7
II.1.3.2.1.Contribution dans la tolérance de la compétition interspécifique.....	7
II.1.3.2.2.Contribution dans la protection contre les parasites invertébrés.....	8
II.1.3.2.2.1. La protection contre les insectes ravageurs .....	8
II.1.3.2.2.2.La protection contre les nématodes.....	9
II.1.3.2.3.Contribution dans la protection contre les agents phytopathogènes.....	9
II.1.3.2.3.1.Induction de la résistance systémique chez la plante hôte.....	9
II.1.3.2.3.2.Fortification des parois des cellules végétales de la plante hôte.....	10
II.1.3.2.3.3.Exclusion de niche écologique .....	10
II.1.3.2.3.4.Promotion de la croissance de la plante hôte pendant l'attaque de l'agent pathogène.....	11
II.1.3.2.3.5.Production des composants antimicrobiens.....	11
II.1.3.2.3.6.Hyperparasitisme et prédation .....	13
II.2. <i>Nerium oleander</i> L. (1753).....	13
II.2.1.Noms communs .....	13
II.2.2.Synonymes .....	13
II.2.3.Taxonomie .....	13
II.2.4.Description.....	14
II.2.5.Ecologie et distribution géographique .....	16
II.2.6.Activité insecticide.....	16
II.2.7.Activité antifongique.....	16
II.2.8.Activité antibactérienne.....	17
II.3.Les espèces des coléoptères des denrées stockées choisies.....	17
II.3.1. <i>Rhizophthera dominica</i> (Fabricius,1792).....	17
II.3.1.1.Noms commun .....	17

II.3.1.2.Synonymes .....	17
II.3.1.3.Description.....	17
II.3.1.3.1.L'œuf.....	17
II.3.1.3.2.La larve.....	18
II.3.1.3.3.L'adulte.....	18
II.3.1.4.Taxonomie.....	19
II.3.1.5.Gamme d'hôtes.....	19
II.3.1.6.Biologie.....	19
II.3.1.7.Distribution géographique.....	20
II.3.1.8.Dégâts.....	20
II.3.2. <i>Sitophilus granarius</i> (Linnaeus,1758).....	21
II.3.2.1.Noms communs.....	21
II.3.2.2.Synonymes.....	21
II.3.2.3.Description.....	21
II.3.2.3.1.L'Œuf.....	21
II.3.2.3.2.La larve.....	21
II.3.2.3.3.L'adulte.....	21
II.3.2.4.Taxonomie.....	22
II.3.2.5.Gamme d'hôtes.....	22
II.3.2.6.Biologie.....	22
II.3.2.7.Distribution géographique.....	23
II.3.2.8.Dégâts.....	23
II.3.3. <i>Sitophilus zeamais</i> (Motschulsky,1855).....	23
II.3.3.1.Noms communs.....	23
II.3.3.2.Synonymes .....	24
II.3.3.3.Description.....	24
II.3.3.3.1.L'Œuf.....	24
II.3.3.3.2. La larve.....	24
II.3.3.3.3.L'adulte.....	24
II.3.3.4.Taxonomie.....	25
II.3.3.5.Gamme d'hôtes.....	25
II.3.3.6.Biologie.....	25
II.3.3.7. Distribution géographique.....	26
II.3.3.8.Dégâts.....	26
II.3.4.Méthodes de lutte .....	26
II.3.4.1.Lutte préventive.....	26
II.3.4.2.Lutte curative.....	26

II.3.4.2.1.Lutte physique.....	26
II.3.4.2.1.1.Lutte par le froid.....	26
II.3.4.2.1.2.Lutte par le chaleur.....	27
II.3.4.2.1.3.Modification de l'atmosphère du milieu.....	27
II.3.4.2.1.4.Utilisation de matières inertes.....	27
II.3.4.2.1.5.L'irradiation ionisante.....	28
II.3.4.2.2.Lutte mécanique.....	29
II.3.4.2.3.Lutte biologique.....	29
II.3.4.2.4.Lutte par l'utilisation des régulateurs de croissance des insectes.....	30
II.3.4.2.5.Lutte par l'utilisation de l'ozone gazeux (O <sub>3</sub> ).....	30
II.3.4.2.6.Lutte par l'utilisation des huiles essentielles.....	31
II.3.4.2.7.Lutte chimique.....	31
III. Matériel et méthodes.....	32
III.1.Matériel.....	32
III.1.1.Matériel animal.....	32
III.1.2.Matériel végétal.....	32
III.2.Méthodes.....	32
III.2.1.Elevage de masse des insectes.....	32
III.2.2.La stérilisation superficielle.....	33
III.2.3.Isolement des champignons endophytes de <i>N. oleander</i> L.....	33
III.2.4.Obtention des cultures fongiques pures.....	34
III.2.5.Identification des mycotaxons endophytes.....	34
III.2.6.Conservation des souches.....	35
III.2.7.Induction de l'activité protéolytique.....	35
III.2.7.1.Induction de l'activité protéolytique sur milieu de culture solide.....	35
III.2.7.2.Induction de l'activité protéolytique dans un milieu de culture liquide.....	35
III.2.8.Induction de l'activité chitinolytique.....	35
III.2.8.1.Préparation de la chitine colloïdale en poudre.....	35
III.2.8.1.1.Préparation de la chitine.....	35
III.2.8.1.1.1. Préparation des coupeaux de carapaces.....	36
III.2.8.1.1.2.Déminéralisation avec de l'acide chlorhydrique.....	36
III.2.8.1.1.3.Déprotéinisation avec de l'hydroxyde de sodium aqueux.....	37
III.2.8.1.1.4.Elimination des lipides et des pigments.....	37
III.2.8.1.2.Blanchissement de la chitine.....	38
III.2.8.1.3.Préparation de la chitine colloïdale.....	38
III.2.8.1.4.Préparation de la chitine colloïdale en poudre.....	39
III.2.8.2.Induction de l'activité chitinolytique sur milieu de culture solide.....	39

III.2.8.3. Induction de l'activité chitinolytique sur milieu de culture liquide..	40
III.2.9. Choix des mycotaxons candidats pour la mise en évidence de l'activité insecticide	40
III.2.10. Préparation des filtrats des mycotaxons choisies	40
III.2.11. Les essais de traitement	41
III.2.11.1. Organismes cibles	41
III.2.11.2. Dispositif expérimental	41
III.2.11.3. Calcul du taux de mortalité	42
III.2.12. Paramètres étudiés	42
III.2.13. Analyse des données	42
IV. Résultats et discussion	43
IV.1. Composition et fréquence de colonisation des isolats fongiques endophytes du <i>Nerium oleander</i>	43
IV.1.1. Résultats	43
IV.1.2. Discussion	47
IV.2. Mise en évidence de l'activité chitinolytique des champignons endophytes du <i>N.oleander</i>	48
IV.2.1. Résultats	48
IV.2.2. Discussion	48
IV.3. Evolution de l'activité protéolytique des champignons endophytes sélectionnés	49
IV.3.1. Résultats	49
IV.3.2. Discussion	50
IV.4. Mise en évidence de l'activité protéolytique des champignons endophytes du <i>N.Oleander</i>	51
IV.4.1. Résultats	51
IV.4.2. Discussion	51
IV.5. Evolution de l'activité chitinolytique des champignons endophytes sélectionnés	52
IV.5.1. Résultats	52
IV.5.2. Discussion	53
IV.6. Evolution de la croissance radiale des colonies dans les différents milieux de culture utilisés	54
IV.6.1. Résultats	54
IV.6.2. Discussion	56
IV.7. Relation entre la croissance radiale et l'activité protéolytique des champignons endophytes sélectionnés	57
IV.7.1. Résultats	57
IV.7.2. Discussion	59
IV.8. Relation entre la croissance radiale et l'activité chitinolytique des champignons endophytes sélectionnés	60
IV.8.1. Résultats	60
IV.8.2. Discussion	62

IV.9.Mise en évidence de l'activité insecticide des filtrats d'activité protéolytique et chitinolytique vis à vis <i>Rhizopertha dominica</i> , <i>Sitophilus granarius</i> et <i>Sitophilus zeamais</i> .....	62
IV.9.1.Mise en évidence de l'activité insecticide du filtrat d'activité protéolytique d' <i>Alternaria sp5</i> vis à vis <i>Rhizopertha dominica</i> , <i>Sitophilus granarius</i> et <i>Sitophilus zeamais</i> .....	63
IV.9.1.1.Résultats.....	63
IV.9.1.2.Discussion.....	64
IV.9.2.Mise en évidence de l'activité insecticide du filtrat d'activité protéolytique de <i>Cladosporium sp</i> vis à vis <i>Rhizopertha dominica</i> , <i>Sitophilus granarius</i> et <i>Sitophilus zeamais</i> .....	67
IV.9.2.1.Résultats.....	67
IV.9.2.2.Discussion.....	67
IV.9.3.Mise en évidence de l'activité insecticide des filtrats d'activité protéolytique et chitinolytique de <i>Curvularia sp</i> vis à vis <i>Rhizopertha dominica</i> , <i>Sitophilus granarius</i> et <i>Sitophilus zeamais</i> .....	70
IV.9.3.1.Résultats.....	70
IV.9.3.2.Discussion.....	72
IV.9.4.Mise en évidence de l'activité insecticide des filtrats d'activité protéolytique et chitinolytique du genre <i>Fusarium spp</i> vis à vis <i>Rhizopertha dominica</i> , <i>Sitophilus granarius</i> et <i>Sitophilus zeamais</i> .....	74
IV.9.4.1.Résultats.....	74
IV.9.4.2.Discussion.....	83
IV.10.Relation entre l'activité protéolytique et insecticide des filtrats d'activité protéolytique des champignons sélectionnés.....	86
IV.10.1.Résultats.....	86
IV.10.2.Discussion.....	93
IV.11.Relation entre l'activité chitinolytique et insecticide des filtrats d'activité chitinolytique des champignons sélectionnés.....	94
IV.11.1.Résultats.....	94
IV.11.2.Discussion.....	103
V. Conclusion.....	104
Références bibliographiques.....	107



# ***INTRODUCTION***

## I. Introduction

En Algérie, les produits céréaliers (blé , mais ,orge ,avoine ,riz blanche) occupent une place stratégique dans le système alimentaire et dans l'économie nationale (Djermoun ,2009), leur consommation s'estime à 230 kg /habitant/an (FAO, 2013).

Les insectes sont responsables de pertes de céréales stockées pouvant atteindre jusqu'à 10% à l'échelle mondiale (De Carvalho et al., 2013).Par ailleurs, en Algérie ,ces pertes peuvent atteindre plus de 2 % (FAO, 2013).

Parmi ceux ci *Rhyzopertha dominica* Fab, 1792 (Coleoptera:*Bostrichidae*) (Saroukolai et al., 2010; Edde, 2012),*Sitophilus zeamais* Motschulsky,1855(Coleoptera:*Curculionidae*)(Demissie et al., 2008) et *Sitophilus granarius* L,1758(Coleoptera:*Curculionidae*) (Piasecka-Kwiatkowska et al., 2013).

Le contrôle de ces insectes repose en grande partie sur l'utilisation des insecticides de synthèse (Kljajic et Peric, 2007;Islam et al.,2010). Ces produits chimiques sont rentables, mais leur utilisation massive a créé des problèmes tels que le phénomène de résistance, la pollution de l'environnement et des effets indésirables sur la santé humaine et sur les auxiliaires (Desneux et al., 2007;Pimentel et al., 2009; Islam et al., 2010; Ali et al., 2012).

Les risques et les problèmes associés à l'utilisation de produits chimiques conduisent à une réglementation environnementale de plus en plus strictes des pesticides (Pavela et al., 2007).

Il ya donc un besoin urgent de développer des alternatives efficaces respectueuses de l'environnement, plus sûres, faciles à utiliser et ont le potentiel de remplacer les pesticides de synthèse (Tapondjou et al., 2005).

Parmi ces alternatives, les champignons endophytes qui sont considérés actuellement comme un des groupes biologiques les plus prometteurs en matière de protection des plantes contre un bon nombre des insectes ravageurs et pathogènes (Vega et al., 2009).

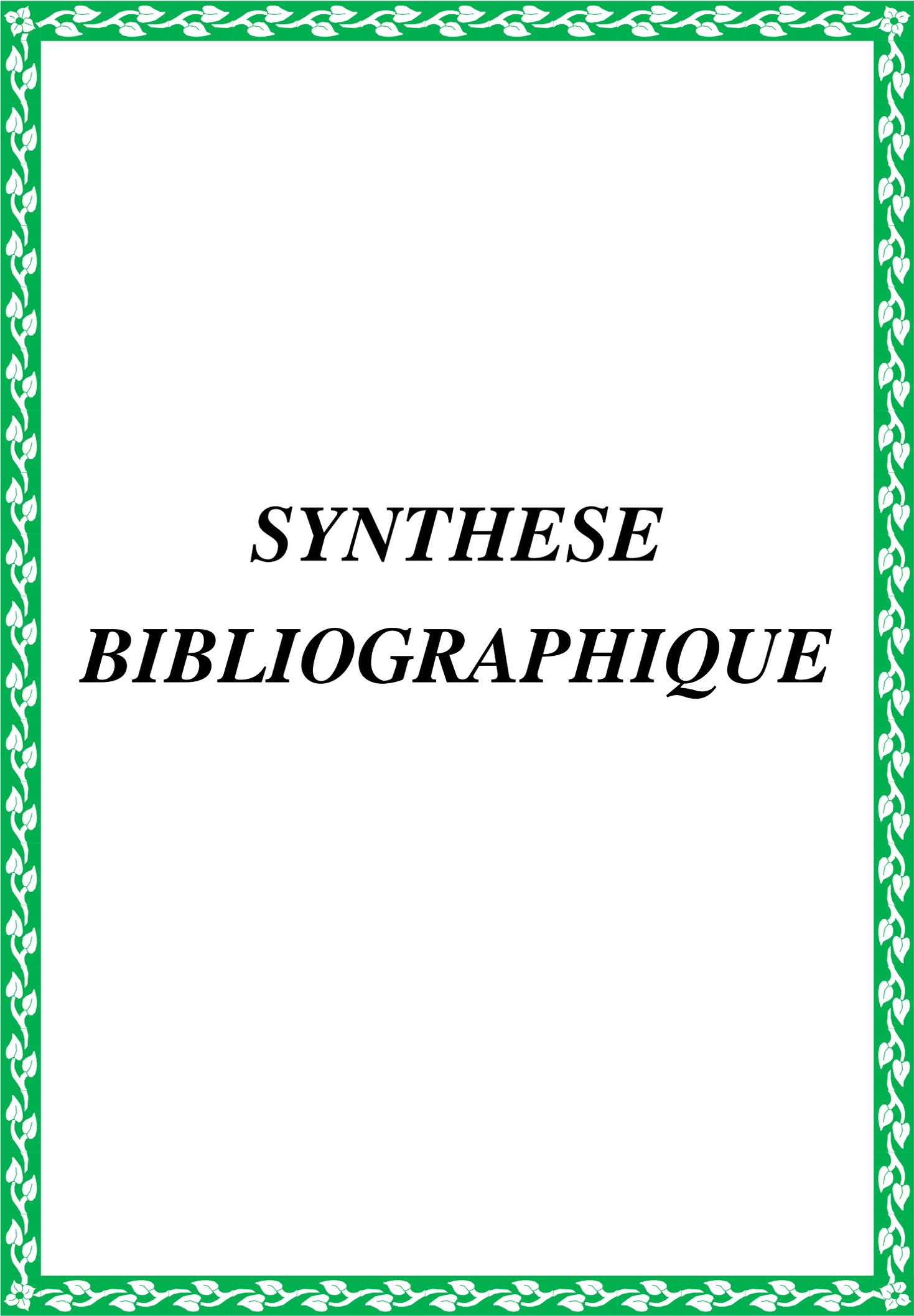
Dans ce contexte, la présente étude est focalisée dans la bioprospection des taxons fongiques endophytes isolés à partir des feuilles et des tiges du laurier rose (*Nerium oleander* L./ *Apocynaceae*) pour leur activité insecticide vis-à-vis de 3 coléoptères des denrées stockées *S. granarius*,*S.zeamais*,*R.dominica*.

Ce travail est structuré en 3 parties:

- La première partie est consacrée à une revue bibliographique mettant l'accent sur : les champignons endophytes,laurier rose (*Nerium oleander*) et les coléoptères des denrées stockées :*Sitophilus granarius*,*Sitophilus zeamais*,*Rhyzopertha dominica*.
- La deuxième partie illustre le matériel et les méthodes utilisées.

- Ainsi qu'une troisième partie démontrant les résultats obtenus en ce qui concerne les différentes expériences effectuées.

Enfin, une conclusion générale qui résume l'ensemble des résultats obtenus.



***SYNTHESE***  
***BIBLIOGRAPHIQUE***

### II. Synthèse bibliographique

#### II.1. Les champignons endophytes

##### II.1.1. Définition

Le terme endophyte a été inventé par Heinrich Anton de Bary en 1884 (Griffin,2014),il est composé de deux mots grecs, endon signifiant au sein et phyton désignant plante (Staniek et *al.*, 2008).

Ce terme est employé pour définir les microorganismes colonisants les tissus végétaux internes sans causer des symptômes apparents sur la plante hôte (Porras Alfaro et bayman, 2011).

Les études récentes ont prouvé que les microorganismes endophytes sont presque présents dans toutes les plantes (Wang et Dai, 2011).

Ces microorganismes colonisent l'espace intercellulaire ou intracellulaire, au moins pour une partie de leur vie sans causer des symptômes d'infection apparents (Kaul et *al.*, 2012).

##### II.1.2.L'interaction endophyte-plante hôte

Selon les espèces concernées, le résultat d'une interaction plante-endophytes peut aller de l'antagonisme au mutualisme (Zabalgozcoa, 2008).

Les champignons endophytes englobent des saprophytes latentes ,des espèces mutualistes et des pathogènes latents (Zabalgozcoa, 2008).

Parmi les champignons endophytes considérés comme pathogènes latents les champignons,il est à citer *Phomopsis citri*,*Fusicoccum aesculi* et *Lasiodiplodia theobromae* isolées à partir de *Citrus spp* (Wright, 1998) ainsi que *Phomopsis viticola* isolé à partir de *Vitis vinifera* (Mostert et *al.*, 2000).Ces agents sont co-évoluées avec leurs hôtes et ne sont donc pas très virulents, et ne causent aucun symptôme à leurs hôtes,mais si la plante est stressée ou bien la sénescence des feuilles commence,la sporulation de ces agents pathogènes commence (Sieber, 2007).

Plusieurs études récentes confirment que certaines espèces endophytes sont également décomposeurs de la litière (Promputtha et *al.*, 2010;Chaverri et Gazis, 2011;Purahong et Hyde, 2011;Sun et *al.*, 2011;Hirose et *al.*, 2013).

Certains champignons saprophytes trouvés couramment dans les parties sénescents de la plante ont été isolés comme endophytes des tissus sains (Promputtha et *al.*, 2007).

Il est à signaler que certains des endophytes ont la capacité de continuer à exister en tant que saprophytes dans les feuilles mortes (Unterseher et *al.*, 2013).

Ces champignons agissant comme des saprophytes latents, se développent d'une façon asymptomatique à l'intérieur des tissus de leurs plantes hôtes mais dans le cas de la

sénescence ou la mort des tissus de l'hôte, le développement et la sporulation de ces derniers débutent (Zabalgoceazcoa, 2008).

L'association mutualistique des champignons endophytes avec leurs plantes hôtes est asymptomatique (Ting,2014),agissant contre les prédateurs, les agents pathogènes, les herbivores et les insectes nuisibles (Lacava et Azevedo, 2014).

Ces champignons endophytes augmentent la résistance des plantes aux agents pathogènes par la production des agents antimicrobiens et des régulateurs de croissance. Ils améliorent également la tolérance du stress biotique et abiotique (Lacava et Azevedo,2014). En retour, les plantes hôtes fournissent la structure spatiale, la protection contre la dessiccation, les éléments nutritifs, la fourniture des photosynthétats et dans le cas de la transmission verticale ,la diffusion dans la prochaine génération des plantes hôtes(Clay,1988;Wolock-Madej et Clay, 1991;Knoch *et al.*,1993; Saikkonen *et al.*,1998;Faeth et Fagan,2002;Rudgers *et al.*,2004).

### II.1.3. Principaux rôles physiologiques

#### II.1.3.1. Contribution dans la tolérance au stress abiotique par la plante

Le stress abiotique cause la perte de plus de 50% des rendements des cultures potentiels à l'échelle mondiale (Boyer, 1982;Bray *et al.*, 2000;Sturz *et al.*, 2000;Singh *et al.*, 2011).

le stress abiotique pourrait être le résultat des pollutions par des métaux lourds,la sécheresse,la salinité et les contraintes de température (Liarzi et Ezra, 2014).Il est connu que les champignons endophytes améliorent la tolérance aux stress abiotique de leurs plantes hôtes (Saikkonen *et al.*, 2010 ;Vesterlund *et al.*, 2011).

##### II.1.3.1.1. Contribution dans la tolérance de la pollution par des métaux lourds

Le champignon endophyte *Neotyphodium gansuense* améliore la croissance de sa plante hôte *Achnatherum inebrians* sous une concentration élevée de cadmium par un mécanisme qui implique des activités enzymatiques anti-oxydantes (Zhang *et al.*, 2010b).De façon similaire,le champignon endophyte des racines de *Triticum aestivum* (variété Sardari ,39) *Piriformospora indica* réduit la teneur en cadmium dans le sol entourant les racines de sa plante hôte et améliore sa croissance (Shahabivand *et al.*, 2012).Il en est de même pour les champignons du genre *Neotyphodium* capable d'améliorer la croissance, la production de la biomasse et le potentiel d'accumulation du cadmium dans les racines de *Festuca arundinacea* et *Festuca pratensis* (Soleimani *et al.*, 2010a,b).D'autres travaux ont montré que le champignon endophyte *Sordariomycetes* sp. isolé à partir de feuilles de *Suaeda salsa* et introduit dans le riz *Oryza sativa*, améliore la croissance du riz sous une concentration modéré de plomb par un mécanisme qui implique l'amélioration de la photosynthèse et de

l'activité anti-oxydante (Li et *al.*, 2012). Il est à mentionner aussi que le champignon endophyte *Exophiala pisciphila* H93 favorise la croissance des racines et des pousses du maïs et améliore sa tolérance sous le stress due à la présence des métaux lourds (plomb, zinc et cadmium) (Li et *al.*, 2011).

### II.1.3.1.2. Contribution dans la tolérance de la sécheresse

La tolérance de la sécheresse des plantes infectées par des champignons endophytes a été démontrée dans plusieurs études (Arechavaleta et *al.*, 1992; Lewis et Vaughan, 1997; Malinowski et *al.*, 1998; Lewis, 2004; Malinowski et *al.*, 2005). Par exemple les deux champignons endophytes du concombre *Phoma glomerata* LWL2 et *Penicillium* sp. LWL3 augmentent la biomasse végétale dans des conditions de stress hydrique (Waqas et *al.*, 2012). Le même effet est observé pour les champignons endophytes des graminées qui augmentent le taux et la durée de croissance des racines contribuant à la protection de leurs plantes hôtes contre la sécheresse (Kuldau et Bacon, 2008). De même les champignons endophytes *Neotyphodium* sp., *Acremonium* sp., *Phialophora* sp. et *Curvularia* sp. confèrent aux graminées une tolérance de la sécheresse (Bacon et Hill, 1996; Bacon, 1993; West, 1994; Joost, 1995; Singh et *al.*, 2011).

Dans des conditions de stress hydrique, les champignons endophytes de la famille des *Clavicipitaceae* augmentent l'élasticité des parois cellulaires (White et *al.*, 1992), le taux de croissance des racines et des poils absorbants et diminuent le diamètre des racines (Malinowski et *al.*, 1997, 1999b).

Plus récemment, des métabolites secondaires fongiques et spécifiques ont été impliqués dans des mécanismes de tolérance à la sécheresse, telle que l'augmentation de la production des alcaloïdes qui affectent le potentiel osmotique ce qui réduit les effets de la sécheresse (Bush et *al.*, 1997; Hahn et *al.*, 2007).

Les alcaloïdes loline affectent le potentiel osmotique et donc de réduire les effets du stress due au sécheresse (Bush et *al.*, 1997).

Le niveau de ces alcaloïdes augmente en réponse à la chaleur ou à la sécheresse qui affecte l'équilibre osmotique et par conséquent protège les macromolécules de la dénaturation (Malinowski et Belesky, 2000).

Un autre mécanisme possible est l'implication des protéines déhydrines (Carson et *al.*, 2004). Au niveau cellulaire, il y a une association des champignons endophytes avec les déhydrins, un groupe de protéines intrinsèquement non structurés formés abondamment pendant la dernière phase d'embryogenèse (Carson et *al.*, 2004).

Cette association aide plusieurs plantes à tolérer la sécheresse ou la température (Richardson et al., 1990).

### II.1.3.1.3. Contribution dans la tolérance de la salinité

La salinisation des sols est une menace étendue de la productivité des cultures (Singh et al., 2011).

Environ 7% de la surface du globe terrestre est couverte par de sols salins (Ruiz Lozano et al., 1996), et 5% des terres cultivées ont un excès en teneur des sels (Munn et al., 1999).

Le champignon endophyte de l'orge *Piriformospora indica* élimine les effets du stress salin chez sa plante hôte par l'augmentation de l'activité métabolique dans les feuilles, l'induction de changements dans la composition des acides gras dans les feuilles, la régulation positive de l'activité des enzymes anti-oxydantes (Baltruschat et al., 2008), l'augmentation de la biomasse (Waller et al., 2005) et l'induction de la biosynthèse de l'éthylène dans les racines d'orge (Cao et al., 2006).

Le champignon endophyte du concombre *Paecilomyces formosus* LHL10 améliore la croissance et la tolérance de sa plante hôte de la salinité par l'accumulation de proline et des antioxydants (Khan et al., 2012a).

De la même manière, les champignons endophytes *Phoma glomerata* LWL2 et *Penicillium* sp. LWL3 augmentent également la biomasse et améliorent l'assimilation des éléments nutritifs essentiels du concombre dans des conditions du stress salin (Waqas et al., 2012).

L'association symbiotique plante hôte–endophyte agit contre le stress salin par la régulation de l'activité du glutathione, le catalase, le peroxydase, le polyphénol oxydase et l'acide abscissique, modification de l'acide jasmonique, et augmentation de la teneur en acide salicylique (Waqas et al., 2012).

Les 2 champignons endophytes *Penicillium minioluteum* LHL09 et *Penicillium funiculosum* LHL06 isolés à partir de *Glycine max.*L.(soja) améliorent la croissance de leurs plante hôte en régulant la biosynthèse des hormones et des flavonoïdes (Khan et al., 2011a). Il a été signalé aussi que le champignon endophyte du concombre *Exophiala* sp. LHL08 contribue dans la tolérance de la salinité par l'augmentation de la teneur en acide salicylique (Khan et al., 2011b).

### II.1.3.1.4. Contribution dans la tolérance à la chaleur et au froid

L'inoculation de plantes de *Dichanthelium lanuginosum* avec le champignon endophyte *Curvularia* sp. leur confère une tolérance d'une température élevée du sol où des plantes non inoculés ne peuvent pas survivre (Redman et al., 2002). Des constatations similaires sont

observées chez *Cucumis sativus* inoculé par *Paecilomyces formosus* LHL10 où la croissance est améliorée (Khan et al., 2012b).

Le mécanisme possible pour la tolérance de la chaleur implique des osmoprotectants tels que le tréhalose ,la glycine ,le bêtaïne ,la taurine et la mélanine (pigment) (Morsy et al.,2010).

### **II.1.3.2. Contribution dans la tolérance au stress biotique par la plante**

Le stress abiotique pourrait être le résultat de la compétition interspécifique, parasites invertébrés, herbivores (mammifères), les maladies causées par des agents phytopathogènes (Liarzi et Ezra, 2014).Il a été constaté que ces champignons améliorent la tolérance de leurs plantes hôtes (Arnold et al., 2003;Vega, 2008;Rocha et al., 2011).

#### **II.1.3.2.1. Contribution dans la tolérance de la compétition interspécifique**

*Centaurea stoebe* est une plante herbacée envahissante en Amérique du Nord ; la présence des champignons endophytes du genre *Alternaria* améliore sa capacité concurrentielle sans augmenter sa taille et le mécanisme par lequel ces endophytes augmentent la compétitivité de sa plante hôte est inconnue, mais elle n'est pas liée à la croissance accrue (Aschehoug et al., 2012).

Il a été suggéré que les mécanismes de la compétition interspécifique impliquent une augmentation de la reproduction végétative et la croissance des racines,la production des substances allélochimiques et du rendement en graines(Kuldau et Bacon 2008;Bush et al., 1997; Malinowski et al., 1999a).Par conséquent, une augmentation du nombre de talles, une plus grande vitesse d'élongation des feuilles et une modification de l'architecture des racines a été notée (Malinowski et Belesky, 2000).Dans ce sens des expériences sur terrain ont montré que la fétuque élevée *Festuca arundinacea* infectée par des champignons endophytes supprime d'autres graminées et plantes herbacées par rapport à la fétuque non infectée (Clay et Schardl ,2002).D'autres travaux ont mentionnée que les extraits de graines de la fétuque élevée *Festuca arundinacea* infectées par des endophytes inhibent la germination de *Trifolium* spp. (Springer, 1997). De même le nombre de trèfle blanc *Trifolium repens* a diminué dans les pâturages dominés par autres plantes infectées par des champignons endophytes (Sutherland et Hoglund, 1989).Il a été suggéré que les alcaloïdes loline améliorent la capacité concurrentielle des herbes endophytes infectées en retardant la mise en place de concurrents. Ceci est basé sur la constatation que les alcaloïdes loline sont le seul groupe d'alcaloïdes liés aux endophytes qui réduit le taux de germination des graines de monocotylédones et dicotylédones (Petroski et al., 1990).

Le champignon endophyte de *Cinna arundinacea* *Neotyphodium schardlii* réduit la vie de sa plante hôte,mais augmente sa capacité de régénération (Rudgers et al., 2012).

### II.1.3.2.2. Contribution dans la protection contre les parasites invertébrés

#### II.1.3.2.2.1. Protection contre les insectes ravageurs

Plusieurs endophytes ont des propriétés insecticides (Kaul, 2012). Des études ont mentionné que les métabolites secondaires des champignons endophytes tels que les alcaloïdes contribuent à la toxicité des insectes, en particulier la péramine (Ball et al., 1995; Rowan et al., 1986), l'ergovaline (Siegel et al., 1990; Wilkinson et al., 2000; Riedell et al., 1991), et les janthitremes (Tapper et Lane, 2004).

Il est à souligner que les endophytes du genre *Neotyphodium* contribuent dans la résistance de leurs plantes hôtes contre *Agrotis ipsilon* par la sécrétion de la N-acetyl norloline et la peramine et l'ergovaline (Baldauf et al., 2011).

Deux autres champignons endophytes *Claviceps purpurea* et *Claviceps* sp. et *Chaetomium* sp. de *Achnatherum inebrians* en Chine possèdent une activité insecticide significative contre *Aphis gossypii* (Zhang et al., 2010 a,b).

L'inoculation simultanée des courges par les champignons endophytes des racines *Fusarium oxysporum* Fo162 et *Rhizobium etli* G12 induit une résistance systémique et réduit l'effectif de la population *Aphis gossypii* Glover (Hemiptera, *Aphididae*) (Martinuz et al., 2012).

Une expérience de choix avec des courges montre que les pucerons préfèrent s'alimenter à partir des plantes dépourvues d'endophytes, ce qui indique que *Fusarium oxysporum* Fo162 et *Rhizobium etli* G12 affectent la préférence de la plante hôte par les pucerons (Martinuz et al., 2012).

L'inoculation du champignon endophyte *M. anisopliae* à l'intérieur des plantes de *Brassica napus* provoque un pourcentage de mortalité respective de 35,56.7 et 63.3 après 2,3,4 semaines des larves phytophages de *Plutella xylostella*. En comparaison avec des larves qui se nourrissent des plantes non inoculés par ce champignon où le pourcentage de mortalité a varié en fonction des mêmes dates d'observation de façon respective (15,18.3 et 11.7) (Batta, 2013).

Le sterigmatocystine et 13-hydroxyversicolorine B secrétés par le champignon endophyte *Podospora* sp. isolé à partir de *Laggera alata* sont utilisées contre le troisième stade larvaire d'*Anopheles gambiae* (Josphat et al., 2011).

Le résultat a été des valeurs de CL50 et CL90 de 13,3 et 73,5 ppm et une mortalité de 95% des individus traités observée à une concentration de 100 ppm après 24 h de traitement pour le sterigmatocystine, CL50 de 294,5 ppm et une mortalité de 95% des individus traités observée à une concentration de 1000 ppm pour le 13-hydroxyversicolorine B (Josphat et al., 2011).

L'alimentation et la survie de l'altise du maïs *Chaetocnema pulicaria* (Coleoptera, Chrysomelidae) est réduite par une infection de la fétuque élevée avec *N. coenophialum*, et le mécanisme proposé est l'antixénose (Ball et al., 2011). Similairement la prédation des graines par *Glyphipterix simpliciella* est plus faible pour des herbes de fétuque élevée contenant des champignons endophytes (Saari et al., 2010). Il en est de même pour les champignons endophytes isolés des feuilles de *Picea rubens* montre une toxicité contre *Choristoneura fumiferana* (Lepidoptera, Tortricidae) (Sumarah et al., 2010; Porras- Alfaro et Bayman, 2011). Le traitement des adultes d'*Acanthoscelides obtectus* par différentes concentrations (25%, 50%, 75%, 100%) du filtrat du champignon endophyte du *Nerium oleander* *Cladosporium* sp. provoque les taux de mortalités maximales suivants: 39%-41%-61%-84% respectivement) et cela après 48 heures (Laib, 2014).

### II.1.3.2.2. Protection contre les nématodes

Le champignon endophyte de la tomate *Fusarium oxysporum* souche 162 induit la résistance systématique contre le nématode *Meloidogyne incognita* (Martinuz et al., 2012) et *R. similis* dans la banane par application combinée avec le champignon *Paecilomyces lilacinus* souche 251 et la bactérie *Bacillus firmus* (Mendoza et Sikora, 2009).

*N. coenophialum* un champignon endophyte de la fétuque élevée provoque un épaissement des parois cellulaires endodermiques qui réduit la capacité de pénétration des racines par le nématode *Meloidogyne marylandi* (Gwinn et Bernard, 1993; Kimmons et al., 1990).

L'inoculation du *Fusarium oxysporum* et à un moindre degré, des espèces de *Trichoderma* dans les racines de la tomate et du bananier réduit les populations de nématodes (Sikora et al., 2008).

### II.1.3.2.3. Contribution dans la protection contre les agents phytopathogènes

Plusieurs mécanismes sont utilisés par les endophytes pour la protection de leurs plantes hôtes contre les agents phytopathogènes (Kuldau et Bacon, 2008; Reinhold-Hurek et Hurek 2011). Parmi eux :

#### II.1.3.2.3.1. Induction de la résistance systémique chez la plante hôte

L'endophyte induit une résistance systémique chez sa plante hôte (Chen et al., 1995; Kloepper et Beauchamp, 1992; Kunkel et al., 2004; Waller et al., 2005; Serfling et al., 2007; Waller et al., 2008) qui est un mécanisme important dans la protection de la plante contre les agents phytopathogènes qui implique les champignons endophytes ou leurs métabolites (Kloepper et Ryu, 2006; Compant et al., 2005).

Les champignons endophytes peuvent induire la résistance systémique de leurs plantes hôtes contre les agents pathogènes après avoir pénétré activement et coloniser ces derniers,

favorisant la synthèse de composés biologiquement actifs ou provoquant des changements dans la morphologie et / ou la physiologie végétale (Hanada et *al.*, 2010).

Les champignons endophytes peuvent également produire des métabolites secondaires qui inhibent directement les agents pathogènes ou produisent des éliciteurs qui stimulent la plante à produire ce type de métabolites secondaires (Liarzi et Ezra, 2014).

Les métabolites secondaires produits par les arbres et les plantes ligneuses pour leur protection contre les agents pathogènes des plantes sont bien connus et ont été étudiés (Liarzi et Ezra, 2014). Parmi ces métabolites les phytoalexines comme les flavonoides et les terpénoïdes (Smith, 1996).

Les plantes produisent les polyphénols et des enzymes liés à la défense comme la phénylalanine ammoniac lyase, la peroxydase, la catalase et le super oxyde dismutase et les champignons endophytes peuvent également favoriser la production de plantes de ces molécules (Liarzi et Ezra, 2014).

Parmi les éliciteurs produits par ces endophytes les lipopolysaccharides, les polysaccharides, et les glycoprotéines qui stimulent la production des métabolites secondaires de défense par leurs plantes hôtes, Ces derniers suppriment efficacement les agents pathogènes (Gao et *al.*, 2010, 2011).

### **II.1.3.2.3.2. Fortification des parois des cellules végétales de la plante hôte**

L'épaississement de la paroi cellulaire est due au dépôt de callose et l'accumulation de composés phénoliques sur le site de contact avec l'agent pathogène (Benhamou et *al.*, 1998). Les enzymes sont également impliqués dans la synthèse de lignine qui forme une barrière de protection supplémentaire contre la pénétration par des agents pathogènes (Pankhurst et *al.*, 1979).

Certains champignons endophytes de l'orge provoquent un épaississement des parois des cellules chez leur plante hôte et par conséquent limitent la pénétration par l'agent pathogène *Verticillium longisporum* (Narisawa et *al.*, 2004).

### **II.1.3.2.3.3. Exclusion de niche écologique**

Étant donné que les populations biologiques d'un écosystème interagissent les uns avec les autres, des interactions positives (commensalisme, mutualisme et synergie) peuvent permettre à certaines populations de fonctionner comme une communauté au sein de cet habitat (Liarzi et Ezra, 2014).

Les interactions positives entre les populations autochtones sont généralement plus développées dans les communautés matures que dans les communautés nouvellement établies (Liarzi et Ezra, 2014).

Ainsi, le nouveau agent pathogène sera confrontée à des réactions négatives de la part des populations autochtones (Sturz et *al.*, 2000).

Les champignons endophytes protègent leurs plantes hôtes par la colonisation rapide et l'épuisement des substrats disponibles et limitées de sorte qu'aucune source nutritive ne soit disponible pour les agents pathogènes (Pal et Gardener, 2006).

Dans les tissus de la plante hôte la diversité des champignons endophytes est principalement limitée par la concurrence entre eux pour l'alimentation ou le microhabitat, ce qui limite l'invasion des tissus par d'autres micro-organismes endophytes ou des agents pathogènes (Albrechtsen et Witzell, 2012).

### **II.1.3.2.3.4. Promotion de la croissance de la plante hôte pendant l'attaque de l'agent pathogène**

l'effet positif de l'endophyte pour sa plante hôte n'est pas seulement limité à la suppression de l'agent pathogène, mais aussi à la promotion de la croissance au moment de l'infection par l'agent pathogène (Liarzi et Ezra, 2014).

le champignon endophyte *Fusarium verticillioides* module la croissance de l'agent pathogène *Ustilago maydis* dans le maïs et diminue son agressivité vers la plante en interférant au début du processus d'infection (Lee et *al.*, 2009).

### **II.1.3.2.3.5. Production des composants antimicrobiens**

Ces champignons produisent une variété de composés antimicrobiens provoquant une anomalie de croissance des hyphes de l'agent pathogène (Ting, 2014). Les composants antimicrobiens sont des substances de faible poids moléculaire, actifs à de faibles concentrations contre d'autres micro-organismes (Guo et *al.*, 2000). Par exemple *Trichoderma virens* souche 223 produit un chitinase contre le pathogène *Ceratocystis paradoxa* sur la canne à sucre (Romão-Dumaresq et *al.*, 2012). Il en est de même pour le champignon endophyte *Phoma* sp. isolé à partir de différentes plantes médicinales qui a été signalé comme une source prometteuse de composés antimicrobiens (Kaul, 2012).

Parmi ces composés antimicrobiens produits par *Phoma* sp. isolé à partir *Arisaema erubescens* le 3,6,7- trihydroxy-a-tétralone, cercosporamide, b-sitostérol, le trichodermine (Wang et *al.*, 2012).

Ces composés isolés ont démontré une activité antifongique contre *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum gloeosporioides* et *Magnaporthe oryzae* et antibactérienne contre les bactéries pathogènes *Xanthomonas campestris* et *Xanthomonas oryzae* (Wang et *al.*, 2012).

Les sesquiterpènes, diterpènes et triterpénoïdes sont les principaux terpénoïdes produites par les champignons endophytes et qui possèdent une activité antimicrobienne (Kaul, 2012).

Le champignon endophyte *Phomopsis cassiae* isolé à partir de *Cassia spectabilis* produit cinq sesquiterpènes de cadinane, le 3,9,12-trihydroxycalamenènes; 3,12-dihydroxycalamenène; 3,12-dihydroxycadalène et 3,11,12-trihydroxycadalène. ce dernier est le composé le plus actif contre les champignons phytopathogènes (Silva et al., 2010).

Le champignon *Xylaria* sp. isolé à partir de *Piper aduncum* également produit deux sesquiterpènes de presilphiperfolane ayant une activité antifongique (Silva et al., 2010). Liu et al. (2008) ont rapporté que *Xylaria* sp. YX-28 isolé à partir de *Ginkgo biloba* produit l'acide 7-amino-4-méthylcoumarine (C<sub>10</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>2</sub>) ayant une activité antibactérienne et antifongique contre de nombreux micro-organismes pathogènes. Le champignon endophyte *Chaetomium globosum* isolé à partir *G. biloba* produit les chaetomugiline D, chaetomugiline A et chaetoglobosine C (Qin et al., 2009).

Ces composés sont des dérivés de l'azaphilone chlorée et ont une activité significative contre *Artemia salina* et *Mucor miehei* (Qin et al., 2009).

*F. solani* isolé à partir de *Taxus baccata* produit le 1-tétradécène et le 8 octadécane, ,8 pentadécane, octylcyclohexane et le 10 nonadécane avec une activité antibactérienne et antifongique (Tayung et al., 2011).

Li et al. (2012) ont rapporté deux alcaloïdes qui possèdent une activité antifongique le 12b-hydroxy-13a-méthoxyverruculogène TR-2 et le 3- hydroxyfumiquinazoline A produites par le champignon endophyte du *Melia azedarach* *A. fumigatus* LN-4.

Deux métabolites l'asperfumoïde et l'asperfumine isolés à partir d'*Aspergillus fumigatus* CY018 un champignon endophyte du *Cynodon dactylon* inhibent le développement de *Candida albicans* (Liu et al., 2004).

*Acremonium zeae* un endophyte de maïs a montré une activité antifongique significative contre *Aspergillus flavus*, *Fusarium verticillioides* et une activité antibactérienne contre la plupart des bactéries Gram-positives (Wicklow et al., 2005).

Cette activité est due à la production par ce champignon des métabolites antibiotiques qui sont les pyrrocidines A (C<sub>31</sub>H<sub>37</sub>NO<sub>4</sub>) et B (C<sub>31</sub>H<sub>39</sub>NO<sub>4</sub>) (Wicklow et al., 2005). Le naphthaquinone antibactérien Javanicine (C<sub>15</sub>H<sub>14</sub>O<sub>6</sub>) présentant une activité contre *Pseudomonas* sp. a été isolé à partir de *Chloridium* sp. un endophyte d'*Azadirachta indica* (Kharwar et al., 2008).

Le cryptocandin (C<sub>15</sub>H<sub>82</sub>N<sub>8</sub>O<sub>17</sub>) est un composant produit par le champignon endophyte *Cryptosporiopsis cf. quercina* a effet antifongique contre *C.albicans*, *Trichophyton rubrum*, *Sclerotinia sclerotiorum* , *Botrytis cinerea* (Strobel et al., 1999).

### II.1.3.2.3.6. Hyper parasitisme et prédation

L'hyperparasitisme est une stratégie écologique utilisé par les endophytes pour protéger leurs plantes hôtes pendant laquelle l'agent pathogène est directement attaqué et détruit par un endophyte particulier (Tripathi et al., 2008). Il a été observé que les champignons endophytes parasitent les hyphes des champignons phytopathogènes en pénétrant ces derniers et en sécrétant la lyase pour décomposer leurs parois cellulaires (Grosch et al., 2006).

Par exemple, *Trichoderma* sp. est capable de parasiter les hyphes de *Rhizoctonia solani* (Grosch et al., 2006). La prédation microbienne est une manière plus générale de suppression des agents phytopathogènes où certains endophytes montrent un comportement de prédation dans des conditions nutritives limitées (Benhamou et Chet, 1997).

Par exemple, *Trichoderma* sp. produit une série d'enzymes capables d'attaquer directement contre les parois cellulaires de champignons phytopathogènes (Benhamou et Chet, 1997).

## II.2. *Nerium oleander* L. (1753 )

### II.2.1. Noms communs

الدفلة (arabe), laurier rose (Français) ; rose bay (Anglais) (Halimi, 1997).

### II.2.2. Synonymes

*Nerion oleandrum* St.-Lag., *Nerium carneum* Dum.Cours, *Nerium flavescens* Spin *Nerium floridum* Salisb, *Nerium grandiflorum* Desf, *Nerium indicum* Mill., *Nerium japonicum* Gentil, *Nerium kotschy* Boiss, *Nerium latifolium* Mill, *Nerium lauriforme* Lam, *Nerium luteum* Nois. ex Steud, *Nerium madonii* M.Vincent, *Nerium mascatense* A.DC, *Nerium odoratissimum* Wender, *Nerium odoratum* Lam, *Nerium odorum* Aiton, *Nerium splendens* Paxton, *Nerium thyrsiflorum* Paxton, *Nerium verecundum* Salisb, *Oleander indica* (Mill.)Medik, *Oleander vulgaris* Medik.

### II.2.3. Taxonomie

Selon Zipcodezoo (2012) laurier rose est classé comme suit :

**Domaine:** Eukaryota ,**Royaume:** Plantae ,**Sous-royaume :**Viridiaeplantae,**Phylum:** Tracheophyta ,**Sous-phylum:** Euphyllophytina ,**Infraphylum:** Radiatopses ,**Classe:** Spermatopsida ,**Sous-classe:** Asteridae ,**Superordre:** Gentiananae ,**Ordre:** Gentianales ,**Famille:** Apocynaceae ;**Sous-famille:** Apocynoideae ,**Tribu:** Wrightieae ,**Genre:** *Nerium*  
**Espèce:** *Nerium oleander* L.

### II.2.4. Description

*Nerium oleander* est un arbuste à feuilles persistantes (Bandara et *al.*, 2010) atteignant 2-6 m de hauteur (Kawalekar et *al.*, 2012) et 2.5 à 4.5 m de largeur (Orecchio et Amorello, 2009) (Figure 1).

La Tige est ramifiée et de couleur grisâtre; feuilles sont coriaces, linéaires, lancéolées, vert foncé, à nervation réticulée, courtes et étroites, opposées ou verticillées par 3 (Kawalekar et *al.*, 2012).

Les fleurs poussent en grappes à l'extrémité de chaque branche, de couleur blanche, rose à rouge (Pankhurst, 2009) de 5 cm de diamètre environ et possède 5 pétales, en corymbes terminaux, ont une corolle infundibuliforme à gorge rose s'évasant en 5 lobes étalés et ornés d'un appendice à 3-4 dents courtes, s'épanouissent de fin juin à début septembre, sont de teinte rose ou blanche, disposées en corymbe (Delille, 2007) (Figure 1).

Ils sont souvent mais pas toujours parfumées (Bingtao et *al.*, 2009). Le fruit mesure 10 à 12 cm de longueur et 6 à 8 millimètres de diamètre comporte deux follicules allongés soudés jusqu'au début de la déhiscence (Pearn, 1987) (Figure 1).

La graine est duveteuse, est surmontée d'une aigrette sessile qui en facilite la diffusion (Paris et Moyses, 1971; Bruneton, 2001; Hussain et Gorski, 2004) (Figure 1).



a



b



c



d



e

**Figure 1.** Différentes parties de *N. oleander* L. a. Jeune arbustre, b. feuilles, c. fleurs, d. fruits, e. graines (photos personnelles).

### II.2.5. Ecologie et distribution géographique

*Nerium oleander* L. (Apocynaceae) est largement distribué dans la région méditerranéenne, l'Asie subtropicale, et le sud-ouest des États-Unis (Siddiqui et al., 2012).

Cette espèce est souvent cultivée dans les jardins comme plante ornementale, clôture et brise-vent (Perry et Metzger, 1978; Sharma et al., 2010).

Elle pousse sur des sols bien drainés, le long des cours d'eau et les ravins secs des zones côtières et intérieures à une hauteur de 800 m au niveau de la mer (Orecchio et Amorello, 2009).

Elle tolère la sécheresse et parfois un léger gel (-10°C) (Soundararajan et Karrunakaran, 2010).

### II.2.6. Activité insecticide

Les petits producteurs de Sud-Ouest de la France avaient coutume de mettre dans les sacs de grains des plantes odorantes comme la menthe, l'ail ou laurier rose (Elmodafar et al., 2000). *N.oleander* est utilisé d'une manière traditionnelle sous forme de boutures par les agriculteurs dans la région de Constantine pour limiter les dégâts des vers blancs (Madaci et al., 2008).

Les boutures de *N.oleander* ont un effet répulsif sur les larves de *Rhizotrogini* sp., elles sont repoussées à une profondeur de 20cm (Madaci et al., 2008).

Les larves de *Schistocerca gregaria* s'alimentant avec *N. oleander* ne pouvaient pas muer et leur développement a été affectée avec un taux de mortalité de 50% enregistré au 4<sup>ème</sup> jour et 100% au 12<sup>ème</sup> journée (Bagari et al., 2013).

Le traitement des adultes de *Callosobruchus chinensis* avec différentes concentrations (0,1%, 0,5%, 1%, 2,5%, 5%) de l'extrait de *N.oleander* provoque une mortalité de (0,18,18,81,95%) respectivement (Aboelghar et Elsheikh, 1987).

Egalement, l'utilisation de l'extrait de cette plante avec différents concentrations (1%, 2%, 3%) contre les larves des moustiques des genres *Anopheles*, *Aedes*, *Culex* provoque des mortalités qui varie entre 0 et 100% après 72H du premier traitement (Lokesh et al., 2010).

L'extrait aqueux des feuilles provoque une toxicité pour les quatre stades larvaires et les nymphes d'*Anopheles stephensi* (Roni, 2012).

### II.2.7. Activité antifongique

l'extrait éthanolique de *N. oleander* avec différentes concentrations (0,3-0,9%) montre une activité antifongique contre les champignons *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Rizoctonia solani* avec une capacité d'inhibition qui varie entre 8,7% pour *Alternaria alternata* et 90,3% pour *Fusarium oxysporum* (Hadizadeh, 2009).

Le traitement du bois de *Fagus orientalis* L. et *Pinus sylvestris* L. avec des extraits de feuilles et les fleurs de laurier rose provoque une perte de poids entre 5,54 et 10,98% pour *P. placenta* et entre 5,02 et 28,25% pour *T.versicolor* par contre les échantillons de bois non traité a une perte de poids comprise entre 27,37 et 30,66% pour *P. placenta* et 8,64 et 24,06% pour *T. versicolor* (Goktas et al., 2007).

L'extrait brut de *N.oleander* montre une Activité antifongique Contre *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus*, *A. Niger*, *Fusarium moniliforme*, *Penicillium expansum* et *Rhizopus oryzae* avec des zones d'inhibition de 20,12,5,5,15,10 mm respectivement (Elsawi et al., 2010).

### II.2.8.Activité antibactérienne

Les différents types d'extraits de *N.oleander* montrent une forte activité antibactérienne contre *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* (Hussain et Gorski, 2004), contre *Escherichia coli* (PTCC 1047), *Staphylococcus épiderme* (PTCC 1114), *Staphylococcus aureus* (PTCC 1112), *Bacillus cereus* (PTCC 1247), *Erwinia carotovora* (PTCC 1675), *Bacillus pumillus* (PTCC 1319) (Germi et al., 2013). et aussi contre *S. lutea* et *K. pneumoniae* (Abu Hena Mostafa Djamel et al., 2012).

### II.3. Les espèces des coléoptères des denrées stockées choisies

#### II.3.1. *Rhyzopertha dominica* (Fabricius,1792)

##### II.3.1.1.Noms communs

ثاقبة الحبوب الصغرى (arabe) (Elhadjismail,2014); Capucin des grains (Français); Lesser grain borer (Anglais) (Elhadjismail, 2014).

##### II.3.1.2.Synonymes

*Synodendron dominicum* Fabricius,1792, *Synodendron pusillum* Fabricius,1798.*Ptinus fissicornis* Marsham,1802, *Ptinus picus* Marsham ,1802, *Rhyzopertha pusilla* Stephens,1830, *Apate rufa* Hope,1845-47, *Apate pusilla* Fairmaire,1850, *Bostrychus moderatus* Walk., *Dinoderus frumentarius* Motschulsky,1857, *Dinoderus pusillus* Horn,1878, *Rhyzoperta dominica* (F.), *Rhyzopertha dominica* Lesne,1896, *Rhyzopertha rufa* Waterhouse ,1888,*Rhyzopertha pusilla* Fabricius, *Synodendron dominica* Fabricius.

##### II.3.1.3. Description des stades biologiques

###### II.3.1.3.1. L'œuf

L'œuf est généralement blanc au moment de la ponte, tournant au rose ou brun avant l'éclosion, de forme ovoïde, de 0,6 mm de longueur et 0,2 mm de diamètre (Potter, 1935).

### II.3.1.3.2.La larve

Il ya généralement quatre stades larvaires, les larves sont scarabaeiformes, les deux premiers stades ne sont pas recourbés, les troisième et quatrième stades ont la tête et le thorax recourbés vers l'abdomen (Potter, 1935).

Les diamètres de la tête de la première au quatrième stade sont de 0,13, 0,17, 0,26 et 0,41 mm et la longueur des larves sont de 0,78, 1,08, 2,04 et 3,07 mm, respectivement (Potter, 1935) À l'éclosion la larve présente une épine pygidiale caractéristique, de couleur jaune (Delobel et Tran,1993) (Figure 2 a).

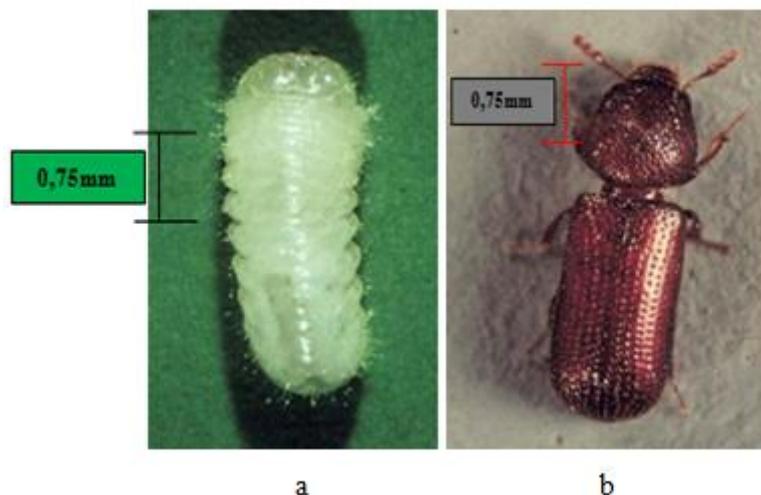
A maturité, elle est de couleur blanchâtre et avec une tête brunâtre et des mandibules plus sombres et armées de trois dents distinctes (Delobel et Tran, 1993). L'antenne comporte deux articles distincts seulement et la cuticule est revêtue d'une pilosité brun pâle (Delobel et Tran, 1993).

### II.3.1.3.3.L'adulte

Les adultes (Figure 2 b) sont de 2-3 mm de diamètre, brun rougeâtre et cylindrique (Potter, 1935) mince et de forme semblable à une balle (Hagstrum et *al.*,2012).

Les élytres sont parallèles, et le pronotum possède des dents (Potter,1935) ornés de lignes de gros points enfoncés (Delobel et Tran,1993).

La tête n'est pas visible (Potter,1935) et remonté sous le thorax (Hagstrum et *al.*,2012).l'antenne a 10 segments les 3 derniers forment une massue (Hagstrum et *al.*,2012).



**Figure 2.** *R.dominica* a,Larve L4,b.Adulte (USDA,1986).

### II.3.1.4. Taxonomie

Selon Zipcodezoo (2014) le capucin des grains est classé comme suit :

**Domaine:** *Eukaryota* ,**Royaume:** *Animalia* ,**Sous royaume:** *Bilateria* ,**Branche:** *Protostomia*  
**Infraroyaume:** *Ecdysozoa* ,**Superphylum:** *Panarthropoda* ,**Phylum:** *Arthropoda*  
**Subphylum:** *Mandibulata* ,**Infraphylum:** *Atelocerata* ,**Superclasse:** *Panhexapoda*  
**Epiclasse:** *Hexapoda* ,**Sousclasse:** *Dicondylia* ,**Infraclasse:** *Pterygota* ,**Ordre:** *Coleoptera*  
**Sous ordre:** *Polyphaga* ,**Infra ordre:** *Bostrichiformia* ,**Superfamille:**  
*Bostrichoidea* ,**Famille:** *Bostrichidae* ,**Genre:** *Rhyzopertha* ,**Espece :** *Rhyzopertha dominica*.

### II.3.1.5. Gamme d'hôtes

Les capucins des grains infestent tous les types de céréales, mais préfèrent le blé, le maïs ou le riz (Hagstrum et al., 2012), Ils se nourrissent aussi sur les arachides, les noix, les fèves, le cacao, les haricots ainsi que des produits transformés tels que les pâtes, le tabac et les épices séchées ; Ils se développent bien dans la farine créée par l'infestation initiale d'autres coléoptères (Hagstrum et al., 2012).

*R.dominica* peut s'alimenter sur des glands de *Quercus muehlenbergii* , les fruits de *Celtis occidentalis*, *Prunus angustifolia*, *Juglans nigra* et *Symphoricarpos orbiculatus* (Nansen et al., 2004 ; Jia et al., 2008).

### II.3.1.6. Biologie

La ponte commence environ 15 jours après l'émergence et peut durer pendant 4 mois, les femelles survivent pendant plusieurs jours après la ponte (Mason, 2003a). La femelle pond jusqu'à 500 œufs qui sont disposés à l'extérieur des grains souvent en groupes, le développement des œufs prend 32 jours à 18,1 °C, mais seulement cinq jours à 36 °C (Hagstrum et al., 2012).

La teneur en humidité du grain est critique pour la ponte et le développement, le blé ayant une teneur en humidité inférieure à 8% n'est pas adapté à la ponte (Hagstrum et al., 2012). Après l'éclosion les jeunes larves creusent à l'intérieur des grains et se nourrissent de ces derniers, l'insecte a de quatre à cinq stades larvaires ou deux à sept (Hagstrum et al., 2012).

Les températures limites pour le développement des larves sont de 18,2 °C et 38,6 °C (Arbogast, 1991).

Le développement larvaire est plus rapide sur grains entiers que sur un repas à base de la même graine et prend habituellement 27- 31 jours à 28 °C et 46 jours à 25°C, les jeunes larves ne peuvent pas pénétrer dans les grains intacts (Mason, 2003a;Hodges, 1986). La nymphose est effectuée dans la cavité d'alimentation à l'intérieur de grain et l'insecte prend

la forme d'un adulte progressivement, elle dure d'environ 5-6 jours à 28°C et 8 jours à 25°C (Mason, 2003a).

Les adultes restent généralement dans la graine pendant quelques jours avant l'émergence (Hagstrum et al., 2012). La durée de vie de l'adulte peut atteindre les 240 jours (Mason, 2003a).

### II.3.1.7. Distribution géographique

L'insecte est cosmopolite, il existe en Australie, en Amérique, en Europe et en Afrique (Balachowsky et Mesnil, 1936). Il se trouve particulièrement dans les zones tempérées et tropicales (Rees, 2007).

### II.3.1.8. Dégâts

*R. dominica* est un ravageur potentiel qui cause des pertes dans la quantité et la qualité de graines stockées (Sanchez-Marinez et al., 1997) et cela demande des coûts financiers immenses pour lutter contre ce ravageur (Cuperus et al., 1990; Anon, 1998).

Des expériences en laboratoire ont estimé que *R. dominica* consomme 0,15 g de blé pendant sa vie (Campbell et Sinha, 1976).

Storey et al. (1983) ont fait un échantillonnage des graines de blé, maïs et avoine à partir des différentes fermes en USA entre 1976 et 1979, ils estiment que *R. dominica* était présent dans 2,6% des échantillons de blé, 0,4% des échantillons de maïs et 0,5% des échantillons d'avoine.

Les échantillons incubés de telle sorte que tous les stades immatures pourraient se développer jusqu'au stade adulte avant tamisage ensuite ils enlèvent et comptent tous les adultes.

Pour le blé, ces mêmes auteurs ont trouvé 160 insectes / kg de blé, 7 insectes / kg de maïs et 23 insectes / kg d'avoine.



**Figure 3.** Dégâts causés par *R. dominica* sur des graines d'orge (Photo personnelle).

### II.3.2. *Sitophilus granarius* (Linnaeus, 1758)

#### II.3.2.1. Noms communs

سوسة الحنطة (arabe) (Elhadjismail, 2014), Granary weevil (Anglais); Charançon du blé (Français) (Delobel et Tran, 1993).

#### II.3.2.2. Synonymes

*Curculio granarius* Linnaeus, 1758, *Curculio contractus* Geoffroy, 1785, *Calandra granaria* Gistel, 1848.

#### II.3.2.3. Description des stades biologiques

##### II.3.2.3.1. L'Œuf

Il est opaque, blanc brillant, ovoïde à forme de poire, plus large en dessous qu'au centre avec une longueur 0,68 au 0,80 mm et une largeur d'environ 0,33 mm (Coton, 1921).

##### II.3.2.3.2. La larve

Elle est d'une longueur de 2-3mm de long, très bombées en dessus et plates en dessous avec une tête brunâtre et hémisphérique et des mandibules à pointes plus foncée et munies d'une dent subapicale interne très prononcée précédée d'une autre petit dent (Balachowsky et Mesnil, 1936).

Les larves ont un labre transverse, des palpes maxillaires gros et arrondies, appliqués non divisés dorsalement, munis de 2 petites articles et un prothorax non divisée dorsalement, méso et métathorax présentant chacun 2 lobes en dessus, un antérieur et un postérieur (Balachowsky et Mesnil, 1936) (Figure 4 a).

##### II.3.2.3.3. L'adulte

Il est de 4 mm de long, brun foncé, ovale, avec des longues pattes et une tête prolongé par un long rostre, les élytres sont striées et ponctuées de gros points, la deuxième paire des ailes est absente, le thorax avec des perforations ovales (Rees, 2007) (Figure 4 b).

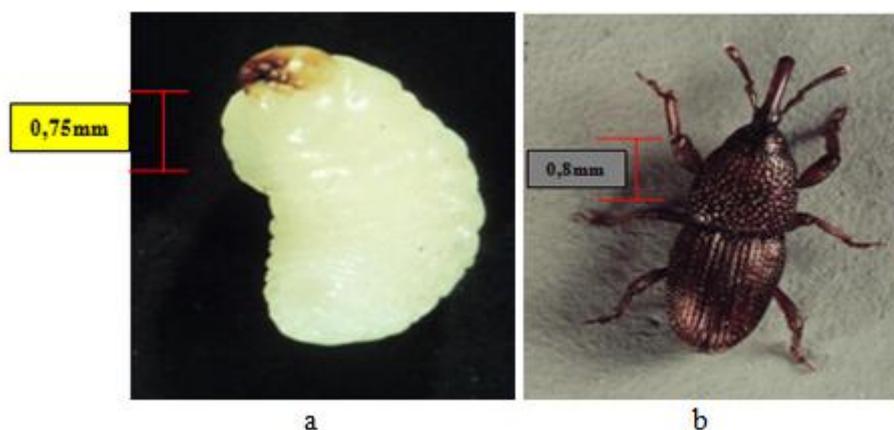


Figure 4. *S. granarius* a, Larve L4, b. Adulte (USDA, 1986).

### II.3.2.4. Taxonomie

Selon Zipcodezoo (2014) le charançon du blé est classé comme suit :

**Domaine:** *Eukaryota* ,**Royaume:** *Animalia*,**Sous royaume:** *Bilateria*,**Branche:** *Protostomia*  
**Infraroyaume:** *Ecdysozoa*,**Superphylum:** *Panarthropoda*,**Phylum:** *Arthropoda*  
**Subphylum:** *Mandibulata*,**Infraphylum:** *Atelocerata* ,**Superclasse:** *Panhexapoda*,**Epiclasse:** *Hexapoda*,**Sousclasse:** *Dicondylia*,**Infraclasse:** *Pterygota*,**Ordre:** *Coleoptera*,**Sous ordre:** *Polyphaga* ,**Infra ordre:** *Cucujiformia* ,**Superfamille:** *Curculionoidea* ,**Famille:** *Curculionidae*,**Sous famille :** *Rhynchophorinae*,**Genre:** *Sitophilus*  
**Espèce:** *Sitophilus granarius*.

### II.3.2.5. Gamme d'hôtes

Ils se nourrissent de grains de céréales intacts et brisées y compris l'orge, le sarrasin, le maïs, le millet, l'avoine, le riz, le seigle et le blé ; Ils sont également signalés dans les graines de tournesol et les fruits du châtaigner (Lyon, 2011).

Ils ne peuvent pas se développer dans un matériau finement broyé comme la farine, mais peuvent survivre dans de nombreux matériaux fabriqués à base de céréales tels que les pattes (Hagstrum et al., 2012).

### II.3.2.6. Biologie

Les femelles de *S.granarius* pondent 150 à 300 œufs pendant leur vie et les déposent individuellement dans des cavités que la femelle fore dans les grains de céréales et scelle par un bouchon cireux sécrété par cette dernière (Longstaff, 1981).

Les femelles de *S. granarius* préfèrent pondre leurs œufs dans des graines propres plutôt que dans des grains sur lesquels des charançons se sont nourri auparavant (Niewiada et al., 2005). Elle pondent également leurs œufs loin de l'embryon pour les protéger d'autres coléoptères (Niewiada et al., 2005).

L'embryon se développe pendant environ 4-14 jours avant l'éclosion, en fonction de la température et de l'humidité (Longstaff, 1981).

Lorsque plus d'un œuf sont pondus, un seul adulte émergera de chaque grain en raison de cannibalisme entre les larves, quatre-vingt pour cent des œufs éclosent lorsque les conditions sont bonnes, les œufs pondus par les femelles âgées ont des taux d'éclosion inférieurs aux femelles plus jeunes (Arbogast, 1991).

Il ya quatre stades larvaires, la larve du premier stade larvaire en s'alimente en creusant un tunnel dans la graine, la nymphose a lieu à l'intérieur du grain (Longstaff, 1981).

À la fin de quatrième stade, la larve utilise un mélange de sciure et son propre sécrétion pour former une cellule de chrysalide (Longstaff, 1981).

Dans des conditions normales de développement, les larves de charançon permettent à leurs excréments de s'accumuler autour d'elles à l'intérieur du grain dans lequel elles se nourrissent; Cependant, si la teneur en dioxyde de carbone est supérieure à 5%, le quatrième stade larvaire fait un petit trou dans le grain et éjecte une grande partie des excréments (Longstaff, 1981).

À la fin de développement l'adulte creuse son chemin hors de la graine en laissant un trou d'émergence avec des bords irréguliers (Bousquet, 1990 ; Kirkpatrick et Wilbur, 1965). Après avoir quitté la graine, les femelles libèrent une phéromone sexuelle pour attirer les mâles et réaliser l'accouplement (Mason, 2003b).

Les adultes vivent sept à huit mois dans les silos de stockage, se déplaçant autour de la masse de grains tout au long de la journée (Hagstrum et *al.*, 2012).

### II.3.2.7. Distribution géographique

*S. granarius* se trouve dans le monde entier, il existe en Australie, en Amérique, en Europe, en Afrique et dans toute la région tropicale (Balachowsky et Mesnil, 1936).

### II.3.2.8. Dégâts

*S. granarius* se développe en s'alimentant sur la graine entière, ne laisse que les cosses et la farine en cas d'une forte infestation, ainsi que les trous de sorties des adultes (Campbell et Sinha, 1976) (Figure 5).

Les pertes peuvent atteindre 3-5 % du poids total des grains (Balachowsky et Mesnil, 1936).

Les excréments comme les matières fécales et de produits urinaires et les exuvies polluent la masse des grains faisant ces derniers impropres à la consommation (Campbell et Sinha, 1976).



**Figure 5.** Dégâts causés par *S. granarius* sur des graines de blé dur (Photo personnelle).

### II.3.3. *Sitophilus zeamais* (Motschulsky, 1855)

#### II.3.3.1. Noms communs

سوسة الذرة (Arabe) (Elhadjismail, 2014); Charançon du maïs (Français), maize weevil (Anglais) (Delobel et Tran, 1993)

### II.3.3.2. Synonymes

*Calandra chilensis* Philippi et Philippi,1864, *Calandra platensis* Zacher,1922,*Cossonus quadrimacula* Walker,1859.

### II.3.3.3. Description des stades biologiques

#### II.3.3.3.1. L'Œuf

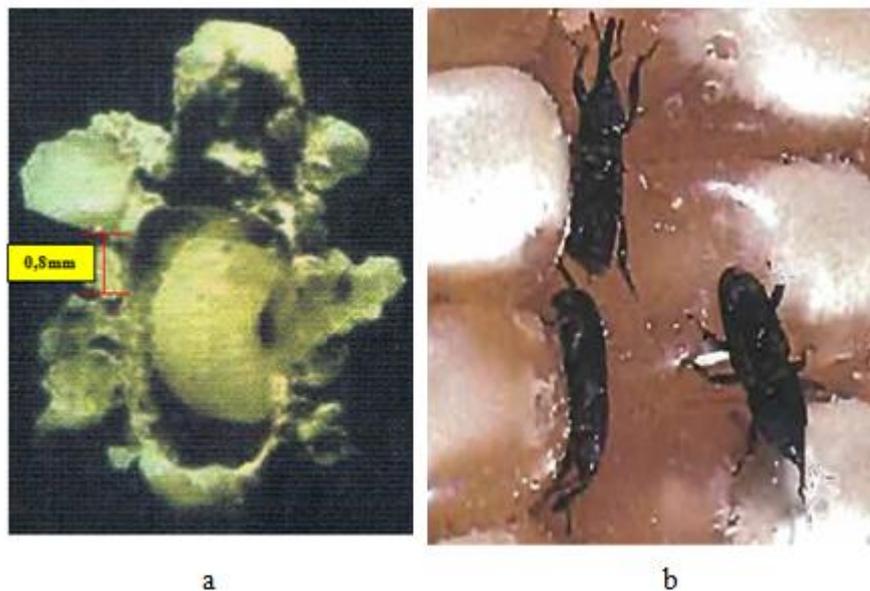
Les œufs sont blancs crèmes et à peine visible à l'œil nu (Hagstrum et *al.*, 2012).

#### II.3.3.3.2. La larve

La larve est d'une couleur blanche crème, avec une tête brune et apode (Hagstrum et *al.*, 2012),de 2-3mm de long, très bombées en dessus et plates en dessous avec une tête brunâtre et hémisphérique et des mandibules à pointes plus foncée et munies d'une dent subapicale interne très prononcée précédée d'une autre petit dent (Balachowsky et Mesnil, 1936) (Figure 6 a).

#### II.3.3.3.3.L'adulte

L'adulte mesure 3-4 mm, brun foncé à noir avec des élytres portant chacun une tache orange, les ailes de vol (2<sup>ème</sup> paire des ailes sous les élytres) est présente, le thorax avec des perforations de forme circulaire (Rees, 2007) (Figure 6 b).



**Figure 6.** *S. zeamais* a.Larve L4 , b.Adultes(Alejandro, 1988).

### II.3.3.4. Taxonomie

Selon Zipcodezoo (2014) le charançon du maïs est classé comme suit :

**Domaine:** Eukaryota, **Royaume:** Animalia, **Sous royaume:** Bilateria, **Branche:** Protostomia  
**Infraroyaume:** Ecdysozoa, **Superphylum:** Panarthropoda, **Phylum:** Arthropoda,  
**Subphylum:** Mandibulata, **Infraphylum:** Atelocerata, **Superclasse:** Panhexapoda, **Epiclasse:**  
Hexapoda, **Sousclasse:** Dicondylia, **Classe :** Insecta, **Infraclasse:** Pterygota, **Ordre:** Coleoptera  
**Sous ordre :** Polyphaga, **Infra ordre:** Cucujiformia, **Superfamille:** Curculionoidea, **Famille:**  
Curculionidae, **Sous famille :** Rhynchophorinae, **Genre:** *Sitophilus*, **Espèce :** *Sitophilus zeamais*

### II.3.3.5. Gamme d'hôtes

On trouve les charançons de maïs couramment sur le maïs, ils peuvent aussi se nourrir des céréales comme le blé, l'orge, le sorgho, le seigle et le riz (Hagstrum et al., 2012).

Ils préfèrent les grains entiers, mais se nourrissent également de produits céréaliers transformés, y compris les pâtes (Hagstrum et al., 2012).

*S. zeamais* supporte un taux élevée d'humidité de son hôte et peut même se nourrir des pommes (Longstaff, 1981; Maceljski et Korunic, 1973).

### II.3.3.6. Biologie

Les œufs sont pondus au cours de toute la durée de la vie adulte, bien que 50% peut être déposée dans les 4-5 premières semaines; chaque femelle peut pondre jusqu'à 150 œufs (Longstaff, 1981).

Les œufs sont déposés individuellement dans de petites cavités creusées dans les grains de céréales par la femelle; chaque cavité est rendue étanche par une sécrétion cireuse produite par cette dernière, protégeant ainsi l'œuf (Longstaff, 1981).

La période d'incubation de l'œuf est d'environ 6 jours à 25°C (Howe, 1952). Les œufs sont pondus à des températures entre 15 et 35 °C (avec un optimum autour de 25 °C) et à une humidité du grain de 10%; cependant, les taux de ponte sont très bas en dessous de 20°C ou supérieure à 32°C, et au-dessous d'environ 12% d'humidité (Birch, 1944). Après l'éclosion, la larve commence à se nourrir à l'intérieur du grain, et creuse un tunnel en se nourrissant (Birch, 1944; Howe, 1952).

Il ya quatre stades larvaires dans le blé à 25°C et 70% d'humidité relative, la nymphose a lieu après environ 25 jours, bien que les périodes de développement sont très prolongées à des températures basses (par exemple 98 jours à 18 °C et 70% HR) (Birch, 1944; Howe, 1952). La nymphose a lieu dans le grain; l'adulte nouvellement développé creuse son chemin, laissant un grand trou de sortie caractéristique (Birch, 1944; Howe, 1952).

La durée de développement total varie de 35 jours dans des conditions optimales à plus de 110 jours dans des conditions défavorables (Birch, 1944; Howe, 1952).

La durée de vie des adultes varie de plusieurs mois à un an (Longstaff, 1981).

### II.3.3.7. Distribution géographique

*Sitophilus zeamais* est répandu dans le monde entier (Balachowsky et Mesnil, 1936), il existe en Australie, en Afrique, en Asie et en Europe (Champ et Dyte, 1976). Il est plus fréquent en régions tropicales et subtropicales (Rees, 2007).

### II.3.3.8. Dégâts

En maïs stocké, de fortes infestations par ces insectes peuvent causer des pertes de poids des grains de 30-40% (Arbogast et Trône, 1997).

La larve produit une poudre blanchâtre abondante qui rend le maïs impropre à la consommation (Freeman, 1980) (Figure 7).



**Figure 7.** Dégâts causés par *S.zeamais* sur des graines de maïs (Photo personnelle).

## II.3.4. Méthodes de lutte disponibles contre les ravageurs des denrées stockées

### II.3.4.1. Lutte préventive

Une fois le lieu de stockage a été vidé et nettoyé physiquement (balayage du sol, enlèvement des toiles d'araignée et de la poussière, collecte et élimination de grains qui restent dans le lieu), il est nécessaire d'éliminer les populations résiduelles d'insectes par l'utilisation de l'azaméthiphos ou un mélange de fénitrothion et le carbaryl (Abdelaziz, 2011).

### II.3.4.2. Lutte curative

#### II.3.4.2.1. Lutte physique

##### II.3.4.2.1.1. Lutte par le froid

La température optimale pour le développement des insectes des denrées stockés est entre 25-33 ° C (Abdelaziz, 2011).

Les basses températures < 10 °C retardent le développement de ces insectes et donc réduisent leurs effectifs à un niveau où ils ne peuvent pas causer des dégâts considérables (Abdelaziz, 2011).

Egalement elles bloquent leur développement, réduisent leurs alimentations, fécondité et survie (Logstaff et Evans, 1983).

### **II.3.4.2.1.2. Lutte par la chaleur**

Une température de grains de 60 à 65°C, pendant 15 minutes est nécessaire pour tuer tous les insectes de céréales stockées (Abdelaziz, 2011).

Ces températures peuvent endommager la qualité boulangère et la faculté germinative de la plupart des graines (Evans, 1987) donc, la température du grain doit être soigneusement mesuré et contrôlé (Abdelaziz, 2011) pour réaliser une désinsectification sans causer des dommages aux derniers (Evans *et al.*, 1983).

La même température minimum doit être atteinte pour tuer les insectes en utilisant l'une de ces méthodes (Abdelaziz, 2011).

La méthode la plus simple et la moins coûteuse est probablement de chauffer les graines dans un séchoir à lit fluidisé (Abdelaziz, 2011).

Elle est la seule méthode de désinsectisation à haute température utilisée pour le traitement de plus de 100 tonnes/heure et qui consiste à traiter les produits en lits fluidisés à haute température (60° C à 180° C); la température propre du produit n'atteignant pas 65° C à 70° C (Neeson et Banks, 2004).

Ce choc thermique dure 8 secondes suivi d'un refroidissement rapide, entraîne une totale mortalité des insectes sans affecter les qualités technologiques du produit (Abdelaziz, 2011).

### **II.3.4.2.1.3. Modification de l'atmosphère du milieu**

Il s'agit d'abaisser le taux d'oxygène de l'atmosphère intergranulaire jusqu'à un taux létal pour tous les stades des insectes des denrées stockées (< 1 % d'O<sub>2</sub>) (Marzke *et al.*, 1970; Storey, 1973, 1975; Jayas *et al.*, 1991).

Généralement les insectes des stocks sont tués lorsque le taux d'oxygène est inférieur à 2 % du volume de l'atmosphère intergranulaire, stade auquel le gaz carbonique (CO<sub>2</sub>) aura atteint un taux d'environ 15 % (FAO, 2013).

### **II.3.4.2.1.4. Utilisation de matières inertes**

Les poussières ou les matières inertes sont des poussières chimiquement non réactives qui tuent les insectes par dessiccation de leurs corps, soit par endommager (terres de diatomées) ou absorber (aérogel de silice) de la couche cireuse de l'insecte qui empêche une perte excessive d'humidité du grain et de l'air intergranulaire (Abdelaziz, 2011).

Elles ne sont pas toxiques pour les humains et les animaux et peuvent fournir une protection continue contre les infestations par les insectes, n'affectent pas la les qualités technologiques des graines (Abdelaziz, 2011).

Les poussières inertes ont été utilisés pendant des siècles par les peuples autochtones en Amérique du nord et en Afrique pour lutter contre les insectes des denrées entreposés (Fields et Muir, 1996).

La terre de diatomées (DE) sont les restes fossilisés de diatomées qui sont des plantes aquatiques microscopiques unicellulaires, ils ont une faible toxicité pour les mammifères (par exemple, la toxicité pour un rat par voie orale  $DL_{50} > 5000$  mg/kg) (Subramanyam et Hagstrum, 1995).

L'aérogel de silice est produit par le séchage d'une solution aqueuse de silicate de sodium (Quarles, 1992).

Le sable et les autres composants du sol sont également utilisés comme des matières inertes (Golob et Webley, 1980).

### **II.3.4.2.1.5. L'irradiation ionisante**

Les rayonnements ionisants créent des ions par la rupture de liaisons chimiques (Faruki et *al.*, 2007).

Ils frappent les électrons hors de leurs orbites entraînant une douche d'électrons, créant des ions et des radicaux qui causent des dommages supplémentaires aux grandes molécules biologiques telles que l'ADN et provoque par conséquent un arrêt de développement d'organismes irradiés et endommagement des sites de division cellulaire qui incluent les gonades et l'intestin moyen chez l'insecte adulte (Hallman, 2012).

À des doses de 10 Kgy ils arrêtent les fonctions de ces organes ce qui provoque un arrêt de reproduction et d'alimentation chez l'insecte (Hallman, 2012).

Deux types de radiations ionisantes sont utilisés pour lutter contre les insectes des denrées stockées, le rayonnement gamma qui peut être produit par un isotope radioactif tel que le cobalt-60 et le rayonnement bêta, qui est un faisceau d'électrons, peut être généré électriquement (Hallman, 2012).

L'irradiation avec un faisceau d'électrons est généralement plus sûr et plus facile à utiliser car il peut être activé et désactivé pendant que l'isotope émette les rayonnements assurant donc la protection de l'utilisateur (Fields et Muir, 1996).

Toutes les étapes de cycle de vie des insectes sont touchées par ce type de rayonnement, la température du grain est augmenté de moins de 0,1°C et sa valeur nutritive n'est pas affectée

à des doses faibles, il ne laisse pas des résidus de produits chimiques nocifs dans la graine (Abdelaziz, 2011).

L'inconvénient de cette méthode est que les insectes adultes continuent à vivre pendant un certains temps et la graine est tuée par l'irradiation nécessaire pour lutter contre les insectes (Abdelaziz, 2011).

Les rayons bêta (faisceaux d'électrons) pénètrent une couche de grains seulement à 0,6 cm et il n'y a aucune protection résiduelle de réinfestation par des sources externes (Abdelaziz, 2011).

La mort immédiate pour les insectes de produits entreposés nécessite des doses plus élevées que pour leur stérilisation (Abdelaziz, 2011).

### II.3.4.2.2. Lutte mécanique

Le transilage, le secouage, le passage au tarare, permettent d'éliminer une partie des insectes contenus dans les stocks et surtout les adultes libres mais ils laissent subsister une partie des larves et des œufs; elles ne peuvent donc pas être envisagées pour un stockage de longue durée, à moins d'être fréquemment renouvelées, ce qui les rend coûteuses (FAO,2013).

### II.3.4.2.3. Lutte biologique

La lutte biologique est une composante très importante de la lutte intégrée des ravageurs de denrées stockées (Flinn et al., 1998).

De nombreuses espèces d'ennemis naturels des insectes se produisent dans l'écosystème de produits stockés et ces espèces représentent des agents potentiels de lutte biologique contre les organismes nuisibles (Brower et al., 1996).

*Xylocoris flavipes* (Reuter) est un prédateur cosmopolite de différents insectes nuisibles des denrées stockées à savoir *Tribolium castaneum* (Coleoptera,Tenebrionidae), *T. confusum* (Coleoptera,Tenebrionidae), *Cryptolestes pusillus* (Coleoptera,Laemophloeidae), *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera ,Bostrichidae) et *Trogoderma granarium* (Coleoptera,Dermestidae) (Ahmed et al., 1991;Rahman et al., 2009).

Les ennemis naturels des insectes des denrées stockées comprennent aussi des guêpes parasitoïdes appartenant aux familles des *Braconidae*, *Ichneumonidae*, *Pteromalidae* , *Bethylidae* et *Reduviidae* (Abdelaziz, 2011).

Parmi eux,les parasitoïdes *Peregrinator biannulipes* (Hemiptera, Reduviidae) (Montrouzier) et *Lariophagus distinguendus* Förster utilisé contre *Sitophilus granarius* (Upadhyay et Ahmad, 2011) et *Theocolax elegans* (Flinn et Hagstrum, 2002).

8 semaines Après la réalisation des lâchers de l'hyménoptère parasitoïde *Theocolax elegans* (Westwood) une mortalité de la population entière de *Sitophilus zeamais* a été observée dans le maïs stockée (Flinn et al., 2005).

Des lâchers de *Xylocoris flavipes* provoque une réduction de 99% des populations de *Oryzaephilus surinamensis* dans le maïs et 90-98% de *Tribolium castaneum* dans l'arachide. Dans le blé stocké, 96% de la population de *Sitophilus Oryzae* a été supprimé par des lâchés du parasitoïde *Anisopteromalus calandrae* (Abdelaziz, 2011).

Egalement plusieurs champignons et bactéries entomopathogènes sont utilisées contre les insectes de denrées stockées (Diaz-Gomez et Rodriguez, 2000).

Les insecticides microbiens sous forme de spores et de toxines sont plus sûres et très spécifiques (Upadhyay et Ahmad, 2011).

La plupart des toxines efficaces sont produites par des souches de *Bacillus thuringiensis* (Upadhyay et Ahmad, 2011) et provoquent une mortalité massive chez les insectes des denrées stockées de l'ordre des lépidoptères (Lacey, 2001).

### **II.3.4.2.4. Lutte par l'utilisation des régulateurs de croissance des insectes**

Les hormones de croissance et leurs analogues sont utilisés pour lutter efficacement dans un environnement fermé contre plusieurs papillons et les coléoptères des produits entreposés (Loshiavo, 1976; Williams et Amos, 1974). Ils perturbent la reproduction et le comportement de ponte chez ces insectes (Upadhyay et Ahmad, 2011).

L'hydrophène montre une inhibition complète de la progéniture de *Sitophilus granarius* (L.) à une dose de 10-20 mg / kg (Upadhyay et Ahmad, 2011).

L'hormone juvénile méthoprène et pyriproxylène et l'ecdysone RH-5849 montrent une excellente activité contre les souches résistantes et sensibles à l'insecticide *Actellic* de *Tribolium castaneum*, *Rhyzopertha dominica* et *Sitophilus oryzae* (Kostyukovsky et al., 2000).

### **II.3.4.2.5. Lutte par l'utilisation de l'ozone gazeux (O<sub>3</sub>)**

L'ozone gazeux (O<sub>3</sub>) est capable de pénétrer entre les grains entreposés, fortement oxydant, instable et se décompose rapidement à l'oxygène sans laisser de résidus (Tiwari et al., 2010).

La dose générale de l'ozone nécessaire pour contrôler tous les stades de 11 espèces de ravageurs des denrées stockées librement exposées est d'environ 35 ppm pendant six jours (Hansen et al., 2012).

Toutefois, les stades immatures de *Rhyzopertha dominica*, *Sitophilus granarius* et *Sitophilus zeamais* protégés à l'intérieur des grains nécessite une dose de 135 ppm pendant huit jours à 20°C (Hansen et al., 2012).

L'ozone se dégrade en oxygène rapidement pendant une période inférieure à 1 h (McCurlkin et Maier, 2010).

La température, l'humidité relative et la vitesse de l'air sont des facteurs déterminant le temps de demi-vie de l'ozone, l'ozonation des grains sera plus efficace dans la présence d'un courant d'air, à basse température et à une faible humidité (McCurlkin et Maier, 2010).

### **II.3.4.2.6. Lutte par l'utilisation des huiles essentielles**

Les huiles essentielles ont une activité insecticide, inhibition de la ponte et de la croissance des insectes des denrées stockées (Verma et al., 2000), une capacité répulsive et toxique à des valeurs de LC très faibles (Upadhyay et al., 2007).

Le salicylate de méthyle un composant de l'huile essentielle extrait à partir de *Securidacalanga pedunculata* est répulsive et toxique contre *Sitophilus zeamais* et *Rhyzopertha dominica* (Jayasekara et al., 2005).

Le méthyle allyle disulfure et le trisulfure de diallyle obtenus à partir des huiles essentielles d'ail sont également utilisés pour lutter contre les ravageurs des produits entreposés (Huang et Subramanyam, 2004).

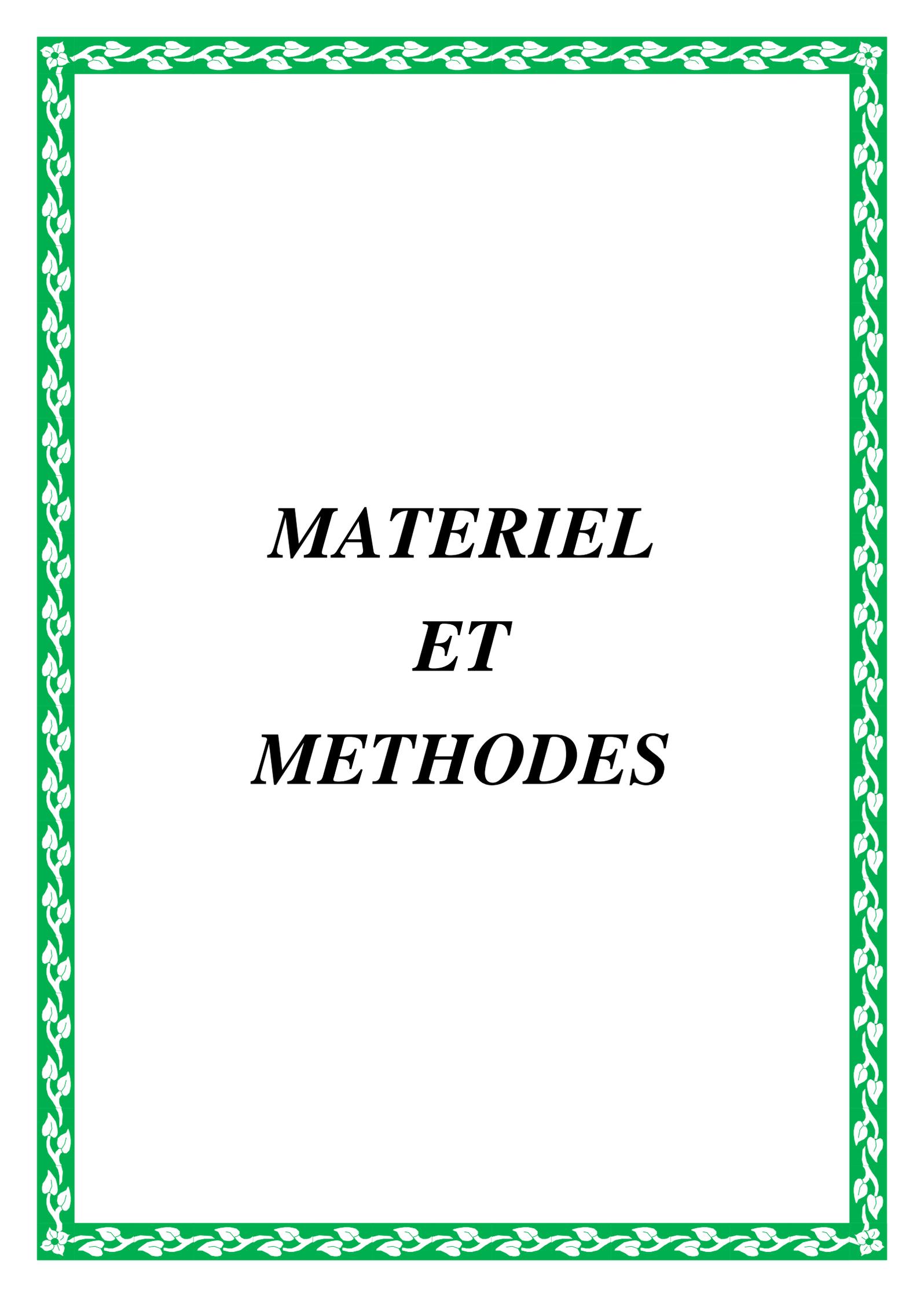
Le constituant volatil di-n-propyle disulfure extrait des graines d'*Azadirachta indica* est toxique, lorsqu'il est appliqué comme fumigant contre les adultes de *Tribolium castaneum*, les larves et les adultes de *Sitophilus oryzae* (Abdelaziz, 2001).

L'huile essentielle extrait des feuilles de *Curcuma longa* L. montre une toxicité, affecte la reproduction et l'alimentation et réduit la ponte et l'éclosion des œufs des insectes des céréales stockées (Sharma et al., 2000).

### **II.3.4.2.7. Lutte chimique**

La lutte chimique ou la fumigation par des insecticides est l'une des méthodes la plus efficace dans lequel les insectes nuisibles sont exposés à un environnement gazeux et toxique (Upadhyay et Ahmad, 2011).

Ces produits chimiques sont rentables, mais leur utilisation massive a créé des problèmes tels que le phénomène de résistance, la pollution de l'environnement et des effets indésirables sur la santé humaine et sur les auxiliaires (Ali et al., 2012).



***MATERIEL***  
***ET***  
***METHODES***

### III. Matériel et méthodes

#### III.1. Matériel biologique

##### III.1.1. Matériel animal

Les trois espèces choisies *S.granarius*, *S.zeamais*, *R.dominica* sont des ravageurs potentiels des céréales en Algérie.

Les souches d'origine de ces insectes proviennent des différents entrepôts de stockage de la région de Skikda.

##### III.1.2. Matériel végétal

Des feuilles et des tiges âgées et fraîches du *N. oleander* sont collectées à partir d'une plante saine issue d'une végétation naturelle dans la région de Djnane el aneb à Skikda en décembre 2013.

#### III.2. Méthodes

##### III.2.1. Elevage de masse des insectes

Le but de cet élevage est l'obtention d'un grand nombre d'insectes adultes des trois espèces choisies utiles pour réaliser les manipulations.

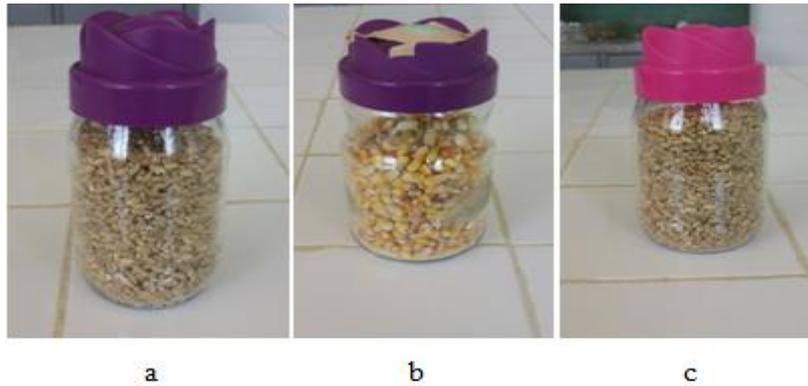
Un nombre indéterminé des individus de *S.granarius* sont placés dans des bocaux en verre, sur des grains de blé.

Ces bocaux sont mis dans une étuve à une température de 26° C ( $\pm$  2° C) et une humidité relative de 75 % ( $\pm$  5%) (Dinuna, 2008) (Figure 8 a).

Pour *S.zeamais* (nombre indéterminé) sont placés dans des bocaux en verre, sur des grains de maïs. Ces bocaux sont mis dans une étuve à une température de 28°C et une humidité relative de 65 % (Danho et Haubruge, 2003) (Figure 8 b).

Concernant l'élevage de *R.dominica* les adultes (nombre indéterminé) sont placés dans des bocaux en verre, sur des grains de blé endommagés préalablement.

Ces bocaux sont mis dans une étuve à une température de  $30 \pm 2^\circ\text{C}$  et une humidité relative de 70-80% (Gonzales, 2014) (Figure 8 c).



**Figure 8.** Elevage de masse des insectes a. *S.granarius*, b. *S.zeamais*, c. *R.dominica*

### III.2.2. La stérilisation superficielle

L'objectif de cette étape est l'élimination des hyphes et des spores des champignons épiphytes.

La procédure générale de réalisation de la stérilisation superficielle est décrite par (Petrini et *al.*, 1992).

Les différentes étapes de cette procédure et comme suit :

- Lavage du matériel végétal à l'eau courante.
- Immersion du matériel végétal dans l'éthanol.
- Stérilisation par hypochlorite de sodium NAOCL dilué.
- 2<sup>ème</sup> immersion du matériel végétal dans l'éthanol.

### III.2.3. Isolement des champignons endophytes de *N. oleander* L.

La procédure d'isolement des champignons endophytes de *N. oleander* a été décrite par (Huang et *al.*, 2007) et se résume comme suit :

#### Pour les feuilles :

- Un total de 20 feuilles de *N.oleander* a été d'abord lavé à l'eau courante, les feuilles ont été coupées en segments (5x5 mm).
- Ces échantillons sontensemencés sur un milieu de culture PDA (Potato Dextrose Agar) (Figure 9).

#### Pour les tiges :

- Un total de 20 tiges du *N. oleander* a été d'abord lavé à l'eau courante, les tiges ont été coupées en morceaux (10 mm de longueur) ;
- Ces échantillons sont égalementensemencés sur un milieu de culture PDA (Potato Dextrose Agar) (Figure 9).



**Figure 9.** Isolement des champignons endophytes de *N. oleander* L. a. feuilles, b. fragments foliaires, c. fragments foliaires fixés sur PDA, d. tiges, e. Coupeaux des tiges, f. Coupeaux des tiges fixés sur PDA (photos personnelles).

**La fréquence de colonisation (FC):** La fréquence de colonisation ou d'infection, exprimée en % est calculée en se basant sur la méthode de Fisher et Petrini (1987), donnée comme suit:

$$FC \% = (N_c / N_t) \times 100$$

Sachant que:  $N_c$ : le nombre de segments colonisés par une espèce ou un groupe fongique.

$N_t$ : le nombre total des segments.

### III.2.4. Obtention des cultures fongiques pures

La purification des souches est effectuée par prélèvement d'un hyphes terminal et le réensemencer dans un milieu de culture neuf (PDA), la souche est ensemencée au centre de la boîte de pétri (Guiraud, 1998). Après l'ensemencement des champignons les souches sont incubées à 25°C pendant 3 à 6 jours.

### III.2.5. Identification des mycotaxons endophytes

L'identification de souches fongiques a été basée sur la morphologie des hyphes et de la colonie, les caractéristiques des spores et les structures de reproduction si ces fonctions étaient perceptibles (Wei, 1979; Carmichael et al., 1980; Barnett et Hunter, 1998).

### III.2.6. Conservation des souches

Les cultures sont maintenues pendant 1 semaine à 30 °C puis stockées à 4 °C pour favoriser la viabilité et limiter les possibilités de variations (Bouchet et *al.*, 1999).

### III.2.7. Induction de l'activité protéolytique

#### III.2.7.1. Induction de l'activité protéolytique sur milieu de culture solide

L'objectif de cette partie est de sélectionner les champignons dotés d'une activité protéolytique.

Selon Lopez-Illorca et *al.* (2002) la procédure de cette méthode est la suivante:

- Prélèvement d'un fragment de colonie (5x5 mm) du champignon ;
- Ensemencement des fragments au centre de chacune des boîtes de pétri qui contiennent préalablement le milieu solide révélateur de l'activité protéolytique (Lopez-Illorca et *al.*, 2002) ;
- Incubation à l'obscurité à 25°C dans une étuve à l'obscurité ;
- Après 48 h, nous mesurons le diamètre de chaque colonie ainsi que le diamètre du halo translucide qui correspond à la zone de dégradation de la gélatine, et qui témoigne l'activité protéolytique, en d'autre terme la synthèse des protéases.

Pour les 12 jours d'expérience, nous calculons pour chaque observation effectuée, l'index protéolytique de Lopez-Illorca et *al.* (2002), donné comme suit:

$$\text{Index protéolytique} = \frac{\text{Le diamètre de la colonie (mm)}}{\text{Le Diamètre du halo (mm)}}$$

Enfin, on trace la courbe de l'activité protéolytique.

#### III.2.7.2. Induction de l'activité protéolytique dans un milieu de culture liquide

Dans cette partie les champignons qui sont dotés d'une bonne activité protéolytique sur milieu de culture solide sont mis dans un milieu liquide (Latgé, 1974) à fin d'induire la synthèse des protéases dans ce milieu et donc avoir des filtrats contenant les protéases secrétés par ces champignons.

### III.2.8. Induction de l'activité chitinolytique

#### III.2.8.1. Préparation de la chitine colloïdale en poudre

La préparation de la chitine colloïdale en poudre se fait par les étapes suivantes :

##### III.2.8.1.1. Préparation de la chitine

Cette partie est réalisée selon la méthode de Shimahara et Takiguchi (1988)

On utilise comme source de la chitine les carapaces des crevettes (Figure 10) et on procède comme suit :

### III.2.8.1.1.1. Préparation des copeaux de carapaces

Se fait selon la procédure suivante :

- Nous raclons les carapaces.
- Nous rinçons les carapaces à plusieurs reprises à l'eau courante.
- Nous procédons au broyage des carapaces en copeaux d'environ  $0,5 \text{ cm}^2$  de diamètre.
- Nous séchons à l'air à température ambiante.



**Figure 10.** Copeaux des carapaces des crevettes (photo personnelle).

### III.2.8.1.1.2. Déminéralisation avec de l'acide chlorhydrique

A pour but l'élimination des sels inorganiques contenues dans les carapaces (Figure 11) et se fait selon la procédure suivante :

- les copeaux secs de la carapace de la crevette (20 g) sont mis dans 1 litre d'acide chlorhydrique 2N.
- Le mélange est maintenu pendant 2 jours à température ambiante avec des agitations fréquentes pour éviter le flottement des copeaux due au  $\text{CO}_2$  issu de la réaction.
- l'acide chlorhydrique épuisé est échangé pendant la réaction.
- les copeaux secs de la carapace de la crevette déminéralisés sont recueillis et lavés avec de l'eau déminéralisée jusqu'à neutralité.



**Figure 11.** Déminéralisation avec de l'acide chlorhydrique (photo personnelle).

### III.2.8.1.1.3. Déprotéinisation avec de l'hydroxyde de sodium aqueux.

- les copeaux secs de la carapace de la crevette déminéralisés sont ajoutés à 1 litre de 1 N aqueuse d'hydroxyde de sodium (Figure 12).
- Le mélange est porté à ébullition pendant 36 h avec agitation occasionnelle.
- Des quantités appropriées d'eau doivent être ajoutées comme produit de vaporisation.
- La solution alcaline épuisée est échangée pendant la réaction.



**Figure 12.** Déprotéinisation avec de l'hydroxyde de sodium aqueux (photo personnelle).

### III.2.8.1.1.4. Elimination des lipides et des pigments

- Les copeaux sont ajoutés à 500 ml d'éthanol à 95% et le mélange est chauffé pendant 6 heures (Figure 13) ;
- Les copeaux de la chitine décolorés sont ensuite recueillis, lavés avec de l'éthanol et séchés à l'air libre.



**Figure 13.** Élimination des lipides et des pigments (photo personnelle).

### III.2.8.1.2. Blanchissement de la chitine

La préparation de la chitine blanchie se fait selon la méthode de Hsu et Lockwood (1975)

La procédure de cette méthode est la suivante:

- 60g de chitine a été agité avec 300 ml d'eau de Javel (hypochlorite de sodium à 5,25%) pendant 10 minutes.
- Ajout de 5 litres d'eau du robinet au mélange.
- Filtration sur papier filtre.
- Elimination de l'eau de Javel par la répétition de l'ajout de l'eau de robinet et la filtration sur papier filtre au moins 5 fois.
- Séchage de la chitine à l'air libre pendant la nuit.
- Ensuite la chitine blanchie et séchée a été broyée.

### III.2.8.1.3. Préparation de la chitine colloïdale.

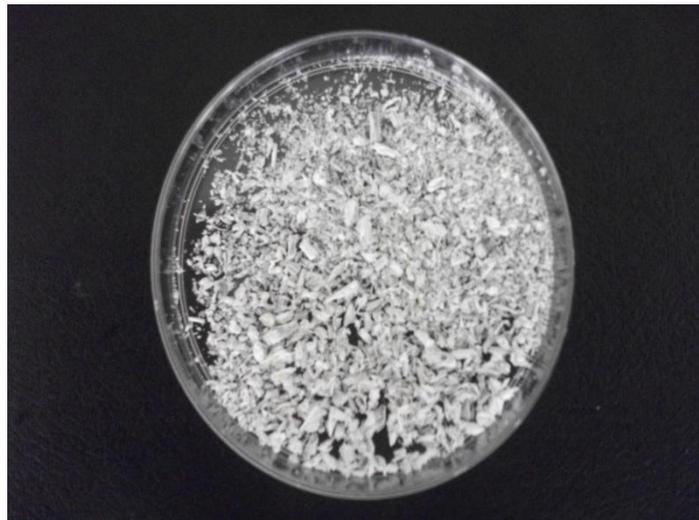
La préparation de la chitine colloïdale se fait selon la méthode de Hsu et Lockwood (1975)

- 40 g de chitine blanchie a été dissoute dans 400 ml de HCl concentré.
- Agitation du mélange pendant 30 à 50 min.
- Précipitation de la chitine sous forme d'une suspension colloïdale en ajoutant lentement 2 litres d'eau à 5 - 10 ° C.
- La suspension a été recueillie par filtration sur un papier filtre.
- Lavage de la suspension par 5 litres d'eau du robinet.
- 2<sup>ème</sup> filtration de la suspension sur papier filtre.
- Le lavage a été répétée au moins trois fois .

### III.2.8.1.4. Préparation de la chitine colloïdale en poudre

La préparation de la chitine colloïdale en poudre se fait selon la méthode de Hsu et lockwood(1975)

- 2 Litres de la suspension de la chitine colloïdale est placée sur une couche mince puis congelé a  $-5^{\circ}\text{C}$ .
- Après la congélation la suspension est séchée dans une étuve à  $25^{\circ}\text{C}$  pendant 3 - 4 jours.
- Après séchage, la chitine colloïdale est facilement désintégrée en poudre (Figure 14).



**Figure 14.** Chitine colloïdale en poudre (Photo personnelle).

### III.2.8.2. Induction de l'activité chitinolytique sur milieu de culture solide

L'objectif de cette partie est de sélectionner les champignons dotés d'une activité chitinolytique

Le milieu de culture solide révélateur de l'activité chitinolytique utilisé est proposé par Hsu et lockwood (1975)

Après autoclavage du milieu on ajoute  $\text{NaOH}(5\text{N})$  pour ajuster le pH du milieu de culture à 8. On utilise la procédure de Lopez-Illorca et *al.* (2002) préalablement citée, seulement l'halo translucide correspond à la zone de dégradation de la chitine colloïdale.

Pour les 12 jours d'expérience, nous calculons pour chaque observation effectuée, l'index chitinolytique de Moscoso et Rosato(1987), donné comme suit:

***Index chitinolytique = Le diamètre du halo (mm) / le diamètre de la colonie (mm)***

### III.2.8.3. Induction de l'activité chitinolytique sur milieu de culture liquide

Dans cette partie les champignons qui sont dotés d'une activité chitinolytique sur milieu de culture solide sont mis dans le milieu liquide proposé par Latgé (1974), afin d'induire la synthèse des chitinases dans ce milieu et donc avoir des filtrats contenant les chitinases secrétés par ces champignons.

### III.2.9. Choix des mycotaxons candidats pour la mise en évidence de l'activité insecticide

Les champignons endophytes choisis pour le test d'activité insecticide en ce basant sur les résultats d'induction de l'activité chitinolytique et/ou protéolytique sur milieu de culture solide.

C'est-à-dire les champignons choisis sont tous dotés d'une activité protéolytique et/ou chitinolytique.

### III.2.10. Préparation des filtrats des mycotaxons choisies

Les cultures sont, par la suite, placées à l'obscurité dans une étuve (25°C). Elles sont soumises chaque jour à des agitations intermittentes (Figure 15) pour une durée d'une heure (1 h), afin d'homogénéiser le milieu et la biomasse fongique.

Dès l'obtention d'une biomasse fongique importante (après 7 à 15 jours), les cultures sont récupérées puis filtrées en série. Les filtrats des cultures fongiques sont préparés selon la méthode de Stekoll et West, (1978) est donnée comme suit:

- Nous récupérons la culture fongique homogénéisée.
- Nous filtrons la culture à travers un papier filtre stérile de type Whatman no. 2 (Figure 16) pour éliminer les résidus mycéliens et éviter la contamination par les spores.



**Figure 15.** Les agitations pour homogénéiser le milieu et la biomasse fongique (photo personnelle).



**Figure 16.** Filtration des milieux des cultures fongiques (photo personnelle).

### III.2.11. Les essais de traitement

#### III.2.11.1. Organismes cibles

Des essais de traitement ont été effectués sur *Sitophilus granarius*, *Sitophilus zeamais* et *Rhizopertha dominica*

#### III.2.11.2. Dispositif expérimental

Le dispositif expérimental (Figure 18) adapté pour ce travail est basé sur la technique dite VCE Ventilated Bioassay Chamber (Butt et Goettel, 2000) (Figure 17).

Le traitement est réalisé par pulvérisation directe, appliqué sur les insectes adultes mis dans des boîtes de pétri à raison de 20 par boîte.

Le filtrat appliqué suivant son type et le gradient de concentration (quatre concentrations pour chacun des filtrats; (25%, 50%, 75%, 100%) avec un nombre de répétition de 5 pour chaque concentration et 5 répétitions traitées à l'eau distillée et considérées comme des témoins.



**Figure 17.** Unité VCE (photo personnelle).

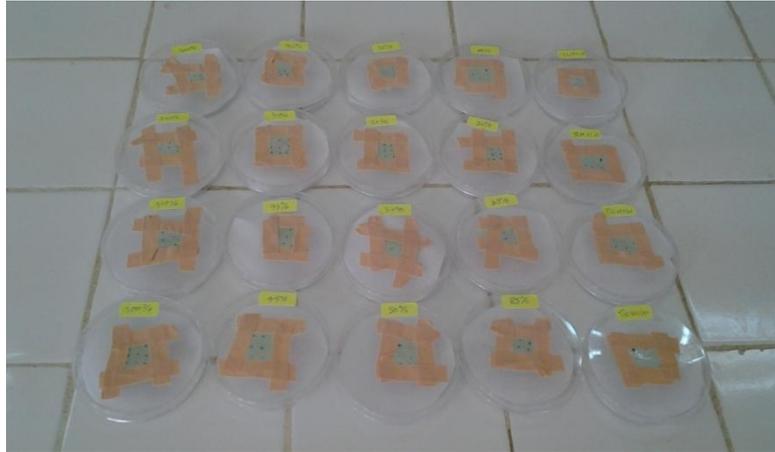


Figure 18. Dispositif expérimental (photo personnelle).

### III.2.11.3. Calcul du taux de mortalité

Le taux de mortalité (%) est déterminé pour chaque traitement après 2 h, 12 h, 24 h, 48h suite à la pulvérisation.

Le calcul du taux de mortalité tient en compte la formule de la mortalité corrigée d'Abbott, 1925:

$$Mc = 100 \times [(Mo - Mt) / (100 - Mt)]$$

Où  $Mc$  = mortalité corrigée en pourcentage ;  $Mo$  = mortalité observée dans l'essai

$Mt$  = mortalité observée dans le témoin

### III.2.12. Paramètres étudiés

Nous avons choisi essentiellement deux paramètres:

- Effet des filtrats sur *S. granarius*, *S. zeamais*, *R. dominica*.
- Effet du gradient de concentration sur la mortalité de ces insectes à l'échelle chronologique (après 2 h, 12h, 24 h, 48h du traitement).

### III.2.13. Analyse des données

Pour cette étude l'analyse de la variance (Anova) et le test de Newman et Keuls sont effectués pour révéler les différences et les liens entre le type de filtrat et le gradient de concentration

L'étude de corrélation est effectuée en illustrant la droite de régression entre :

- la croissance radiale et les deux activités protéolytique et chitinolytique des souches fongiques sélectionnés.
- la mortalité des insectes ciblés et les deux activités protéolytique et chitinolytique des souches fongiques sélectionnés.

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées par l'utilisation du module XLSTAT 2009 de Microsoft Office.



***RESULTATS***  
***ET***  
***DISCUSSION***

IV. Résultats et discussion

IV.1. Composition et fréquence de colonisation des isolats fongiques endophytes du *Nerium oleander*

IV.1.1. Résultats

On a pu isoler 27 taxons différents de champignons endophytes dont 20 à partir de la tige, 3 à partir des feuilles et 4 à partir des deux parties au même temps (Tableau 1).

Le genre le plus dominant est *Fusarium* spp. (6 espèces) avec une fréquence de colonisation totale de 23,23 % suivie par *Alternaria* spp. (5 espèces) 18,59 %, *Torula* spp. (3 espèces) et *Mycelia sterilia* (3 espèces) 9,29% chacun, *Thielavia* sp ; *Annelophora* sp ; *Bipolaris* sp 6,97% chacun, *Chaetomium* spp (2 espèces) et *Phoma* sp 4,65 % chacun, *Rhizoctonia* sp ; *Cladosporium* sp ; *Colletotrichum* sp ; *Curvularia* sp 2,32% chacun (Figure 19).

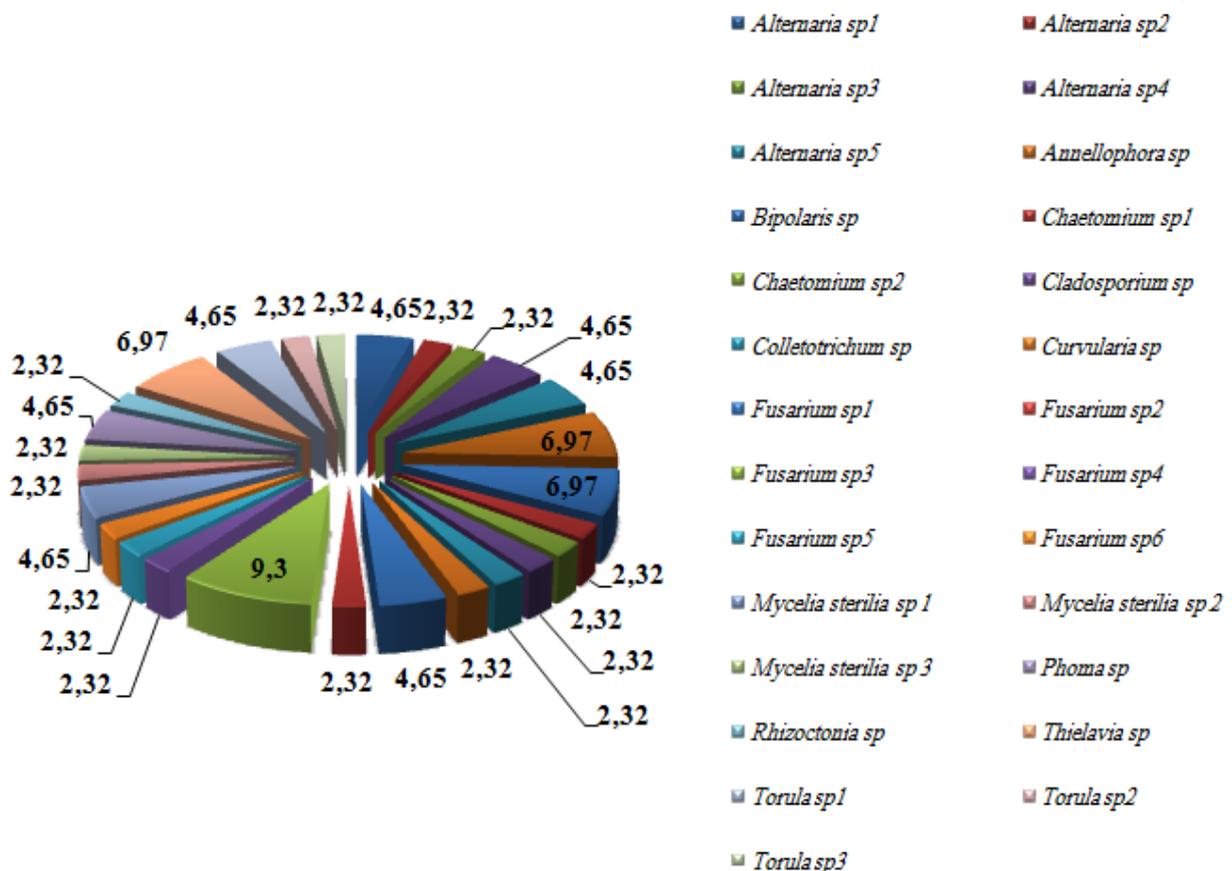
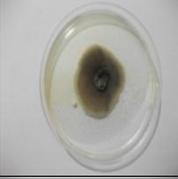
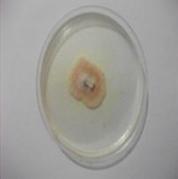
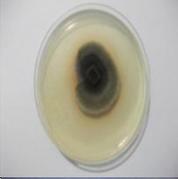
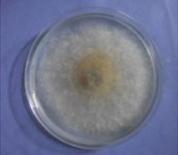
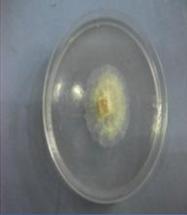


Figure 19. Fréquence de colonisation des champignons endophytes de *Nerium oleander*.

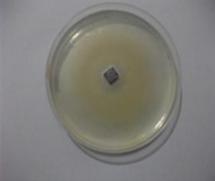
**Tableau 1.** Composition générale de la mycoflore endophyte détectée chez *N.oleander*.

Mycotaxon (Phylum)	Illustration (photos personnelles)	Partie	Auteur
<i>Alternaria sp1</i> (Ascomycota)		Tige	(Nees, 1816)
<i>Alternaria sp2</i> (Ascomycota)			
<i>Alternaria sp3</i> (Ascomycota)			
<i>Alternaria sp4</i> (Ascomycota)			
<i>Alternaria sp5</i> (Ascomycota)			
<i>Annelophora sp</i> (Ascomycota)		Feuille	(Hughes, 1952)
<i>Bipolaris sp</i> (Ascomycota)		Tige	(Shoemaker ,1959)
<i>Chaetomium sp1</i> (Ascomycota)			
<i>Chaetomium sp2</i> (Ascomycota)			(Kunze, 1817)

Suite du Tableau 1

Mycotaxon (Phylum)	Illustration (photos personnelles)	Partie	Auteur
<i>Cladosporium</i> sp (Ascomycota)		Tige	(Link ,1816)
<i>Colletotrichum</i> sp (Ascomycota)		Feuille	(Corda ,1831)
<i>Curvularia</i> sp (Ascomycota)			(Boedijn, 1933)
<i>Fusarium</i> sp1 (Ascomycota)		Tige	(Link ,1809)
<i>Fusarium</i> sp2 (Ascomycota)			
<i>Fusarium</i> sp 3 (Ascomycota)		Tige+feuille	
<i>Fusarium</i> sp4 (Ascomycota)		Tige	
<i>Fusarium</i> sp5 (Ascomycota)			
<i>Fusarium</i> sp6 (Ascomycota)			

Suite du Tableau 1

Mycotaxon (Phylum)	Illustration (photos personnelles)	Partie	Auteur
<i>Mycelia sterilia</i> sp 1		Tige	-
<i>Mycelia sterilia</i> sp 2			
<i>Mycelia sterilia</i> sp 3			
<i>Phoma</i> sp (Ascomycota)			(Saccardo,1880)
<i>Thielavia</i> sp (Ascomycota)			(Zopf ,1876)
<i>Torula</i> sp1 (Ascomycota)			(Pers ,1794)
<i>Torula</i> sp2 (Ascomycota)			
<i>Torula</i> sp3 (Ascomycota)			

#### **IV.1.2. Discussion**

L'intérêt de cette partie de notre étude est de connaître la composition générale et la fréquence de colonisation des champignons endophytes détectés chez *Nerium oleander* L.

Nous avons, en effet, pu isoler et identifier et déterminer la fréquence de colonisation des champignons endophytes isolés à partir des tiges et des feuilles de *Nerium oleander* L.

Les champignons endophytes se trouvent dans les tissus de la plupart des plantes étudiées (Wang et Dai, 2011).

Comparativement à cette partie de notre étude quelques travaux ont porté sur l'isolement, l'identification et le calcul de la fréquence de colonisation des champignons endophytes de *Nerium oleander* L.

Huang et al. (2007) ont pu isoler des champignons endophytes *Chaetomium* sp, *Cladosporium* sp, *Colletotrichum* sp, *Phoma* sp1 et *Phoma* sp 2 à partir des tiges et *Ascomycete* sp, *Mycelia sterilia* spp à partir des feuilles, *Torula* sp et *Hyphomycete* sp à partir des 2 parties au même temps.

Selon le même auteur les fréquences de colonisation sont : 2.38% ,4.76% ; 2.38% ; 4.76 %; 4.76% ;4.76% ;2.38% ;49,99 %; 16.67% ; 11.90% respectivement.

Ramesha et al.(2013) ont pu isoler des champignons endophytes *Curvularia brachyspora*, *Curvularia* sp, *Fusarium* sp, *Fusarium semitectum* à partir des tiges et des fleurs, *Drechslera* sp, *Cladosporium* sp1, *Cladosporium* sp2, *Thielavia terricola* et 3 *Mycelia sterilia* à partir des tiges ;*Torula* sp, *Alternaria alternata*,*Colletotrichum* sp, *Cylindrocephalum* sp, *Aspergillus* sp, *Penicillium* sp, *Cochliobolus* sp, et *Chaetomium* sp à partir des fleurs ;*Bipolaris* sp et *Mycelia sterilia* sp à partir des feuilles .

Selon le même auteur les taux de colonisation par des champignons endophytes sont 54% pour les fleurs, 39% pour les tiges et 7% pour les feuilles.

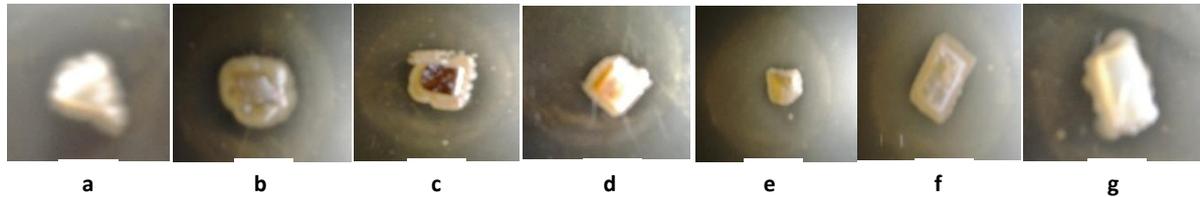
Laib (2014) a pu isoler le champignon endophyte *Cladosporium* sp à partir des feuilles.

Huang et al. (2008) ont pu isoler les champignons endophytes *Ascomycete* sp, *Colletotrichum* sp, *Hyphomycete* sp, *Phoma* sp et *Torula* sp et Ramesha et al.(2014) ont pu isoler le champignon *Cochliobolus kusanoi* à partir des différentes parties.

## IV.2. Mise en évidence de l'activité protéolytique des champignons endophytes du *N. Oleander*

### IV.2.1. Résultats

Des 27 champignons endophytes isolés 7 seulement sont dotés d'une activité protéolytique présentée par un halo translucide entourant les colonies fongiques (Figure 20)



**Figure 20.** Souches fongiques endophytes dotées d'une activité protéolytique présentée par un halo translucide entourant les colonies fongiques a. *Alternaria* sp 5 ., b. *Cladosporium* sp., c. *Curvularia* sp., d. *Fusarium* sp 1 ., e. *Fusarium* sp3 ., f. *Torula* sp1., g. *Torula* sp2.

### IV.2.2. Discussion

L'activité protéolytique est très importante voire primordiale pour les champignons endophytes, elle est reflétée par la production ou l'induction d'enzymes protéolytiques telles que les aminopeptidases et exopeptidases qui jouent le rôle le plus importants dans le processus d'infection de l'hôte (Mustafa et Kaur, 2009).

Dans le cas des champignons entomopathogènes les protéases sont des facteurs importants de virulence et jouent un rôle important dans la dégradation de la cuticule de l'insecte (Pérez et al., 2014).

En se basant sur les informations précitées, l'intérêt de cette partie de notre étude est de sélectionner les champignons endophytes dotés d'une activité protéolytique afin de rechercher les souches à activité insecticide probable.

Nous avons, en effet pu sélectionner les souches dotés d'une activité protéolytique.

La formation d'un halo translucide autour de la colonie est le résultat de la dégradation de la gélatine par les souches fongiques et signifie que ces dernières possèdent une activité protéolytique (Lopez Ilorca et al., 2002 ; Sapna Bai et al., 2012).

Les micro-organismes constituent une excellente source de protéases extracellulaires (Sabotič, 2007) qui agissent comme un catalyseur dans l'hydrolyse de protéines de grande taille en molécules plus petites pour l'utilisation ultérieure par le microorganisme (Rao et al., 1998).

Comparativement à cette partie de notre étude, plusieurs travaux ont porté sur la recherche des souches fongiques qui ont le potentiel de produire des protéases.

Le champignon endophyte *Alternaria alternata* isolé à partir *Eremophila longifolia* est doté d'une bonne activité protéolytique à un ph variant de 3 à 9 (Zaferanloo et al., 2014).

Le champignon endophyte *Cladosporium sphaerospermum* isolé à partir *Opuntia ficus indica* montre une faible activité protéolytique (Bezerra et al., 2012).

Le champignon endophyte *Cladosporium cladosporioides* isolé de la même plante montre une forte activité protéolytique (Bezerra et al., 2012).

Le champignon *Curvularia lunata* est doté d'une activité protéolytique et secrète une protease Curl 1 (Tripathi et al., 2009) et un autre champignon du même genre est trouvé producteur de protéases par Sharma et al.(2006)

Plusieurs souches fongiques qui appartiennent au genre *Fusarium spp* sont dotées d'une bonne capacité de production des protéases (Vishwanatha et al., 2009).

Une protéase alcaline à été purifié des filtrats de champignon endophyte *Fusarium sp.* BLB isolé à partir *Hibiscus sp* (Ueda et al., 2007).

Le champignon endophyte *Fusarium lateritium* isolé à partir *Opuntia ficus indica* montre une bonne activité protéolytique (Bezerra et al., 2012).

Johri et al.(1985) Ont mentionné que les espèces fongiques du genre *Torula spp* sont de meilleures producteurs de protéases.

Le champignon *Torula thermophila* secrète une protéase alcaline (Karavaeva et al., 1975).

### IV.3. Evolution de l'activité protéolytique des champignons endophytes sélectionnés

#### IV.3.1.Résultats

L'activité protéolytique des souches fongiques endophytes est illustrée par l'index protéolytique calculé sur 12 jours successifs (Figure 21).

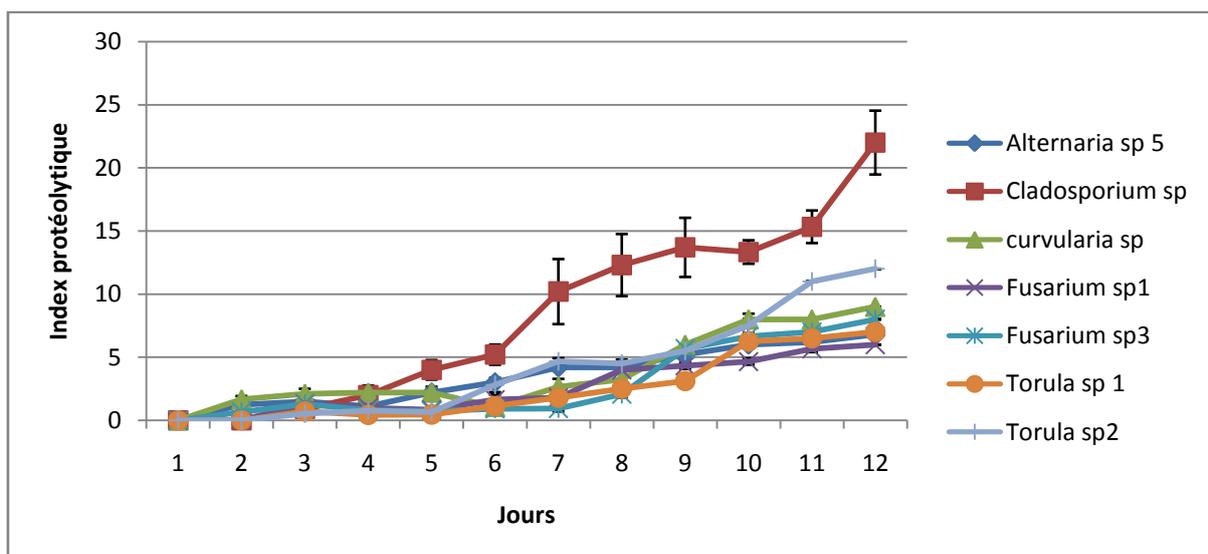


Figure 21. Représentation graphique de l'activité protéolytique des souches fongiques selectionées illustrée par l'index protéolytique calculé sur 12 jours successifs.

On constate que l'induction d'activité protéolytique :

Pour *Alternaria* sp5 commence dès le premier jour et continue à augmenter jusqu'au 3<sup>ème</sup> où elle diminue périodiquement puis elle reprend son augmentation au 4<sup>ème</sup> pour atteindre sa valeur maximale =6.8 au 12<sup>ème</sup> jour .

Pour *Cladosporium* sp commence à partir du 2<sup>ème</sup> jour et continue à augmenter jusqu'au 9<sup>ème</sup> où elle diminue périodiquement puis reprend son augmentation au 10<sup>ème</sup> pour atteindre sa valeur maximale=22 au 12<sup>ème</sup> jour .

Pour *Curvularia* sp commence à partir du 2<sup>ème</sup> jour et continue à augmenter jusqu'au 5<sup>ème</sup> où elle diminue, puis elle reprend son augmentation au 7<sup>ème</sup> pour atteindre sa valeur maximale=9 au 12<sup>ème</sup> jour .

Pour *Fusarium* sp 1 commence dès le 2<sup>ème</sup> jour et continue à augmenter jusqu'au 3<sup>ème</sup> où elle diminue, puis elle reprend son augmentation au 5<sup>ème</sup> pour atteindre sa valeur maximale=6 au 12<sup>ème</sup> jour .

Pour *Fusarium* sp 3 commence dès le 1<sup>er</sup> jour et continue à augmenter jusqu'au 3<sup>ème</sup> où elle diminue puis reprend son augmentation au 5<sup>ème</sup> pour atteindre sa valeur maximale=8 au 12<sup>ème</sup> jour .

Pour *Torula* sp1 commence à partir du 2<sup>ème</sup> jour et continue à augmenter jusqu'au 3<sup>ème</sup> où elle diminue ,puis reprend son augmentation au 4<sup>ème</sup> pour atteindre sa valeur maximale=7 au 12<sup>ème</sup> jour .Pour *Torula* sp 2 commence au 2<sup>ème</sup> jour et continue à augmenter jusqu'au 4<sup>ème</sup> où elle diminue puis reprend son augmentation au 5<sup>ème</sup> pour atteindre sa valeur maximale=12 au 12<sup>ème</sup> jour .

#### **IV.3.2.Discussion**

L'objectif du suivi de l'évolution de l'activité protéolytique des souches fongiques est de connaître leurs potentiels de dégradation du substrat protéique en fonction du temps et donc savoir son comportement probable sur la cuticule d'insecte, contenant des protéines comme composants essentiels (Binod et *al.*,2007).

Nous avons donc pu évaluer l'évolution de l'activité protéolytique des souches fongiques sélectionnées dans la partie précédente en fonction du temps.

Les endophytes sont des sources potentielles des métabolites secondaires bioactives incluant les enzymes utilisés dans le domaine agricole (Zaferanloo et *al.*,2014).

Parmi ces enzymes les protéases qui sont des enzymes hydrolytiques qui dégradent les macromolécules protéiques en molécules de faible poids moléculaire faciles à utiliser comme nutriments par les champignons (Dunaevskii et *al.*,2006),constituant un facteur clé

déterminant la virulence de la souche fongique (Mustafa et Kaur,2009) et un mécanisme de résistance fournit par les champignons endophytes à leurs plantes hôtes (Tan et Zou ,2001).

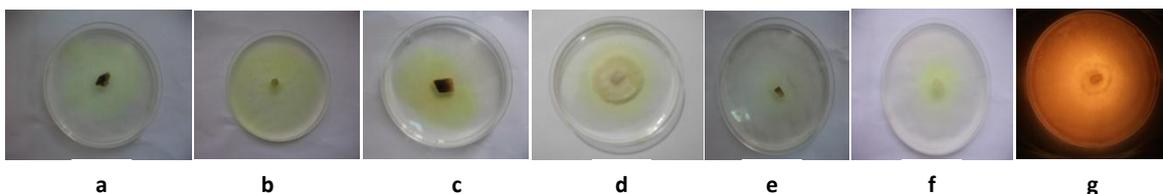
De nombreuses espèces fongiques sécrètent des protéases lorsqu'elles sont cultivées dans un milieu contenant la gélatine comme une seule source d'azote (Reichard *et al.*, 1990 ; Lopez llorca *et al.*,2002 ).

La production d'enzymes comme les protéases dépend de l'âge et l'espèce de la colonie fongique (Matsumoto,2006) ce qui explique la variation observée de l'activité protéolytique en fonction du temps et du type du champignon étudié.

#### **IV.4.Mise en évidence de l'activité chitinolytique des champignons endophytes du *N.Oleander***

##### **IV.4.1.Résultats**

Des 27 champignons endophytes isolés 7 seulement sont dotés d'une activité chitinolytique présentée par un halo translucide entourant les colonies fongiques (Figure 22).



**Figure 22.**Souches fongiques endophytes dotées d'une activité chitinolytique présentée par un halo translucide entourant les colonies fongiques a. *Curvularia* sp.,b. *Fusarium* sp1.,c. *Fusarium* sp2.,d. *Fusarium* sp3.,e. *Fusarium* sp4 .,f. *Fusarium* sp5.,g. *Fusarium* sp6.

##### **IV.4.2.Discussion**

Les chitinases sont produites par plusieurs espèces fongiques (Pedraza et Lopes, 1991; Patidar *et al.*, 2005; Yamazaki *et al.*, 2008; Kern *et al.*, 2009; Ghanem *et al.*, 2010) et possèdent une activité hydrolitique de la chitine qui est décomposée en molécules à faible poids moléculaires comme le chitotetraose, le chitotriose et le chitobiose (Binod *et al.*, 2007).

Les chitinases de champignons pathogènes sont des facteurs de virulence et jouent un rôle important durant l'infection (Seidl, 2008) et leur production de chitinase est une caractéristique commune de la plupart des champignons entomopathogènes (Yang *et al.*, 2007).

En se basant sur les informations précitées l'intérêt de cette partie de notre étude est de sélectionner les champignons endophytes dotés d'une activité chitinolytique afin de rechercher des souches à activité insecticide probable.

Nous avons, en effet pu sélectionner des souches dotées d'une activité chitinolytique.

Les chitinases peuvent être induit en présence de chitine comme source de carbone dans le milieu (Coutiño et al., 2010).

L’halo clair correspond à la zone de dégradation de la chitine colloïdale par les chitinases secrétées par les champignons (Agrawal et Kotasthane, 2012).

Comparativement à cette partie de notre étude, plusieurs travaux ont porté sur la recherche des souches fongiques entomopathogènes qui ont le potentiel de produire des chitinases.

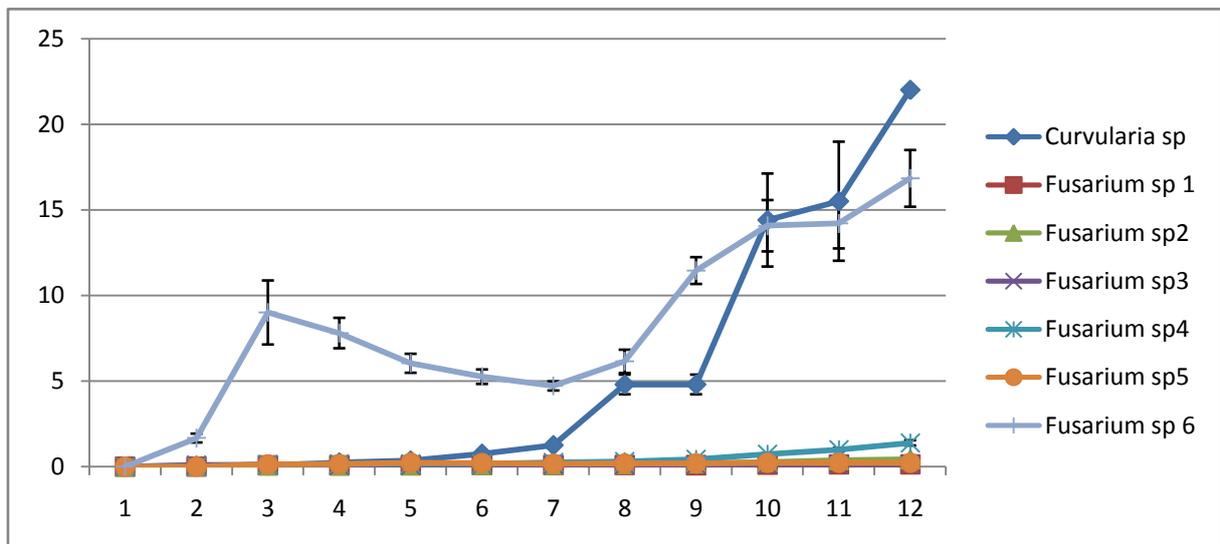
les chitinases sont secrétées par plusieurs champignons entomopathogènes (Ulhoa et Peberdy 1991; Fang et al., 2005) incluant *B. bassiana*, *Trichoderma harzianum*, *Aspergillus fumigates*, *Lecanicillium lecanii*, *Metarhizium anisopliae*, *Fusarium* sp (Matsumoto, 2006) *Trichoderma spp* (Agrawal et Kotasthane, 2012).

Dans le même cadre de comparaison Govinda Rajulu et al. (2011) ont démontré que les champignons endophytes *Aureobasidium pullulans*, *Beltrania rhombica*, *Botrytis* sp, *Chaetomium* sp, *Colletotrichum acutatum*, *Cryptosporiopsis* sp, *Fusarium* sp, *Glomerella* sp, *Lasiodiplodia theobromae*, *Phomopsis* sp, *Xylaria* sp isolés à partir de différentes plantes constituent une bonne source de chitinases.

#### IV.5. Evolution de l’activité chitinolytique des champignons endophytes sélectionnés

##### IV.5.1. Résultats

L’activité chitinolytique des souches fongiques endophytes sélectionnés est illustrée par l’index chitinolytique calculé sur 12 jours successifs (Figure 23).



**Figure 23.** Représentation graphique de l’activité chitinolytique des souches fongiques sélectionnées illustrée par l’index protéolytique calculé sur 12 jours successifs.

On constate que l'induction d'activité chitinolytique :

Pour *Curvularia* sp commence dès le premier jour et continue à augmenter pour atteindre sa valeur maximale=22 au 12<sup>ème</sup> jour .

Pour *Fusarium* sp1 commence dès le 2<sup>ème</sup> jour et continue à augmenter jusqu'au 3<sup>ème</sup> ,diminue puis reprend son augmentation au 5<sup>ème</sup> et 6<sup>ème</sup> jour et diminue une autre fois pendant 3 jours,puis elle reprend une autre fois son augmentation pour atteindre sa valeur maximale=0.12 au 12<sup>ème</sup> jour .

Pour *Fusarium* sp 2 dès le premier jour et continue à augmenter jusqu'au 3<sup>ème</sup> où elle diminue puis reprend son augmentation au 4<sup>ème</sup> pour atteindre sa valeur maximale=0.42 au 12<sup>ème</sup> jour .

Pour *Fusarium* sp 3 commence dès le premier jour et continue à augmenter jusqu'au 3<sup>ème</sup> où elle diminue périodiquement puis reprend son augmentation au 5<sup>ème</sup> jour pour atteindre sa valeur maximale=0.15 au 12<sup>ème</sup> jour .

Pour *Fusarium* sp 4 commence dès le 2<sup>ème</sup> jour et continue à augmenter pour atteindre sa valeur maximale=1.38 au 12<sup>ème</sup> jour .

Pour *Fusarium* sp 5 commence dès le 2<sup>ème</sup> jour et continue à augmenter jusqu'au 5<sup>ème</sup> où elle diminue puis reprend son augmentation au 7<sup>ème</sup> pour atteindre sa valeur maximale=0.22 au 12<sup>ème</sup> jour .

Pour *Fusarium* sp 6 commence dès le 2<sup>ème</sup> jour et continue à augmenter jusqu'au 5<sup>ème</sup> où elle diminue puis reprend son augmentation au 7<sup>ème</sup> pour atteindre sa valeur maximale=16.38 au 12<sup>ème</sup> jour .

#### **IV.5.2.Discussion**

L'objectif du suivi de l'évolution de l'activité chitinolytique des souches fongiques est de connaître leurs potentiels de dégradation du substrat chitinique en fonction du temps et donc savoir son comportement probable sur la cuticule d'insecte, contenant de la chitine comme composant structurel essentiel (Yang et al., 2013).

Nous avons donc pu évaluer l'évolution de l'activité chitinolytique des souches fongiques sélectionnées dans la partie précédente en fonction du temps.

Les champignons endophytes constituent une bonne source de chitinases (Govinda Rajulu et al. ,2011) qui dégradent la chitine en hydrolysant les liaisons  $\beta$  -1, 4- glycosidiques entre les molécules de N-acétyl glucosamine (Kitamura et Kamei ,2003) et sont considérées comme facteur important de pathogenicité (Nguyen et al., 2009) et une caractéristique commune de la plupart des champignons entomopathogènes (Yang et al., 2007).

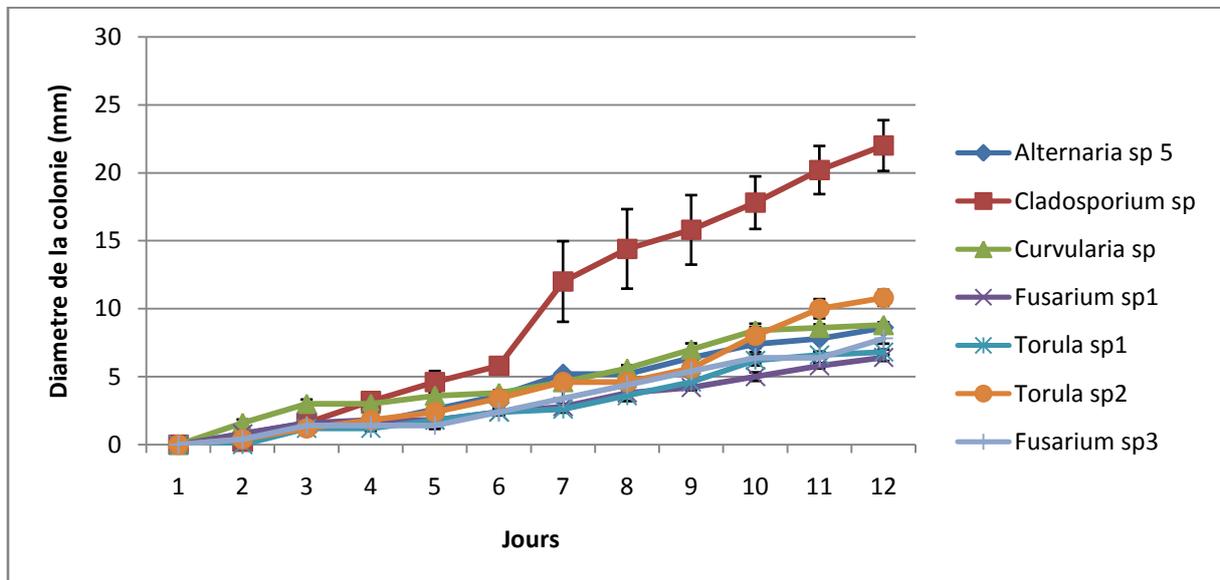
De nombreuses espèces fongiques sécrètent des chitinases lorsqu'elles sont cultivées dans un milieu contenant la chitine colloïdale comme source de carbone (Agrawal et Kotasthane, 2012).

La production des chitinases dépend de l'âge de l'espèce de la colonie fongique (Matsumoto, 2006) ce qui explique la variation observée de l'activité chitinolytique en fonction du temps et du type du champignon étudié.

#### **IV.6. Evolution de la croissance radiale des colonies fongiques sélectionnées dans les différents milieux de culture utilisés.**

##### **IV.6.1. Résultats**

Au cours des jours d'observation, nous avons pu enregistrer l'évolution de l'extension radiale des colonies fongiques sélectionnées dans les milieux solides d'activité protéolytique (Figure 24) et chitinolytique (Figure 25).



**Figure 24.** Evolution de la croissance radiale des colonies fongiques sélectionnées sur une période de 12 jours dans le milieu d'activité protéolytique.

L'extension radiale de la colonie fongique dans le milieu d'activité protéolytique :

Pour *Alternaria* sp 5 débute vers le 2<sup>ème</sup> jour , se stabilise pendant le 3<sup>ème</sup> jour et reprend vers le 4<sup>ème</sup> jour puis se stabilise une 2<sup>ème</sup> fois pendant le 7<sup>ème</sup> jour puis reprend une 2<sup>ème</sup> fois pour atteindre une valeur maximale de 8,6 mm au 12<sup>ème</sup> jour.

Pour *Cladosporium* sp débute vers le 2<sup>ème</sup> jour pour atteindre une valeur maximale de 22 mm au 12<sup>ème</sup> jour.

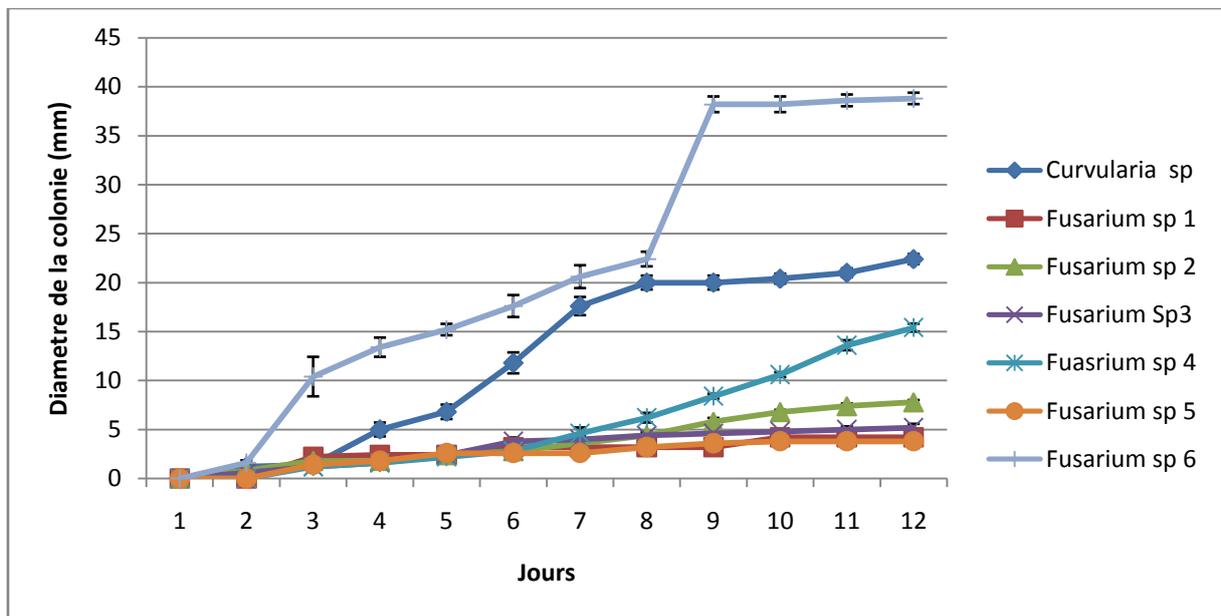
Pour *Fusarium* sp 1 débute vers le 2<sup>ème</sup> jour pour atteindre une valeur maximale de 6,4 mm au 12<sup>ème</sup> jour .

Pour *Fusarium* sp 3 débute vers le 2<sup>ème</sup> jour ,se stabilise pendant les 3<sup>ème</sup>,4<sup>ème</sup> et 5<sup>ème</sup> jour puis reprend jusqu'au 10<sup>ème</sup> jour où elle se stabilise une deuxième fois puis elle reprend une 2<sup>ème</sup> pour atteindre une valeur maximale de 7,8mm au 12<sup>ème</sup> jour .

Pour *Curvularia* sp débute vers le 2<sup>ème</sup> jour ,se stabilise pendant le 3<sup>ème</sup> jour et reprend une 2<sup>ème</sup> fois pour atteindre une valeur maximale de 8,8 mm au 12<sup>ème</sup> jour.

Pour *Torula* sp 1 débute vers le 3<sup>ème</sup> jour pour atteindre une valeur maximale de 6,8 mm au 12<sup>ème</sup> jour .

Pour *Torula* sp 2 débute vers le 2<sup>ème</sup> jour pour atteindre une valeur maximale de 10,8 mm au 12<sup>ème</sup> jour .



**Figure 25.** Evolution de la croissance radiale des colonies fongiques sélectionnées sur une période de 12 jours dans le milieu d'activité chitinolytique.

L'extension radiale de la colonie fongique dans le milieu d'activité chitinolytique :

Pour *Curvularia* sp débute vers le 2<sup>ème</sup> jour pour atteindre une valeur maximale de 22,4 mm au 12<sup>ème</sup> jour .

Pour *Fusarium* sp1 débute vers le 3<sup>ème</sup> jour , se stabilise du 6<sup>ème</sup> au 9<sup>ème</sup> jour et reprend vers le 10<sup>ème</sup> où elle atteint une valeur maximale de 4,2 mm puis stabilise une deuxième fois.

Pour de *Fusarium* sp2 débute vers le 2<sup>ème</sup> jour pour atteindre une valeur maximale de 7,8 mm au 12<sup>ème</sup> jour.

Pour *Fusarium* sp3 débute vers le 2<sup>ème</sup> jour pour atteindre une valeur maximale de 5,2 mm au 12<sup>ème</sup> jour .

Pour *Fusarium* sp4 débute vers le 3<sup>ème</sup> jour pour atteindre une valeur maximale de 15,4 mm au 12<sup>ème</sup> jour .

Pour *Fusarium* sp5 débute vers le 3<sup>ème</sup> jour pour atteindre une valeur maximale de 3,8 mm au 12<sup>ème</sup> jour.

Pour *Fusarium* sp6 débute vers le 2<sup>ème</sup> jour pour atteindre une valeur maximale de 38,8 mm au 12<sup>ème</sup> jour .

#### **IV.6.2.Discussion**

Les courbes de croissance constituent un outil utile pour mieux comprendre les caractéristiques de champignons filamenteux dans différents milieux nutritifs (Meletiadis et *al.*,2001).L'objectif du suivi de l'évolution de la croissance radiale des champignons dans le milieu d'activité protéolytique ou chitinolytique est de connaître leurs potentiels de développement sur un substrat protéique et chitinique d'où sa capacité de se développer sur la cuticule de l'insecte ciblé.

L'exosquelette de l'insecte est composée principalement de protéines et de chitine et constitue une barrière physique contre les prédateurs et les conditions environnementales (Binod et *al.*, 2007) et la capacité des champignons de se développer sur elle est primordiale pour les classer comme entomopathogène (Sapna Bai et *al.*, 2012).

Le modèle de croissance exponentielle est partagé entre la quasi-totalité des champignons filamenteux (Prosser, 1994) qui appartiennent au *Ascomycota* englobant les genres *Fusarium* spp, *Alternaria* spp, *Cladosporium* spp,*Curvularia* spp,*Torula* spp (Abarca et *al.*, 2004; Taylor ,1995).

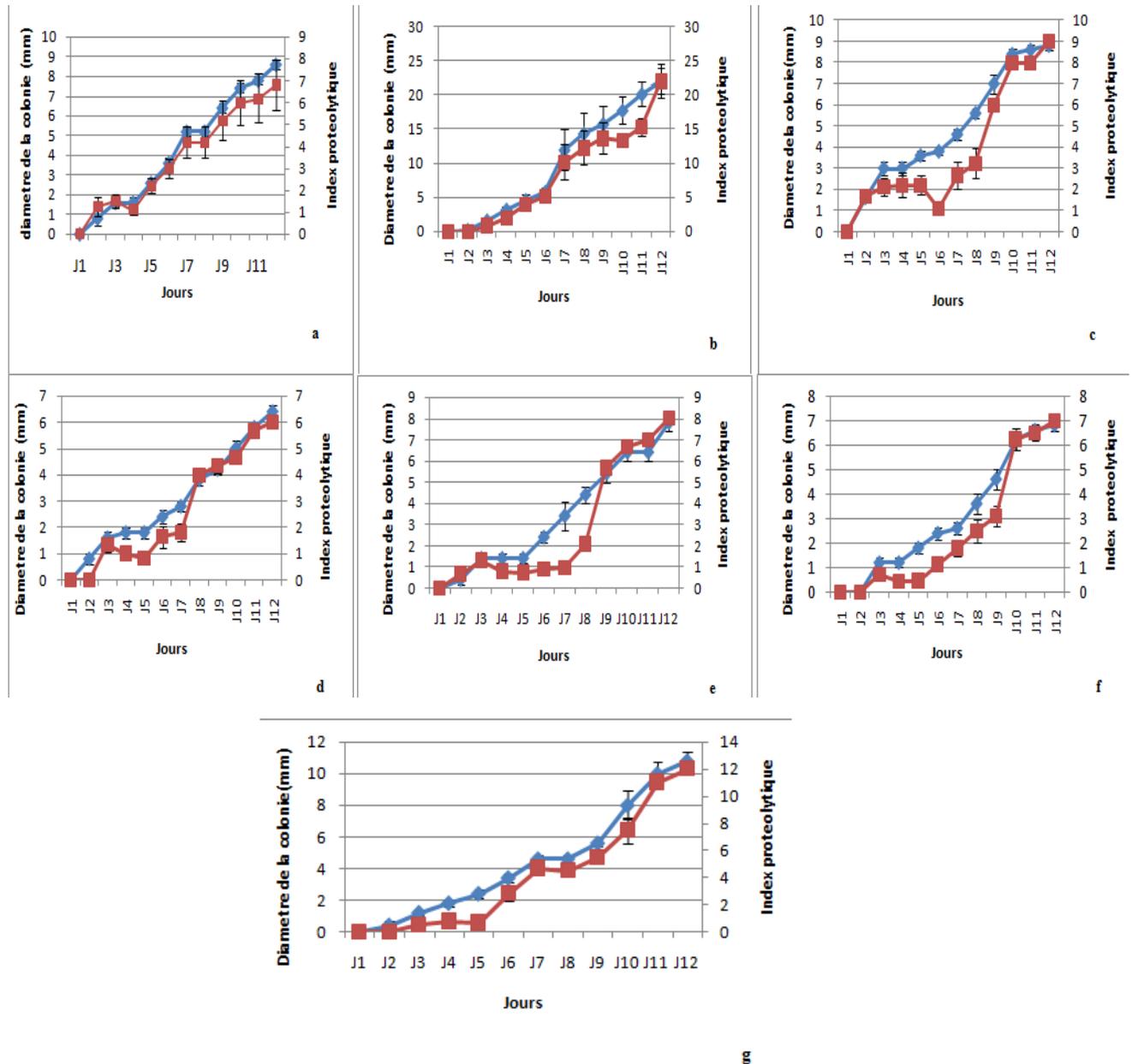
Ce modèle comprend cinq phases distinctes de la croissance : la phase de latence, la première période de transition, la phase logarithmique, la seconde période de transition, et la phase stationnaire (Meletiadis et *al.*, 2001).

La croissance des champignons filamenteux est ralentie par un manque ou un taux faible de glucose dans le milieu (Müller et *al.*, 2000) ce qui explique la croissance lente des colonies fongiques dans notre expérience.

Egalement La croissance des colonies est affectée par une interaction complexe entre les conditions environnementales (par exemple, température, pH, salinité, etc.), les taux d'absorption des éléments nutritifs et la conversion en biomasse, et la biophysique de la croissance de la colonie (Lew, 2011) et l'espèce fongique (Matsumoto, 2006) ce qui explique la variation dans la croissance observée entre les différents champignons.

IV.7.Relation entre la croissance radiale et l'activité protéolytique des champignons endophytes sélectionnés

IV.7.1.Resultats

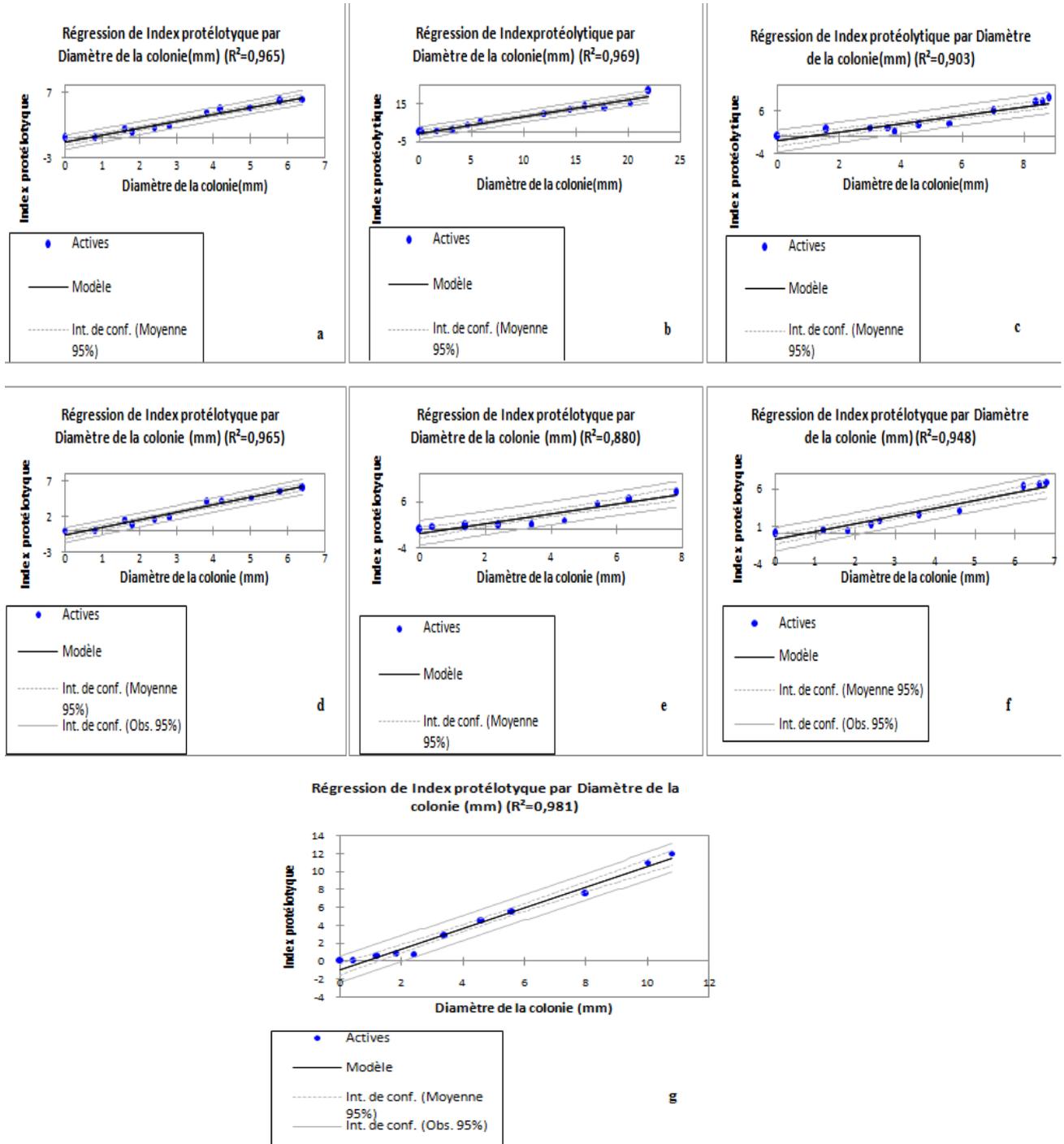


**Figure 26.**Des doubles graphes montrant la relation entre le diamètre de la colonie et l'activité protéolytique des champignons endophytes sélectionnés a.*Alternaria* sp5, b.*Cladosporium* sp, c.*Curvularia* sp, d.*Fusarium* sp1, e. *Fusarium* sp3 ,f.*Torula* sp1,g.*Torula* sp2.

D'après ces doubles graphes (Figure 26) l'activité protéolytique :

Pour *Alternaria* sp5., *Cladosporium* sp., *Fusarium* sp1., *Fusarium* sp3 ., *Torula* sp1., *Torula* sp2 .,commence avec la croissance radiale et continue à augmenter en parallèle avec cette dernière.

Pour *Curvularia* sp commence avec la croissance radiale, diminue vers le 5<sup>ème</sup> jour et reprend son augmentation au 7<sup>ème</sup> jour pour atteindre une valeur maximale au 12<sup>ème</sup> jour tandis que pendant la période s'étendant du 5<sup>ème</sup> au 12<sup>ème</sup> la croissance radiale continue à augmenter sans ralentissement.



**Figure 27.** Droites de la régression linéaire montrant la relation entre la croissance radiale et l'activité protéolytique des champignons endophytes sélectionnés a. *Alternaria* sp5, b. *Cladosporium* sp, c. *Curvularia* sp, d. *Fusarium* sp1, e. *Fusarium* sp3, f. *Torula* sp1, g. *Torula* sp2.

D'après ces droites de la régression linéaire (Figure 27) nous ne constatons que la valeur de r (coefficient de corrélation de Pearson) :

Pour *Alternaria* sp5., *Cladosporium* sp., *Fusarium* sp1 =0,98, pour *Curvularia* sp =0,95, pour *Fusarium* sp3 = 0,93, pour *Torula* sp1= 0,97, pour *Torula* sp2=0,99 se trouve dans l'intervalle 0,5 à 1 donc il ya une forte corrélation positive entre la croissance radiale et l'activité protéolytique de ces champignons endophytes .

#### **IV.7.2.Discussion**

Pour déterminer les performances enzymatiques protéolytiques en fonction de l'âge, l'espèce des champignons endophytes on cherche à connaître la relation qui existe entre l'activité protéolytique et la croissance des colonies fongiques endophytes .

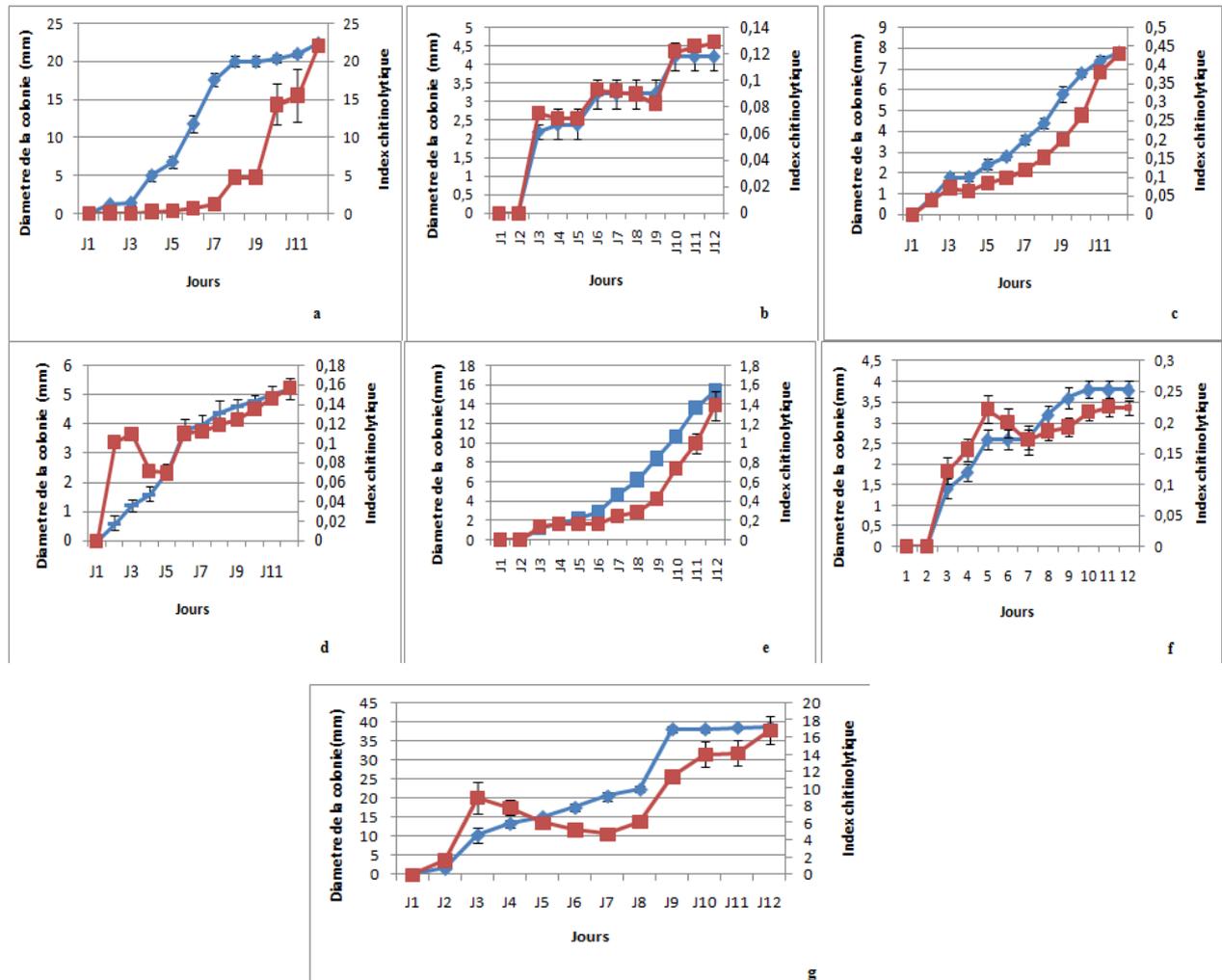
Les micro-organismes constituent une excellente source de protéases extracellulaires (Gupta et al., 2002) qui agissent comme un catalyseur dans l'hydrolyse de protéines de grande taille en molécules plus petites pour l'utilisation ultérieure par le microorganisme (Rao et al., 1998).

D'après les résultats obtenus ,l'activité protéolytique de différentes souches commence avec sa croissance radiale et continue à augmenter en parallèle avec cette dernière.

Le maximum d'activité protéolytique chez 12 souches de champignons filamenteux *Ophiostoma piceae* 387E, 387J et 387N; *Ophiostoma ainoae* 701A; *Ophiostoma pihferum* 55H; *Ophiostoma piceae* 212735 ;*Ophiostoma populinum*; *Ceratocystis adiposa* 251B; *Altemaria tenius* 2G; *Trichoderma harzianum* E58 ;*Aureobasidium pullulans* 132Q; *Cladosporium cladosporioides* 273D; a été enregistrée dans la phase active(phase logarithmique) de la croissance des champignons (Breuil et Huang,1994) ce qui confirme les résultats obtenus.

IV.8.Relation entre la croissance radiale et l'activité chitinolytique des champignons endophytes sélectionnés

IV.8.1.Resultats



**Figure 28.**Des doubles graphes montrant la relation entre le diamètre de la colonie et l'activité chitinolytique des champignons endophytes sélectionnés a. *Curvularia* sp, b. *Fusarium* sp1, c. *Fusarium* sp2, d. *Fusarium* sp3, e. *Fusarium* sp4, f. *Fusarium* sp5, g. *Fusarium* sp6.

D'après ces doubles graphes (Figure 28) l'activité chitinolytique :

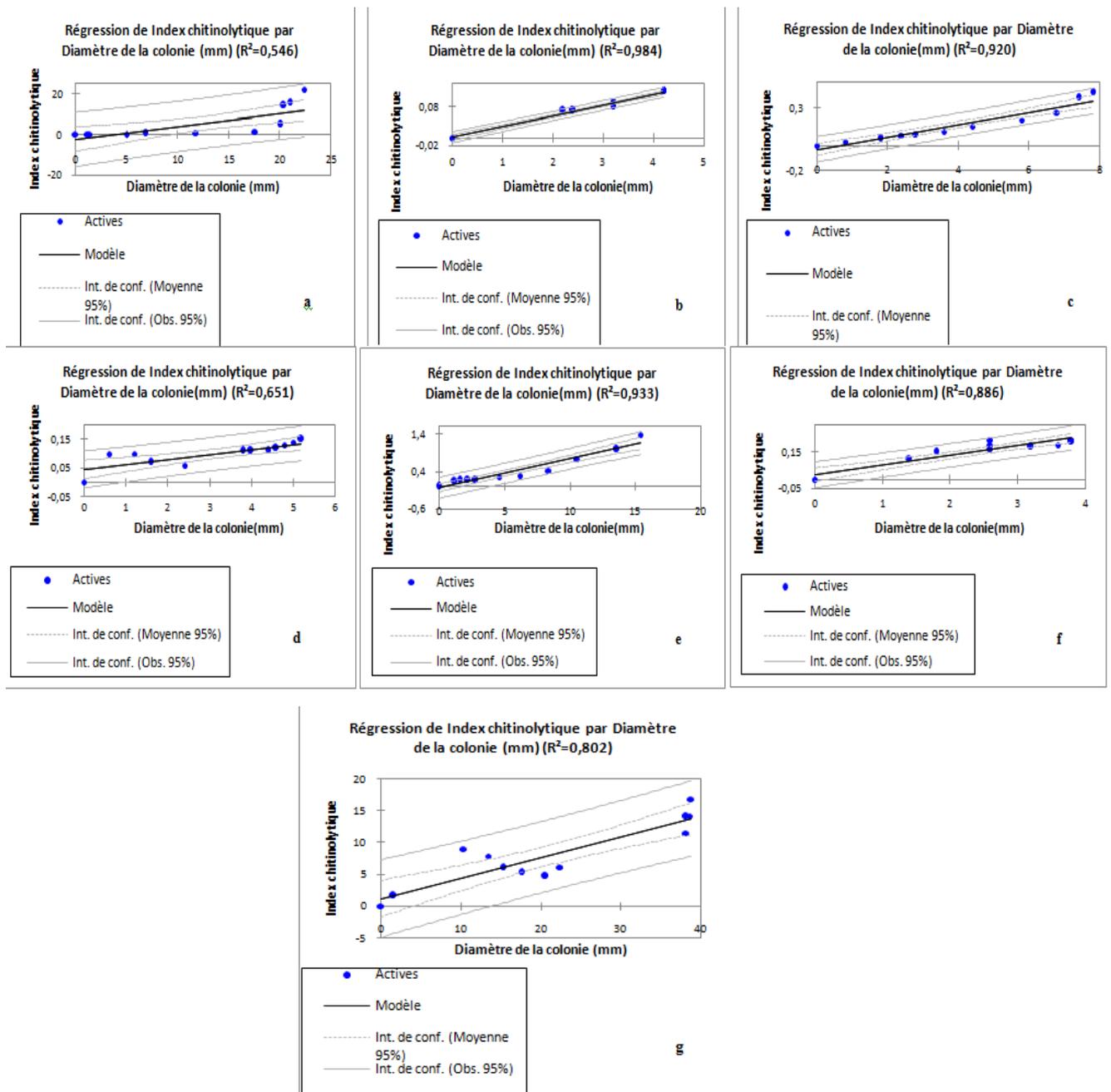
Pour *Curvularia* sp., *Fusarium* sp2., *Fusarium* sp4 commence avec sa croissance radiale et continue à augmenter en parallèle avec cette dernière.

Pour *Fusarium* sp1 commence avec sa croissance radiale, et continue à augmenter en parallèle avec cette dernière jusqu'au 10 jour où elle diminue légèrement tandis que la croissance radiale qui continue à augmenter et se stabilise périodiquement.

Pour *Fusarium* sp 3 commence avec sa croissance radiale, diminue au 3<sup>ème</sup> jour au contrairement à la croissance radiale puis reprend au 5<sup>ème</sup> jour et continue à augmenter en parallèle avec cette dernière jusqu'au 12<sup>ème</sup> jour.

Pour *Fusarium* sp5 commence avec sa croissance radiale, diminue au 5<sup>ème</sup> jour avec une stabilisation de la croissance radiale puis reprend au 7<sup>ème</sup> jour et continue à augmenter en parallèle avec cette dernière jusqu'au 12<sup>ème</sup> jour.

Pour *Fusarium* sp 6 commence avec sa croissance radiale, diminue au 3<sup>ème</sup> jour avec une augmentation de la croissance radiale puis reprend au 8<sup>ème</sup> jour et continue à augmenter en parallèle avec cette dernière jusqu'au 12<sup>ème</sup> jour.



**Figure 29.** Droites de la régression linéaire montrant la relation entre la croissance radiale et l'activité chitino lytique des champignons endophytes sélectionnés a. *Curvularia* sp, b. *Fusarium* sp1, c. *Fusarium* sp2, d. *Fusarium* sp3, e. *Fusarium* sp4, f. *Fusarium* sp5, g. *Fusarium* sp6.

D'après ces droites de régression linéaire (Figure 29) nous ne constatons que la valeur de r (coefficient de corrélation de Pearson) :

Pour *Curvularia* sp=0,73 , pour *Fusarium* sp1=0,99 , pour *Fusarium* sp2=0,95, pour *Fusarium* sp3=0,8, pour *Fusarium* sp4= 0,96, pour *Fusarium* sp5= 0,94, pour *Fusarium* sp6=0,89 donc il ya une forte corrélation positive entre la croissance radiale et l'activité chitinolytique pour ces champignons endophytes.

#### **IV.8.2.Discussion**

Pour déterminer les performances enzymatiques chitinolytiques en fonction de l'âge de l'espèce des champignons endophytes on cherche à connaître la relation qui existe entre l'activité chitinolytique et la croissance des colonies fongiques endophytes .

Une large gamme de micro-organismes a la capacité de dégrader la chitine en produisant les chitinases pour la nutrition, l'antagonisme et la lutte contre les parasites (Faramarzi et *al.*, 2009).

D'après les résultats obtenus l'activité chitinolytique de différentes souches commence avec sa croissance radiale et continue à augmenter en parallèle avec cette dernière.

L'activité chitinolytique des champignons entomopathogènes *B. bassiana*, *Trichoderma harzianum*, *Aspergillus fumigatus*, *Lecanicillium lecanii*, *Metarhizium anisopliae*, *Fusarium* spp augmente en fonction du temps (Matsumoto, 2006).

La production de chitinase a lieu lors des phases de croissance logarithmique de différents champignons ( Ghanem et *al.*, 2011) ce qui confirme nos résultats.

#### **IV.9.Mise en évidence de l'activité insecticide des filtrats d'activité protéolytique et chitinolytique vis à vis *Rhizopertha dominica*, *Sitophilus granarius* et *Sitophilus zeamais***

Pour cette partie les filtrats des mycotaxons qui sont dotées d'une activité protéolytique et /ou chitinolytique sont testés pour leur activité insecticide vis à vis *Rhizopertha dominica*, *Sitophilus granarius* et *Sitophilus zeamais* et les résultats ainsi obtenus sont représentés sur les figures (30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41).

IV.9.1.Résultats

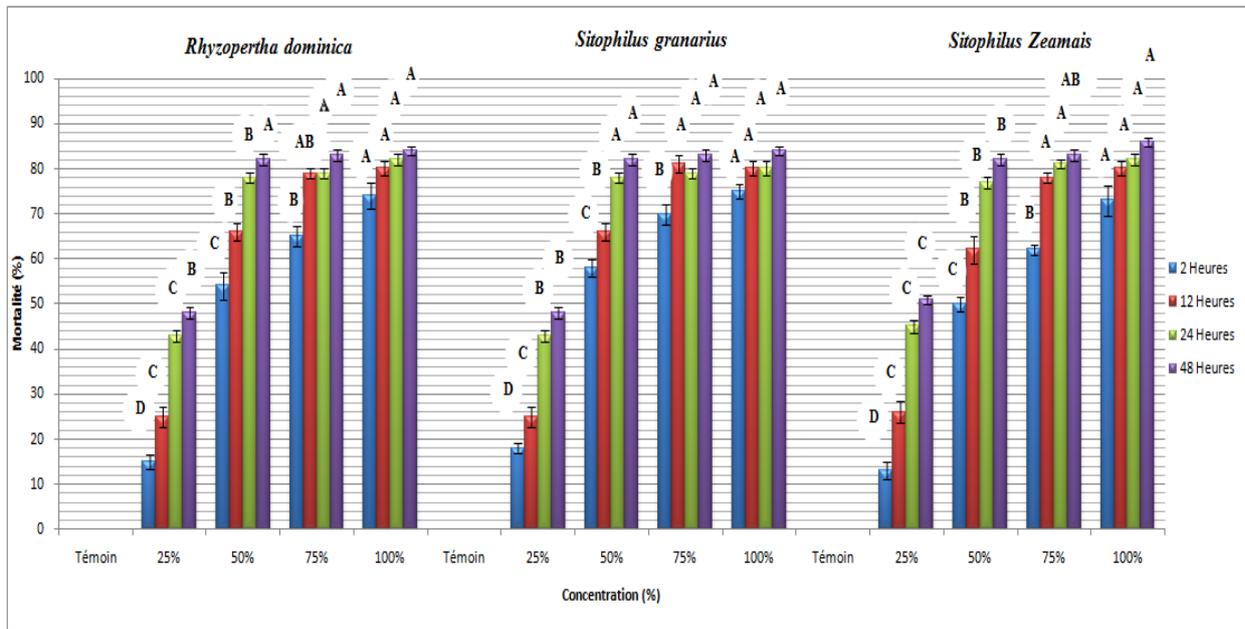


Figure 30. Mortalité en (%) des insectes traités avec différentes concentrations du filtrat d'activité protéolytique d'*Alternaria* sp5.

Pour le traitement de *Rhyzopertha dominica* par le filtrat d'activité protéolytique d'*Alternaria* sp5, l'analyse de la variance (Anova) et le test de Newman-Keuls (avec un intervalle de confiance à 95%) ont révélé :

À 2 heures une différence significative entre toutes les concentrations du filtrat.

À 12 heures une différence non significative entre les concentrations 75% et 100% et une différence significative entre les autres concentrations du filtrat.

À 24 heures une différence non significative entre les concentrations 75% et 100% et entre 50% et 75% et une différence significative entre les autres concentrations du filtrat.

À 48 heures différence non significative entre les concentrations 25% et 100% et entre 25% et 75% et une différence significative entre les autres concentrations du filtrat.

Pour le traitement de *Sitophilus granarius* par le filtrat d'activité protéolytique d'*Alternaria* sp5, l'analyse de la variance (Anova) et le test de Newman-Keuls (avec un intervalle de confiance à 95%) ont révélé :

À 2 heures une différence significative entre toutes les concentrations du filtrat.

À 12 heures une différence non significative entre les concentrations 75% et 100% et une différence significative entre les autres concentrations.

À 24 heures une différence non significative entre les concentrations 75% et 100% et une différence significative entre les autres concentrations.

À 48 heures une différence non significative entre les concentrations 50 % et 75% ,50% et 100% ,75% et 100% et une différence significative entre les autres concentrations

Pour le traitement de *Sitophilus zeamais* par le filtrat d'activité protéolytique d'*Alternaria* sp5.l'analyse de la variance (Anova) et le test de Newman-Keuls (avec un intervalle de confiance à 95%) ont révélé :

À 2 heures une différence non significative entre tous les concentrations du filtrat.

À 12 heures une différence non significative entre les concentrations 75% et 100% et une différence significative entre les autres concentrations

À 24 heures une différence non significative entre les concentrations 75% et 100% et une différence significative entre les autres concentrations

À 48 heures une différence non significative entre les concentrations 50% et 75 %et entre 75% et 100%

À partir des résultats obtenus (Figure 30) nous avons constaté que le filtrat d'activité protéolytique du champignon endophyte *Alternaria* sp5 a une activité insecticide variable vis-à-vis *Rhizopertha dominica*,*Sitophilus granarius* et *Sitophilus zeamais* cette variation d'activité (exprimée en mortalité observée chez les individus) est déterminée également sur une échelle chronologique et en fonction des différentes concentrations .

L'effet du filtrat change selon la concentration utilisée et le temps, la concentration 100% semble la concentration la plus efficace contre les insectes ciblés après 48heures du premier traitement avec des taux de mortalité de 86% pour *Rhizopertha domininca* ,84% pour *Sitophilus granarius* et 84% pour *Sitophilus zeamais* enregistrés après 48 heures d'essai.

#### **IV.9.1.2.Discussion**

L'intérêt de cette partie de notre travail est de rechercher des souches endophytes de *Nerium oleander* L qui possèdent une capacité insecticide contre 3 insectes des denrées stockées *Rhizopertha domininca* ,*Sitophilus granarius* ,*Sitophilus zeamais*.en effet, nous avons pu évaluer l'activité insecticide du filtrat d'activité protéolytique d' *Alternaria* sp5 présentant des concentrations croissantes .

Des taux de mortalité maximale de 86% pour *Rhizopertha domininca* ,84% pour *Sitophilus granarius* et 84% pour *Sitophilus zeamais* enregistrés après 48 heures d'essai.

Ceci laisse suggérer qu'*Alternaria* sp5 pourrait être utilisé en matière de lutte biologique contre les insectes précités.

On suggère que la mortalité des insectes est peut être du aux protéases, mycotoxines ou autres molécules à potentiel insecticide produite par *Alternaria* sp5.

Les protéases dégradent la cuticule de l'insecte et constituent un facteur important de virulence des champignons entomopathogènes (Pérez *et al.*, 2014).

Les 2 protéases du champignon entomopathogène *Beauveria bassiana* pr1 et pr2 agissent en collaboration pour dégrader l'épicuticule de l'insecte (St. Leger *et al.*, 1996; Campos *et al.*, 2005; Kaur et Padmaja, 2008).

Les mycotoxines provoquent des maladies pour le ravageur par la modulation des réponses de défense de ce dernier, permettant la colonisation de son tissu et ont un impact négatif sur les insectes qui se nourrissent de plantes hôtes infectées par le champignon endophyte producteur de ces molécules (Johnson *et al.*, 2013).

Les toxines d'*Alternaria alternata* ont des effets négatifs sur la reproduction de *Macrosiphum rosivorum* (Yang *et al.*, 2012).

L'extrait brut (toxine) d'*Alternaria alternata* souche 7484 pulvérisé à une concentration de 50,0 µg / ml stimule la résistance de *Rosa chinensis* contre *Macrosiphum rosivorum* (Yang *et al.*, 2012).

Une diminution de l'effectif des larves, un retard de développement et diminution du taux d'émergence des adultes du ravageur *Henosepilachna vigintioctopunctata* a été remarquée lorsqu'ils s'alimentent des feuilles *Withania somnifera* infectées par le champignon *A. alternata* (Sharma *et al.*, 2012).

Un autre type de molécules insecticides sont les molécules inhibitrices d'acétylcholinestérase qui sont utilisées en l'agriculture dans le contrôle des insectes et des arthropodes nuisibles (Singh *et al.*, 2012) en agissant sur leurs systèmes nerveux provoquant leur mort (Singh *et al.*, 2014).

Le champignon endophyte *Alternaria sp* Cas 1(JX177676) isolé à partir *Ricinus communis* est doté d'une activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase avec un taux d'inhibition de 78% (Singh *et al.*, 2012).

Plusieurs champignons endophytes du genre *Alternaria spp* isolées à partir *Azadirachta indica*, *Ocimum tenuiflorum*, *Withania somnifera*, *Vinca rosea*, *Ficus carica*, *Spindus detergens*, *Psidium guajava*, *Ricinus communis* produisent des inhibiteurs d'acétylcholinestérase qui ont une capacité d'inhibition variant de 3% à 85% (Singh *et al.*, 2014).

Comparativement à cette partie de notre étude, plusieurs travaux ont porté sur l'utilisation des filtrats fongiques du genre *Alternaria spp* en matière de lutte contre les insectes.

La pulvérisation du filtrat du champignon *Alternaria sp* Cas 1(JX177676) isolé à partir *Ricinus communis* à différentes concentrations (5, 10, 15, and 20 µl/ml) provoque une

mortalité croissante des larves de *Spodoptera litura* en fonction du dose utilisée (Singh et al., 2012).

Des extraits des filtrats d' *Alternaria alternata* à différentes concentrations 5, 10, 15, 20, 25 µl/ml ajoutés aux régime alimentaire de provoquent des effets néfastes sur la viabilité, le développement et la croissance des larves de *Spodoptera litura* (Kaur et al., 2013).

Les espèces du genre *Alternaria* produisent des molécules insecticides (Singh et al., 2012) et sont prouvées comme entomopathogène pour *Thrips tabaci* et *Oulema gallaeciana* (Machowicz-Stefaniak et Miczulski, 1985), pour *Anopheles* sp et *Culex* sp (Rybalchenko et Gopkalo, 1980).

Podova et al (1977) ont isolé une substance insecticide puissante à partir de cultures stationnaires des différents souches d'*Alternaria spp* qui inhibent le développement de *Drosophila melanogaster*.

Christias et al (2001) ont démontré le potentiel aphicide d'*Alternaria alternata* Une souche d'*Alternaria tenuis* est signalée comme entomopathogène *Oulema gallaeciana* par Miczulski et Machowicz-Stefaniak (1977).

*Alternaria* sp a été isolé de 3ème et 4ème stade larvaire d'*Aedes* ,d'*Anopheles* et de *Culex* spp (Rybalchenko et Gopkalo, 1980).

*Alternaria alternata* a été isolé à partir des cadavres de *Zyginidia pullula* (Ozino, 1982) et des adultes hivernants de *Corythuca ciliata* (Ozino et Menardo, 1984), signalé comme pathogène pour les thrips (Raizada, 1976) et comme faible pathogène de *Oulema gallaeciana* (Machowicz-Stefaniak et Miczulski, 1985).

*Alternaria infectoria* et *Alternaria alternata* ont été signalés comme un agent de lutte biologique des cochenilles et des pucerons (Shabana et Ragab , 1997; Christias et al., 2001).

IV.9.2.Mise en évidence de l'activité insecticide du filtrat d'activité protéolytique de *Cladosporium* sp vis à vis *Rhizopertha dominica*, *Sitophilus granarius* et *Sitophilus zeamais*

IV.9.2.1.Résultats

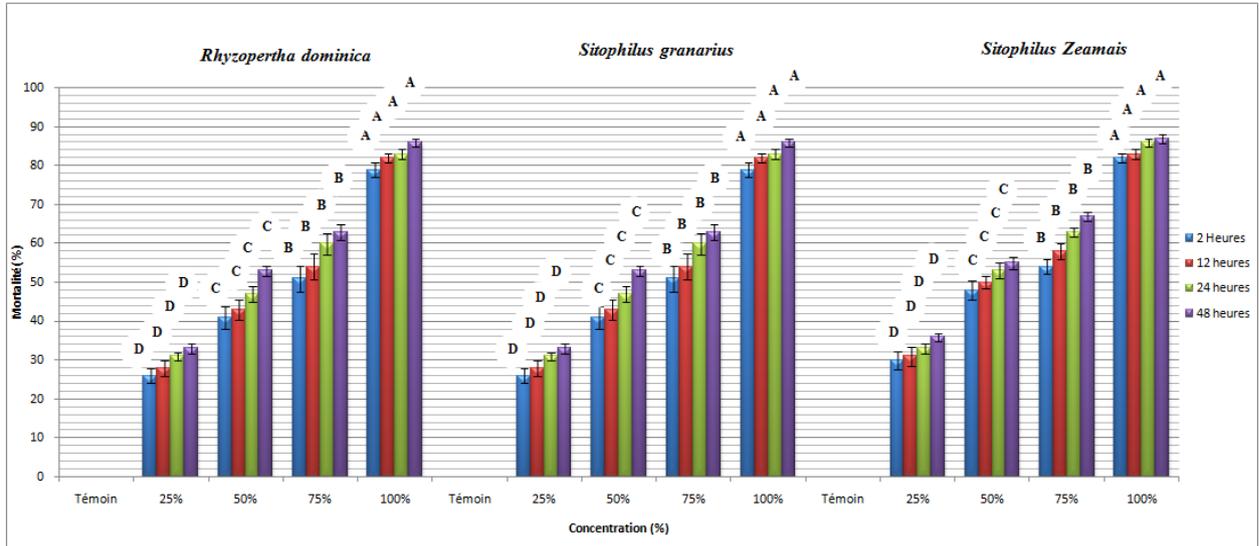


Figure 31.Mortalité en (%) des insectes traités avec différentes concentrations du filtrat d'activité protéolytique de *Cladosporium* sp.

Pour le traitement de *Rhizopertha dominica*, *Sitophilus granarius*, *Sitophilus zeamais* par le filtrat d'activité protéolytique de *Cladosporium* sp. l'analyse de la variance (Anova) et le test de Newman-Keuls (avec un intervalle de confiance à 95%) ont révélé à 2 h, 12h, 24h et 48h des différences significatives entre toutes les concentrations du filtrat.

À partir des résultats obtenus (Figure 31), nous avons constaté que le filtrat d'activité protéolytique du champignon endophyte *Cladosporium* sp. a une activité insecticide variable vis-à-vis *Rhizopertha dominica*, *Sitophilus granarius* et *Sitophilus zeamais*, cette variation d'activité (exprimée en mortalité observée chez les individus) est déterminée également sur une échelle chronologique et en fonction des différentes concentrations.

L'effet du filtrat change selon la concentration utilisée et le temps, la concentration 100% semble la concentration la plus efficace contre les insectes ciblés avec des taux de mortalité de 86% pour *Rhizopertha dominica* 86% pour *Sitophilus granarius* et 87% pour *Sitophilus zeamais* enregistrés après 48 heures d'essai.

IV.9.2.2.Discussion

L'intérêt de cette partie de notre travail est de rechercher des souches endophytes de *Nerium oleander* L qui possèdent une capacité insecticide contre 3 insectes des denrées stockées *Rhizopertha dominica*, *Sitophilus granarius*, *Sitophilus zeamais*.

En effet nous avons pu évaluer l'activité insecticide du filtrat d'activité protéolytique de *Cladosporium sp* présentant des concentrations croissantes.

Un taux de mortalité maximale de 86% pour *Rhizopertha dominica*, 86% pour *Sitophilus granarius* et 87 % pour *Sitophilus zeamais* enregistrés après 48 heures d'essai.

Ceci laisse à suggérer que *Cladosporium sp* pourrait être utilisé en matière de lutte biologique contre les insectes précités.

On suggère que la mortalité des insectes est peut être due aux protéases, mycotoxines ou autres molécules à capacité insecticide produites par ce champignon.

Les protéases dégradent les protéines de la cuticule (St. Leger *et al.*, 1998).

Les mycotoxines sont des métabolites secondaires de faible poids moléculaire, principalement des peptides cycliques qui possèdent des propriétés insecticides (Strasser *et al.*, 2000 ; Vey *et al.*, 2001).

Les champignons entomopathogènes secrètent des mycotoxines dans des milieux de cultures artificiels (Mazet *et al.*, 1994; Vey, 1998 ; Vey *et al.*, 2001).

Le champignon endophyte *Cladosporium uredinicola* isolé à partir de *Tinospora cordifolia* secrète un mycotoxine à effet négatif sur l'émergence des adultes, la longévité et la reproduction de *Spodoptera litura* (Thakur *et al.*, 2013).

Des études récentes (Thakur *et al.*, 2013) ont montré que les plantes de chou-fleur infectées par le champignon endophyte *Cladosporium sp.* ont un effet négatif sur la prise alimentaire et le développement de *S. litura*.

*Cladosporium sphaerospermum* isolé à partir *Aegiceras corniculatum* (L.) secrète des alcaloïdes, des composés phénoliques et quinine (Kjer, 2010), ces composés ont été démontrés comme répulsifs de *S. litura* (Morimoto *et al.*, 2006).

Les Inhibiteurs de l'acétylcholinestérase est utilisée en agriculture pour le contrôle des insectes ravageurs en agissant sur leurs systèmes nerveux provoquant leurs morts (Singh *et al.*, 2014).

Le champignon endophyte *Cladosporium cladosporioides* LF70 isolé à partir *Huperzia serrata* secrète l'huperzine A à capacité inhibiteur de l'acétylcholinestérase (Zhang *et al.*, 2011).

Les champignons endophytes *Shiraia sp* et *Cladosporium cladosporioides* isolées des feuilles d' *Huperzia serrata* produisent l'inhibiteur de l'acétylcholinestérase l'huperzine (Zhu *et al.*, 2010 ; Zhang *et al.*, 2011).

Des extraits des filtrats des champignons endophytes des genres *Chaetomium sp*, *Guignardia mangiferae*, *Pestalotiopsis guepinii*, *Phomopsis sp*, *Physalospora sp*, *Xylaria sp* isolés à partir

des plantes des familles *Anacardiaceae*, *Apocynaceae*, *Leguminosae* et *Palmae* sont dotés d'une activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase (Rodrigues et al., 2004).

Comparativement à cette partie de notre étude, il existe des travaux qui ont porté sur l'utilisation des filtrats fongiques du genre *Cladosporium* spp en matière de lutte contre les insectes.

Le traitement des adultes d'*Acanthoscelides obtectus* par différentes concentrations (25%,50%,75%,100%) du filtrat du champignon endophyte du *Nerium oleander* *Cladosporium* sp provoque les taux de mortalités maximales suivants:39%-41%-61%-84% respectivement) et cela après 48heures (Laib, 2014) .

Des champignons endophytes entomopathogènes du genre *Cladosporium* spp sont isolés à partir de différentes parties des plantes de café (Vega et al., 2008).

Les champignons entomopathogènes du genre *Cladosporium* spp. ont été isolés à partir différents insectes (Abdel-Baky 2000; Abdel-Baky et Abdel-Salam, 2003; Abdel-Baky et al.,1998; Lagowska,1995;Pan et al.,1989; Perea et al., 2003;Rojas et al., 1998; Thumar Kapadia et al.,1994) et acariens (Cabrera et al., 2005; Van der Geest et al.,2002). *Cladosporium oxysporum* est pathogène aux insectes (Zi-Chao et Zhuang-Tu, 1980; Bellotti, 1983; Samways, 1983).

*Cladosporium herbarum* montre une bonne activité insecticide contre *Aleurodicus coccis*, *Bemisia* sp., *Aleurothrixus* sp, et *Dialeurodes* sp (Rojas et al., 1998).

Plusieurs études ont démontré la capacité insecticide de *Cladosporium* spp contre les aleurodes, les pucerons, les homoptères (Abdel-Baky et al. 1998; Baoyu et al., 1997; Pan et al., 1989; Thumar et Kapadia, 1994).

*Cladosporium* sp cause la mortalité de 82.2% des nymphes d'*Aleurothrixus aepium* dans des conditions de terrain (Farias et Filho ,1987).

Le pourcentage de *Bemisia* spp infecte 10.0% à 28.0% dans les conditions du terrain et 80% dans les conditions de laboratoire (Abdel-Baky et al., 1998).

*Cladosporium cladosporioides* cause une mortalité de 20–57% de *Hemiberlesia pitysophila* dans les conditions du terrain et 39% dans les conditions de laboratoire (Pan et al., 1989).

Il ya des rapports qui démontrent le rôle de *Cladosporium* spp. dans la réduction de la taille de la population de pucerons (Baoyu et al., 1997; Lagowka, 1995;Vallejo et al., 1996).

Abdel-Baky et al. (1998) ont enregistré trois espèces de *Cladosporium* (*C. uredinicola*, *C. et C. cladosporioides chlorocephalum*) qui infectent *Bemisia* spp., *Aphis gossypii* et *Empoasca* sp.

Bahar et al. (2011) ont démontré le potentiel insecticide de *Cladosporium sp.* contre *Helicoverpa armigera* (Hübner), *Aphis gossypii* et *Bemisia tabaci* (Gennadius) .

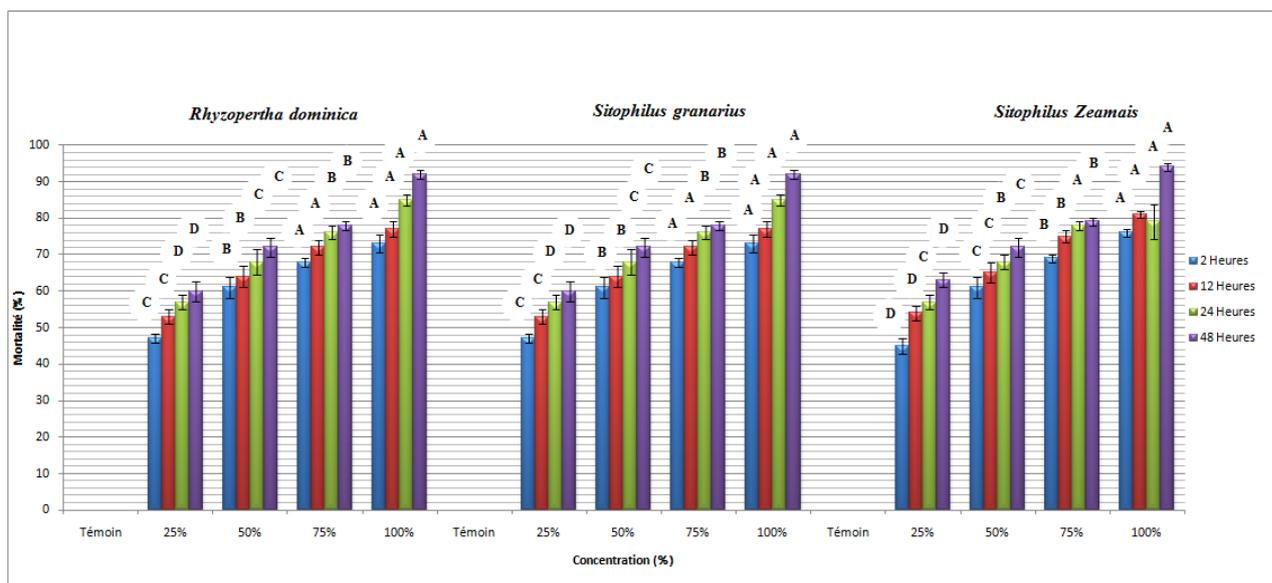
*Cladosporium cladosporioides* provoque une mortalité de 20-57% de *Hemiberlesia pitysophila* (Homoptera: *Diaspididae*) dans des conditions de terrain et 38,9% dans les tests de laboratoire (Pan et al., 1989).

Samways et Grech (1986) ont trouvé que *C. oxysporum* isolé de *Planococcus citri* (Risso) est pathogène pour une gamme d'insectes homoptères.

*C. cladosporioides* a une activité acaracide contre *Tetranychus urticae* et *Paracoccus marginatus* (Jeyarani et al., 2011).

#### IV.9.3.Mise en évidence de l'activité insecticide des filtrats d'activité protéolytique et chitinolytique de *Curvularia sp* vis à vis *Rhyzopertha dominica*, *Sitophilus granarius* et *Sitophilus zeamais*

##### IV.9.3.1.Résultats



**Figure 32.** Mortalité en (%) des insectes traités avec différentes concentrations du filtrat d'activité protéolytique de *Curvularia sp.*

Pour le traitement de *Rhyzopertha dominica* par le filtrat d'activité protéolytique de *Curvularia sp.* l'analyse de la variance (Anova) et le test de Newman et Keuls (avec un intervalle de confiance à 95%) ont révélé :

À 2 heures une différence significative entre toutes les concentrations du filtrat.

À 12 heures une différence non significative entre les concentrations 75% et 100% et une différence significative entre les autres concentrations.

À 24 heures une différence non significative entre les concentrations 75% et 100% et une différence significative entre les autres concentrations.

À 48 heures une différence non significative entre toutes les concentrations du filtrat.

Pour le traitement *Sitophilus granarius* par le filtrat d'activité protéolytique de *Curvularia* sp. l'analyse de la variance (Anova) et le test de Newman-Keuls (avec un intervalle de confiance à 95%) ont révélé :

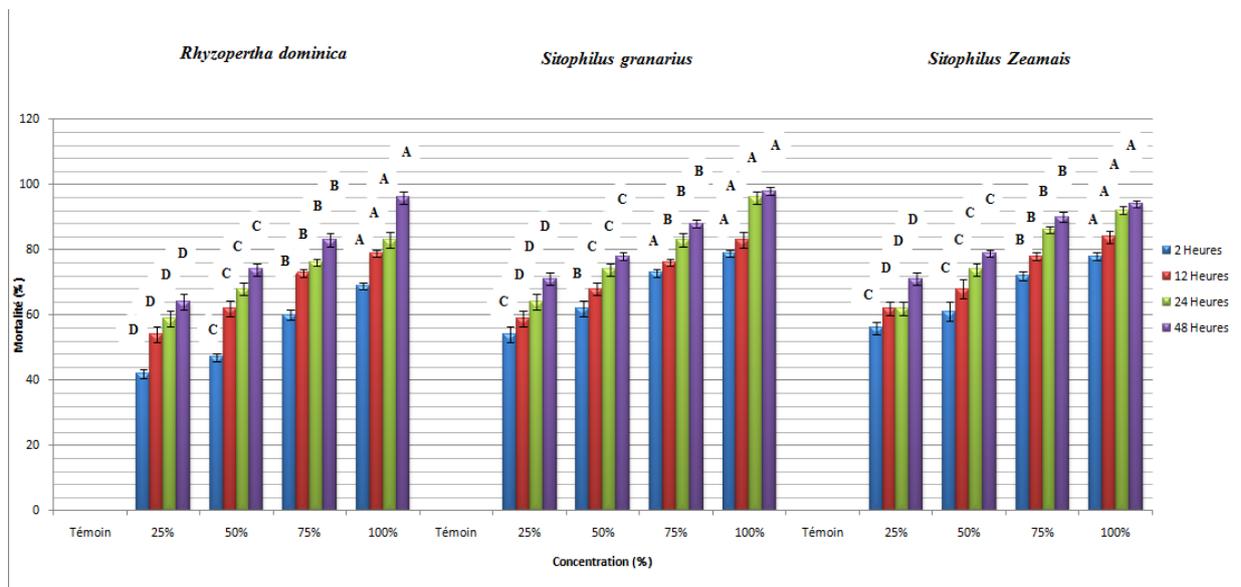
À 2 h et 12 h une différence non significative entre les concentrations 75% et 100% et une différence significative entre les autres concentrations.

À 24 h et 48h une différence significative entre toutes les concentrations du filtrat.

Pour le traitement de *Sitophilus zeamais* par le filtrat d'activité protéolytique de *Curvularia* sp. l'analyse de la variance (Anova) et le test de Newman-Keuls (avec un intervalle de confiance à 95%) ont révélé :

À 2 h,12h,48h une différence significative entre tous les concentrations du filtrat.

À 24h une différence non significative entre les concentrations 75% et 100% et une différence significative entre les autres concentrations.



**Figure 33.** Mortalité en (%) des insectes traités avec différentes concentrations du filtrat d'activité chitinolytique de *Curvularia* sp.

Pour le traitement de *Rhyzopertha dominica* par le filtrat d'activité chitinolytique de *Curvularia* sp. l'analyse de la variance (Anova) et le test de Newman-Keuls (avec un intervalle de confiance à 95%) ont révélé une différence significative entre toutes les concentrations du filtrat.

Pour le traitement de *Sitophilus granarius* par le filtrat d'activité chitinolytique de *Curvularia* sp. l'analyse de la variance (Anova) et le test de Newman-Keuls (avec un intervalle de confiance à 95%) ont révélé :

À 2 h une différence non significative entre les concentrations 75% et 100% et une différence significative entre les autres concentrations.

À 12h, 24h,48h une différence significative entre toutes les concentrations.

Pour le traitement de *Sitophilus zeamais* par le filtrat d'activité chitinolytique de *Curvularia* sp. l'analyse de la variance (Anova) et le test de Newman-Keuls (avec un intervalle de confiance à 95%) ont révélé :

À 2 h une différence non significative entre les concentrations 25% et 50% et une différence significative entre les autres concentrations.

À 12h, 24h,48h une différence significative entre toutes les concentrations.

À partir des résultats obtenus figures (32,33) nous avons constaté que les 2 filtrats d'activité protéolytique et chitinolytique du champignon endophyte *Curvularia sp* ont une activité insecticide variable vis-à-vis *Rhizopertha dominica*, *Sitophilus granarius* et *Sitophilus zeamais* cette variation d'activité (exprimée en mortalité observée chez les individus) est déterminée également sur une échelle chronologique et en fonction des différentes concentrations.

L'effet des filtrats du *Curvularia* sp. change selon la concentration utilisée et le temps, la concentration 100% semble la concentration la plus efficace contre les insectes ciblés avec des taux de mortalité enregistrés après 48 heures d'essai :

Pour le filtrat d'activité protéolytique 92% pour *Rhizopertha domininca* ,92% pour *Sitophilus granarius* et 94% pour *Sitophilus zeamais* .

Pour le filtrat d'activité chitinolytique les taux de mortalité sont 96% pour *Rhizopertha domininca* ,98% pour *Sitophilus granarius* et % 94 pour *Sitophilus zeamais* .

#### **IV.9.3.2.Discussion**

L'intérêt de cette partie de notre travail est de rechercher des souches endophytes de *Nerium oleander* L qui possèdent une capacité insecticide contre 3 insectes des denrées stockées *Rhizopertha domininca* ,*Sitophilus granarius*,*Sitophilus zeamais* .

En effet, nous avons pu évaluer l'activité insecticide des filtrats d'activité chitinolytique et protéolytiques de *Curvularia* sp. présentant des concentrations croissantes.

des taux de mortalité maximales sont enregistrés après 48 heures d'essai pour le filtrat d'activité protéolytique 92% pour *Rhizopertha domininca* ,92% pour *Sitophilus granarius* ,94% pour *Sitophilus zeamais* et pour le filtrat d'activité chitinolytique les taux de mortalité

sont 96% pour *Rhizopertha dominica*, 98% pour *Sitophilus granarius* et 94% pour *Sitophilus zeamais*.

Ceci laisse à suggérer que *Curvularia* sp. pourrait être utilisé en matière de lutte biologique contre les insectes précités.

On suggère que la mortalité des insectes est peut être due aux chitinases et /ou protéases produites par ce champignon.

Les chitinases sont produites par plusieurs espèces fongiques (Pedraza et Lopes, 1991; Patidar et al., 2005; Yamazaki et al., 2008; Kern et al., 2009; Ghanem et al., 2010), reconnus comme bioinsecticide (Pérez et al., 2014) et jouent un rôle important durant l'infection (Seidl, 2008). Elles dégradent la chitine en molécules à faible poids moléculaires comme le chitotetraose, le chitotriose et le chitobiose (Binod et al., 2007).

Les chitinases agissent de différentes façons contre les insectes soit par voie digestive par la pénétration dans l'intestin d'insectes causant ainsi des blessures de la membrane péritrophique qui se traduira par l'inhibition de la prise alimentaire et conduit par conséquent à la mort (Binod et al., 2007) ou par contact en décomposant la cuticule des insectes (Pérez et al., 2014).

Les champignons entomopathogènes sont utilisés dans la lutte biologique contre différents insectes et leur activité insecticide dépend de leur arsenal enzymatique incluant les protéases et chitinases qui ont comme rôle de dégrader la cuticule de l'insecte (Pérez et al., 2014).

Les champignons entomopathogènes *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* (Kang et al., 1999) *Lecanicillium muscarium* CCFEE 5003 (Fenice et al., 1997) *Trichoderma* spp (Agrawal et Kotasthane, 2012) produisent des chitinases dans un milieu de culture liquide contenant la chitine colloïdale comme source de carbone.

*Curvularia lunata* est trouvé entomopathogène contre *Nezara viridula* (Insecta: Heteroptera) parasitant *Vigna unguiculata* (Singh et al., 1991).

Comparativement à cette partie de notre étude, il existe des travaux qui ont porté sur l'utilisation des filtrats fongiques en matière de lutte contre les insectes.

Une mortalité de 70% des larves de *Helicoverpa armigera* par l'application topique du filtrat du *Trichoderma harzianum* à concentration de chitinase 2000 U ml<sup>-1</sup> (Binod et al., 2007)

L'utilisation du filtrat contenant les chitinases de *Trichoderma harzianum* à différentes concentrations contre *Helicoverpa armigera* réduit fortement l'effectif des différents stades de développement de cet insecte (Binod et al., 2007).

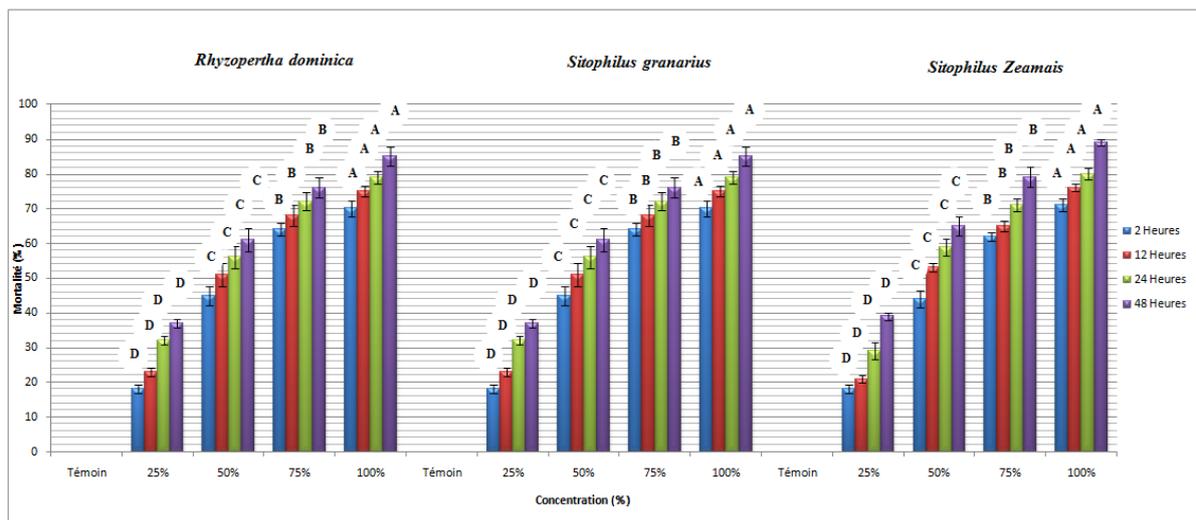
Les filtrats de *Beauveria sulfurescens* possèdent une activité cytotoxique contre les cellules de l'insecte *Mamestra brassicae* (Mollier, 1994).

Une mortalité dose dépendante des adultes de *Culex quinquefasciatus*, *Aedes aegypti* et *Anopheles stephensi* a été enregistrée après 24 heures de traitement par des filtrats de champignon entomopathogène *Culicinomyces clavisporus* (Singh et Prakash, 2012).

Cette mortalité varie entre 33.3 % pour une concentration de 4µl/cm<sup>2</sup> et 93.3% pour une concentration de 9 µl/cm<sup>2</sup> pour *Culex quinquefasciatus*, entre 40,4% pour une concentration de 2µl/cm<sup>2</sup> et 100% pour une concentration de 10 µl/cm<sup>2</sup> pour *Aedes aegypti* et entre 70,4 % pour une concentration de 3 µl/cm<sup>2</sup> et 95% pour une concentration de 7 µl/cm<sup>2</sup> pour *Anopheles stephensi* (Singh et Prakash, 2012).

**IV.9.4.Mise en évidence de l'activité insecticide des filtrats d'activité protéolytique et chitinolytique du genre *Fusarium spp* vis à vis *Rhyzopertha dominica*, *Sitophilus granarius* et *Sitophilus zeamais*.**

**IV.9.4.1.Résultats**

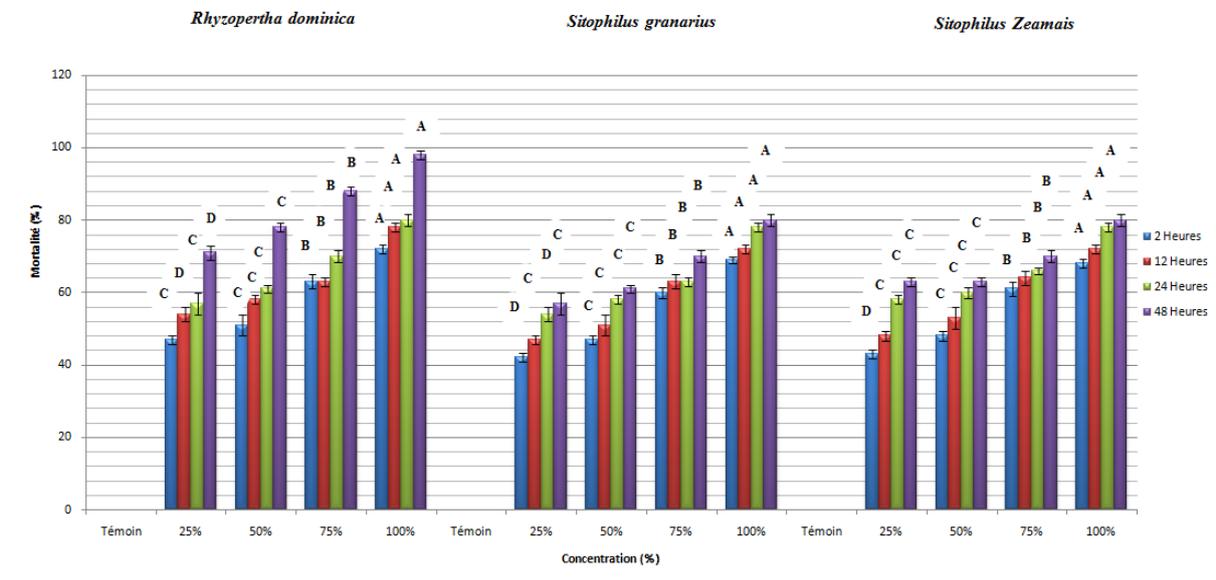


**Figure 34.** Mortalité en (%) des insectes traités avec différentes concentrations du filtrat d'activité protéolytique de *Fusarium sp1*.

Pour le traitement de *Rhyzopertha dominica* par le filtrat d'activité protéolytique de *Fusarium sp1*, l'analyse de la variance (Anova) et le test de Newman-Keuls (avec un intervalle de confiance à 95%) ont révélé à 2 h, 12h, 24h, 48h une différence significative entre toutes les concentrations du filtrat.

Pour le traitement de *Sitophilus granarius* par le filtrat d'activité protéolytique de *Fusarium sp1*, l'analyse de la variance (Anova) et le test de Newman-Keuls (avec un intervalle de confiance à 95%) ont révélé à 2 h, 12h, 24h, 48h une différence significative entre toutes les concentrations du filtrat.

Pour le traitement de *Sitophilus zeamais* par le filtrat d'activité protéolytique de *Fusarium* sp1.l'analyse de la variance (Anova) et le test de Newman-Keuls (avec un intervalle de confiance à 95%) ont révélé à 2 h,12h,24h,48h une différence significative entre toutes les concentrations du filtrat.



**Figure 35.** Mortalité en (%) des insectes traités avec différentes concentrations du filtrat d'activité chitinolytique de *Fusarium* sp1.

Pour le traitement de *Rhyzopertha dominica* par le filtrat d'activité chitinolytique de *Fusarium* sp1.l'analyse de la variance (Anova) et le test de Newman-Keuls (avec un intervalle de confiance à 95%) ont révélé :

À 12 h et 48h une différence non significative entre les concentrations 25% et 50% et une différence significative entre les autres concentrations.

À 2h et 24h une différence significative entre toutes les concentrations.

Pour le traitement de *Sitophilus granarius* par le filtrat d'activité chitinolytique de *Fusarium* sp1.l'analyse de la variance (Anova) et le test de Newman-Keuls (avec un intervalle de confiance à 95%) ont révélé :

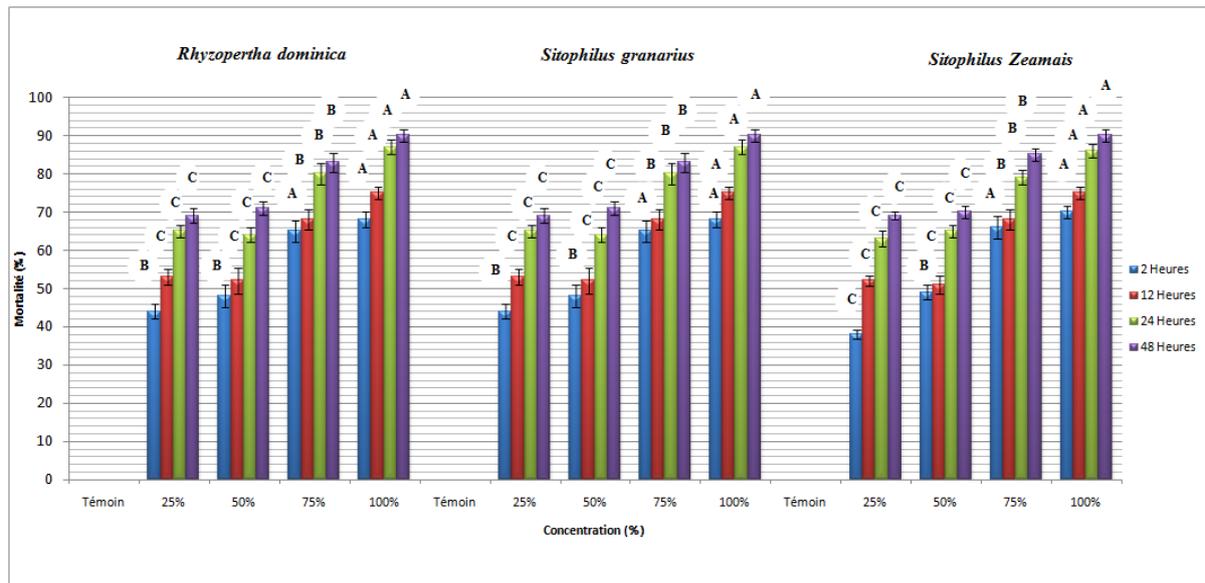
À 12 h et 48h une différence non significative entre les concentrations 25% et 50% et une différence significative entre les autres concentrations.

À 2h et 24h une différence significative entre toutes les concentrations.

Pour le traitement de *Sitophilus zeamais* par le filtrat d'activité chitinolytique de *Fusarium* sp1. l'analyse de la variance (Anova) et le test de Newman-Keuls (avec un intervalle de confiance à 95%) ont révélé :

À 2h une différence significative entre toutes les concentrations.

À 12 h ,24h et 48h une différence non significative entre les concentrations 25% et 50% et une différence significative entre les autres concentrations.



**Figure 36.** Mortalité en (%) des insectes traités avec différentes concentrations du filtrat d'activité chitinolytique de *Fusarium* sp2.

Pour le traitement de *Rhyzopertha dominica* par le filtrat d'activité chitinolytique de *Fusarium* sp2. l'analyse de la variance (Anova) et le test de Newman-Keuls (avec un intervalle de confiance à 95%) ont révélé :

À 12 h ,24h et 48h une différence non significative entre les concentrations 25% et 50% et une différence significative entre les autres concentrations.

À 2h une différence non significative entre les concentrations 25% et 50% et entre 75% et 100% et une différence significative entre les autres concentrations.

Pour le traitement de *Sitophilus granarius* par le filtrat d'activité chitinolytique de *Fusarium* sp2.l'analyse de la variance (Anova) et le test de Newman-Keuls (avec un intervalle de confiance à 95%) ont révélé :

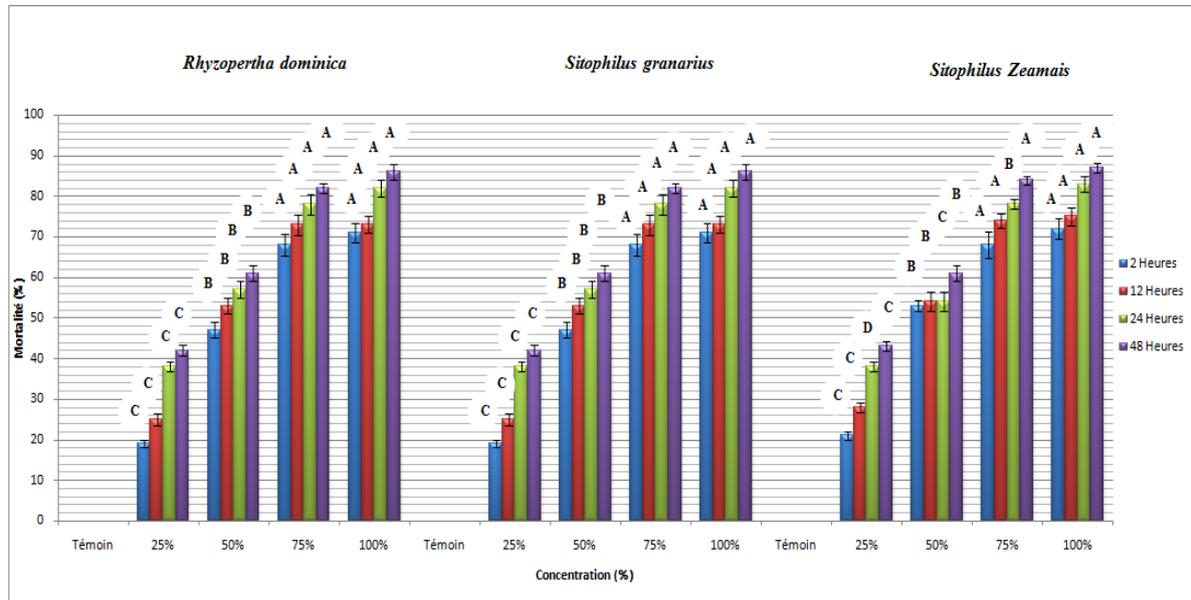
À 12 h ,24h et 48h une différence non significative entre les concentrations 25% et 50% et une différence significative entre les autres concentrations.

À 2h une différence non significative entre les concentrations 25% et 50% et entre 75% et 100% et une différence significative entre les autres concentrations.

Pour le traitement de *Sitophilus zeamais* par le filtrat d'activité chitinolytique de *Fusarium* sp2.l'analyse de la variance (Anova) et le test de Newman-Keuls (avec un intervalle de confiance à 95%) ont révélé :

À 2h une différence non significative entre les concentrations 75% et 100% et une différence significative entre les autres concentrations.

À 12 h ,24h et 48h une différence non significative entre les concentrations 25% et 50% et une différence significative entre les autres concentrations.



**Figure 37.** Mortalité en (%) des insectes traités avec différents concentrations du filtrat d'activité protéolytique de *Fusarium* sp3.

Pour le traitement de *Rhyzopertha dominica* par le filtrat d'activité protéolytique de *Fusarium* sp3. l'analyse de la variance (Anova) et le test de Newman-Keuls (avec un intervalle de confiance à 95%) ont révélé :

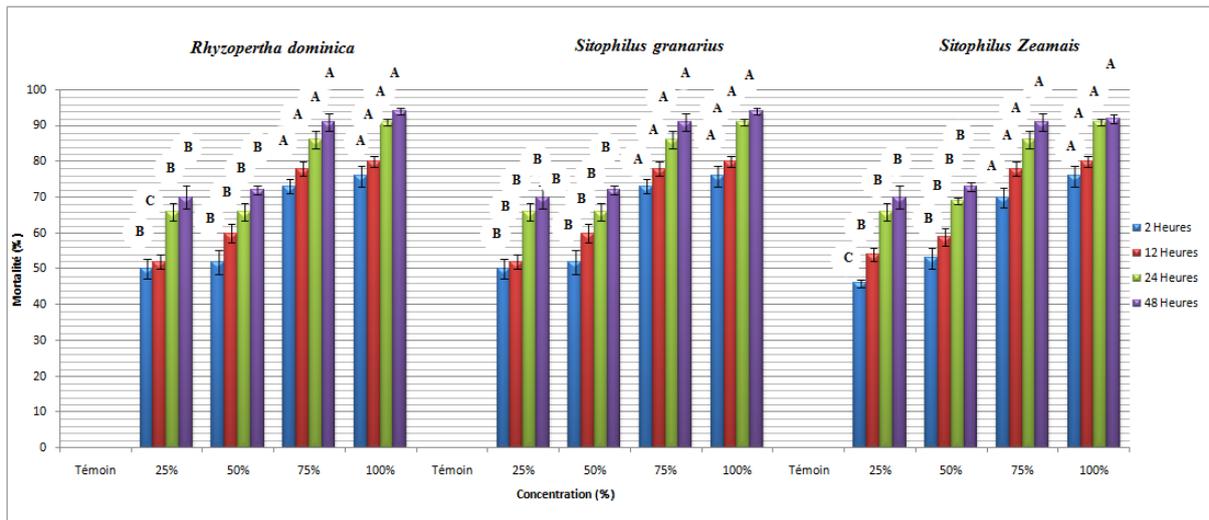
à 2 h,12h,24h,48h une différence non significative entre les concentrations 75% et 100% et une différence significative entre les autres concentrations.

Pour le traitement de *Sitophilus granarius* par le filtrat d'activité protéolytique de *Fusarium* sp3.l'analyse de la variance (Anova) et le test de Newman-Keuls (avec un intervalle de confiance à 95%) ont révélé à 2 h,12h,24h,48h une différence non significative entre les concentrations 75% et 100% et une différence significative entre les autres concentrations.

Pour le traitement de *Sitophilus zeamais* par le filtrat d'activité protéolytique de *Fusarium* sp3,l'analyse de la variance (Anova) et le test de Newman-Keuls (avec un intervalle de confiance à 95%) ont révélé :

A 2h,12h,48h une différence non significative entre les concentrations 75% et 100% et une différence significative entre les autres concentrations.

A 24 h une différence significative entre toutes les concentrations du filtrat.



**Figure 38.** Mortalité en (%) des insectes traités avec différentes concentrations du filtrat d'activité chitinolytique de *Fusarium* sp3.

Pour le traitement de *Rhyzopertha dominica* par le filtrat d'activité chitinolytique de *Fusarium* sp3. l'analyse de la variance (Anova) et le test de Newman-Keuls (avec un intervalle de confiance à 95%) ont révélé :

À 2 h, 24h et 48h une différence non significative entre les concentrations 25% et 50% et entre 75% et 100% et une différence significative entre les autres concentrations.

À 12h une différence non significative entre les concentrations 75% et 100% et une différence significative entre les autres concentrations.

Pour le traitement de *Sitophilus granarius* par le filtrat d'activité chitinolytique de *Fusarium* sp3. l'analyse de la variance (Anova) et le test de Newman-Keuls (avec un intervalle de confiance à 95%) ont révélé :

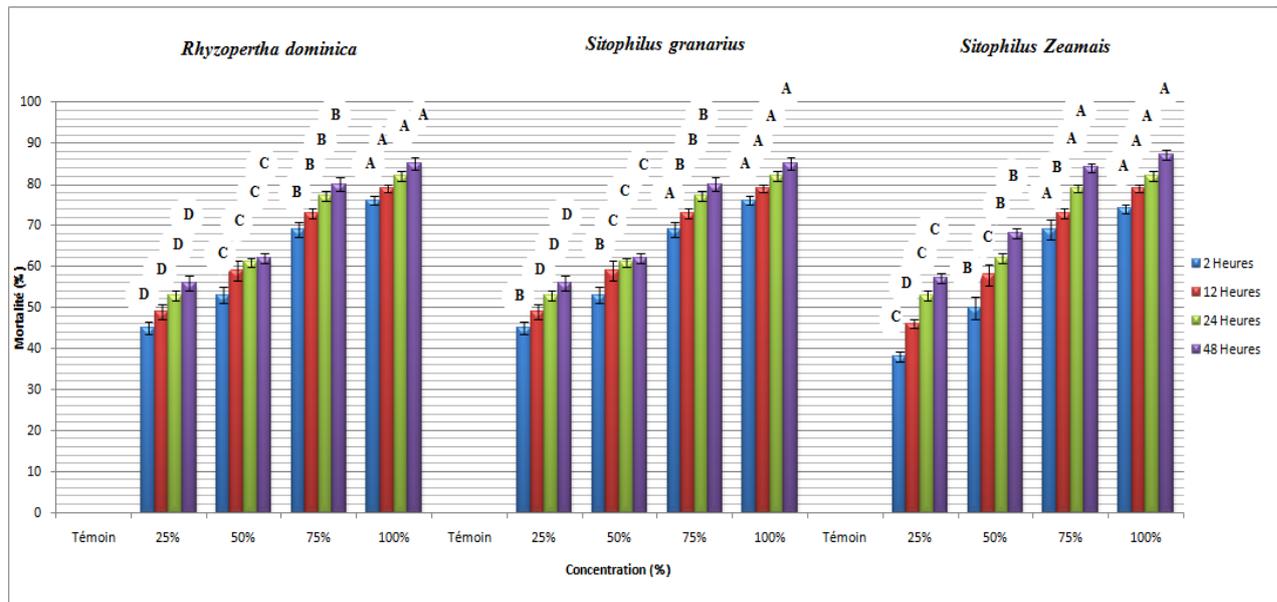
À 2 h, 12h et 24h une différence non significative entre les concentrations 25% et 50% et entre 75% et 100% et une différence significative entre les autres concentrations.

À 48h une différence significative entre tous les concentrations.

Pour le traitement de *Sitophilus zeamais* par le filtrat d'activité chitinolytique de *Fusarium* sp3. l'analyse de la variance (Anova) et le test de Newman-Keuls (avec un intervalle de confiance à 95%) ont révélé :

À 12 h , 24h et 48h une différence non significative entre les concentrations 25% et 50% et entre 75% et 100% et une différence significative entre les autres concentrations.

A 2h une différence non significative entre les concentrations 75% et 100% et une différence significative entre les autres concentrations.



**Figure 39.** Mortalité en (%) des insectes traité avec différentes concentrations du filtrat d’activité chitinolytique de *Fusarium* sp4.

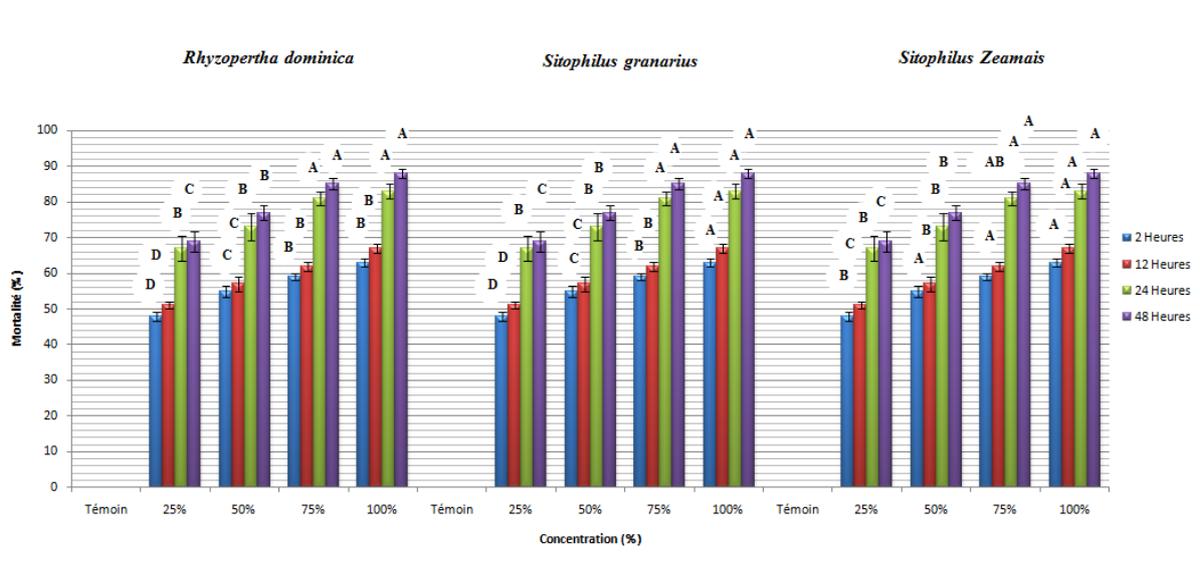
Pour le traitement de *Rhyzopertha dominica* par le filtrat d’activité chitinolytique de *Fusarium* sp4. l’analyse de la variance (Anova) et le test de Newman-Keuls (avec un intervalle de confiance à 95%) ont révélé une différence significative entre toutes concentrations du filtrat.

Pour le traitement de *Sitophilus granarius* par le filtrat d’activité chitinolytique de *Fusarium* sp4. l’analyse de la variance (Anova) et le test de Newman-Keuls (avec un intervalle de confiance à 95%) ont révélé une différence significative entre tous concentrations du filtrat.

Pour le traitement de *Sitophilus zeamais* par le filtrat d’activité chitinolytique de *Fusarium* sp4. ,l’analyse de la variance (Anova) et le test de Newman-Keuls (avec un intervalle de confiance à 95%) ont révélé :

À 12 h ,24h et 48h une différence non significative entre les concentrations 75% et 100% et une différence significative entre les autres concentrations.

À 2h une différence significative entre toutes les concentrations du filtrat.



**Figure 40.** Mortalité en (%) des insectes traités avec différentes concentrations du filtrat d'activité chitinolytique de *Fusarium* sp5.

Pour le traitement de *Rhyzopertha dominica* par le filtrat d'activité chitinolytique de *Fusarium* sp5, l'analyse de la variance (Anova) et le test de Newman-Keuls (avec un intervalle de confiance à 95%) ont révélé :

À 2h et 12h une différence significative entre toutes les concentrations du filtrat.

À 24 h une différence non significative entre les concentrations 25% et 50% et entre 75% et 100% et une différence significative entre les autres concentrations.

À 48 h une différence non significative entre les concentrations 75% et 100% et une différence significative entre les autres concentrations.

Pour le traitement de *Sitophilus granarius* par le filtrat d'activité chitinolytique de *Fusarium* sp5, l'analyse de la variance (Anova) et le test de Newman-Keuls (avec un intervalle de confiance à 95%) ont révélé :

À 2h et 12h une différence significative entre toutes les concentrations du filtrat.

À 24 h une différence non significative entre les concentrations 25% et 50% et entre 75% et 100% et une différence significative entre les autres concentrations.

À 48 h une différence non significative entre les concentrations 75% et 100% et une différence significative entre les autres concentrations.

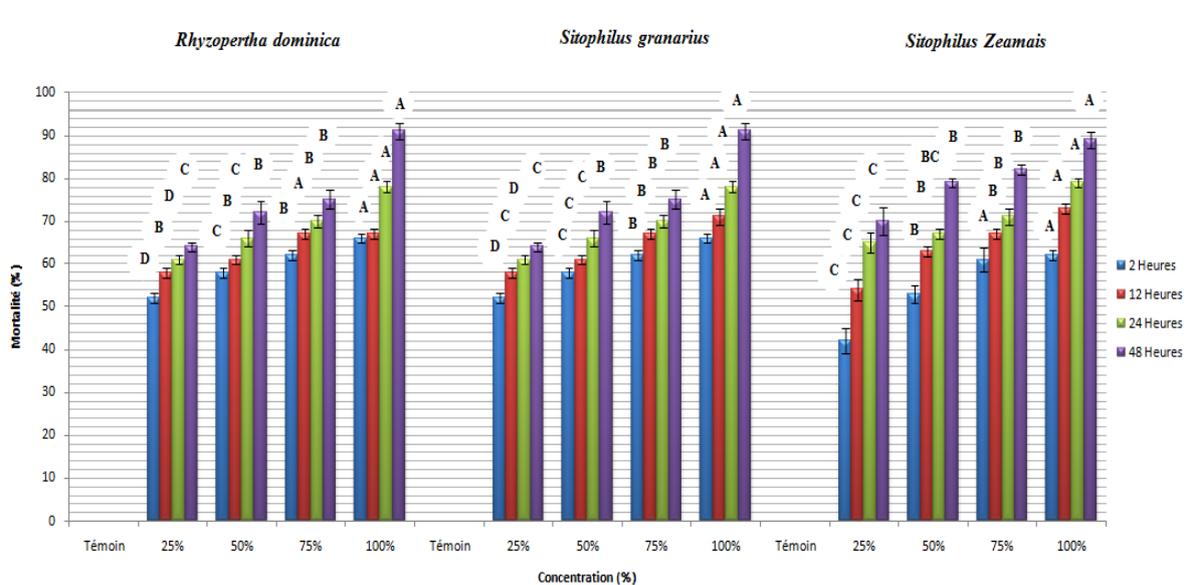
Pour le traitement de *Sitophilus zeamais* par le filtrat d'activité chitinolytique de *Fusarium* sp5, l'analyse de la variance (Anova) et le test de Newman-Keuls (avec un intervalle de confiance à 95%) ont révélé :

À 2h une différence non significative entre les concentrations 50 % et 75%,50% et 100%,75 % et 100% et une différence significative la concentration 25% et les autres concentrations du filtrat.

À 12h une différence non significative entre les concentrations 50 % et 75%,75% et 100% et une différence significative entre les autres concentrations du filtrat.

À 24 h une différence non significative entre les concentrations 25 % et 50%,75% et 100% et une différence significative entre les autres concentrations du filtrat.

À 48h une différence non significative entre les concentrations 75% et 100% et une différence significative entre les autres concentrations du filtrat.



**Figure 41.** Mortalité en (%) des insectes traités avec différentes concentrations du filtrat d'activité chitinolytique de *Fusarium* sp6.

Pour le traitement de *Rhyzopertha dominica* par le filtrat d'activité chitinolytique de *Fusarium* sp 6.l'analyse de la variance (Anova) et le test de Newman-Keuls (avec un intervalle de confiance à 95%) ont révélé :

A 2h,12h,24h une différence significative entre tous les concentrations du filtrat

A48h une différence non significative entre les concentrations 50 % et 75% et une différence significative entre les autres concentrations.

Pour le traitement de *Sitophilus granarius* par le filtrat d'activité chitinolytique de *Fusarium* sp 6.l'analyse de la variance (Anova) et le test de Newman-Keuls (avec un intervalle de confiance à 95%) ont révélé :

À 2h et 24h une différence significative entre tous les concentrations du filtrat.

À 12h une différence non significative entre les concentrations 25% et 50% et une différence significative entre les autres concentrations.

À 48 h une différence non significative entre les concentrations 75% et 100% et une différence significative entre les autres concentrations.

Pour le traitement de *Sitophilus zeamais* par le filtrat d'activité chitinolytique de *Fusarium* sp6. l'analyse de la variance (Anova) et le test de Newman-Keuls (avec un intervalle de confiance à 95%) ont révélé :

A 2h une différence non significative entre les concentrations 75% et 100% et une différence significative entre les autres concentrations.

A 12h une différence non significative entre les concentrations 50% et 75% et une différence significative entre les autres concentrations.

A 24h une différence non significative entre les concentrations 25% et 50% et entre 50% et 75% et une différence significative entre les autres concentrations.

A 48h une différence non significative entre les concentrations 50% et 75% et une différence significative entre les autres concentrations.

À partir des résultats obtenus figures (34,35,36,37,38,39,40,41) nous avons constaté que les filtrats des champignons endophytes du genre *Fusarium* spp. (sp1,sp2,sp3,sp4,sp5,sp6) ont une activité insecticide variable vis-à-vis *Rhizopertha dominica*, *Sitophilus granarius* et *Sitophilus zeamais* cette variation d'activité (exprimée en mortalité observée chez les individus) est déterminée également sur une échelle chronologique et en fonction des différentes concentrations.

L'effet des filtrats change selon la concentration utilisée et le temps, la concentration 100% semble la concentration la plus efficace contre les insectes ciblés avec des taux de mortalité après 48 heures d'essai de :

85% pour *Rhizopertha dominica* ,85% pour *Sitophilus granarius* et 89% pour *Sitophilus zeamais* enregistrés pour le filtrat d'activité protéolytique de *Fusarium* sp1.

98% pour *Rhizopertha dominica* ,80% pour *Sitophilus granarius* et 80% pour *Sitophilus zeamais* enregistrés pour le filtrat d'activité chitinolytique de *Fusarium* sp1 .

90 % pour *Rhizopertha dominica* ,90% pour *Sitophilus granarius* et 90 % pour *Sitophilus zeamais* enregistrés pour le filtrat d'activité chitinolytique de *Fusarium* sp2 .

86% pour *Rhizopertha dominica* ,86% pour *Sitophilus granarius* et 87% pour *Sitophilus zeamais* enregistrés pour le filtrat d'activité protéolytique de *Fusarium* sp3 .

94% pour *Rhizopertha dominica* ,94% pour *Sitophilus granarius* et 92% pour *Sitophilus zeamais* enregistrés pour le filtrat d'activité chitinolytique de *Fusarium* sp3 .

85% pour *Rhizopertha domininca* ,85% pour *Sitophilus granarius* et 87% pour *Sitophilus zeamais* enregistrés pour le filtrat d'activité chitinolytique de *Fusarium* sp4 .

88% pour *Rhizopertha domininca* ,88% pour *Sitophilus granarius* et 89 % pour *Sitophilus zeamais* enregistrés pour le filtrat d'activité chitinolytique de *Fusarium* sp5 .

91% pour *Rhizopertha domininca* ,91% pour *Sitophilus granarius* et 89% pour *Sitophilus zeamais* enregistrés pour le filtrat d'activité chitinolytique de *Fusarium* sp6 .

#### **IV.9.4.2.Discussion**

L'intérêt de cette partie de notre travail est de rechercher des souches endophytes de *Nerium oleander* L qui possèdent une capacité insecticide contre 3 insectes des denrées stockées *Rhizopertha domininca* ,*Sitophilus granarius* ,*Sitophilus zeamais* .

en effet, nous avons pu évaluer l'activité insecticide des filtres d'activité protéolytique et chitinolytique des champignons du genre *Fusarium spp* présentant des concentrations croissantes.

L'effet des filtres change selon la concentration utilisée et le temps, la concentration 100% semble la concentration la plus efficace contre les insectes ciblés avec des taux de mortalité après 48 heures d'essai de :

85% pour *Rhizopertha domininca* ,85% pour *Sitophilus granarius* et 89% pour *Sitophilus zeamais* enregistrés pour Le filtrat d'activité protéolytique de *Fusarium* sp1.

98% pour *Rhizopertha domininca* ,80% pour *Sitophilus granarius* et 80% pour *Sitophilus zeamais* enregistrés pour Le filtrat d'activité chitinolytique de *Fusarium* sp1 .

90 % pour *Rhizopertha domininca* ,90% pour *Sitophilus granarius* et 90 % pour *Sitophilus zeamais* enregistrés pour le filtrat d'activité chitinolytique de *Fusarium* sp2 .

86% pour *Rhizopertha domininca* ,86% pour *Sitophilus granarius* et 87% pour *Sitophilus zeamais* enregistrés pour le filtrat d'activité protéolytique de *Fusarium* sp3 .

94% pour *Rhizopertha domininca* ,94% pour *Sitophilus granarius* et 92% pour *Sitophilus zeamais* enregistrés pour le filtrat d'activité chitinolytique de *Fusarium* sp3 .

85% pour *Rhizopertha domininca* ,85% pour *Sitophilus granarius* et 87% pour *Sitophilus zeamais* enregistrés pour le filtrat d'activité chitinolytique de *Fusarium* sp4 .

88% pour *Rhizopertha domininca* ,88% pour *Sitophilus granarius* et 89 % pour *Sitophilus zeamais* enregistrés pour le filtrat d'activité chitinolytique de *Fusarium* sp5 .

91% pour *Rhizopertha domininca* ,91% pour *Sitophilus granarius* et 89% pour *Sitophilus zeamais* enregistrés pour le filtrat d'activité chitinolytique de *Fusarium* sp6 .

Ceci laisse à suggérer que les champignons du genre *Fusarium spp* pourraient être utilisés en matière de lutte biologique contre les insectes précités.

On suggère que la mortalité des insectes est peut être due aux protéases, chitinases, mycotoxines ou autres métabolites à capacité insecticide produites par ces champignons.

Les protéases sont considérées comme les enzymes les plus importants dans le processus d'infection de l'hôte (Mustafa et Kaur, 2009) incluant les aminopeptidases et exopeptidases qui dégradent les protéines de la cuticule d'insecte en acides aminés utilisés par la suite dans la nutrition du champignon entomopathogène (Wang et al., 2002).

Les chitinases sont produites par plusieurs espèces fongiques (Pedraza et Lopes, 1991; Patidar et al., 2005; Yamazaki et al., 2008; Kern et al., 2009; Ghanem et al., 2010), reconnus comme bioinsecticide (Pérez et al., 2014) et jouent un rôle important durant l'infection (Seidl, 2008).

Elles dégradent la chitine en molécules à faible poids moléculaires comme le chitotetraose, le chitotriose et le chitobiose (Binod et al., 2007)

Elles agissent de différentes façons contre les insectes soit par voie digestive par la pénétration dans l'intestin d'insectes causant ainsi des blessures à la membrane péritrophique qui se traduira par l'inhibition de la prise alimentaire et conduit par conséquent à la mort (Binod et al., 2007), ou par contact en décomposant la cuticule des insectes (Pérez et al., 2014).

Les champignons produisent un large éventail de toxines qui peuvent contribuer positivement dans le contexte agricole contre plusieurs ravageurs (Johnson et al., 2013).

Les enniatins et le beauvericine sont les deux mycotoxines à capacité insecticide secrétées par les champignons du genre *Fusarium spp* (Jian Xu et al., 2009).

Les enniatines A, A1, B, B1 sont des composés bioactifs qui ont des propriétés insecticides (Grove et Pople, 1980) et sont produites par *Fusarium subglutinans* (Bottalico et Perrone, 2002), *Fusarium proliferatum* (Plattner et Nelson, 1994) et *Fusarium tricinctum* (Watjen et al., 2009).

Le champignon endophyte *Fusarium redolens* Dzf2 isolée à partir du rhizome de *Dioscorea Zingiberensis* secrète le beauvericine qui est considéré comme une mycotoxine à potentiel insecticide et peut être utilisé comme bioinsecticide en agriculture (Jian Xu et al., 2011).

Les trichothécènes (T-2) sont des mycotoxines produites par les champignons du genre *Fusarium spp* qui ont un effet insecticide contre *Tribolium spp* et *Ostrinia nubilalis* (Gertrud et al., 1983).

Le champignon *F. larvarum* souche 2139 a une haute activité insecticide (> 60%) enregistrée après 10 minutes après de son application (formulation solide) contre *Schizaphis graminum* (Ganassi et al., 2000) et une bonne activité insecticide contre *Saissetia oleae* (Stornelli et al., 1998)

Il produit des métabolites insecticides tels que le monocerin, fusaretin 6-méthyl éther et fusaretin 6,7-diméthyl éther (Claydon et al., 1979 ; Grove et Pople , 1979 ; Grove et Pople , 1981 ) qui ne sont pas toxiques pour les mammifères donc il pourrait être un bon agent de lutte biologique de *S. graminum* (Ganassi et al., 2000).

Egalement un autre composant insecticide est l'acide fusarique sécrété par les champignons pathogènes du genre *Fusarium* (Burmeister et al., 1985).

Comparativement à cette partie de notre étude, il existe des travaux ont porté sur l'utilisation des filtrats fongiques en matière de lutte contre les insectes.

Les filtrats de *Fusarium oxysporum*, *Lagenidium giganteum*, *Trichophyton ajelloi*, *Culicinomyces clavispurus* provoquent une mortalité de 99% des adultes de *Culex quinquefasciatus* à des concentrations de 52,48 % ;11,3% ;66,06 ; 8,7% respectivement (Singh et Prakash., 2011).

Plusieurs champignons du genre *Fusarium* ont été signalée comme étant entomopathogènes (Miczulski et Macowicz-Stefaniak, 1977; Lynch et Lewis, 1978; Gilliam et al., 1990).

Des champignons endophytes entomopathogènes du genre *Fusarium* spp provoquent une mortalité de 56 % sous forme de poudre et 63% sous forme liquide (filtrat) des œufs de *Conopomorpha cramerella* (Snellen) (Lepidoptera: *Gracillariidae*) (Nur et al., 2014).

Le champignon *Fusarium solani* est trouvé comme entomopathogène de *Tetanops myopaeformis* (Majumdar et al., 2008).

IV.10.Relation entre l'activité protéolytique et insecticide des filtrats d'activité protéolytique des champignons sélectionnés.

IV.10.1.Résultats

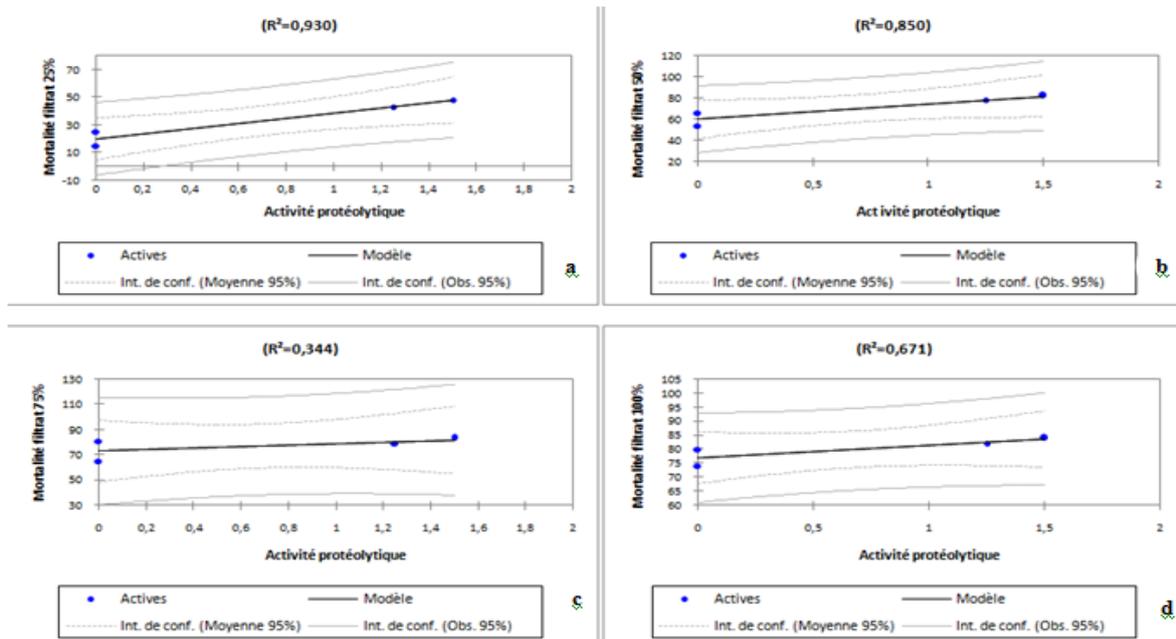


Figure 42. Droites de régression linéaire montrant la relation entre l'activité protéolytique et insecticide contre *Rhyzopertha dominica* pour le filtrat d'activité protéolytique d'*Alternaria* sp5 a.concentration 25%,b.concentration 50% ,c.concentration 75 % , concentration 100 % .

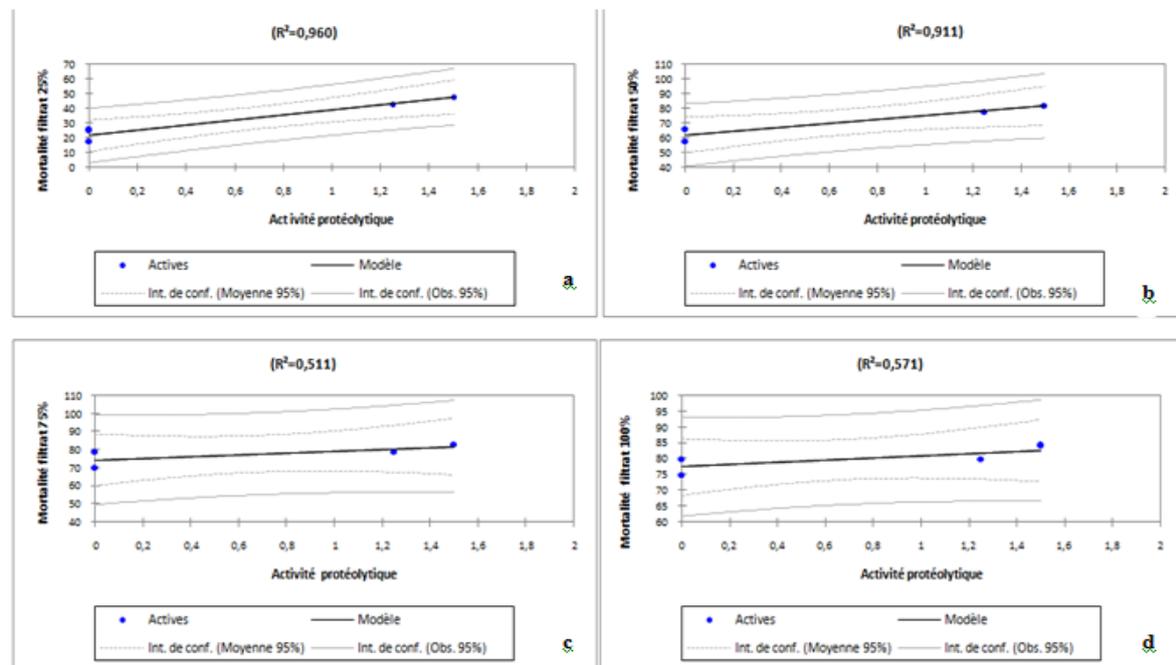
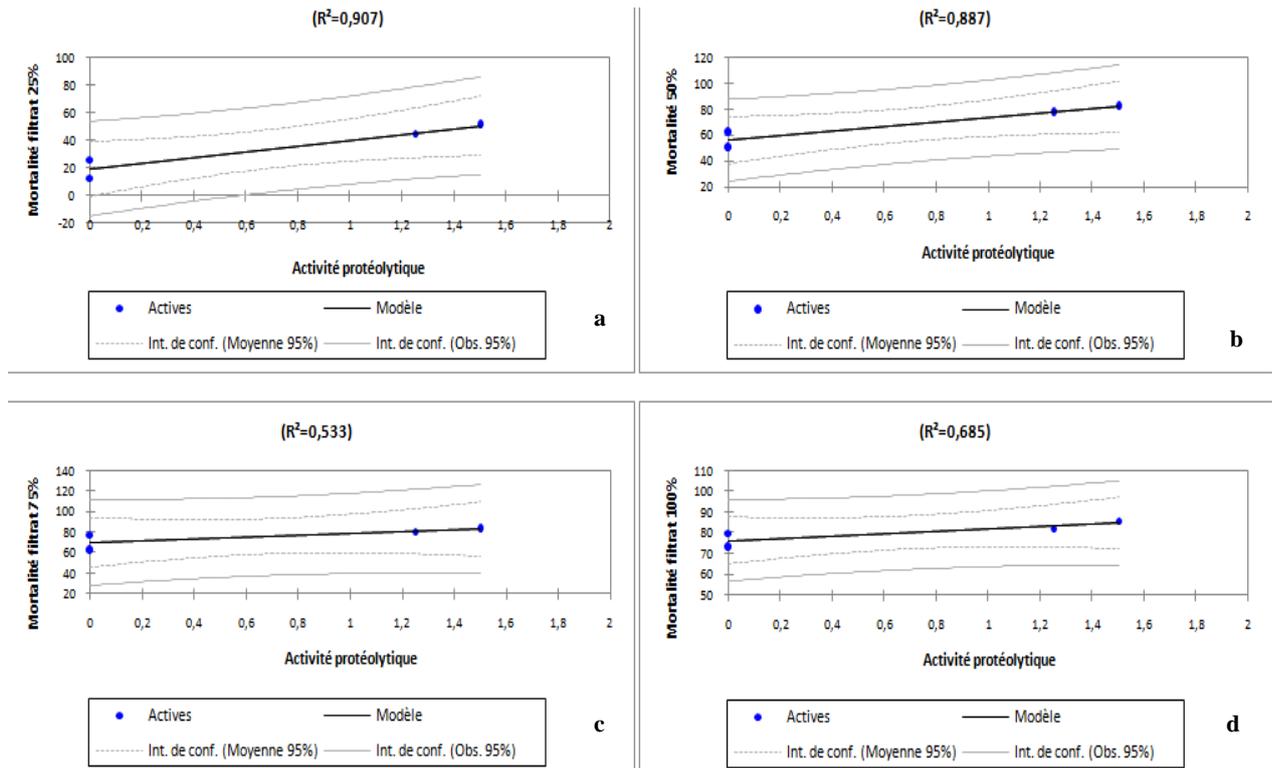
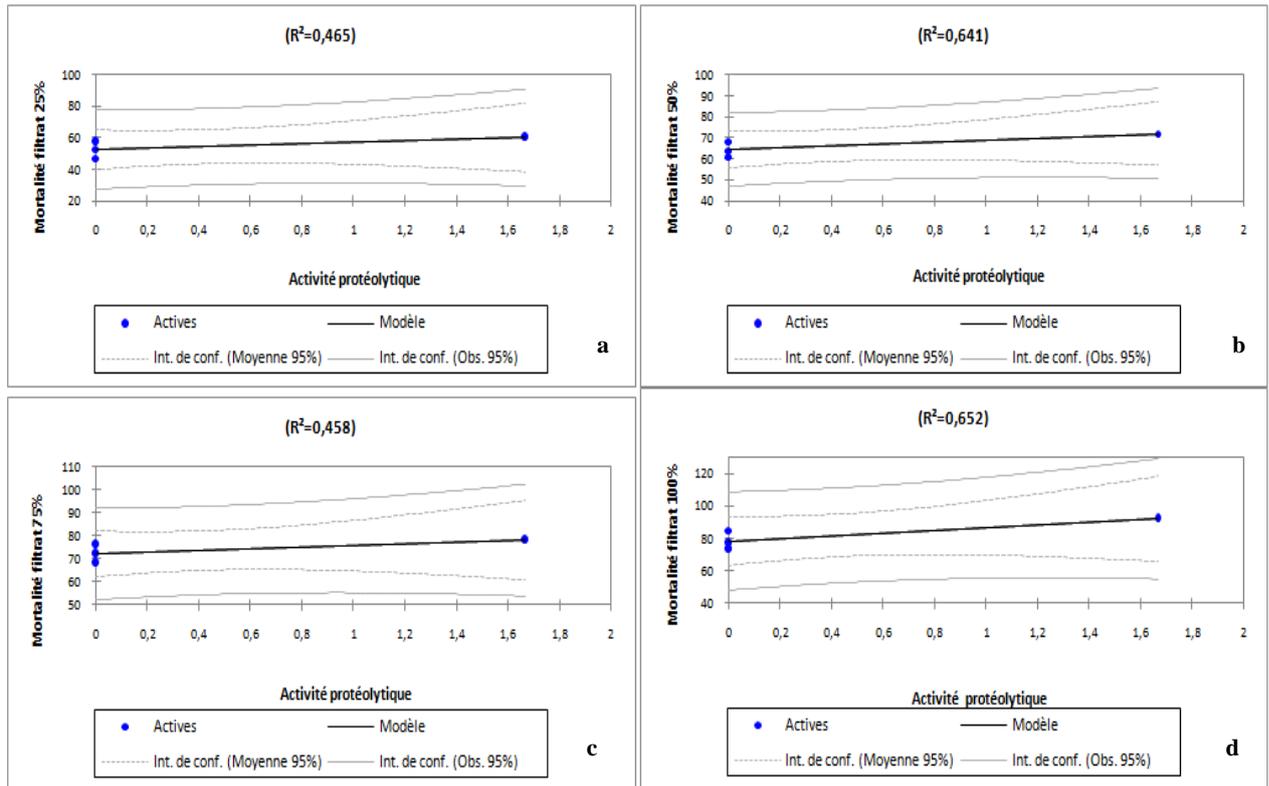


Figure 43. Droites de régression linéaire montrant la relation entre l'activité protéolytique et insecticide contre *Sitophilus granarius* pour le filtrat d'activité protéolytique d'*Alternaria* sp5. a.concentration 25%,b.concentration 50% ,c.concentration 75 % , concentration 100 % .

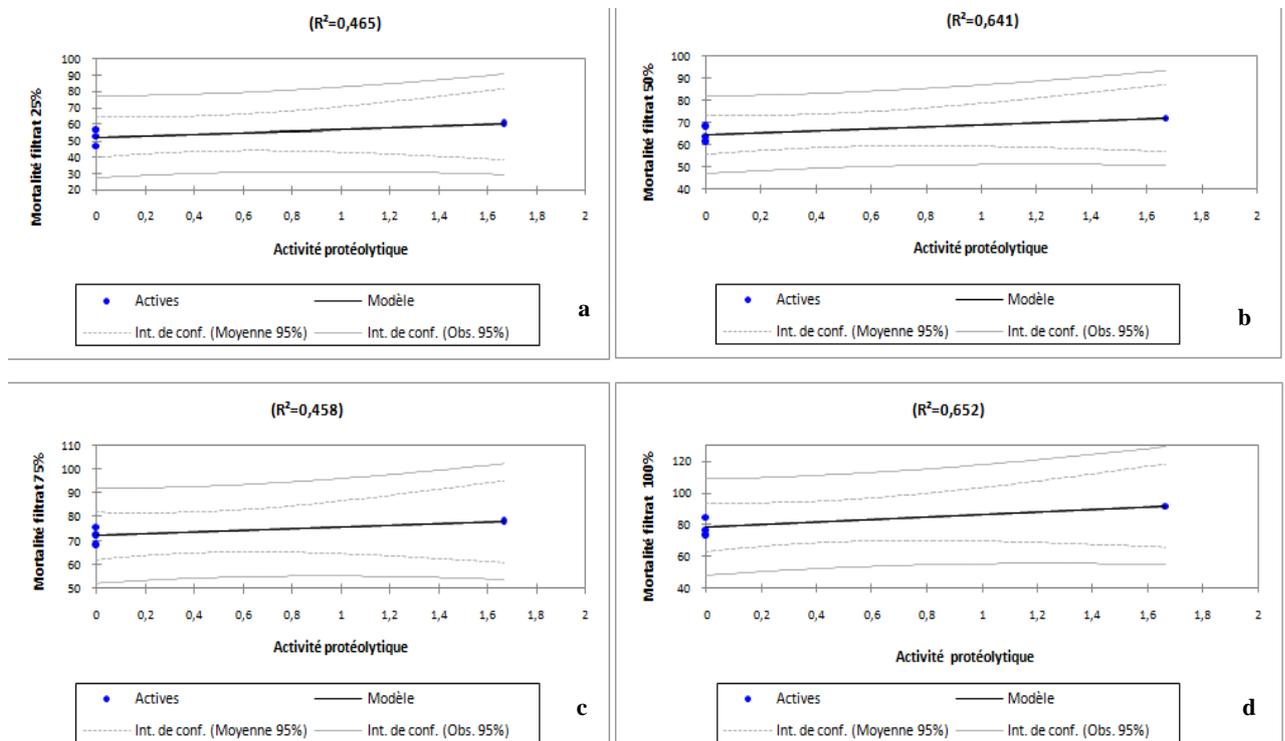


**Figure 44.** Droites de régression linéaire montrant la relation entre l'activité protéolytique et insecticide contre *Sitophilus zeamais* pour le filtrat d'activité protéolytique d'*Alternaria sp5* a.concentration 25%,b.concentration 50% ,c.concentration 75 % , concentration 100 % .

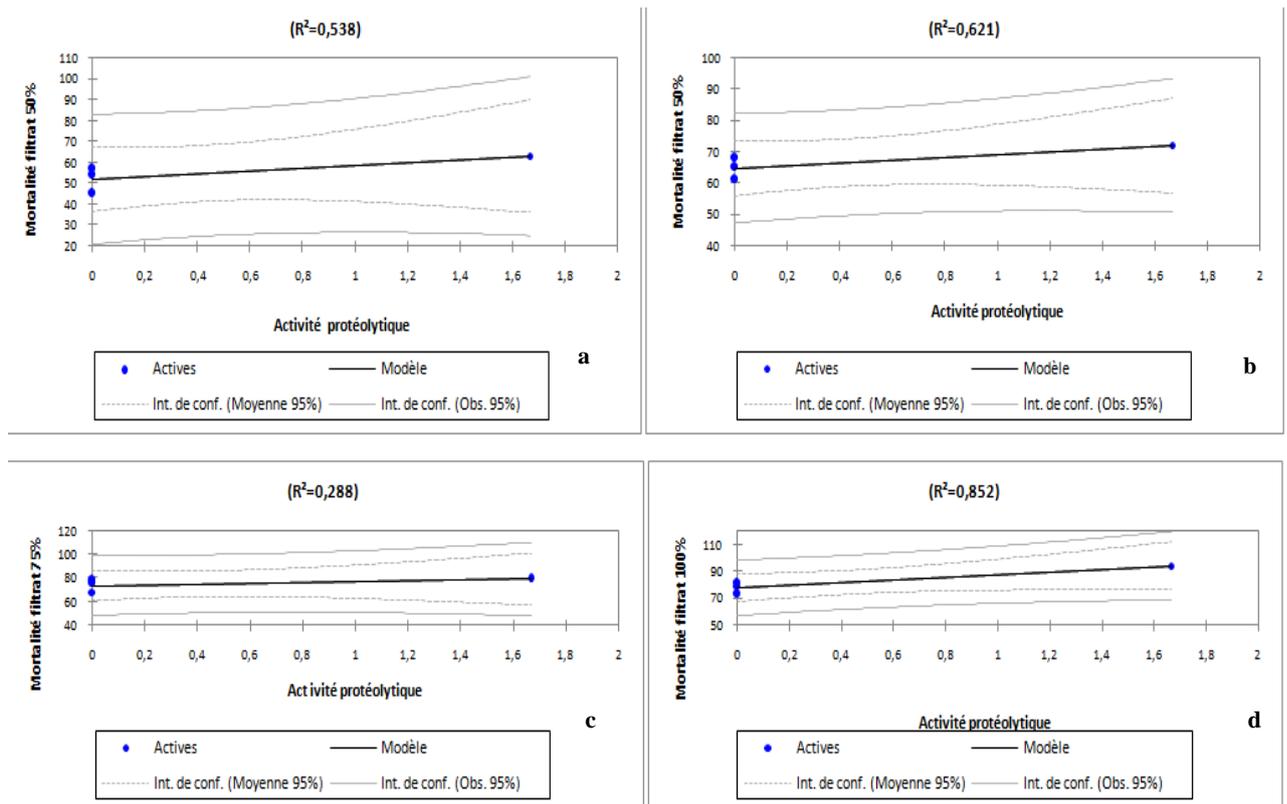
D'après ces droites de régression Figures (42,43,44) nous constatons que r (coefficient de corrélation de Pearson) se trouve dans l'intervalle 0,5 à 1 donc il ya une forte corrélation positive entre l'activité protéolytique et insecticide contre *Rhyzopertha dominica*, *Sitophilus granarius* et *Sitophilus zeamais* pour le filtrat d'activité protéolytique d'*Alternaria sp5*.



**Figure 45.** Droites de régression linéaire montrant la relation entre l'activité protéolytique et insecticide contre *Rhyzopertha dominica* pour le filtrat d'activité protéolytique de *Curvularia* sp. a.concentration 25%,b.concentration 50% ,c.concentration 75 % , concentration 100 % .

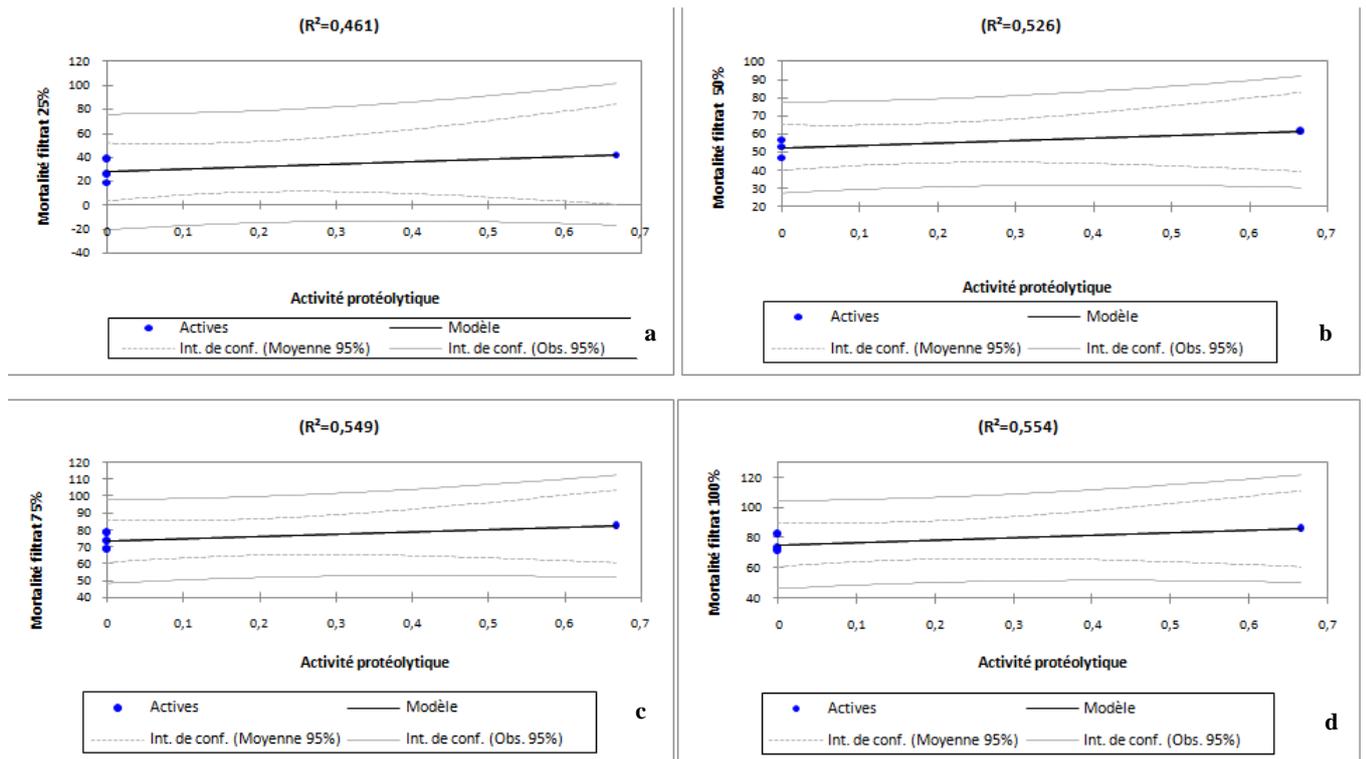


**Figure 46.** Droites de régression linéaire montrant la relation entre l'activité protéolytique et insecticide contre *Sitophilus granarius* pour le filtrat d'activité protéolytique de *Curvularia* sp. a.concentration 25%,b.concentration 50% ,c.concentration 75 % , concentration 100 % .

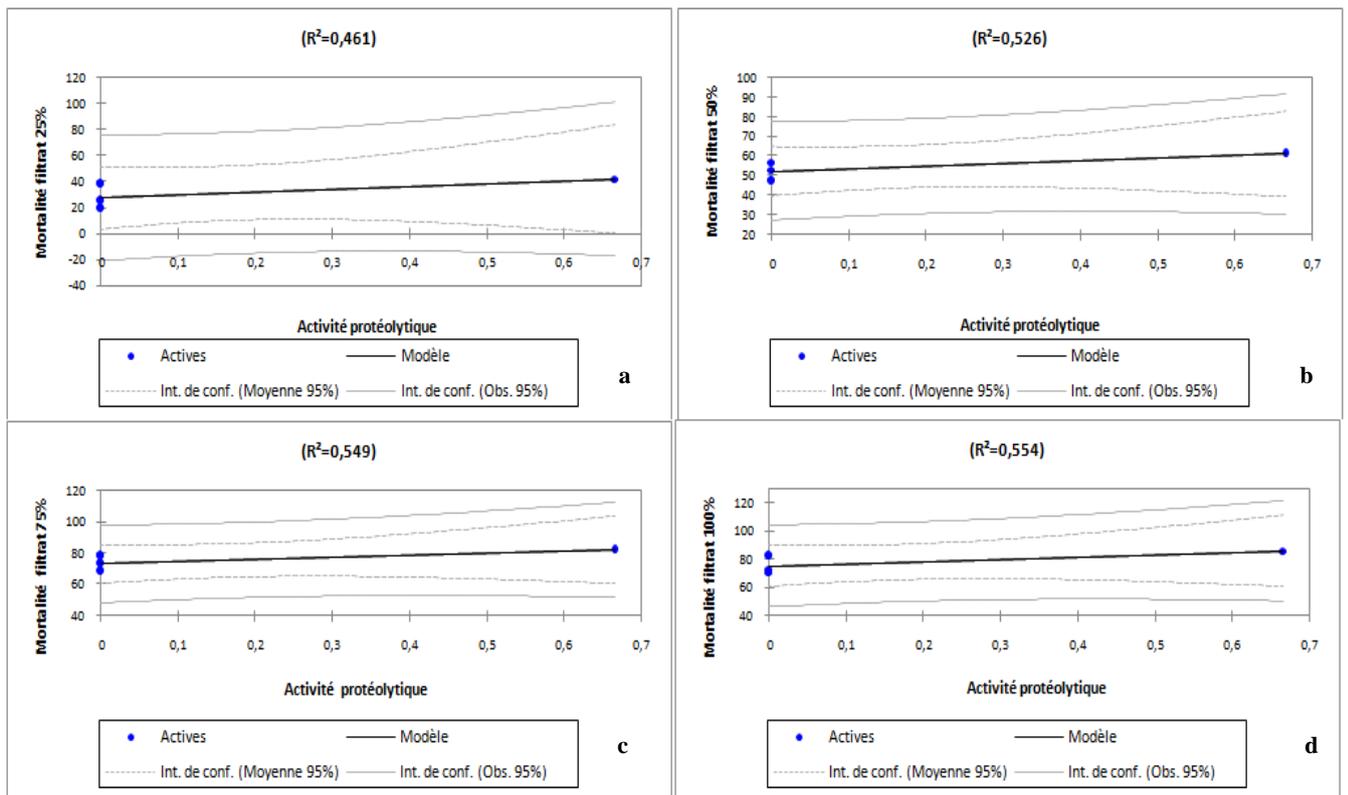


**Figure 47.** Droites de régression linéaire montrant la relation entre l'activité protéolytique et insecticide contre *Sitophilus zeamais* pour le filtrat d'activité protéolytique de *Curvularia* sp. a.concentration 25%,b.concentration 50% ,c.concentration 75 % , concentration 100 % .

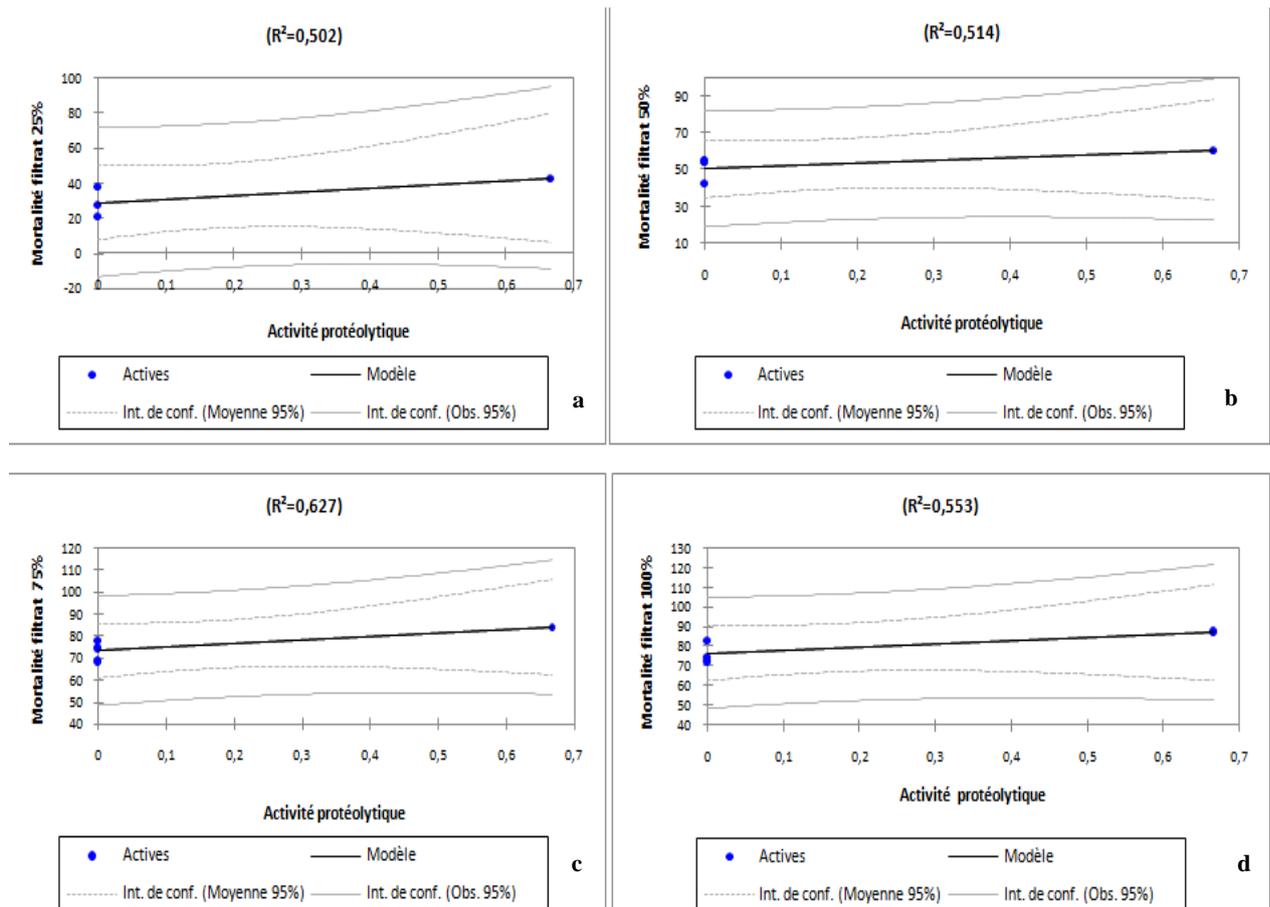
D'après ces droites de régression figures (45,46,47) nous constatons que  $r$  (coefficient de corrélation de Pearson) se trouve dans l'intervalle 0,5 à 1 donc il ya une forte corrélation positive entre l'activité protéolytique et insecticide contre *Rhizopertha dominica*, *Sitophilus granarius* et *Sitophilus zeamais* pour le filtrat d'activité protéolytique de *Curvularia* sp.



**Figure 48.** Droites de régression linéaire montrant la relation entre l'activité protéolytique et insecticide contre *Rhyzopertha dominica* pour le filtrat d'activité protéolytique de *Fusarium* sp3. a.concentration 25%, b.concentration 50% ,c.concentration 75 % , concentration 100 % .



**Figure 49.** Droites de régression linéaire montrant la relation entre l'activité protéolytique et insecticide contre *Sitophilus granarius* pour le filtrat d'activité protéolytique de *Fusarium* sp3. a.concentration 25%, b.concentration 50% ,c.concentration 75 % , concentration 100 % .



**Figure 50.** Droites de régression linéaire montrant la relation entre l'activité protéolytique et insecticide contre *Sitophilus zeamais* pour le filtrat d'activité protéolytique de *Fusarium* sp3. a.concentration 25%,b.concentration 50% ,c.concentration 75 % , concentration 100 % .

D'après ces droites de régression figures (48 ,49 ,50) nous constatons que r (coefficient de corrélation de Pearson) se trouve dans l'intervalle 0,5 à 1 donc il ya une forte corrélation positive entre l'activité protéolytique et insecticide contre *Rhizopertha dominica*, *Sitophilus granarius* et *Sitophilus zeamais* pour le filtrat d'activité protéolytique de *Fusarium* sp3.

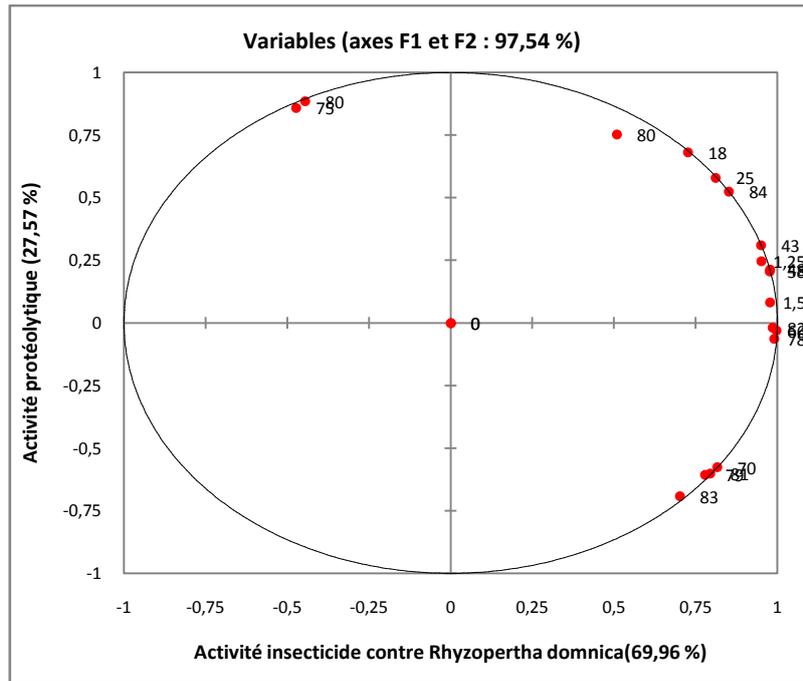


Figure 51. ACP montrant la relation entre l'activité protéolytique et insecticide contre *R.dominica* pour les différentes filtrats des champignons endophytes sélectionnées.

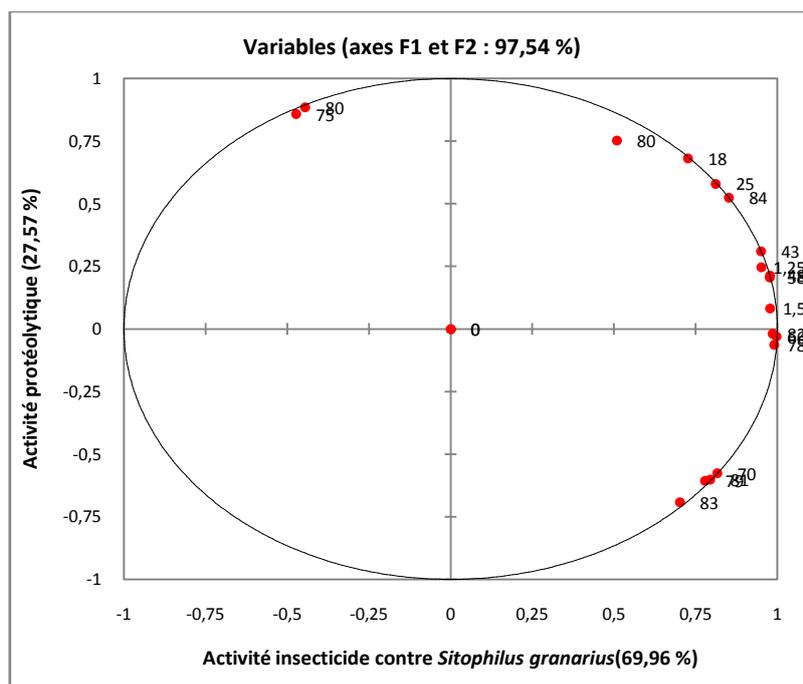
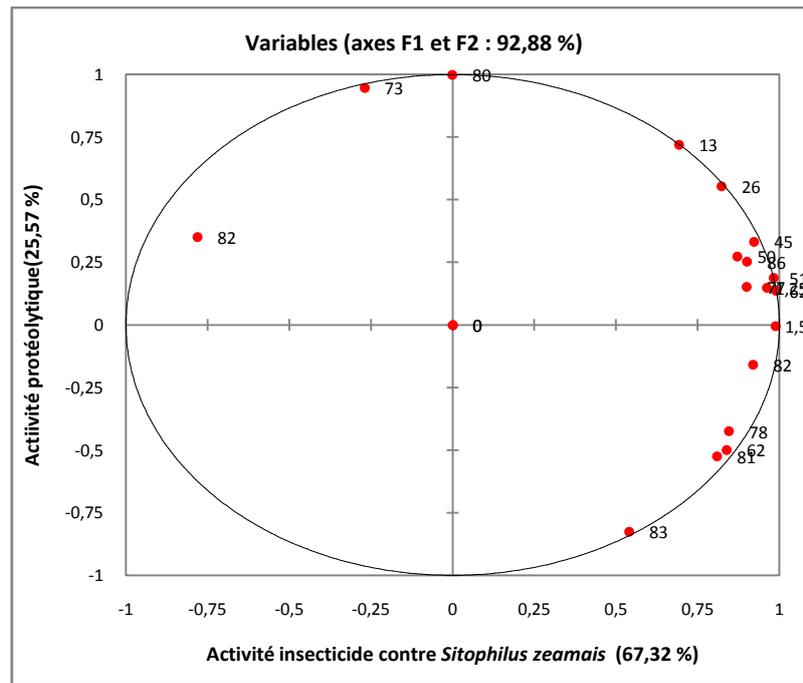


Figure 52. ACP montrant la relation entre l'activité protéolytique et insecticide contre *S.granarius* pour les différentes filtrats des champignons endophytes sélectionnées.



**Figure 53 .** ACP montrant la relation entre l’activité protéolytique et insecticide contre *S.zeamais* pour les différentes filtrats des champignons endophytes sélectionnées.

D’après ces ACP figures (51,52,53) on constate qu’il y a une corrélation positive entre l’activité protéolytique et insecticide contre *R.dominica*, *S.granarius*, *S.zeamais* pour les filtrats d’activité protéolytique de *Alternaria sp5*, *Curvularia sp* et *Fusarium sp3* seulement.

#### IV.10.2.Discussion

Pour mieux savoir la vraie raison des mortalités enregistrées pour les 3 insectes ciblés *Rhizopertha dominica*, *Sitophilus granarius*, *Sitophilus zeamais* on cherche à connaître la relation entre l’activité protéolytique et insecticide des filtrats des champignons sélectionnés

Pour les champignons *Alternaria sp5*, *Curvularia sp* et *Fusarium sp3* l’analyse des composants principaux (ACP) et la régression linéaire entre la mortalité des 3 espèces d’insectes ciblés et l’activité protéolytique pour les 4 concentrations utilisées (25%,50%,75%,100%) du filtrat d’activité protéolytique montre une forte corrélation positive entre ces deux paramètres (mortalité enregistrée et l’activité protéolytique).

On peut donc suggérer que la mortalité des 3 espèces d’insectes ciblés pour *Alternaria sp5*, *Fusarium sp3* est due aux protéases, mycotoxines ou autres composés à capacité insecticide sécrétés par ces champignons et aux protéases pour *Curvularia sp*.

Pour *Cladosporium sp* et *Fusarium sp1* l’activité insecticide n’a aucune relation avec leurs activités protéolytiques.

La mortalité donc pour ces deux champignons précités est peut être due aux mycotoxines ou autres composés à capacité insecticide secretés par ces champignons.

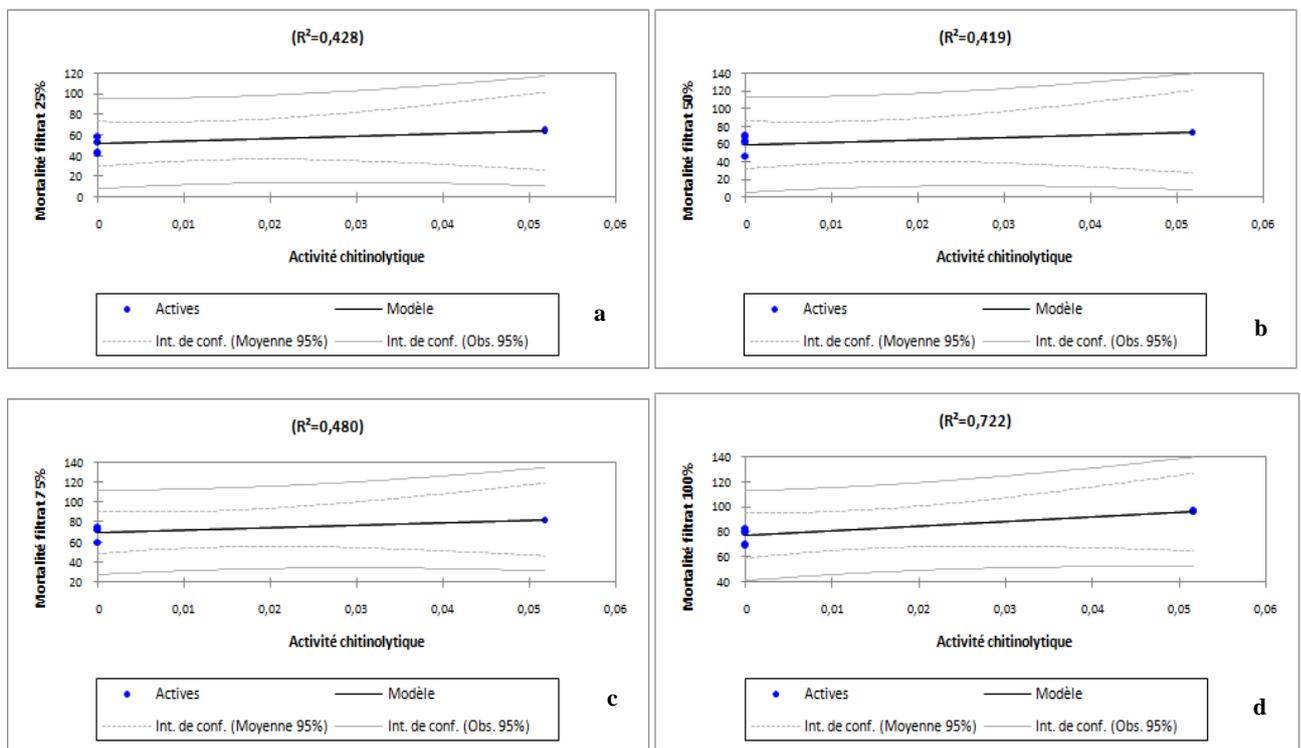
Les protéases sont des enzymes qui agissent par la dégradation de la cuticule de l'insecte et constituent un facteur important de virulence des champignons entomopathogènes (Pérez et al., 2014).

Les mycotoxines sont des métabolites secondaires possèdent des propriétés insecticides en agissant par la modulation des réponses de défense de l'insecte, permettant la colonisation de son tissu (Johnson et al., 2013).

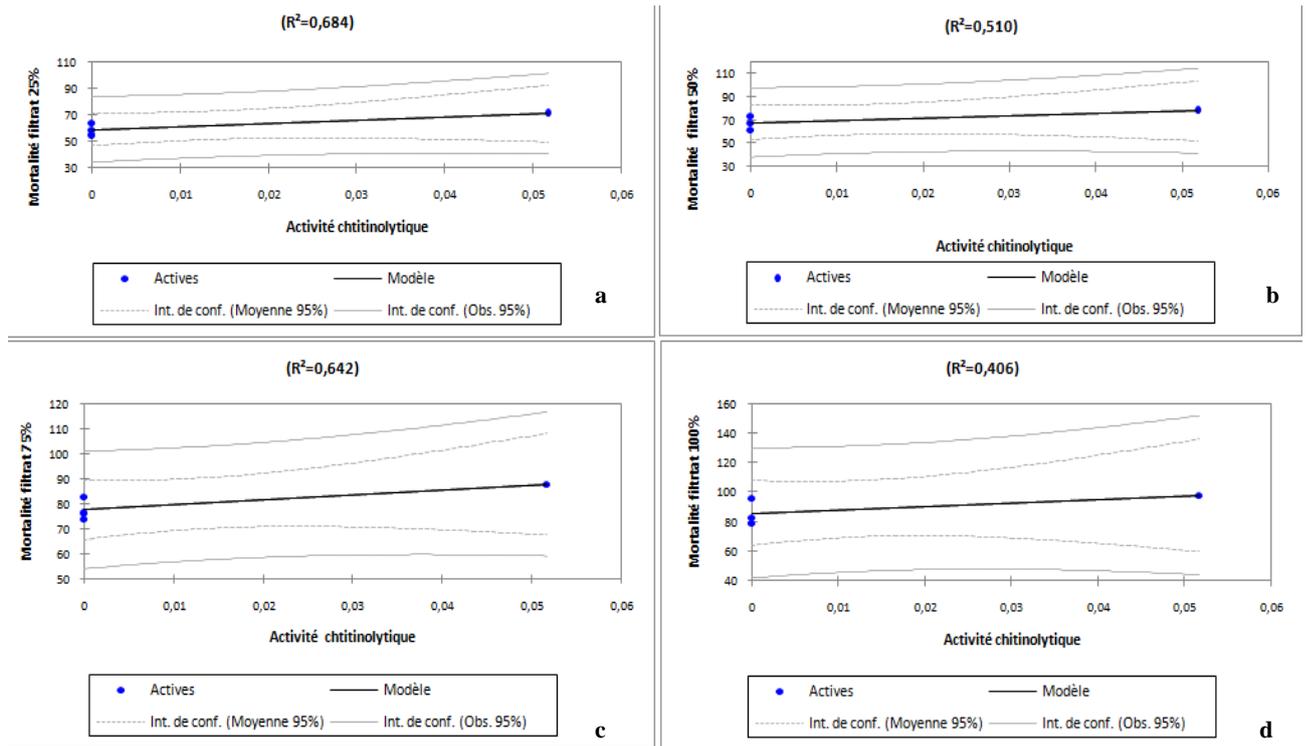
Il provoquent également des effets néfastes sur les insectes qui se nourrissent de plantes hôtes infectées par le champignon endophyte producteur de ces molécules (Johnson et al., 2013).

#### IV.11.Relation entre l'activité chitinolytique et insecticide des filtrats d'activité chitinolytique des champignons sélectionnés.

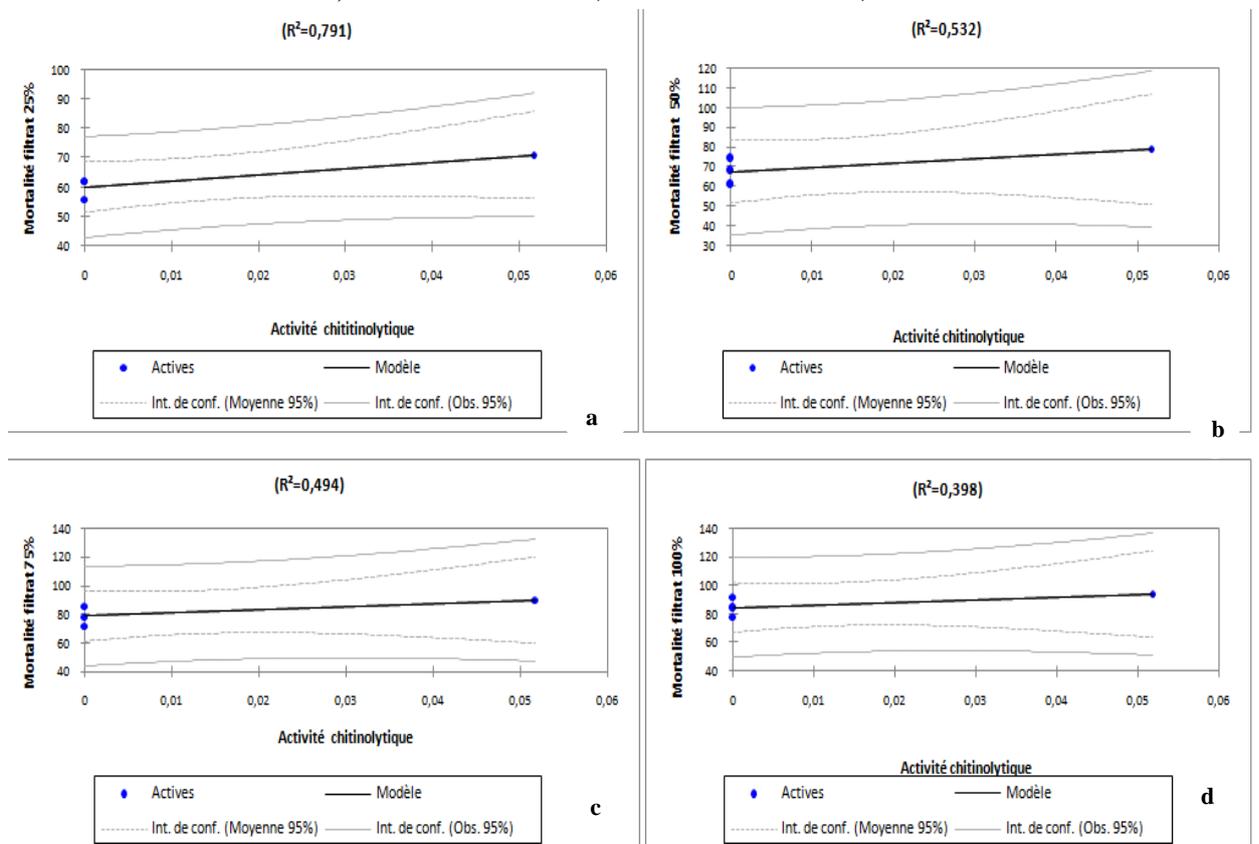
##### IV.11.1.Résultats



**Figure 54.** Droites de régression linéaire montrant la relation entre l'activité chitinolytique et insecticide contre *Rhyzopertha dominica* pour le filtrat d'activité chitinolytique de *Curvularia sp.*  
a.concentration 25%,b.concentration 50% ,c.concentration 75 % , concentration 100 % .

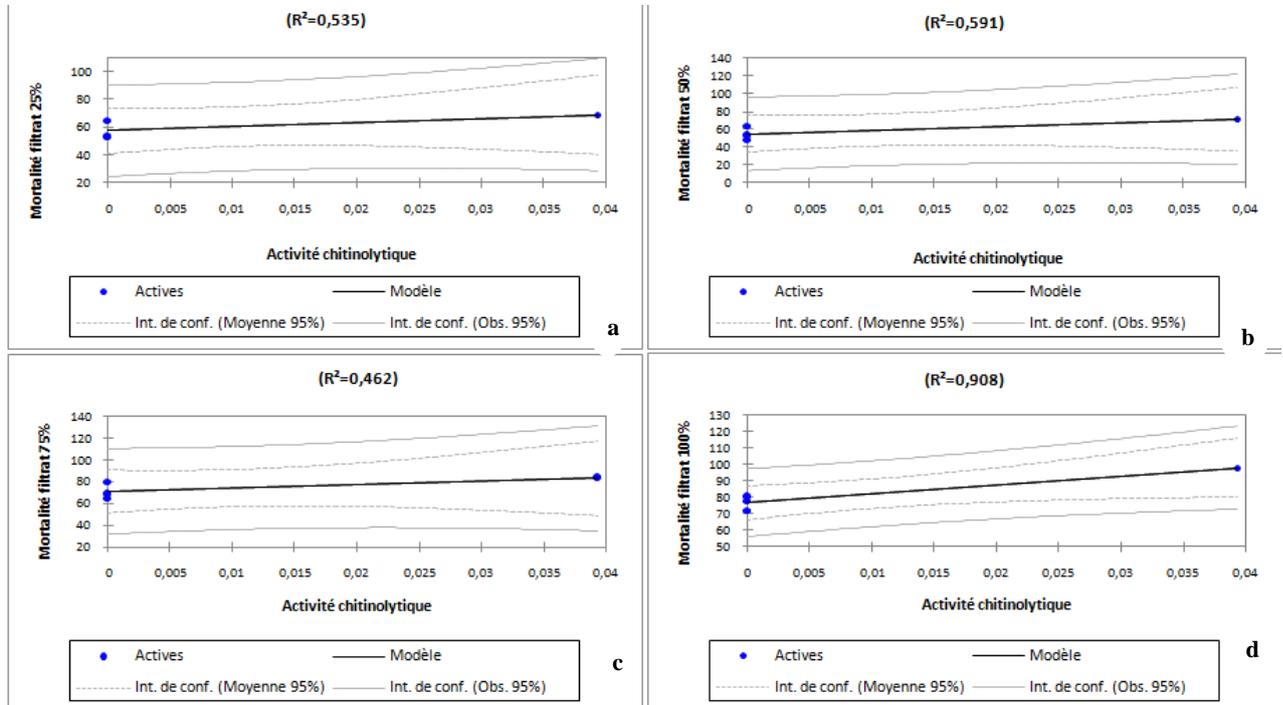


**Figure 55.** Droites de régression linéaire montrant la relation entre l'activité chitinolytique et insecticide contre *Sitophilus granarius* pour le filtrat d'activité chitinolytique de *Curvularia* sp. a.concentration 25%,b.concentration 50% ,c.concentration 75 % , concentration 100 % .

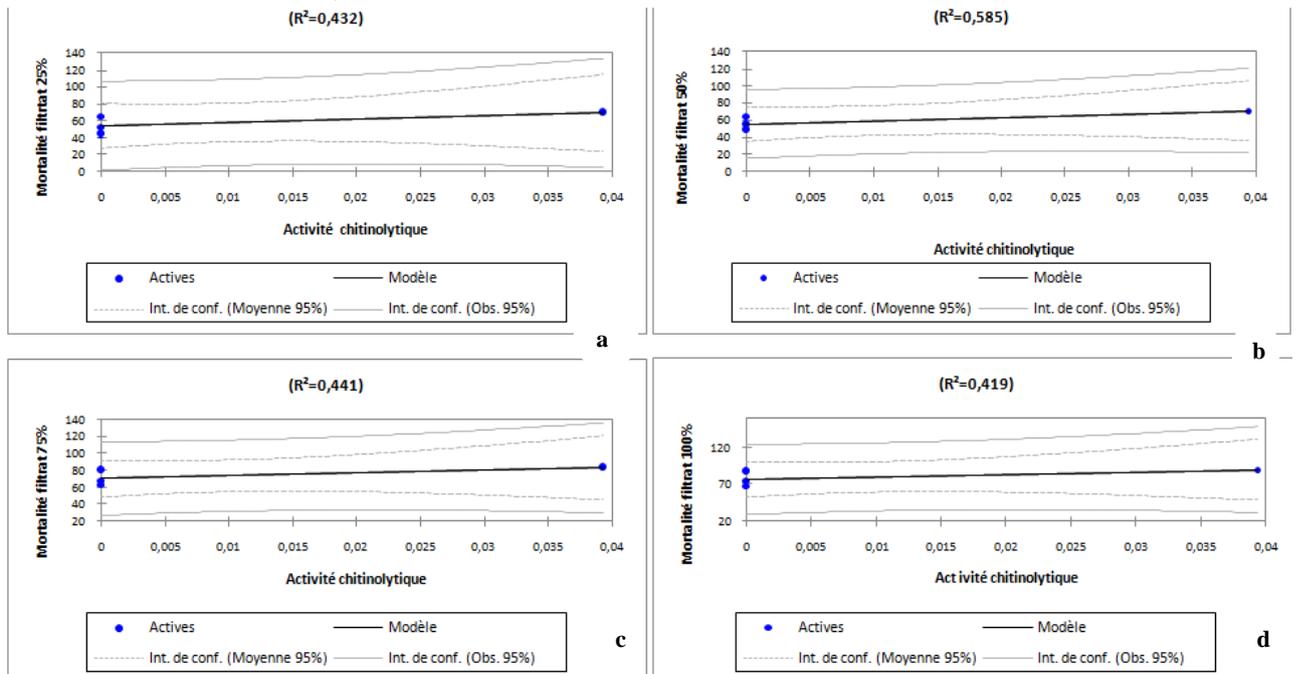


**Figure 56.** Droites de régression linéaire montrant la relation entre l'activité chitinolytique et insecticide contre *Sitophilus zeamais* pour le filtrat d'activité chitinolytique de *Curvularia* sp. a.concentration 25%,b.concentration 50% ,c.concentration 75 % , concentration 100 % .

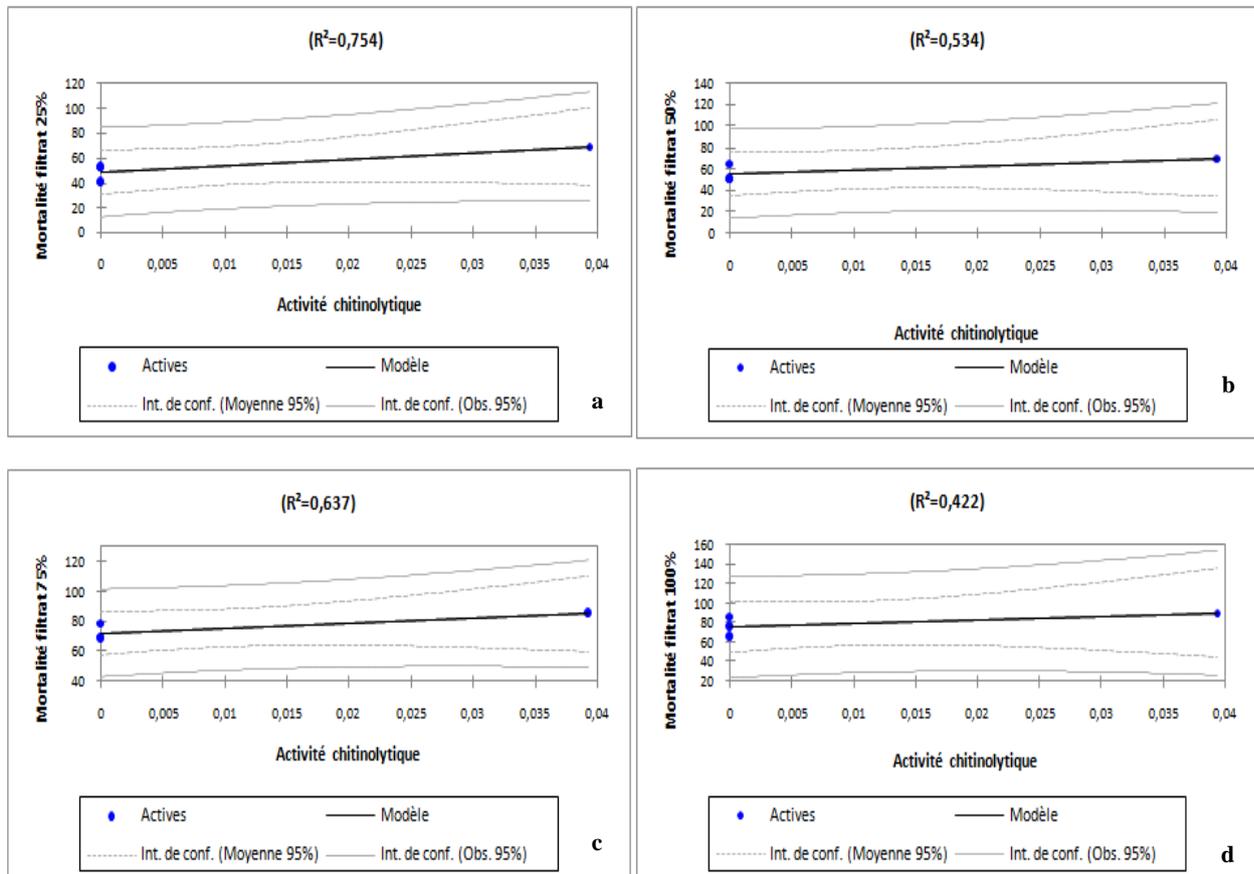
D'après ces droite de régression figures (54,55,56) nous constatons que  $r$  (coefficient de corrélation de Pearson) se trouve dans l'intervalle 0,5 à 1 donc il ya une forte corrélation positive entre l'activité chitinolytique et insecticide contre *Rhyzopertha dominica*, *Sitophilus granarius* et *Sitophilus zeamais* pour le filtrat d'activité chitinolytique de *Curvularia* sp.



**Figure 57.** Droites de régression linéaire montrant la relation entre l'activité chitinolytique et insecticide contre *Rhyzopertha dominica* pour le filtrat d'activité chitinolytique de *Fusarium* sp2. a.concentration 25%, b.concentration 50% ,c.concentration 75 % , concentration 100 % .

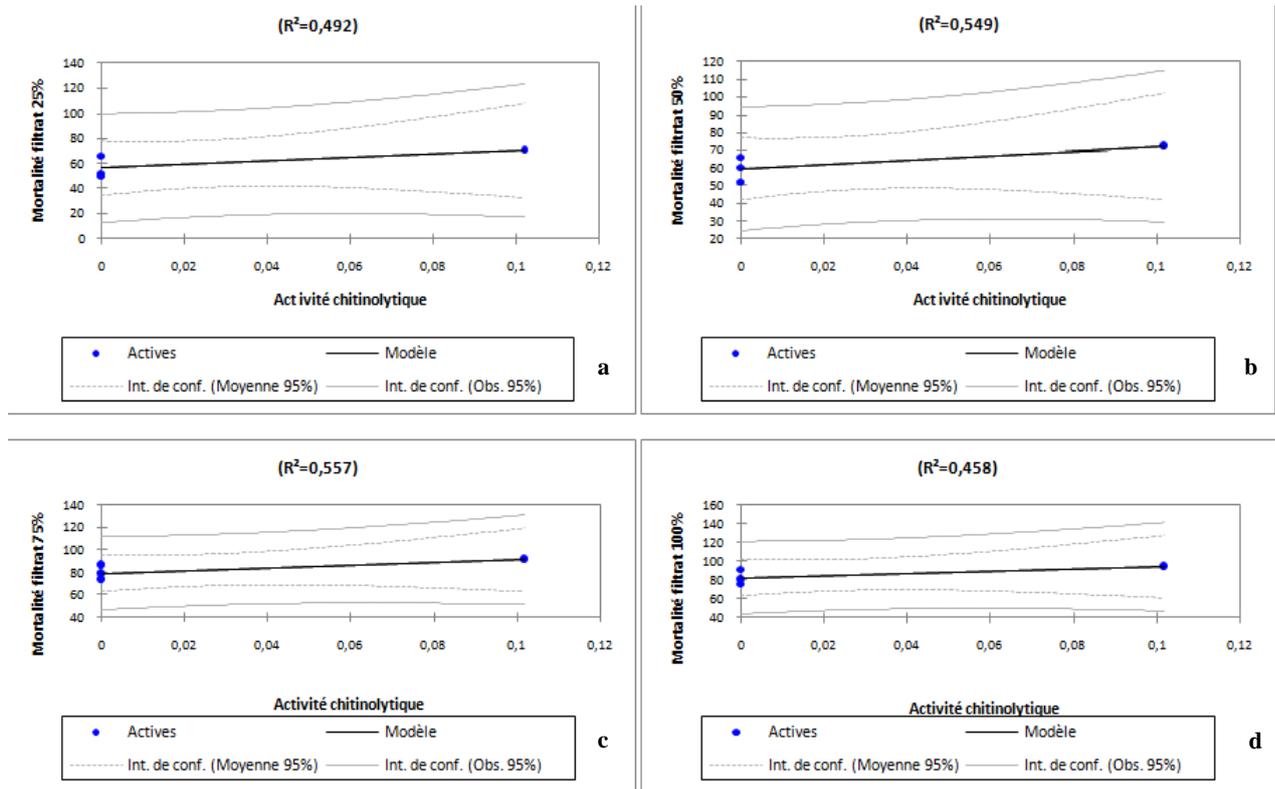


**Figure 58.** Droites de régression linéaire montrant la relation entre l'activité chitinolytique et insecticide contre *Sitophilus granarius* pour le filtrat d'activité chitinolytique de *Fusarium* sp2. a.concentration 25%, b.concentration 50% ,c.concentration 75 % , concentration 100 % .

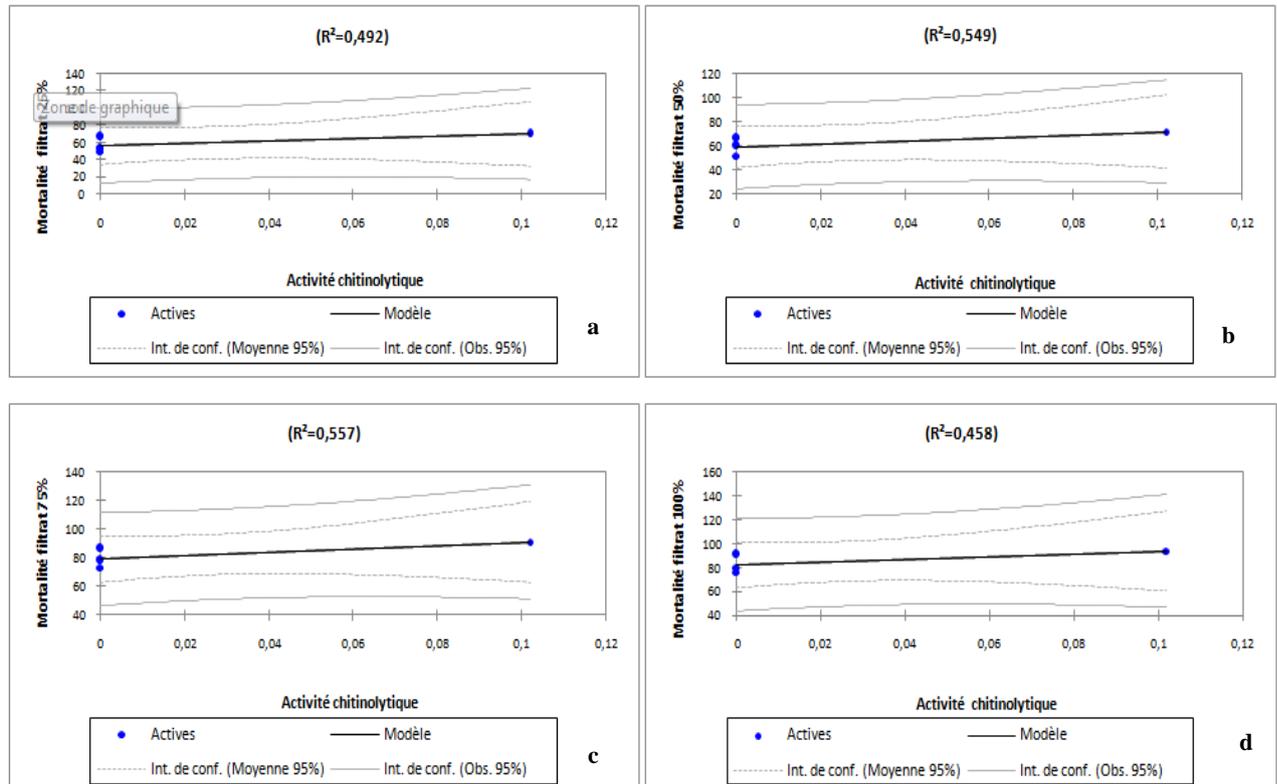


**Figure 59.** Droite de régression linéaire montrant la relation entre l'activité chitinolytique et insecticide contre *Sitophilus zeamais* pour le filtrat d'activité chitinolytique de *Fusarium* sp2. a.concentration 25%,b.concentration 50% ,c.concentration 75 % , concentration 100 % .

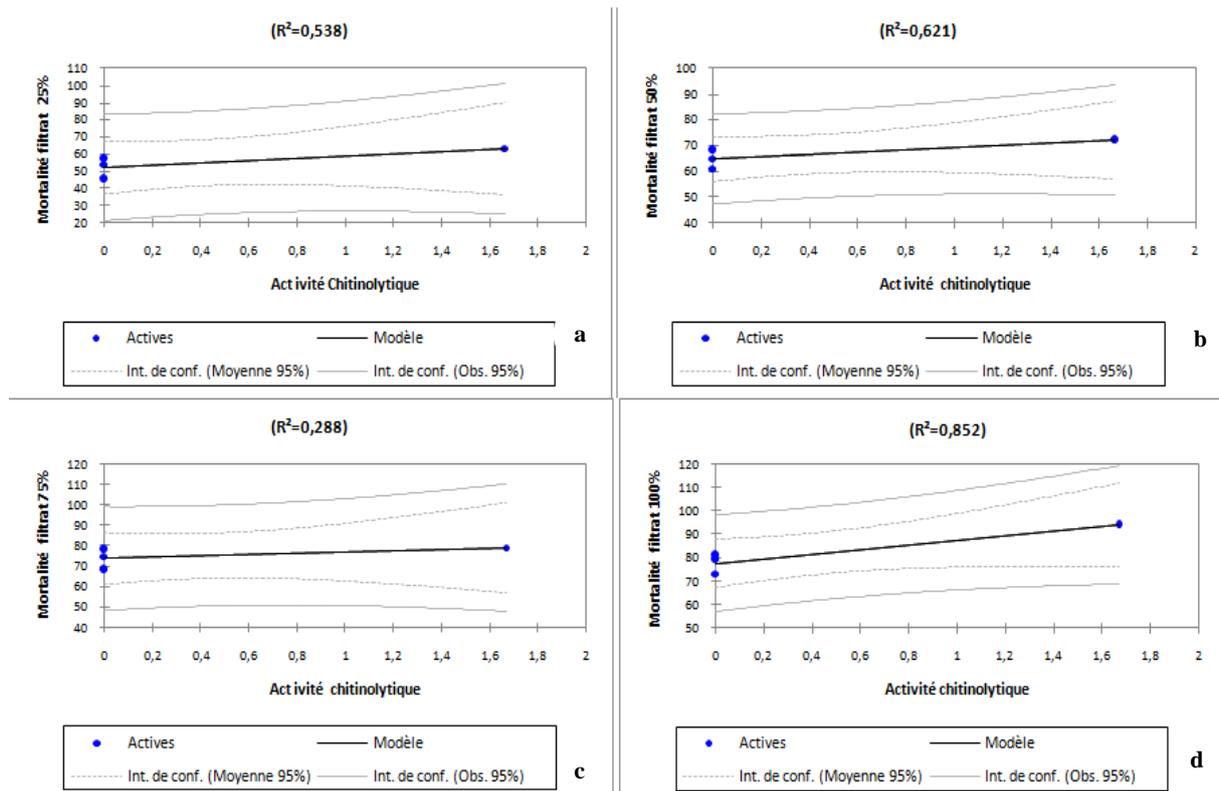
D'après ces droites de régression figures (57,58,59) nous constatons que  $r$  ( $r$  : coefficient de corrélation de Pearson) se trouve dans l'intervalle 0,5 à 1 donc il ya une forte corrélation positive entre l'activité chitinolytique et insecticide contre *Rhizopertha dominica*, *Sitophilus granarius* et *Sitophilus zeamais* pour le filtrat d'activité chitinolytique de *Fusarium* sp 2.



**Figure 60.** Droite de régression linéaire montrant la relation entre l'activité chitinolytique et insecticide contre *Rhyzopertha dominica* pour le filtrat d'activité chitinolytique de *Fusarium* sp3. a.concentration 25%, b.concentration 50% ,c.concentration 75 % , concentration 100 % .

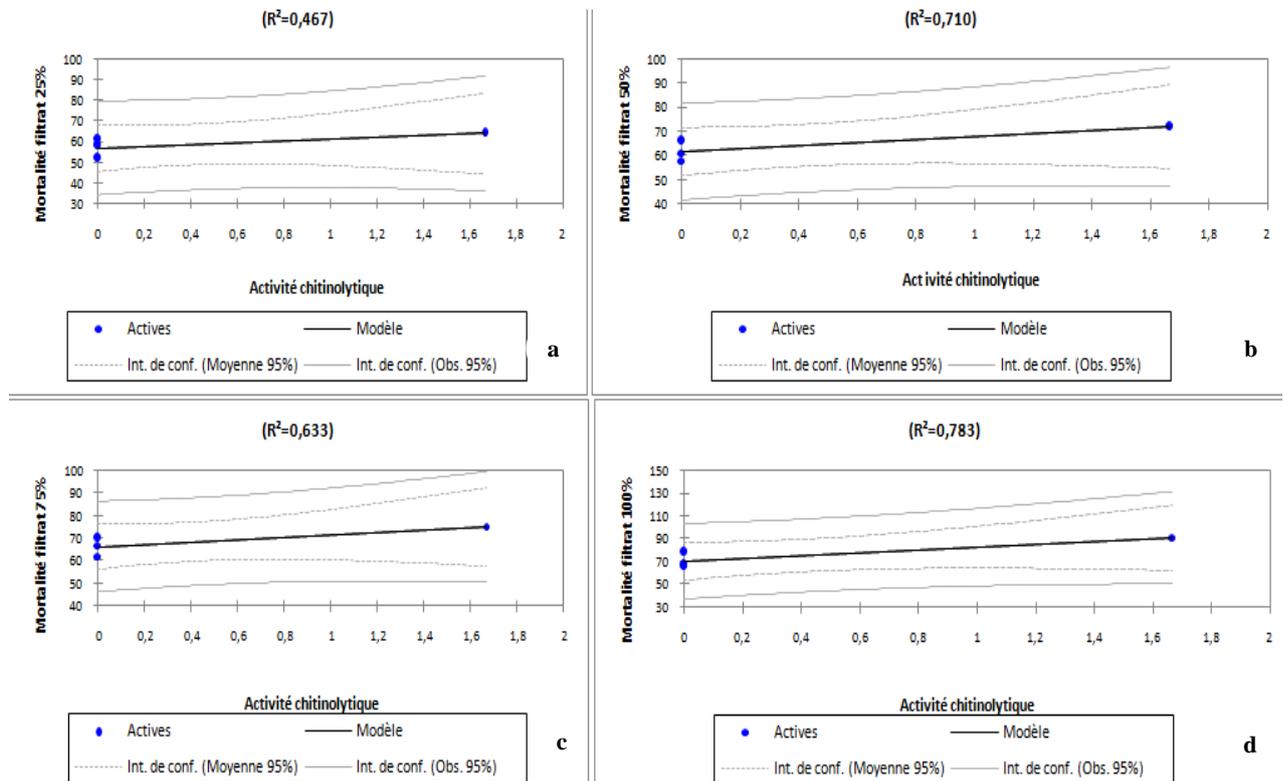


**Figure 61.** Droites de régression linéaire montrant la relation entre l'activité chitinolytique et insecticide contre *Sitophilus granarius* pour le filtrat d'activité chitinolytique de *Fusarium* sp3. a.concentration 25%, b.concentration 50% ,c.concentration 75 % , concentration 100 % .

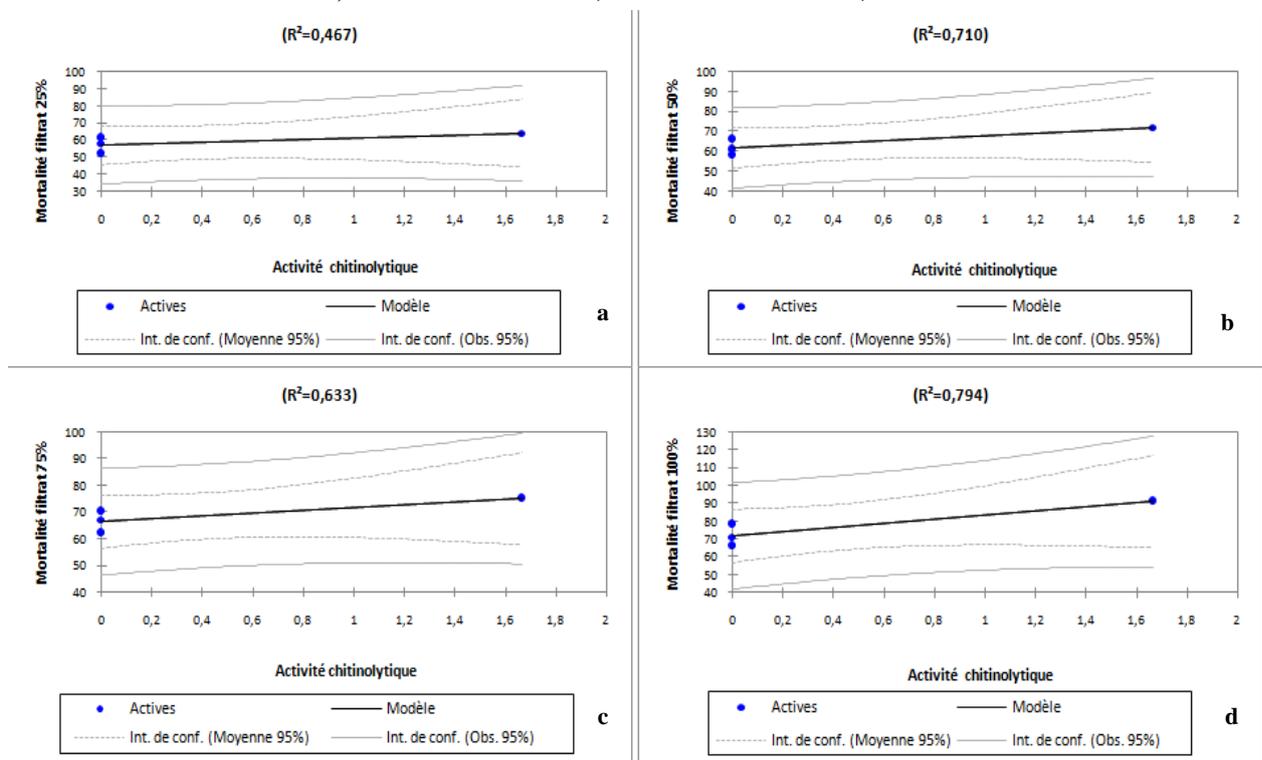


**Figure 62.** Droite de régression linéaire montrant la relation entre l'activité chitinolytique et insecticide contre *Sitophilus zeamais* pour le filtrat d'activité chitinolytique de *Fusarium* sp3. a.concentration 25%,b.concentration 50% ,c.concentration 75 % , concentration 100 % .

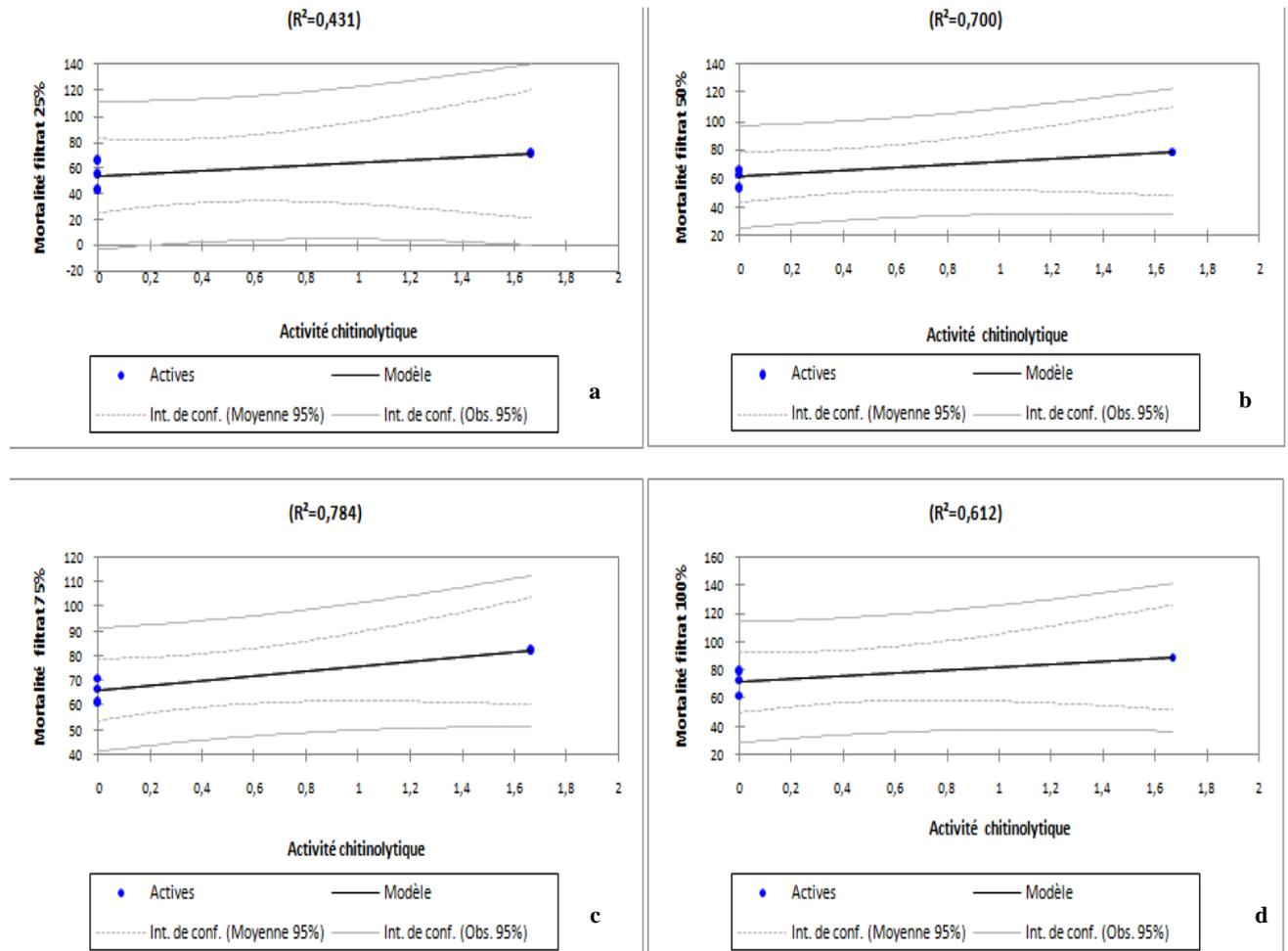
D'après ces droites de régression figures (60,61,62) nous constatons que r (coefficient de corrélation de Pearson) se trouve dans l'intervalle 0,5 à 1 donc il ya une forte corrélation positive entre l'activité chitinolytique et insecticide contre *Rhizopertha dominica*, *Sitophilus granarius* et *Sitophilus zeamais* pour le filtrat d'activité chitinolytique de *Fusarium* sp3.



**Figure 63.** Droites de régression linéaire montrant la relation entre l'activité chitinolytique et insecticide contre *Rhyzopertha dominica* pour le filtrat d'activité chitinolytique de *Fusarium* sp6. a.concentration 25%,b.concentration 50% ,c.concentration 75 % , concentration 100 % .



**Figure 64.** Droites de régression linéaire montrant la relation entre l'activité chitinolytique et insecticide contre *Sitophilus granarius* pour le filtrat d'activité chitinolytique de *Fusarium* sp6. a.concentration 25%,b.concentration 50% ,c.concentration 75 % , concentration 100 % .



**Figure 65.** Droites de régression linéaire montrant la relation entre l'activité chitinolytique et insecticide contre *Sitophilus zeamais* pour le filtrat d'activité chitinolytique de *Fusarium* sp6. a.concentration 25%,b.concentration 50% ,c.concentration 75 % , concentration 100 % .

D'après ces droites de régression figures (63,64,65) nous constatons que r (coefficient de corrélation de Pearson) se trouve dans l'intervalle 0,5 à 1 donc il ya une forte corrélation positive entre l'activité chitinolytique et insecticide contre *Rhizopertha dominica*, *Sitophilus granarius* et *Sitophilus zeamais* pour le filtrat d'activité chitinolytique de *Fusarium* sp6.

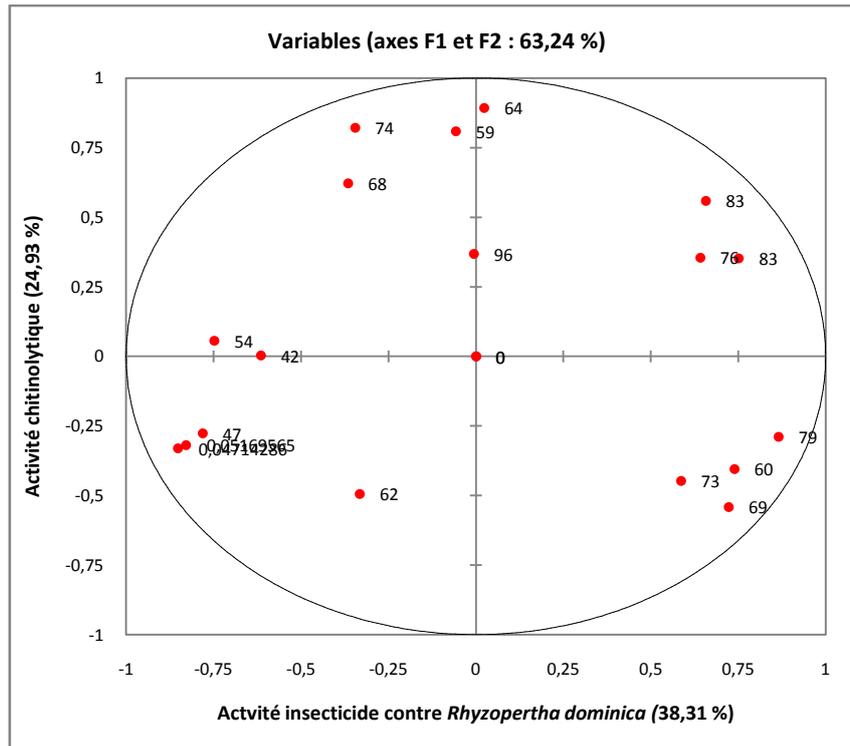


Figure 66. ACP montrant la relation entre l'activité chitinolytique et insecticide contre *R. dominica* pour les différentes filtrats des champignons endophytes sélectionnés.

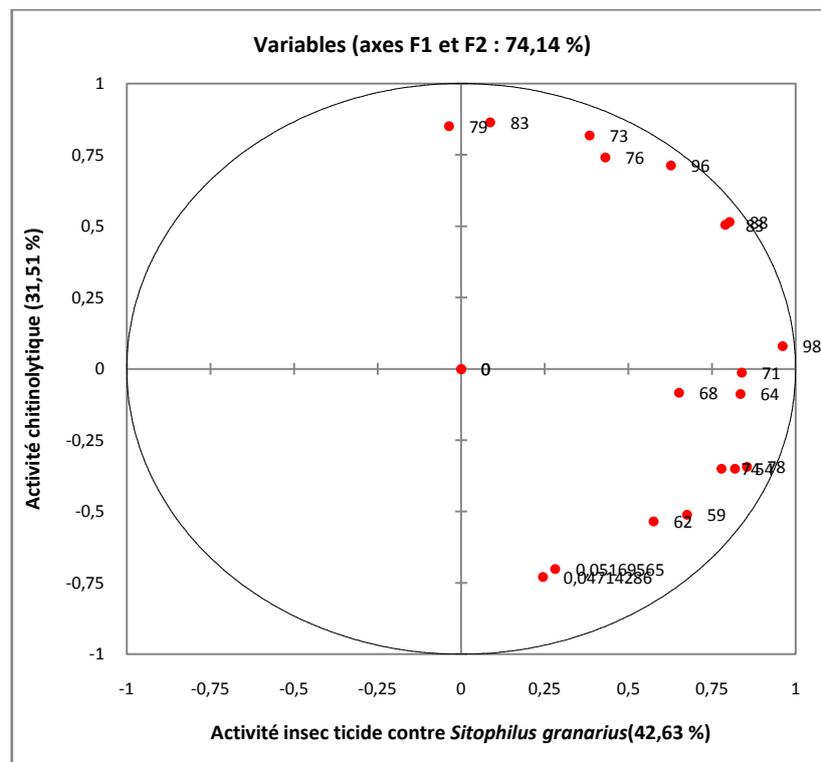
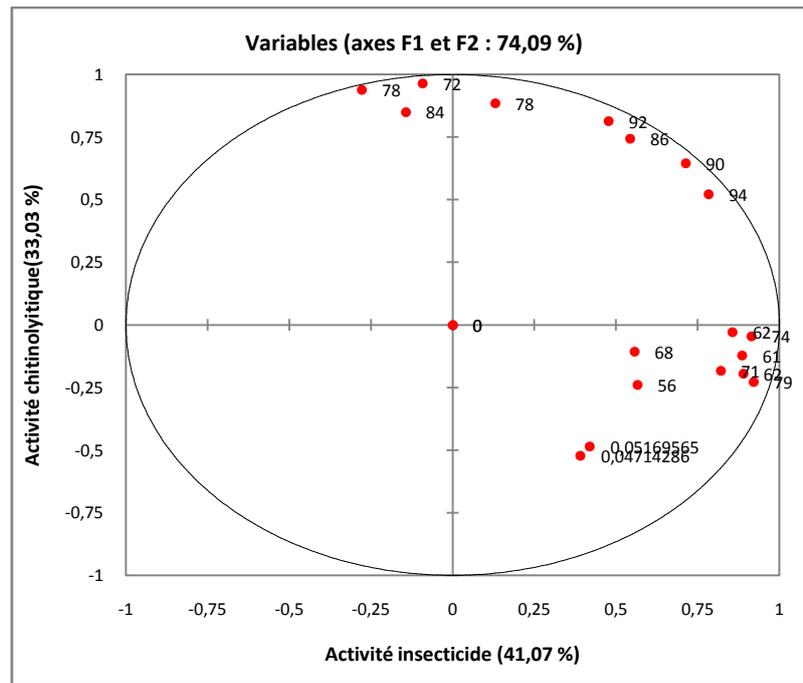


Figure 67. ACP montrant la relation entre l'activité chitinolytique et insecticide contre *S. granarius* pour les différentes filtrats des champignons endophytes sélectionnés.



**Figure 68.** ACP montrant la relation entre l'activité chitinolytique et insecticide contre *S.zeamais* pour les différents filtrats des champignons endophytes sélectionnés.

D'après ces ACP figures (66,67,68) on constate qu'il y a une corrélation positive entre l'activité protéolytique et insecticide contre *R.dominica*, *S.granarius*, *S.zeamais* pour les filtrats d'activité chitinolytique de *Curvularia sp*, *Fusarium sp2*, *Fusarium sp3*, *Fusarium sp6* seulement.

#### IV.11.2. Discussion

Pour mieux savoir la vraie raison des mortalités enregistrées pour les 3 insectes ciblés *Rhizopertha dominica*, *Sitophilus granarius*, *Sitophilus zeamais* on cherche à connaître la relation entre l'activité chitinolytique et insecticide des filtrats des champignons sélectionnés (dotés d'une activité chitinolytique).

L'activité insecticide pour les 4 concentrations du filtrat de *Curvularia sp* et *Fusarium* (Sp2, Sp3, Sp6) utilisées contre les 3 insectes ciblés commence avant leurs activités chitinolytiques et continue à augmenter à partir 24 heures en parallèle avec cette dernière.

Pour *Curvularia sp* et *Fusarium* (Sp2, Sp3, Sp6) l'analyse des composants principaux et la régression linéaire entre la mortalité des 3 espèces d'insectes ciblés et l'activité chitinolytique pour les 4 concentrations utilisées (25%, 50%, 75%, 100%) du filtrat d'activité chitinolytique montre une forte corrélation positive entre ces deux paramètres (mortalité enregistrée et l'activité chitinolytique).

On peut donc suggérer que la mortalité enregistrée des 3 insectes ciblés pour le champignon *Curvularia sp* est due aux chitinases produites par ce champignon et aux chitinases, mycotoxines ou autres composées à capacité insecticide pour *Fusarium* (Sp2,Sp3,Sp6) .

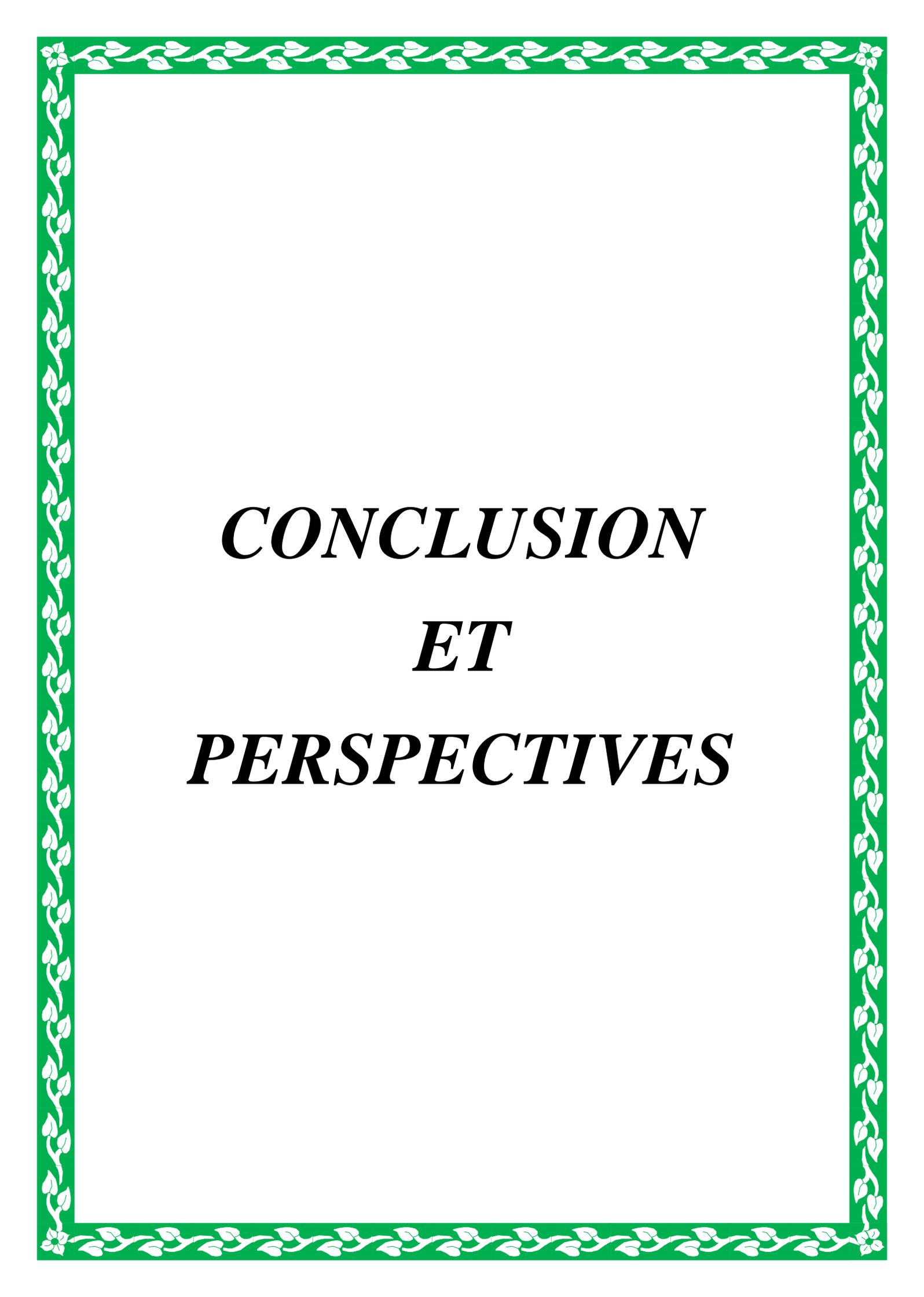
Pour *Fusarium* (Sp1,Sp4,Sp5) l'activité insecticide de ces champignons n'a aucune relation avec leurs activités chitinolytiques.

On peut donc suggérer que la mortalité enregistrée des 3 insectes ciblés pour ces champignons est due aux mycotoxines ou autres composées à capacité insecticide.

Les chitinases sont des enzymes produites par plusieurs espèces fongiques (Pedraza et Lopes, 1991; Patidar et al., 2005; Yamazaki et al., 2008; Kern et al., 2009; Ghanem et al., 2010) et qui ont une capacité insecticide en agissant soit par voie digestive par la pénétration dans l'intestin d'insectes causant ainsi des blessures de la membrane péritrophique qui se traduira par l'inhibition de la prise alimentaire et conduit par conséquent à la mort (Binod et al., 2007) ou par contact en décomposant la cuticule des insectes (Pérez et al., 2014).

Les mycotoxines sont produites par plusieurs champignons et agissent en provoquant des maladies pour le ravageur par la modulation des réponses de défense de ce dernier, permettant la colonisation de son tissu et ont un impact négatif sur les insectes qui se nourrissent de plantes hôtes infectées par le champignon endophyte producteur de ces molécules (Johnson et al., 2013).





***CONCLUSION***  
***ET***  
***PERSPECTIVES***

### V. Conclusion et perspectives

Dans ce modeste travail, nous avons pu mettre en évidence des champignons endophytes associés aux feuilles et aux tiges du laurier rose *Nerium oleander* L.

On a pu isoler 27 espèces différentes de champignons endophytes dont 20 à partir de la tige et 3 à partir des feuilles et 4 à partir des deux parties de la plante au même temps.

Le genre le plus dominant est *Fusarium* spp (6 espèces) avec une fréquence de colonisation totale de 23,23 % suivie par *Alternaria* spp (5 espèces) 18,59 %, *Torula* spp (3 espèces) et *Mycelia sterilia* (3 espèces) 9,29% chacun, *Thielavia* sp ; *Annellophora* sp ; *Bipolaris* sp 6,97% chacun, *Chaetomium* spp (2 espèces) et *Phoma* sp 4,65 %chacun, *Rhizoctonia* sp ; *Cladosporium* sp ; *Colletotrichum* sp ; *Curvularia* sp 2,32% chacun.

Des 27 champignons endophytes isolés 7 sont dotés d'une activité protéolytique et 7 sont dotés d'une activité chitinolytique.

*Torula* sp1 ,*Torula* sp2 sont dotés d'une bonne activité protéolytique mais aucune activité insecticide n'a été enregistrée pour ces 2 champignons.

Les filtrats issus des champignons *Alternaria* sp5, *Cladosporium* sp, *Curvularia* sp, *Fusarium* sp1, *Fusarium* sp2, *Fusarium* sp3, *Fusarium* sp4 ,*Fusarium* sp5, *Fusarium* sp6 démontrèrent une activité insecticide variable vis-à-vis *Rhyzopertha dominica*, *Sitophilus granarius* et *Sitophilus zeamais*.

Cette variabilité est peut être due principalement à la nature des métabolites produits par ces champignons (protéases, chitinases, mycotoxines, autres composants chimiques).

Nous avons constaté que la mortalité des insectes ciblés est positivement proportionnelle avec les concentrations des filtrats et le temps, la concentration 100% semble la concentration la plus efficace contre ces insectes après 48 heures de traitement.

Nous avons constaté que les activités protéolytiques et chitinolytiques sont liées positivement à la croissance radiale de ces champignons.

Nous avons essayé d'interpréter l'effet insecticide des filtrats préparés en s'appuyant sur l'étude de leurs activités protéolytiques et chitinolytiques et nous avons constaté que :

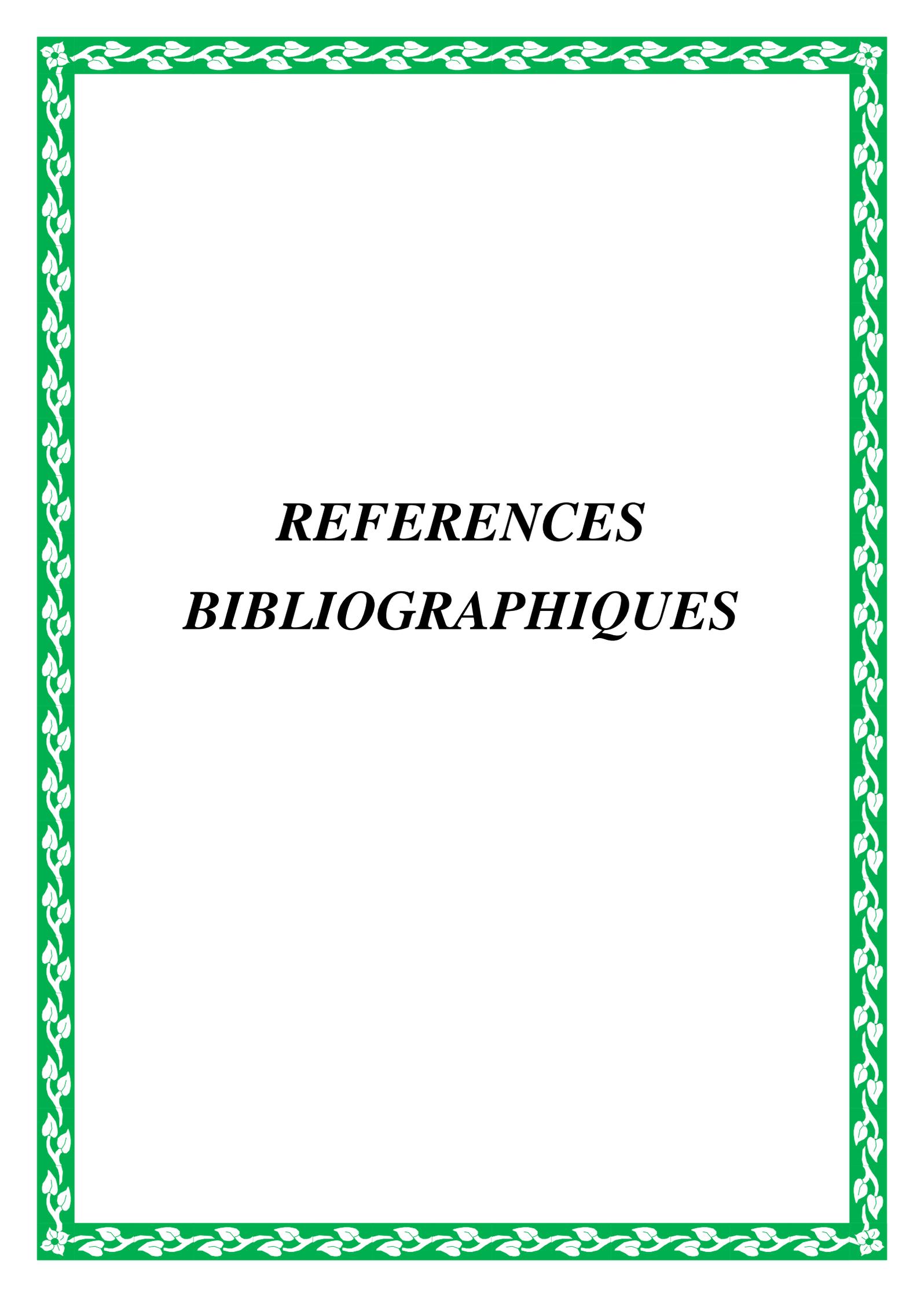
- l'activité protéolytique pour *Alternaria* sp5, *Curvularia* sp, *Fusarium* sp3 est liée positivement à la mortalité enregistrée pour les insectes ciblés.
- Pour *Cladosporium* sp et *Fusarium* sp1 l'activité insecticide n'a aucune relation avec leurs activités protéolytiques.
- l'activité chitinolytique pour *Curvularia* sp, *Fusarium* (sp2, sp3, sp6) est liée positivement à la mortalité enregistrée pour les insectes ciblés.

- Pour *Fusarium* (Sp1,Sp4,Sp5) l'activité insecticide de ces champignons n'a aucune relation avec leurs activités chitinolytiques .

Ces résultats démontrent que *Curvularia* sp, *Fusarium* sp3 peuvent être utilisés comme mycoinsecticides de contact, que ce soit sous forme de filtrats, tandis que *Alternaria* sp5, *Cladosporium* sp, *Fusarium* sp1, sp2, sp4, sp5, sp6 peuvent refléter une activité biologique autre qu'enzymatique (mycotoxines, inhibiteurs d'acétylcholinestérase par exemple ?), c'est pourquoi des analyses biochimiques des filtrats préparés doivent être effectuées.

Il est recommandé dans les futures études de réaliser des travaux plus approfondis qui auront pour objectifs:

- Réaliser davantage des études sur la mycoflore endophyte du laurier rose et également diversifier les parties du végétal à investiguer (racines, fruits, fleurs) ;
- Cibler d'autres organismes ravageurs afin d'évaluer le spectre d'action des filtrats ;
- Inoculer des céréales sur champs par ces champignons et voir la réaction entre les insectes des denrées stockées face aux graines issues de ces plantes après récolte.
- Enfin, il serait plus fiable et plus productif de caractériser la nature chimique des substances impliquées dans l'activité insecticide ce qui nécessite l'implication des méthodes plus performantes comme la chromatographie en phase gazeuse (CPG), la chromatographie en phase liquide (HPLC) et l'électrophorèse (SDS-PAGE).



***REFERENCES***  
***BIBLIOGRAPHIQUES***

- 1-Abarca M.L.,Accensi F.,Cano J.,&Cabañes F.J.,2004.Taxonomy and significance of black aspergilli. *Antonie Van Leeuwenhoek.*,**86**:33-49.
- 2-Abbott W.S.,1925.A method of computing the effectiveness of an insecticide.*Journal of Economic Entomology.*,**18**: 265-267.
- 3-Abdelaziz S.E.,2001.Persistence of some plant oils against the bruchid beetle, *Callosobruchus maculatus*(F.).(Coleoptera:*Bruchidae*) during storage *Journal of Agricultural Science.*,**9**(1):423-432.
- 4-Abdelaziz S.E.,2011.Control Strategies of Stored Product Pests.*Journal of Entomology.*,**8** (2):101-122.
- 5-Abdelbaky N.F.,Arafat N.S.,&Abdelsalam A.H.,1998.Three *Cladosporium spp.*as promising biological control candidates for controlling whiteflies (*Bemisia spp.*)in Egypt.*Pakistan Journal of Biological Science.*,**1**:188-195.
- 6-Abdelbaky N.F.,2000.*Cladosporium spp.*an entomopathogenic fungus for controlling whiteflies and aphids in Egypt. *Pakistan Journal of Biological Science.*,**3**:1662-1667.
- 7-Abdelbaky N.F.,&Abdel-Salam A.H.,2003.Natural incidence of *Cladosporium spp.*as a bio-control agent against whiteflies and aphids in Egypt.*Journal of Applied Entomology.*,**127**:228-235.
- 8-Aboelghar G.E.S.,&El-sheikh A.E.,1987.Effectiveness of some plant extracts as surface protectants of cowpea seeds against the pulse beetle *Callosobruchus chinensis*. *Phytoparasitica.*,**15**:109-113.
- 9-Abu Hena Mostofa Jamal M.,Shahedur R.,Azizul I.,Rezaul K.,Samsul A.,&Ziaur R.,2012.Minimum Inhibitory Concentration Analysis of *Nerium oleander* against Bacterial Pathogens. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine.*,**1**:1664-1666.
- 10-Agrawal T.,&Kotasthane A.S.,2012.Chitinolytic assay of indigenous *Trichoderma* isolates collected from different geographical locations of Chhattisgarh in Central India.*Springer Plus.*,**1**:73.
- 11-Ahmed K.N.,Khatun M.,&RahmanM.M.,1991.Biological notes on *Xylocoris flavipes*(Reuter) (Hemiptera: Anthocoridae).*Journal of the Asiatic Society of Bangladesh Science.*,**17**: 65-67.
- 12-Aimanbetov M.Z.,&Azhenov V.K.,2004.Plant protection in Kazakhstan.*Zashchita i Karantin Rastenii.*,**3**:18-21.

- 13-Albrechtsen B.R.,&Witzell J.,2012.**Disentangling functions of fungal endophytes in forest trees. In: Silva A.P.,Sol M.(eds).Fungi types,environmental impact and role in disease.Nova Science Publishers Inc, New York.pp:235-246.
- 14-Alejandro O.C.,1988.**Insectes ravageurs du maïs guide d'identification au champs.International maize and wheat Improvement center.Lisboa,115p.
- 15-Ali A.,Ahmad F., Biondi A.,Wang Y.,&Desneux N.,2012.**Potential for using *Datura alba* leaf extracts against two major stored grain pests,the khapra beetle *Trogoderma granarium* and the rice weevil *Sitophilus oryzae*. *Journal of Pest Science.*,**85**:359-366.
- 16-Anon A.,1998.**Reregistration Eligibility Decision:Aluminium and magnesium phosphide.Washington DC,191p.
- 17-Arbogast R.T.,1991.** Beetles: Coleoptera. In: Gorham J.R.(Ed.).Ecology and Management of Food-Industry Pests. Association of Analytical Chemists,California, pp:131-176.
- 18-Arbogast R.T.,&Throne J.E.,1997.** Insect infestation of farm-stored maize in South Carolina: towards characterization of a habitat. *Journal of Stored Products Research.*, **33**(3):187-198.
- 19-Arechavaleta M.,Bacon C.W.,Plattner R.D.,Hoveland C.S.,&Radcliffel D.E.,1992.** Accumulation of ergopeptide alkaloids in symbiotic tall fescue grown under deficits of soil water and nitrogen fertilizer. *Applied and Environmental microbiology.*,**58**:857-861.
- 20-Arnold A.E.,&Herre E.A.,2003.**Canopy cover and leaf age affect colonization by tropical fungal endophytes:ecological pattern and process in *Theobroma cacao*(*Malvaceae*). *Mycologia.*,**95**:388-398.
- 21-Asanov K.,1970.**The lesser grain borer. *Zashchita Rastenii.*,**15**(10):47.
- 22-Aschehoug E.T.,Metlen K.L.,Callaway R.M.,&Newcombe G.,2012.**Fungal endophytes directly increase the competitive effects of an invasive forb. *Ecology.*,**93**:3-8.
- 23-ACTA,1982.**The pests of stored grain. Les ravageurs des grains entreposes.ACTA,Paris,8 p.
- 24-Ayuk-Takem J.A.,Chheda H.R.,&Eckebil J.P.,1982.**Problems and potentials of maize research and production in Cameroon (*Zea mays* L.). *Revue Science et Technique.*, **2**(4):5-16.
- 25-Bacon C.W.,1993.**Abiotic stress tolerances(moisture,nutrients) and photosynthesis in endophyte-infected tall fescue. *Agriculture, Ecosystems & Environment.*,**44**:123-141.
- 26-Bacon C.W.,&Hill N.S.,1996.**Symptomless grass endophytes.In:Redkin S.C.,Carris L.M .(eds).Endophytic fungi in grasses and woody plants products of coevolutionary symbioses and their role in the ecological adaptations of grasses.APS Press,St. Paul,pp:155-178.

- 27-Bagari M.,Bouhaimi A.,Ghaout S.,&Chihrane J.,2013.**The toxic effects of *Nerium oleander* on larvae of the desert locust *Schistocerca gregaria* (Forskål,1775) (Ortoptera,*Acrididae*). *Zoologica Baetica.*,**24**:193-203.
- 28-Bahar M.H.,Backhouse D.,Gregg P.C.,&Mensah R.,2011.**Efficacy of a *Cladosporium* sp. fungus against *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae),other insect pests and beneficial insects of cotton.*Biocontrol science and Technology.*,**21**(12):1387-1397.
- 29-Bahr I.,&Prinz W.,1977.**Insects in stored grain in the German Democratic Republic and the prevention of damage. *Nachrichtenblatt fur den Pflanzenschutz in der DDR.*,**31**(10):200-204.
- 30-Balachowsky A.,&Mesnil L.,1936.**Les insectes nuisibles aux plantes cultivées leurs moeurs leurs destruction.Paris,1921 p.
- 31-Baldauf M.W.,Mace W.J.,&Richmond D.S.,2011.**Endophyte mediated resistance to black cutworm as a function of plant cultivar and endophyte strain in tall fescue.*Environmental Entomology.*,**40**:639-647.
- 32-Ball O.J.P.,Prestidge R.A.,&Sprosen J.M.,1995.**Interrelationships between *Acremonium lolii* , peramine and lolitrem B in perennial ryegrass.*Applied and Environmental Microbiology.*,**61**:1527-1533.
- 33-Ball O.J.,Gwinn K.D, Pless C.D.,&Popay A.J.,2011.**Endophyte isolate and host grass effects on *Chaetocnema pulicaria* (Coleoptera: *Chrysomelidae*) feeding.*Journal of Economic Entomology.*,**104**:665-672.
- 34-Baltruschat H.,Fodor J.,Harrach B.D.,Niemczyk E.,Barna B.,Gullner G.,Janeczko A.,**  
**35-Kogel K.H.,Schäfer P.,Schwarczinger I.,Zuccaro A.,&Skoczowski A.,2008.**Salt tolerance of barley induced by the root endophyte *Piriformospora indica* is associated with a strong increase in antioxidants. *New Phytologist.*,**180**:501-510.
- 36-Bandara V.,Weinstein S.A.,White J.,&Eddleston M.,2010.**A review of the natural history, toxinology, diagnosis and clinical management of *Nerium oleander* (common oleander) and *Thevetia peruviana* (yellow oleander) poisoning. *Toxicon.*,**56**:273-281.
- 37-Baoyu H.,Hangu Z.,&Liu C.,1997.**Epizootic infection and spatial pattern wi thin epizootic peak period of *Cladosporium* sp. to the population of *Aleurocanthus spiniferus*.*Entomology Journal of East China.*,**6**:66-70.
- 38-Barnett H.,&Hunter B.,1998.**Illustrated Genera of Imperfect Fungi.APS Press.Minnesota, 218p.

- 39-Batta Y.A.,2013.**Efficacy of endophytic and applied *Metarhizium anisopliae*(Metch.) Sorokin (Ascomycota: Hypocreales)against larvae of *Plutella xylostella* L.(Yponomeutidae: Lepidoptera) infesting *Brassica napus* plants.*Crop Protection.*,**44** :128-134.
- 40-Bellotti,A.C., 1983.** More on the mealybug: a major cassava pest. *Cassava News.*,**7**: 1-4.
- 41-Benhamou N.,&Chet I.,1997.**Cellular and molecular mechanisms involved in the interaction between *Trichoderma harzianum* and *Pythium ultimum*.*Applied and Environmental Microbiology.*,**63**:2095-2099.
- 42-Benhamou N.,Kloepper J.W.,&Tuzun S.,1998.**Induction of resistance against *Fusarium* wilt of tomato by combination of chitosan with and endophytic bacterial strain: ultrastructure and cytochemistry of the host response. *Planta.*,**204**:153-168.
- 43-Berger H.K,&Hetfleis M.,1985.**Stored-product protection-pests and their control. *Pflanzenschutz*,**2**:9-10.
- 44-Bezerra J.D.P.,Santos M.G.S.,Svedese V.M.,Lima D.M.M.,Fernandes M.J.S.,Paiva L.M., &Souza-Motta C.M.,2012.**Richness of endophytic fungi isolated from *Opuntia ficus-indica* Mill.(Cactaceae) and preliminary screening for enzyme production.*World Journal of Microbiol Biotechnology.*,**28**:1989-1995.
- 45-Bottalico A.,&Perrone G.,2002.**Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with head blight in small-grain cereals in Europe. *European Journal of Plant Pathology.*,**108** :611-624.
- 46-Bouchet P.H.,Guignard J.L.,&Vihard J.,1999.**Les champignons mycologie fondamentale et appliquée. Masson.Paris,194p.
- 47-Bousquet Y.,1990.**Beetles associated with stored products in Canada:An identification guide. Canadian Government Pub Centre.Ottawa,220pp.
- 48-Boyer J.S .,1982.** Plant productivity and environment. *Science.*,**218**:443-448.
- 49-Brader B.,Lee R.C.,Plarre R.,Burkholder W.,Kitto G.B.,Kao C.H.,Polston L.,Dorneanu E., Szabo I.,Mead B.,Rouse B.,Sullins D.,&Denning R.,2002.**A comparison of screening methods for insect contamination in wheat. *Journal of Stored Products Research*,**38**:75-86.
- 50-Bray E.A., Bailey-Serres J.,&Weretilny K.E.,2000.**Responses to abiotic stresses. In: Gruissem W.,Buchanan B.,Jones R.(eds).Biochemistry and molecular biology of plants.American Society of Plant Physiologists, Rockville, pp:1158-1249.

- 51-Breuil C.,&Huang J.,1994.**Activities and properties of extracellular proteinases produced by staining fungi grown in protein-supplemented liquid media.*Enzyme and Microbial Technology* .,16:602-607.
- 52-Brower J.H.,Smith H.L.,Vail P.V.,&Flinn P.W.,1996.**Biological control.In: Subramanyam B.,Hagstrum D.W.(eds).Integrated Management of Insects in Stored Products.Marcel Dekker, New York, pp: 223-286.
- 53-Bruneton J.,2001.**Plantes toxiques:végétaux dangereux pour l'homme et les animaux.Tec & Doc Lavoisier.Paris,pp :129-136.
- 54-Bingtao L.,Leeuwenberg A.J.M.,&Middleton D.J.,2009.***Nerium oleander* Linn.*Flora of China*.,16:173.
- 55-Binod P.,Sukumaran R.K.,Shirke S.V.,Rajput J.C.,&Pandey A.,2007.**Evaluation of fungal culture filtrate containing chitinase as a biocontrol agent against *Helicoverpa armigera*. *Journal of Applied Microbiology*.,103:1845-1852.
- 56-Birch L.C.,1944.**Two strains of *Calandra oryzae* L.(Coleoptera).*Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science*.,22:271-275.
- 57-Burmeister H.R.,Grove M.D.,Peterson R.E.,Weisleder D.,&Plattner R.D.,1985.**Isolation and characterization of two new fusaric acid analogs from *Fusarium moniliforme* NRRL 13.,163. *Applied and Environmental Microbiology*.,50: 311-314.
- 58-Bush L.P.,Wilkinson H.H.,&Schardl C.L.,1997.**Bioprotective alkaloids of grass-fungal endophyte symbioses. *Plant Physiology*.,114:1-7.
- 59-Butt T.M.,&Goettel M.S.,2000.**Bioassays for entomogenous fungi. In: Navon A.,Ascher K.R.S.(eds).Bioassays of entomopathogen microbes and nematodes.CABI Publishing Wallingford, pp:141-195.
- 60-Cabrera R.I.,Garcia A.,Otero-Colina G.,Almaguel L.,&Ginarte A.,2005.***Hirsutella nodulosa* and other fungus species associated to the rice tarsonemid mite *Steneotarsonemus pinki* (Acari: Tarsonemidae) in Cuba. *Folia entomológica mexicana* .,44:115-121.
- 61-Campbell A.,&Sinha R.N.,1976.**Damage of wheat by feeding of some stored product beetles. *Journal of Economic Entomology*.,69(1):11-13.
- 62-Campos R.A.,Arruda W.,Boldo J.T.,Silvia M.V.,Barros N.M.,Azedevo J.L.,Schrack A., &Vainstein M.H.,2005.***Boophilus microplus* infection by *Beauveria amorpha* and *Beauveria bassiana*: SEM analysis and regulation of subtilisin-like proteases and chitinases.*Current Microbiology*.,50: 257-261.
- 63-Cao W.H, Liu J.,He X.J.,Mu R.L.,Zhou H.L.,Chen S.Y.,&Zhang J.S.,2006.**Modulation of ethylene responses affects plant salt-stress responses.*Plant Physiology*.,140:707-719.

- 64-Carmichael J.W.,Kendrick B.W.,Connors I.L.,&Lynne S.,1980.***Genera of Hyphomycetes.*The University of Alberta Press.Edmonton,386pp.
- 65-Carson R.D.,West C.P.,Reyes B.D.L., Rajguru S.,&Guerber C.A.,2004.** Endophyte effects on dehydrin protein expression and membrane leakage in tall fescue.5th International Symposium on *Neotyphodium/Grass Interactions*,pp: 202.
- 66-Champ B.R.,&Dyde C.E.,1976.**Report of the FAO global survey of pesticide susceptibility of stored grain pests. FAO,Rome,2p.
- 67-Chaverri P.,&Gazis R.O.,2011.**Linking ex *planta* fungi with their endophytic stages: *Perisporiopsis*,a common leaf litter and soil fungus, is a frequent endophyte of *Hevea spp.* and other plants. *Fungal Ecology* .,4: 94-102.
- 68-Chehat F.,2007.**Analyse macroéconomique des filières, la filière blés en Algérie .Perspectives agricoles et agroalimentaires Maghrébines Libéralisation et Mondialisation .Alger :7-9 avril.
- 69-Chen C.,Bauske E.M.,Musson G.,Rodriguez-Kabana R.,&Kloepper J.W.,1995.**Biological control of *Fusarium* wilt of cotton by use of endophytic bacteria. *Biological Control*.,6:83-91.
- 70-Christias C.,Hatzipapas P.,Dara A.,Kaliapas A.,&Chrysanthis G.,2001.***Alternaria alternata*, a new pathotype pathogenic to aphids. *BioControl* .,46: 105-124.
- 71-Clay K.,1988.**Fungal endophytes of grasses: A defensive mutualism between plants and fungi. *Ecology*.,69:10-16.
- 72-Clay K.,&Schardl C.L.,2002.**Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses. *The American Naturalist*.,160:99-127.
- 73-Claydon N.,Grove J.F.,&Pople M.,1979.**Insecticidal secondary metabolic products from the entomogenous fungus *Fusarium larvarum*.*Journal of Invertebrate Pathology*.,33: 364-367.
- 74-Clement G.,Dallard J.,Poisson C.,&Sauphanor B.,1988.**The factors of paddy rice resistance to stored product insect pests. I. Influence of open lemma. *Agronomie Tropicale*.,43(1):47-58.
- 75-Compant S.,Duffy B.,Nowak J.,Clément C.,&Barka E.A.,2005.**Use of plant growth-promoting bacteria for bio-control of plant diseases:principles,mechanisms of action and future prospects. *Applied and Environmental Microbiology*.,71:4951-4959.
- 76-Cotton R.T.,1921.**Four *Rhynchophora* attacking corn in storage.*Journal of Agricultural Research*.,20(8): 605-614.

- 77-Coutiño L.R.,Marquez J.E.,Peter M.G.,&Shirai K.,2010.**The effect of pH on the production of chitinolytic enzymes of *Verticillium fungicola* in submerged cultures.*Bioresource Technology.*,**101**:9236-9240.
- 78-Cuperus G.W.,Noyes R.T.,Fargo W.S.,Clary B.L.,Arnold D.C.,&Anderson K.,1990.** Management practices in a high-risk stored-wheat system in Oklahoma.*Bulletin of the Entomological Society of America.*,**36**(2):129-134.
- 79-Danho M.,&Haubruge E.,2003.**Comportement de ponte et stratégie reproductive de *Sitophilus zeamais*.*Phytoprotection.*,**84**:59-67.
- 80-De Carvalho B.N.C.R.,Negrisoli Junior A.S.,Bernardi D.,&Silviera Garcia M.,2013.** Activity of eight strains of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae, Heterorhabditidae) against five stored product pests.*Experimental Parasitology.*,**134**:384-388.
- 81-Delille L.,2007.**Les plantes médicinales d'Algérie.Berti éditions, Alger,pp :141-142.
- 82-Delobel A.,1992.**Dried cassava chips,an important reservoir for stored-product insects in Central Africa. *Journal of African Zoology.*,**106**(1):17-25.
- 83-Delobel A.,&Tran M.,1993.**Les coléoptères des denrées alimentaires entreposées dans les régions chaudes.Orstom .Paris,442pp.
- 84-Demissie G., TeferaT.,&Tadesse A.,2008.** Efficacy of Silicosec, filter cake and wood ash against the maize weevil,*Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae) on three maize genotypes .*Journal of Stored products Research.*,**44**:227-231.
- 85-Desneux N.,Decourtye A.,&Delpuech J.M.,2007.**The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *Annual Review of Entomology.*,**52**: 81-106.
- 86-Diaz-Gomez O.,Rodriguez J.C.,Shelton A.M.,Lagunes T.A.,&Bujanos M.R.,2000.** Susceptibility of *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) populations in Mexico to commercial formulations of *Bacillus thuringiensis*.*Journal of Economic Entomology.*, **93**(3): 963-970.
- 87-Dinună A.,Bunescu H.,Proorocu M.,Bodis I.,&Oros S.,2008.**Researches concerning the external morphology of granary weevil's adult(*sitophilus granarius* L.) a major pest of the stored cereals. *Agriculture.*,**65**(1):72-77.
- 88-Djermoun A.,2009.**La production céréalière en Algérie:les principales caractéristiques .*Revue Nature et Technologie.*,**1**:45-53.
- 89-Dunaevskii Y.E.,Gruban T.N.,Belyakova G.A.,&Belozerskii M.A.,2006.**Extracellular Proteinases of Filamentous Fungi as Potential Markers of Phytopathogenesis.*Microbiology.*, **75**(6) :649-652.

- 90-Edde P.A.,2012.**A review of the biology and control of *Rhyzopertha dominica* (F.) the lesser grain borer .*Journal of Stored products Research.*,**48**:1-18.
- 91-Elhadjismail I.Y.,2014.**Pests of Stored Products (Theoretical+Practical Lectures),Mosul University, Mosul,399pp.
- 92-El Modafar C.,&El Boustani T.A.,2000.**Time course accumulation and Fungitoxicity of date palm phytoalexins towards *Fusarium oxysporum* f.sp.albedinis cell wall-degading enzymes.*Journal of Phytopathology.*,**148**:405-411.
- 93-ElSawi N.M.,Geweely N.S.,Qusti S.,Mohamed M.,&Kamel A.,2010.**Cytotoxicity and Antimicrobial Activity of *Nerium oleander* Extracts.*Journal of Applied Animal Research.*,**37**: 25-31.
- 94-Evans D.E.,1987.**The survival of immature grain beetles at low temperatures.*Journal of Stored Products Research.*,**23**: 79-83.
- 95-Evans D.E,Thorpe G.R.,&Dermott T.,1983.**The disinfestation of wheat in a continuous flow fluidized bed. *Journal of Stored Products Research.*,**19**:125-137.
- 96-Faeth S.H.,&Fagan W.F.,2002.**Fungal endophytes: Common host plant symbionts but uncommon mutualists. *Integrative and Comparative Biology.*,**42**:360-368.
- 97-Fang W.,Leng B., Xiao Y., Jin K., Ma J., Fan Y., Feng J.,Yang X.,Zhang Y.,&Pei P.,2005.** Cloning of *Beauveria bassiana* chitinase gene Bchit1 and its application to improve fungal strain virulence. *Applied and Environmental Microbiology.*,**71**: 363-370.
- 98-FAO,2013.** Conservation des grains en régions chaudes.FAO,Rome,545pp
- 99-Faramarzi M.A.,Fazeli M.,Yazdi M.T.,Adrangi S.,Al-Ahmadi K.J.,Tasharrofi N., &Mohseni F.A.,2009.**Optimization of cultural conditions for production of chitinase by a soil isolate *Massilia timonae*.*Biotechnology.*,**8**(1): 93-99.
- 100-Farias A.R.N.,&Filho H.P.S.,1987.**Ocorrencia de *Cladosporium* spp. infectando a masca branca *Aleurothrixus aepium* em mandioca no Estado da Bahia.*Revista Brasileira Mandioca.*,**6**:79-80.
- 101-Faruki S.I.,Das D.R.,Khan A.R.,&Khatun M.,2007.**Effects of ultraviolet (254nm) irradiation on egg hatching and adult emergence of the flour beetles,*Tribolium castaneum*,*T.confusum* and the almond moth,*Cadra cautella*. *Journal of Insect Science* .,**7**:1-6.
- 102-Fenice M.,Selbmann L.,Zucconi L.,&Onofri S.,1997.**Production of extracellular enzymes by Antarctic fungal strains. *Polar Biology.*,**17**:275-280.

- 103-Fields P.G.,&Muir W.E.,1996.**Physical Control.In: Subramanyam B.,Hagstrum D.W.(Eds). Integrated Management of Insects in Stored Products.Marcel Dekker Inc,New York, pp:195-221.
- 104-Fisher P.J.,&PetriniO.,1987.**Location of fungal endophytes in tissues of *Suaeda fruticola*: a preliminary study. *Mycological Research.*,**89**: 246-249.
- 105-Flinn P.W.,Hagstrum D.W.,&Muir W.E.,1998.**Effects of time of aeration,bin size and latitude on insect populations in stored wheat: A simulation study.*Journal of Economic Entomology.*,**90**: 646-651.
- 106-Flinn P.W.,&Hagstrum D.W.,2002.**Temperaturemediated functional response of *Theocolax elegans*(Hymenoptera:Pteromalidae)parasitizing *Rhyzopertha dominica*(Coleoptera: Bostrichidae) in stored wheat. *Journal of Stored Products Research.*,**38**:185-190.
- 107-Flinn P.W.,Kramer K.J.,Throne J.E.,&Morgan T.D.,2005.**Protection of stored maize from insect pests using a two-component biological control method consisting of a hymenopteran parasitoid,*Theocolax elegans*,and transgenic avidin maize powder. *Journal of Stored Products Research .*,**42**:218-225.
- 108-Freeman P.,1980.**Common Insect pests of stored food products.A guide to their identification.British Museum (Natural History). London,69p.
- 109-Ganassi S.,Moretti A., Stornelli C., Fratello B., Bonvicini Pagliai A.M., Logrieco A.,& Sabatini M.A.,2000.**Effect of *Fusarium*, *Paecilomyces* and *Trichoderma* formulations against aphid *Schizaphis graminum*. *Mycopathologia .*,**151**: 131-138.
- 110-Gao F.,Dai C.,&Liu X.,2010.**Mechanisms of fungal endophytes in plant protection against pathogens. *African Journal of Microbiology Research.*,**4**:1346-1351.
- 111-Gao F.,Yong Y.,&Dai C.,2011.**Effects of endophytic fungal elicitor on two kinds of terpenoids production and physiological indexes in *Euphorbia pekinensis* suspension cells.*Journal of Medicinal Plants Research.*,**5**:4418-4425.
- 112-Gelosi A.,&Arcozzi L.,1983.**Maize weevil (*Sitophilus zeamais* Motschulsky).*Informatore Fitopatologico.*,**33**(12):27-30.
- 113-Germi K.G., Namian P., Talebi T.,&Shabani F.,2013.**Screening of Biological Activities (Antioxidant, Antibacterial and Antitumor)of *Nerium oleander* Leaf and Flower Extracts. *American Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics.*,**4**: 378-384.
- 114-Gertrud H.T.B.,&Roberts D.W.,1983.**Entomogenous *Fusarium* species.*Mycopathologia .*,**84** :3-16.

- 115-Ghanem K.M.,Al-Garni S.M.,&Al-Makishah N.H.,2010.**Statistical optimization of cultural conditions for chitinase production from fish scales waste by *Aspergillus terreus*.*African Journal of Biotechnology.*,**9**(32): 5135-5146.
- 116-Ghanem K.M.,Al-Fassi F.A.,&Farsi R.M.,2011.**Statistical optimization of cultural conditions for chitinase production from shrimp shellfish waste by *Alternaria alternata*.*African Journal of Microbiology Research.*,**5**(13) : 1649-1659.
- 117-Gilliam M.,Spangler H.G.,Prest D.B.,&Lorenz B.J.,1990.**Mycosis of a queen harvest ant,*Pogonomyrmex rugosus*.*Journal of Invertebrate Pathology.*,**55**: 437-438.
- 118-Goktas O.,Mammadov R.,Duru M.E.,Ozen E.,&Colak A.M.,2007.**Application of extracts from the poisonous plant,*Nerium oleander L.*,as a wood preservative.*African Journal of Biotechnology.*,**6**:2000-2003.
- 119-Golob P.,&Wibley D.J.,1980.**The Use of Plants and Minerals as Protectants of Stored ProductTropical Product Institute G138.Post-Harvest Pest and Quality Section Natural ResourceInstitute.Cathan,32p.
- 120-González J.O.W.,Gutiérrez M.M.,Ferrero A.A.,&Band B.F.,2014.**Essential oils nanoformulations for stored-product pest control -Characterization and biological properties. *Chemosphere* .,**100**:130-138.
- 121-Govinda Rajulu M.B., Thirunavukkarasu N., Suryanarayanan T.S.,Ravishankar J.P.,El Gueddari N.E.,&Moerschbacher B.M.,2011.**Chitinolytic enzymes from endophytic fungi. *Fungal Diversity.*,**47**:43-53.
- 122-Griffin M.R.,2014.**Biocontrol and Bioremediation:Two Areas of Endophytic Research Which Hold Great Promise. *Advances in Endophytic Research.*,**14**:257-277.
- 123-Grosch R.,Scherwinski K.,Lottmann J.,&Berg G.,2006.**Fungal antagonists of the plant pathogen *Rhizoctonia solani*:selection,control efficacy and influence on the indigenous microbial community. *Mycological Research.*,**110**:1464-1474.
- 124-Grove J.F.,&Pople M.,1979.**Metabolic products of *Fusarium larvarum* Fuckel.The fusaretins and absolute configuration of monocerin.*Journal of the Chemical Society,Perkin Transactions.*,**1**: 2048-2051.
- 125-Grove J.F.,&Pople M.,1980.**The insecticidal activity of beauvericin and the enniatin complex. *Mycopathologia.*,**70** :103-105.
- 126-Grove J.F.,&Pople M.,1981.**The insecticidal activity of some fungal dihydroisocoumarins. *Mycopathologia.*,**76**: 65-67.
- 127-Guiraud J.,1998.**Microbiologie alimentaire. Dunod.Paris,651p.

- 128-Guo B.,Dai J.R.,Ng S.,Huang Y.,Leong C.,Ong W.,&Carte B.K.,2000.**Cytotoxic acids A and B: novel tridepside inhibitors of HCMV protease from the endophytic fungus *Cytospora species*.*Journal of Natural Products*.,**63**:602-604.
- 129-Gupta R.,Beg Q.K.,&Lorenz P.,2002.**Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*.,**59**:15-32.
- 130-Gwinn K.D.,&Bernard E.C.,1993.**Interactions of endophyteinfected grasses with the nematodes *Meloidogyne marylandi* and *Pratylenchus scribneri*.Proceedings of 2nd international symposium *Acremonium* grass interact,pp:156-160.
- 131-Hadizadeh I.,Peivastegan B.,&Kolahi M.,2009.**Antifungal Activity of Nettle *Urtica dioica* L.,Colocynth *Citrullus colocynthis* L.Schrad,*Oleander Nerium oleander* L.and Konar *Ziziphus spina-christi* L.Extracts on Plants Pathogenic Fungi.,*Pakistan Journal of Biological Sciences*.,**12**:58-63.
- 132-Hagstrum D.W.,Phillips T.W.,&Cuperus G.,2012.**Stored Product Protection.K-State Research and Extension.Kansas,358pp.
- 133-Hahn D.,Fiehn O.,McManus M.A.,&Scott D.B.,2007.**Metabolic profiling of endophyte-infected and endophyte-free ryegrass grown under sufficient water supply and drought. Proceedings of the 6<sup>th</sup> International Symposium on Fungal Endophytes of Grasses, pp: 189.
- 134-Hallman.G.J.,2013.**Control of stored product pests by ionizing radiation.*Journal of Stored Products Research*.,**52**:36-41.
- 135-Halimi A.,1997.**Les plantes medicinales en algerie,Ministère algerienne de l'agriculture et de la pêche maritime.Alger,pp:127.
- 136-Hanada R.E.,Pomella A.W.V.,Costa H.S.,Bezerra J.L.,Loguercio L.L.,&Pereira J.O.,2010.** Endophytic fungal diversity in *Theobroma cacao* (cacao) and *T. grandiflorum* (cupuaçu) trees and their potential for growth promotion and bio-control of black-pod disease.*Fungal Biology*.,**114**:901-910.
- 137-Hansen L.S.,Hansen P.,&Jensen K.M.V.,2012.** Lethal doses of ozone for control of all stages of internal and external feeders in stored products.*Pest Management Science*.,**68**(9): 1311-1316.
- 138-Hirose D.,Matsuoka S.,&Osono T.,2013.**Assessment of the fungal diversity and succession of ligninolytic endophytes in *Camellia japonica* leaves using clone library analysis.*Mycologia* .,105:837-843.

- 139-Hodges R.J.,1986.**The biology and control of *Prostephanus truncatus* (Horn) (Coleoptera:*Bostrichidae*) A destructive storage pest with an increasing range.*Journal of Stored Products Research.*,**22**(1):1-14.
- 140-Hoppe T.,1986.**Storage insects of basic food grains in Honduras.*Tropical Science.*,**26**(1):25-38.
- 141-Howe R.W.,1952.**The biology of the rice weevil,*Calandra oryzae* (L.).*Annals of Applied Biology.*,**39**(1):68-180.
- 142-Hsu S.C.,&Lockwood J.L.,1975.**Powdered Chitin Agar as a Selective Medium for Enumeration of Actinomycetes in Water and Soil. *Applied microbiology.*,**29** (3):422-426.
- 143-Huang F.,&Subramanyam B.,2004.**Responses of *Corcyra cephalonica* (Stainton) to pirimiphosmethyl,spinosad and combinations of pirimiphosmethyl and synergized pyrethrins. *Pest Management Science.*,**60**(2): 191-198.
- 144-Huang W.Y.,Cai Y.Z .,Kevin D., Hyde H.C.,&Sun M.,2007.**Endophytic fungi from *Nerium oleander* L (Apocynaceae):main constituents and antioxidant activity.*World Journal of Microbiol Biotechnology.*,**23**:1253-1263.
- 145-Huang W.Y.,Cai Y.Z.,Hyde K.D.,Corke H.,&Sun M.,2008.**Biodiversity of endophytic fungi associated with 29 traditional Chinese medicinal plants. *Fungal diversity* .,**33**: 61-75.
- 146-Hussain M.A.,&Gorsi.M.S.,2004.**Antimicrobial activity of *Nerium oleander* Linn.*Asian Journal of Plant Sciences.*,**3** :177-180.
- 147-Islam M.S.,Hasan M.M.,Lei C.,Mucha pelzer T.,Mewis I.,&Ulrichs C.,2010.**Direct and admixture toxicity of diatomaceous earth and monoterpenoids against the storage pests *Collosobruchus maculatus* (F.) and *Sitophilus oryzae* (L.).*Journal of Pest Science.*,**83**:105-112.
- 148-Jayas D.S.,Khangura B.,&White N.D.G.,1991.**Controlled atmosphere storage of grains. *Postharvest News and Information* .,**2**:423-427.
- 149-Jayasekara T.K.,Stevenson P.C.,Hall D.R.,&Belmain S.R.,2005.**Effect of volatile constituents from *Securidaca longepedunculata* on insect pests of stored grain.*Journal of Chemical Ecology.*,**31**(2): 303-313.
- 150-Jeyarani S.,Banu J.G.,&Ramaraju K.,2011.**First record of natural occurrence of *Cladosporium cladosporioides*(Fresenius) de Vries and *Beauveria bassiana* (Bals.Criv.) Vuill. on two spotted spider mite *Tetranychus urticae* Koch from India.*Journal of Entomology.*,**8**:274-279.

- 151-Jia F.,Toews M.D.,Campbell J.F.,&Ramaswamy S.B.,2008.**Survival and reproduction of lesser grain borer, *Rhyzopertha dominica* (F.) (Coleoptera: Bostrichidae) on flora associated with native habitats in Kansas. *Journal of Stored Products Research.*,**44**: 366-372.
- 152-Jian Xu L.,Liu Y.S.,Zhou L.G.,&Wu J.Y.,2009.**Enhanced beauvericin production with in situ adsorption in mycelial liquid culture of *Fusarium redolens* Dzf2.*Process Biochemistry.*,**44**:1063-1067.
- 153-Jian Xu L.,Liu Y.S.,Zhou L.G.,&Wu J.Y.,2011.,**Modeling of *Fusarium redolens* Dzf2 mycelial growth kinetics and optimal fed-batch fermentation for beauvericin production.*Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology.*,**38**:1187-1192.
- 154-Johnson R.D.,Akagi Y.,Fleetwood D.J.,Gardiner D.M., Kodama M.,Young C.,&Voisey C.R.,2013.**Fungal Toxins of Agricultural Importance.In : Kempken F.(Ed).Agricultural Applications. Springer ,Berlin,pp :75-99.
- 155-Johri B.N.,Jain S.Y.,&Chouhan S.,1985.**Enzymes from thermophilic fungi: Proteases and lipases.*Proceedings of Indian Academy Science.*,**94**(2-3):175-196.
- 156-Joost R.E.,1995.***Acromonium* in fescue and ryegrass:boon or bane?A review.*Journal of Animal Science .*,**73**:881-888.
- 157-Josphat C.M.,Birger D.,Schueffler A.,&Laatsch H.,2011.**Larvicidal activity of metabolites from the endophytic *Podospora sp.* against the malaria vector *Anopheles gambiae*.*Parasitology Research.*,**108**:561-566.
- 158-Kang S.C.,Park S.,&Lee D.G.,1999.**Purification and Characterization of a Novel Chitinase from the Entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*.*Journal of Invertebrate Pathology.*,**73**:276-281.
- 159-Karavaeva N.N.,Zakirov M.N.,&Mukhiddinova N.G.,1975.**Partial purification and some properties of protease from *Torula thermophila*.*Biochimija.*,**40**:909-914.
- 160-Kaul S.,Gupta S.,Ahmed M.,&Dhar M.K.,2012.**Endophytic fungi from medicinal plants: a treasure hunt for bioactive metabolites. *Phytochemistry Reviews.*,**11**:487-505.
- 161-Kaur G.,&Padmaja V.,2008.**Relationships among activities of extracellular enzyme production and virulence against *Helicoverpa armigera* in *Beauveria bassiana*.*Journal of Basic Microbiology.*,**48**: 1-10.
- 162-Kaur H.P.,Singh B.,Kaur A.,&Kaur S.,2013.**Antifeedent and toxic activity of endophytic *Alternaria alternata* against tobacco caterpillar *Spodoptera litura*.*Journal of Pest Science .*,**86**:543-550.

- 163-Kawalekar J.S.,Varsha P.,&Vijayalakshmi N.,2012.**Preliminary Phytochemical Investigations on Roots of *Nerium Oleander*, Linn *.International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research.*,**4**:134 -138.
- 164-Kern M.,Maraschin S.,Vom Endt D., Schrank A.,Vainstein M.,&Pasquali G.,2009.** Expression of a chitinase gene from *Metarhizium anisopliae* in tobacco plants confers resistance against *Rhizoctonia solani*.*Applied Biochemistry and Biotechnology.*,**160**:1933-1946.
- 165-Khan A.L.,Hamayun M.,Ahmad N.,Hussain J.,Kang S.M.,Kim Y.M.,Adnan M.,Tang D.S., Waqas M.,Radhakrishnan R.,Hwang Y.H.,&Lee I.J.,2011a.**Salinity stress resistance offered by endophytic fungal interaction between *Penicillium minioluteum* LHL09 and *Glycine max* L.*Journal of Microbiology and Biotechnology.*,**21**:893-902.
- 166-Khan A.L.,Hamayun M.,Ahmad N.,Waqas M.,Kang SM.,Kim YH.,&Lee I.J.,2011b.** *Exophiala* sp.LHL08 reprograms *Cucumis sativus* to higher growth under abiotic stresses. *Physiologia Plantarum.*,**143**:329-343.
- 167-Khan A.L.,Hamayun M.,Kang SM.,Kim Y.H.,Jung H.Y.,Lee J.H.,&Lee I.J.,2012a.** Endophytic fungal association via gibberellins and indole acetic acid can improve plant growth under abiotic stress: an example of *Paecilomyces formosus* LHL10.*BMC Microbiol* .,**12**:3.
- 168-Khan A.L.,Hamayun M.,Radhakrishnan R.,Waqas M.,Kang S.M.,Kim Y.H.,Shin J.H., Choo Y.S.,Kim J.G.,&Lee I.J.,2012b.**Mutualistic association of *Paecilomyces formosus* LHL10 offers thermotolerance to *Cucumis sativus* . *Antonie von Leeuwenhoek.*,**101**:267-279.
- 169-Kharwar R.N.,Verma V.C.,Kumar A.,Gond S.K.,Harper J.K.,Hess W.M.,Lobkovosky E.,Ma C.,Ren Y.,&Strobel G.A.,2008.**Javanicin,an antibacterial naphthaquinone from an endophytic fungus of neem, *Chloridium* sp.*Current Microbiology.*,**58**:233-238.
- 170-Khastini R.O.,Ohta H.,&Narisawa K.,2012.**The role of dark septate endophytic fungus, *Veronaeopsis simplex* Y34 in *Fusarium* disease suppression in Chinese cabbage.*Journal of Microbiology.*,**50**:618-624.
- 171-Kimmons C.A.,Gwinn K.D.,&Bernard E.C.,1990.**Nematode reproduction on endophyte-infected and endophyte free tall fescue. *Plant Disease* .,**74**:757-761.
- 172-Kirkpatrick R.L.,&Wilbur D.A.,1965.**The development and habits of the granary weevil, *Sitophilus granarius* within the kernel of wheat.*Journal of Economic Entomology.*,**58**(5): 979-985.

- 173-Kitamura E.,&Kamei Y.,2003.**Molecular cloning, sequencing and expression of the gene encoding a novel chitinase A from marine bacterium, *Pseudomonas sp.* PE2, and its domain structure. *Applied Microbiology and Biotechnology.*,**61**:140-149.
- 174-Kjer J., Debbab A., Aly A.H.,&Proksch P.,2010.**Methods for isolation of marine-derived endophytic fungi and their bioactive secondary products.*Nature Protocols.*,**5**(3):479-490.
- 175-Kljajic P.,&Peric I.,2006.**Susceptibility to contact insecticides of granary weevil *Sitophilus granarius* (L.) (Coleoptera: Curculionidae) originating from different locations in the former yugoslavia. *Journal of Stored Products Research.*,**42**:149-161.
- 176-Kloepper J.W.,&Beauchamp C.J.,1992.**A review of issues related to measuring colonization of plant roots by bacteria.*Canadian Journal of Microbiology.*,**38**:1219-1232.
- 177-Kloepper J.W.,&Ryu C.M.,2006.**Bacterial endophytes as elicitors of induced systemic resistance.In:Schulz B.,Boyle C.,Sieber T.N.(eds).Microbial root endophytes.Springer, Berlin, pp 33-52.
- 178-Knoch T.R.,Faeth S.H.,&Arnott D.L.,1993.** Endophytic fungi alter foraging and dispersal by desert seed-harvesting ants.*Oecologia.*,**95**:470-475.
- 179-Kostyukovsky M.,Chen B.,Atsmi S.,&Shaaya E.,2000.**ecdysteroids against three stored product insects *Insect.Biochemistry and Molecular Biology.*,**30**(8-9): 891-897.
- 180-Kuldau G.,&Bacon C.,2008.**Clavicipitaceous endophytes: their ability to enhance resistance of grasses to multiple stresses. *Biological Control.*,**46**:57-71.
- 181-Kunkel B.A.,Grewal P.S.,&Quigley M.F.,2004.**A mechanism of acquired resistance against an entomopathogenic nematode by *Agrotis ipsilon* feeding on perennial ryegrass harboring a fungal endophyte.*Biological Control.*,**29**:100-108.
- 182-Lacava P.T.,&Azevedo J.L.,2014.**Biological Control of Insect-Pest and Diseases by Endophytes. *Advances in Endophytic Research.*,**13** :231-248.
- 183-Lacey L.A.,Frutos R.,Kaya H.K.,&Vail P.,2001.**Insect pathogens as biological control agents: Do they have a future? *Biological Control.*,**21**: 230-248.
- 184-Lagowka B.,1995.**The biological control perspective of scale insects (Homoptera: Coccinea) on ornamental plants in glasshouses.*Wiadomosci Entomologiczne.*,**14**:5-10.
- 185-Laib D.E.,2014.**Etude de l'activité insecticide du champignon endophyte *Cladosporium sp.* isolé du Laurier rose *Nerium oleander* L.(Apocynaceae,Gentianales) sur la bruche des haricots *Acanthoscelides obtectus* Say (Coleoptera,Bruchidae).*Nature & Technologie.*,**10**:39-44.

- 186-Latgé J.P.,1974.**Activités protéolytique et chitinolytique de *Cordyceps militaris*. *Entomophaga.*,**19**(1):41-53.
- 187-Lavigne R.J.,1991.**Stored grain insects in underground storage pits in Somalia and their control. *Insect Science and its Application.*,**12**(5-6):571-578.
- 188-Lee K.,Pan J.J.,&May G.,2009.**Endophytic *Fusarium verticillioides* reduces disease severity caused by *Ustilago maydis* on maize.*FEMS Microbiol Letters.*,**299**:31-37.
- 189-Letellier C.,Haubruge E.,&Gaspar C.,1994.**Importance of insect pests of stored cereals in Belgium. *Parasitica.*,**50**(1-2):81-88.
- 190-Lew R.,2011.**How does a hypha grow? The biophysics of pressurized growth in fungi. *Nature Reviews Microbiology.*,**9**: 509-518.
- 191-Lewis G.C.,&Vaughan B.,1997.**Evaluation of a fungal endophyte(*Neotyphodium lolii*) for control of leather jackets(*Tipula* spp.)in perennial ryegrass.*Annals Applied Biology Supplement.*,**130**:34-35.
- 192-Lewis G.C.,2004.**Effects of biotic and abiotic stress on the growth of three genotypes of *Lolium perenne* with and without infection by the fungal endophyte *Neotyphodium lolii*. *Annals of Applied Biology.*,**144**:53-63.
- 193-Li T.,Liu M.J.,Zhang X.T.,Zhang H.B.,Sha T.,&Zhao Z.W.,2011.**Improved tolerance of maize ( *Zea mays* L.) to heavy metals by colonization of a dark septate endophyte *Exophiala pisciphila* . *Science of Total Environment* .,**409**:1069-1074.
- 194-Li X.,Bu N.,Li Y.,Ma L.,Xin S.,&Zhang L.,2012.**Growth, photosynthesis and antioxidant responses of endophyte infected and non-infected rice under lead stress conditions.*Journal of Hazardous Materials.*,**213-214**:55-61.
- 195-Liarzi O.,&Ezra D.,2014.**Endophyte-Mediated Biocontrol of Herbaceous and Non-herbaceous Plants .*Advances in Endophytic Research.*,**18**:335-356.
- 196-Liu J.Y.,Song Y.C.,Zhang Z.,Wang L.,Guo Z.J.,Zou W.X.,&Tan R.X.,2004.***Aspergillus fumigatus* CY018, an endophytic fungus in *Cynodon dactylon* as a versatile producer of new and bioactive metabolites. *Journal of Biotechnology.*,**114**:279-287.
- 197-Lokesh R.,Leonard Barnabas E.,Madhuri P.,Saurav K.,&Sundar K.,2010.**Larvicidal Activity of *Trigonella foenum* and *Nerium oleander* Leaves Against Mosquito Larvae Found in Vellore City , India.*Current Research Journal of Biological Sciences.*,**3**:154-160.
- 198-Longstaff B.C.,1981.**Biology of the grain pest species of the genus *Sitophilus* (Coleoptera: Curculionidae): A critical review. *Protection Ecology.*,**2**: 83-130.

- 199-Longstaff B.C.,&Evans D.E.,1983.**The demography of the rice weevil *Sitophilus of oryzae* (L.)(Coleoptera: Curculionidae), submodels of age-specific survivorship and fecundity. *Bulletin of Entomological Research.*,**73**: 333-344.
- 120-Lopez-Illorca L.V.,Carbonell T.,&Vidal S.G.,2002.**Degradation of insect cuticle by *Paecilomyces farinosus* proteases. *Mycological Progress.*,**1**(3): 249-256.
- 121-Loshiavo S.R.,1976.**Effect of the synthetic regulators methoprene and hydroprene on survival, development or reproduction of six species of stored-product insects.*Journal of Economic Entomology.*,**60**: 395-99.
- 122-Lynch R.E.,&Lewis L.C.,1978.**Fungi associated with eggs and first instar larvae of the European corn borer. *Journal of Invertebrate Pathology.*,**32**: 6-11.
- 123-Lyon W.F.,2011.**Granary and Rice Weevils. Ohio State University Extension Fact Sheet, HYG-2088-97. <http://ohioline.osu.edu/hyg-fact/2000/2088.html>.
- 124-Maceljski M.,&Korunic Z.,1973.**Contribution to the morphology and ecology of *Sitophilus zeamais* Motsch. in Yugoslavia. *Journal of Stored Products Research.*,**9**: 225-234.
- 125-Machowicz-Stefaniak Z.,&Miczulski B.,1985.**Tests to determine the pathogenicity of the fungus *Alternaria alternata* Keissler to larvae of the blue cereal leaf beetle *Oulema gallaeciana* Heyden (Coleoptera: Chrysomelidae). *Roczniki Nauk Rolniczych .*,**15**: 151-157.
- 126-Madaci B.,Merghem R.,Doumandji B.,&Soltani N.,2008.**Effet du *Nerium oleander*, laurier-rose, (Apocynacées) sur le taux des protéines, l'activité de l'ACHE et les mouvements des vers blancs *Rhizotrogini*, (Coleoptera Scarabaeidae). *Sciences & Technologie C.*,**27**:73-78.
- 127-Majumdar A.,Boetel M.A.,&Jaronski S.T.,2008.**Discovery of *Fusarium solani* as a naturally occurring pathogen of sugar beet root maggot(Diptera: Ulidiidae) pupae: Prevalence and baseline susceptibility. *Journal of Invertebrate Pathology.*,**97**:1-8.
- 128-Malinowski D.,Leuchtman A.,Schmidt D.,&Nösberger J.,1997.**Symbiosis with *Neotyphodium uncinatum* endophyte may increase the competitive ability of meadow fescue. *Agronomy Journal.*,**89**:833-839.
- 129-Malinowski D.P.,Belesky D.P.,Hill N.S.,Baligar V.C.,&Fedders J.M.,1998.**Influence of phosphorus on the growth and ergot alkaloid content of *Neotyphodium coenophialum*-infected tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb). *Plant and Soil.*,**198**:53-61.
- 130-Malinowski D.P.,Belesky D.P.,&Fedder J.M.,1999a.**Endophyte infection may affect the competitive ability of tall fescue grown with red clover.*Journal of Agronomy and Crop Science.*,**183**:91-102.

- 131-Malinowski D.P.,Brauer D.K.,&Belesky D.P.,1999b.***Neotyphodium coenophialum*-endophyte affects root morphology of tall fescue grown under phosphorous deficiency.*Journal of Agronomy and Crop Science.*,**183**:53-60.
- 132-Malinowski D.P.,&Belesky D.P.,2000.**Adaptations of endophyte-infected cool-season grasses to environmental stresses: mechanism of drought and mineral stress tolerance.*Crop Science* ,**40**:923-940.
- 133-Malinowski D.P.,Belesky D.P.,&Lewis G.C.,2005.**Abiotic stresses in endophytic grasses.In :Roberts C.A.,West C.P.,Spiers D.E.(eds).*Neotyphodium in Cool-Season Grasses*.Blackwell Publishing, Iowa, pp:187-199.
- 134-Martinuz A.,Schouten A.,Menjivar R.D.,&Sikora R.A.,2012.**Effectiveness of systemic resistance toward *Aphis gossypii*(Hom., *Aphididae*) as induced by combined applications of the endophytes *Fusarium oxysporum* Fo162 and *Rhizobium etli* G12.*Biological Control* ,**62**:206-212.
- 135-Marzke F.O.,Press J.A.F.,&Pearman G.C.,1970.**Mortality of the rice weevil, the Indian meal moth, and *Trogoderma glabrum* exposed to mixtures of atmospheric gases at various temperatures. *Journal of Economic Entomology* ,**63**:570-574.
- 136-Mason L.J.,2003a.***Rhyzopertha dominica* (Fab.). *Purdue extension.*,**238**: 1-2.
- 137-Mason L.J.,2003b.**Rice,Granary,and Maize Weevils *Sitophilus oryzae* (L.), *S. granarius* (L.), and *S. zeamais* (Motsch).*Purdue extension.*,**237**:1-2.
- 138-Matsumoto K.S.,2006.**Fungal Chitinases.In:Gerardo R.,Guevara-Gonzales I.,Pacheco T.(Eds).Advances in Agricultural and Food Biotechnology.Research Signpost,Kerala,pp: 289-304.
- 139-Mazet I., Hung S.Y.,&Boucias D.G.,1994.**Detection of toxic metabolites in the haemolymph of *Beauveria bassiana* infected *Spodoptera exigua* larvae. *Experientia.*,**50**:142-147.
- 140-McClurkin J.D.,&Maier D.E.,2010.**Ozone treatment effects on microbial count on maize.10th International Working Conference on Stored Product Protection,pp:548-552.
- 141-Meletiadis J.,Meis J.F.G.M.,Mouton J.W.,&Verweij P.E.,2001.**Analysis of Growth Characteristics of Filamentous Fungi in Different Nutrient Media.*Journal of clinical microbiology.*,**39**(2) :478-484.
- 142-Mendoza A.R.,&Sikora R.A.,2009.**Biological control of *Radopholus similis* in banana by combined application of the mutualistic endophyte *Fusarium oxysporum* strain 162, the egg pathogen *Paecilomyces lilacinus* strain 251 and the antagonistic bacteria *Bacillus firmus*. *Biocontrol.*,**54**:263-272.

- 143-Miczulski B.,&Machowicz-Stefaniak Z.,1977.**Fungi associated with the cereal leaf beetle *Oulema gallaeciana* (Coleoptera: Chrysomelidae).*Journal of Invertebrate Pathology.*,**29**: 386-387.
- 144-Mollier P.,Lagnel J.,Quiot J.M.,Aioun A.,&Riba G.,1994.**Cytotoxic Activity in Culture Filtrates from the Entomopathogenic Fungus *Beauveria sulfurescens*.*Journal of invertebrate Pathology.*,**64**:208-213 .
- 145-Morimoto M.,&Komai K.,2006.**Insect antifeedant activity of natural products and the structure-activity relationship of their derivatives.In:Morimoto M.,Komai K.(Eds).Natural products for pest management. ACS Symposium Series,Washington DC,pp : 182-193.
- 146-Morsy M.R.,Oswald J.,He J.,Tang Y.,&Roossinck M.J.,2010.**Teasing apart a three-way symbiosis: transcriptome analyses of *Curvularia protuberata* in response to viral infection and heat stress. *Biocheical and Biophysical Research Communications.*,**401**:225-230.
- 147-Moscoso L.,&Rosato Y.B.,1987.**Extracellular enzyme production by haploids,heterocaryons and diploids of *Aspergillus nidulans*.*Applied Microbiology and Biotechnology.*,**26**:365-368.
- 148-Mostert L.,Crous P.W.,&Petrini O.,2000.**Endophytic fungi associated with shoots and leaves of *Vitis vinifera*,with specific reference to the *Phomopsis viticola* complex.*Sydowia.*,**52**:46-58.
- 149-Mould H.A.,1973.**Grain storage in Ghana.Grain storage in the humid tropics, pp:44.
- 150-Mpuchane S.,Gashe B.A.,Allotey J.,Siame B.,Teferra G.,&Ditlhogo M.,2000.**Quality deterioration of phane, the edible caterpillar of an emperor moth *Imbrasia belina*.*Food Control.*,**11**(6):453-458.
- 151-Müller C.,Spohr A.,&Nielsen J.,2000.**Role of substrate concentration in mitosis and hyphal extension of *Aspergillus*.*Biotechnology and Bioengineering.*,**67**:390-397.
- 152-Munn R.,Cramer G.R.,&Ball M.C.,1999.**Interactions between rising CO<sub>2</sub>,soil salinity and plant growth.In:Luo Y.,Mooney H.A.(eds).Carbon dioxide and environmental stress. Academic, London, pp:139-167.
- 153-Mustafa U.,&Kaur G.,2009.**Extracellular Enzyme Production in *Metarhizium anisopliae* Isolates.*Folia Microbiologica.*,**54** :499-504.
- 154-Nansen C.,Meikle W.G.,Tigar B.,Harding S.,&Tchabi A.,2004.**Non agricultural hosts of *Prostephanus truncatus*(Coleoptera:Bostrichidae) in a west African forest.*Annals of the Entomological Society of America.*,**97**(3): 481-491.

- 155-Narisawa K.,Usuki F.,&Hashiba T.,2004.**Control of *Verticillium* yellows in Chinese cabbage by the dark septate endophyte fungus LTVB3. *Phytopathology.*,**94**:412-418.
- 156-Neeson R.,&Banks H.J.,2004.**On-farm storage of organic grain. *Agdex.*,**102**(28) :1-6.
- 157-Nguyen V.N.,Oh I.J.,Kim Y.J.,Kim K.Y.,Kim Y.C.,&Park R.D.,2009.**Purification and characterization of chitinases from *Paecilomyces variotii* DG-3 parasitizing on *Meloidogyne incognita* eggs.*Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology.*,**36**:195-203.
- 158-Niewiada A.,Nawrot J.,Szafranek J.,Szafranek B.,Synak E.,&Jelen H.H.,2005.**Some factors affecting egg-laying of the granary weevil (*Sitophilus granarius* L.).*Journal of Stored Products Research.*,**41**(5): 544-555.
- 159-Nur A.,Daha L.,&Agus N.,2014.**The Study on the Role of Entomopathogenic Fungal Endophytes in Controlling the Cocoa Pod Borer *Conopomorpha cramerella* (Snellen)(Lepidoptera: Gracillariidae) on Cocoa Plant. *Journal of Entomology.*,**11**(3):142-152.
- 160-Orecchio S.,&Amorello D.,2009.**Platinum and rhodium associated with the leaves of *Nerium oleander* L.; analytical method using voltammetry; assessment of air quality in the Palermo (Italy) area. *Journal of Hazardous Materials.*,**174**:720-727.
- 161-Ozino M.,1982.**Preliminary researches on hyphomycetes isolated from *Zyginidia pullula*. *Allionia Turin.*,**25**: 101-104 .
- 162-Ozino M.,&Menardo R.,1984.**Micromycetes isolated from *Corythuca ciliata*.*Bollettino del laboratorio di Entomologia Agraria Filippo Silvestri .*,**41**: 183-187.
- 163-Pacavira R.,Mata O.,Manuel A.,Pereira A.P.,&Mexia A.,2006.** Detection of stored products pests by pheromone traps in seven warehouses in Luanda/Angola.Proceedings of the 9th International Working Conference on Stored-Product Protection,pp:1157-1165.
- 164-Pal K.K.,&Gardener B.M.,2006.**Biological control of plant pathogens the plant health instructor. *APS Net.*,**2**: 1117.
- 165-PanW.Y.,Chen S.L.,Lian J.H.,Qin H.Z.,&Lan G.,1989.**A preliminary report on control of *Hemiberlesia pitysophila* using *Cladosporium cladosporioides*.*Forest Pests and Disease.*,**3**: 22-23
- 166-Pankhurst C.E.,Craig A.G.,&Jones W.T.,1979.**Effectiveness of root nodules rhizobia.*Journal of Experimental Botany.*,**30**:1085-1093.
- 167-Pankhurst R.,2009.***Nerium oleander* Linn.*Flora Europaea*.Royal Botanic Garden Edinburgh.,**1209**: 1753.
- 168-Paris R.R.,&Moyse H.,1971.**Précis de matière médicale,pharmacognosie spéciale dicotylédones .tome III. Masson .Paris ,pp :32-52.

- 169-Patidar P.,Agrawal D.,Banerjee T.,&Patil S.,2005.**Optimisation of process parameters for chitinase production by soil isolates of *Penicillium chrysogenum* under solid substrate fermentation.*Process Biochemistry.*, **40**: 2962-2967.
- 170-Pavela R.,2007.**Possibilities of botanical insecticide exploitation in plant protection.*Pest Technology.*,**1** :47-52.
- 171-Pearn J.,1987.**Oleander poisoning.In:Covacevich J., Davie P.,Pearn J.(eds).Toxic plants & animals;a guide for Australia. Brisbane, Queensland Museum, pp:37-49.
- 172-Pedraza R.M.,&Lopez R.E.,1991.**Chitinase activity in germinating cells of *Mucor rouxii*. *Antonie van Leeuwenhoek.*,**59**:183-189.
- 173-Perea A.E.I.,Rojas M.E.,&Pineda V.Y.A.,2003.**Evaluation of different media for isolation of *Trialeurodes vaporariorum*(Homoptera:Aleyrodidae) molds.*Revista Colombiana de Entomología.*,**29**:13-19.
- 174-Pérez L.D.S.,Florido J.E.B.,Navarro S.R.,Mayagoitia J.F.C., &López M.A.R.,2014.**Enzymes of Entomopathogenic Fungi,Advances and Insights. *Advances in Enzyme Research.*,**2**:65-76.
- 175-Perry L.M.,&Metzger J.,1978.**Medicinal Plants of East and Southeast Asia.The MIT Press, Cambridge,MA, pp:27.
- 176-Petrini O.,Sieber T.N.,Toti L.,&Viret O.,1992.**Ecology, metabolite production and substrate utilization in endophytic fungi. *Natural Toxins.*,**1**:185-196.
- 177-Petroski R.J.,Dornbos D.L.,&Powell R.G.,1990.**Germination and growth inhibition of annual ryegrass ( *Lolium multiflorum* L.) and alfalfa (*Medicago sativa* ) by loline alkaloids and synthetic N-acetyl loline derivatives. *Journal of Agriculture and Food Chemistry.*,**38**:1716-1718.
- 178-Piasecka-Kwiatkowska D.,Nawrot J.,Zielinska-Dawidziak M.,Gawlak M.,&Michalak M.,2013.**Detection of grain infestation caused by the granary weevil *Sitophilus granarius* (L.) using zymography for a-amylase activity.*Journal of Stored Products Research.*,**56**:43-48.
- 179-Pimentel M.A.G.,Faroni L.R.D.,Gudes R.N.C.,Sousa A.H., &Totola M.R.,2009.**Phosphine Resistance in Brazilian populations of *Sitophilus zeamais* Motschulsky(Coleoptera: *Curculionidae*).*Journal of Stored Products Research.*,**45**:71-74.
- 180-Plattner R.D.,&Nelson P.E.,1994.**Production of beauvericin by a strain of *Fusarium proliferatum* isolated from corn fodder for swine.*Applied Environmental Microbiology.*, **60**:3894-3896.

- 181-Podova M.,Dobias J.,&Nemec P.,1977.**Inhibitory effect of fungal metabolites on the development of *Drosophila melanogaster*.*Biologia (Bratislava)*,**32**:657-662.
- 182-Porras Alfaro A.,&Bayman P.,2011.**Hidden fungi, emergent proprieties:endophytes and microbiomes.*Annual Review of Phytopathology*,**49**:291-315.
- 183-Potter C.,1935.**The biology and distribution of *Rhizopertha dominica* (Fab.).*Transactions of the Royal Entomology Society of London*,**83**:449-482.
- 184-Promptuttha I., Lumyong S., Dhanasekaran V.,Mckenzie E.H.C.,Hyde K.D.,&Jeewon R., 2007.**A phylogenetic evaluation of whether endophytes become saprotrophs at host senescence. *Microbial Ecology*,**53**: 579-590.
- 185-Promptuttha I.,Hyde K.D.,McKenzie E.H.C.,Peberdy J.F.,&Lumyong S.,2010.**Can leaf degrading enzymes provide evidence that endophytic fungi becoming saprobes?.*Fungal Diversity*,**41**:89-99.
- 186-Prosser J.I.,1994.**Mathematical modeling of fungal growth.In:Gow N.A.R.,Gad J.M.(Eds).The growing fungus,Chapman &Hall,London,pp:319-335.
- 187-Purahong W.,&Hyde D.,2011.**Effects of fungal endophytes on grass and non-grass litter decomposition rates. *Fungal diversity*,**47**: 1-7.
- 188-Purrini K.,1976.**On the insect fauna and their diseases in several old mills in Kosova County, Yugoslavia. *Acta Phytopathologica Academiae Scientiarum Hungaricp.*,**11**(3-4):305-315.
- 189-Qin J.C,Zhang Y.M,Gao J.M.,Bai M.S.,Yang S.X, Laatsch H.,&Zhang A.L.,2009.**Bioactive metabolites produced by *Chaetomium globosum* an endophyte isolated from Ginkgo biloba. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*,**19**:1572-1574.
- 190-Quarles W., 1992.** Silica gel for pest control. *IPM Practitioner*,**14**: 1-11.
- 191-Rahman M.M.,Islam W.,&Ahmad K.N.,2009.**Functional response of the predator *Xylocoris flavipes* to three stored product insect pests.*International Journal of Agriculture and Biology*,**11**:316-320.
- 192-Raizada U.,1976.**A preliminary report on the fungi infesting thrips (Thysanoptera:*Thripidae*).*Entomon*,**1**: 155-158.
- 193-Ramesha A.,Sunitha V.H.,&Srinivas C.,2013.**Antimicrobial activity of secondary metabolites from endophytic fungi isolated from *Nerium oleander L.**International Journal of Pharma and Bio Sciences*,**4**(1):683-693.
- 194-Ramesha A.,Bojegowda M.R.M.,Kumar V.,Malleesh N.K.,&Chowdappa S.,2014.**Characterisation and bioactivity of oosporein produced by endophytic fungus *Cochliobolus kusanoi* isolated from *Nerium oleander L.* *Natural Product Research*,**1**:1-4.

- 195-Rao M.B., Tanksale A.M., Ghatge M.S., & Deshpande V.V., 1998.** Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Review.*, **62**:597-635.
- 196-Redman R.S., Sheehan K.B., Stout R.G., Rodriguez R.J., & Henson J.M., 2002.** Thermotolerance generated by plant/fungal symbiosis. *Science.*, **298**:1581.
- 197-Rees D., 2007.** Insects of stores grain. Second edition. CSIRO publishing. Collingwood, 81pp.
- 198-Reichard U., Buttner S., Eiffert H., Staib F., & Ruchel R., 1990.** Purification and characterisation of an extracellular serine proteinase from *Aspergillus fumigatus* and its detection in tissue. *Journal of Medical Microbiology.*, **33**:243-251.
- 199-Reinhold-Hurek B., & Hurek T., 2011.** Living inside plants: bacterial endophytes. *Current Opinion in Plant Biology.*, **14**:435-443.
- 200-Revetti L.M., 1972.** Irradiation of grains. I. Irradiation of maize (*Zea mays* L.). *Agronomia Tropical.*, **22**(5):497-507.
- 201-Richardson M.D., Hill N.S., & Hoveland C.S., 1990.** Rooting patterns of endophyte infected tall fescue grown under drought stress. *Agronomy Abstracts.*, **81**:129.
- 202-Riedell W.E., Kieckhefer R.E., Petroski R.J., & Powell R.G., 1991.** Naturally occurring and synthetic loline alkaloids derivatives: insect feeding behavior modification and toxicity. *Journal of Entomological Science.*, **26**:122-129.
- 203-Rocha A.C.S., Garcia D., Uetanabaro A.P.T., Carneiro R.T.O., Araujo I.S., Mattos C.R.R., & Goes-Neto A., 2011.** Foliar endophytic fungi from *Hevea brasiliensis* and their antagonism *Microcyclus ulei* *Fungal Diversity.*, **47**:75-84.
- 204-Rodrigues K.F., Sieber T.N., Grünig C.R., & Holdenrieder O., 2004.** Characterization of *Guignardia mangiferae* Isolated from Tropical Plants Based on Morphology, ISSR-PCR Amplifications and ITS1-5.8S-ITS2 Sequences., *Mycological Research.*, **108**:45-52.
- 205-Rojas T., Pons N., & Arnal E., 1998.** *Cladosporium herbarum* on whiteflies (Homoptera: Aleyrodidae), in Venezuela. *Boletín de Entomología Venezolana.* , **13**:57-65.
- 206-Romão-Dumaresq A.S., De Araújo W.L., Talbot N.J., & Thornton C.R., 2012.** RNA interference of endochitinases in the sugarcane endophyte *Trichoderma virens* 223 reduces its fitness as a bio-control agent of pineapple disease. *Plos One.*, **7**:47888.
- 207-Roni M., Murugan K., Panneerselvam C., Subramaniam J., & Hwang J.S., 2012.** Evaluation of leaf aqueous extract and synthesized silver nanoparticles using

*Nerium oleander* against *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research.*,**112**:981-990.

**208-Rowan D.D., Hunt M.B., & Gaynor D.L., 1986.** Peramine, a novel insect feeding deterrent from ryegrass infected with the endophyte *Acremonium lolii*. *Journal of Chemical Society Chemical Communications.*,**1**:935-936.

**209-Rudgers J.A., Koslow J.M., & Clay K., 2004.** Endophytic fungi alter relationships between diversity and ecosystem properties. *Ecology Letters.*,**7**: 42-51.

**210-Rudgers J.A., Miller T.E.X., Ziegler S.M., & Craven K.D., 2012.** There are many ways to be mutualist: endophytic fungus reduces plant survival but increases population growth. *Ecology.*, **93**:565-574.

**211-Ruiz-Lozano J.M., Azcon R., & Palma J.M., 1996.** Superoxide dismutase activity in arbuscular mycorrhizal *Lactuca sativa* plants subjected to drought stress. *New Phytologist.*,**13**:327-333.

**212-Rybalchenko V.M., & Gopkalo E.L., 1980.** Mycoses of blood sucking mosquito larvae in Kiev Polesy Ukrainian-USSR. *Mikrobiologicheskii Zhurnal (Kiev).*,**42**: 446-452.

**213-Saari S., Helander M., Faeth S.H., & Saikkonen K., 2010.** The effects of endophytes on seed production and seed predation of tall fescue and meadow fescue. *Microbial Ecology.*,**60**:928-934.

**214-Sabotič J., Trček T., Popovič T., & Brzin J., 2007.** Basidiomycetes harbour a hidden treasure of proteolytic diversity. *Journal of Biotechnology.*,**128**:297-307.

**215-Saikkonen K., Faeth S.H., Helander M., & Sullivan T.J., 1998.** Fungal endophytes: A continuum of interactions with host plants. *Annual Review of Ecology evolution and Systematics.*,**29**:319-343.

**216-Saikkonen K., Saari S., & Helander M., 2010.** Defensive mutualism between plants and endophytic fungi? *Fungal Diversity* .,**41**:101-113.

**217-Samways M.J., 1983.** Interrelationship between an entomogenous fungus and two anthomopteran mutualisms (Hymenoptera: *Formicidae*- Hemiptera: *Pseudococcidae* and *Aphidae*). *Bulletin of Entomological Research.*,**73**:321-331.

**218-Samways M.J., & Grech N.M., 1986.** Assessment of the fungus *Cladosporium oxysporum* (Berk. and Curt.) as a potential biocontrol agent against certain Homoptera. *Agriculture, Ecosystems & Environment.*,**15**: 231-239.

**219-Sanchez-Martinez R.I., Cortez-Rocha M.O., Ortega-Dorame F., Morales-Valdes M., & Silveyra M.I., 1997.** End-use quality of flour from *Rhizopertha dominica* infested wheat. *Cereal Chemistry.*,**74**:481-483.

- 220-Sapna Bai N.,Remadevi O.K.,Sasidharan T.O.,Balachander M.,&Dharmarajan P., 2012.**cuticle degrading enzyme production by some isolates of the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae* (metsch.). *Journal of Biosciences.*,**20**:25-32.
- 221-Saroukolai A.T.,Moharramipour S.,&Meshkatalasadat M.H.,2010.**Insecticidal properties of *Thymus Persicus* essential oil against *Tribolium castaneum* and *Sitophilus oryzae*.*Journal of Pest Science.*,**83**: 3-8.
- 222-Seidl V.,2008.**Chitinases of filamentous fungi: a large group of diverse proteins with multiple physiological functions.*Fungal Biology Reviews.*,**22**:36-42.
- 223-Serfling A.,Wirsel S.G.,Lind V.,&Deising H.B.,2007.**Performance of the biocontrol fungus *Piriformospora indica* on wheat under greenhouse and field conditions.*Phytopathology* **97**:523-531.
- 224-Shabana Y.M.,&Ragab M.E.,1997.** *Alternaria infectoria*, a promising biological control agent for the fig wax scale,*Ceroplastes rusci* (Homoptera: *Coccidae*) in Egypt.*Biocontrol Science and Technology.*,**7**: 553-564.
- 225-Shahabivand S.,Maivan H.Z.,Goltapeh E.M.,Sharifi M.,&Aliloo A.A.,2012.**The effects of root endophyte and arbuscular mycorrhizal fungi on growth and cadmium accumulation in wheat under cadmium toxicity.*Plant Physiology and Biochemistry.*,**60**:53-58.
- 226-Sharma S.S.,Gill K.,Malik M.S.,&Malik O.P.,2000.**Insecticidal, antifeedant and growth inhibitory activities of essential oils of some medicinal plants.*Journal of Medicinal and Aromatic Plant Science.*,**2**:6-9.
- 227-Sharma V.R.,Gupta A., Jhingran A., Singh B.P.,Sridhara S.,Gaur S.N.,&Arora N.,2006.** Cloning, Recombinant Expression and Activity Studies of a Major Allergen “Enolase” from the Fungus *Curvularia Lunata*.*Journal of Clinical Immunology.*,**26**(4):360-369.
- 228-Sharma P.,Choudhary A.S.,Parashar P.,Sharma M.C.,&Dobhal M.P.,2010.**Chemical constituents of plants from the Genus *Nerium*.*Chemistry & Biodiversity.*,**7**:1198-1207.
- 229-Sharma A.,Thakur A.,Kaur S.,&Pati P.K.,2012.**Effect of *Alternaria alternata* on the coccinellid pest *Henosepilachna vigintioctopunctata* and its implications for biological pest management.*Journal of Pest Science.*,**85**:513-518.
- 230-Shimahara K.,&Takiguchi Y.,1988.**Preparation of Crustacean Chitin.*Methods in enzymology.*,**161**:417-419.
- 240-Sieber T.,2007.**Endophytic fungi in forest trees: are they mutualists?.*Fungal biology reviews.*,**21**:75-89.

- 241-Siegel M.R.,Latch G.C.M,Bush L.P.,Fannin F.F.,Rowan D.D.,Tapper B.A.,Bacon C.W., &Johnson M.C.,1990.Fungal endophyte-infected grasses:alkaloid accumulation and aphid response. *Journal of Chemical Ecol.*,**16**:3301-3315.
- 242-Siddiqui B.S., Khatoon N.,Begum S.,Farooq A.D,Qamar K.,Bhatti H.A.,&Ali S.K.,2012.Flavonoid and cardenolide glycosides and a pentacyclic triterpene from the leaves of *Nerium oleander* and evaluation of cytotoxicity. *Phytochemistry.*,**77**:238-244.
- 243-Sikora R.A.,Pocasangre L.,Zum Felde A.,Nieme B.,Vu T.T.,&Dababat A.A.,2008.Mutualistic endophytic fungi and *in planta* suppressiveness to plant parasitic nematodes.*Biological Control.*,**46**:15-23.
- 244-Silva G.H.,Oliveira C.M.,Teles H.L.,Pauletti P.M.,Gamboa I.C.,Silva H.S.,Bolzani V.S., Young M.C.M.,Casto-neta C.M.,Pfenning L.H.,Berlinck G.S.,&Araujo A.R.,2010. Sesquiterpenes from *Xylaria sp.*an endophytic fungus associated with *Piper aduncum* (*Piperaceae*). *Phytochemistry Letters.*,**3**:164-167.
- 245-Sinclair E.R.,&Haddrell R.L.,1985.Flight of stored products beetles over a grain farming area in southern Queensland. *Journal of the Australian Entomological Society.*,**24**(1):9-15.
- 246-Singh S.M.,Pathak S.C.,Kulkarni N.,Naidu J.,&DubeyV.,1991.First report of phaeohyphomycosis of *Nezara viridula* Linn.(Insecta:*Heteroptera*) caused by *Curvularia lunata*.*Mycopathologia.*,**116**: 37-43.
- 247-Singh L.P.,Gill S.S.,&Tuteja N.,2011.Unraveling the role of fungal symbionts in plant abiotic stress tolerance.*Plant Signaling & Behaviour.*,**6**:175-191.
- 248-Singh G.,&Prakash S.,2011.Studies on Fungal Cultural Filtrates against Adult *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) a Vector of Filariasis.*Journal of Parasitology Research.*,**147373** :1-5.
- 249-Singh B., Thakur A., Kaur S., Chadha B.S.,&Kaur A.,2012. Acetylcholinesterase Inhibitory Potential and Insecticidal Activity of an Endophytic *Alternaria sp.*from *Ricinus communis*.*Applied Biochemistry and Biotechnology.*,**168**:991-1002.
- 250-Singh G.,&Prakash S.,2012.Evaluation of culture filtrates of *Culicinomyces clavissporus*: Mycoadulcicide for *Culex quinquefasciatus*,*Aedes aegypti* and *Anopheles stephensi*.*Parasitology Research.*,**110**:267-272.
- 251-Singh B.,Bhagat J.,Chadha B.S.,&Kaur A.,2014.Cholinesterase inhibitory potential of different *Alternaria* spp.and their phylogenetic relationships.*Biologia.*,**69**(1):10-14.
- 252-Smith C.J.,1996.Accumulation of phytoalexins: defence mechanism and stimulus response system.*New Phytologist.*,**132**:1-45.

- 253-Soleimani M.,Hajabbasi M.A.,Afyuni M.,Mirlohi A.,Borggaard O.K.,&Holm P.E.,2010a.**Effect of endophytic fungi on cadmium tolerance and bioaccumulation by *Festuca arundinacea* and *Festuca pratensis* .*International Journal of Phytoremediation.*,**12**:535-549.
- 254-Soleimani M., Afyuni M., Hajabbasi M.A., Nourbakhsh F., Sabzalian M.R., & Christensen J.H.,2010b.**Phytoremediation of an aged petroleum contaminated soil using endophyte infected and non-infected grasses. *Chemosphere* .,**81**:1084-1090.
- 255-Soundararajan T.,&Karrunakaran C.M.,2010.**Micropropagation of *Nerium Oleander* through the immature Pods. *Journal of Agricultural Science.*,**2**:181-193.
- 256-Springer W.C.,1997.**Allelopathic effects of tall fescue.Proceedings of southern forage crop improvement conference 53<sup>rd</sup>,pp :25-33.
- 257-Squire F.A.,1972.**Storage and household pests. In:Squire F.A.(ed).Entomological Problems in Bolivia. PANS, Sucre ,p:261.
- 258-Staniek A.,Woerdenbag H.J.,&Kayser O.,2008.**Endophytes exploiting biodiversity for the improvement of natural product-based drug discovery.*Journal of Plant Interactions.*,**3**:75-98.
- 259-Stekoll M.,&West C.A.,1978.**Purification and Properties of an Elicitor of Castor Bean Phytoalexin from Culture Filtrates of the Fungus *Rhizopus stolonifer*.*Plant Physiology* .,**61**:38-45.
- 260-St. Leger R.J.,Joshi L.,Bidochka M.J.,&Roberts D.W.,1996.**Construction of an improved mycoinsecticide overexpressing a toxic protease.*Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.*,**93**: 6349-6354.
- 261-St. Leger R.J.,Joshi L.,&Roberts D.W.,1998.**Ambient ph is a major determinant in the expression of cuticle degrading enzymes and hydrophobin by *Metarhizium anisopliae*. *Applied and Environmental Microbiol.*,**64**(2) :709 -713.
- 262-Storey C.L.,1973.**Exothermic inert atmosphere generator for control of insects in stored wheat. *Journal of Economic Entomology.*,**66**:511-514.
- 263-Storey C.L.,1975.**Mortality of adult stored-product insects in an atmosphere produced by an exothermic inert atmosphere generator. *Journal of Economic Entomology* .,**68**:316-318.
- 264-Stornelli C.,Porcelli F.,Moretti A.,&Logrieco A.,1998.**Prove di controllo delle popolazioni di *Saissetia oleae* (Olivier) in Puglia, mediante distribuzione di funghi isolati nell'area mediterranea.*Micologia Italiana.*,**2**: 11-18.
- 265-Strasser H.,Vey A.,&Butt T.,2000.**Are there any risks in using entomopathogenic fungi for pest control,with particular reference to bioactive metabolites of *Metarhizium*, *Tolypocladium* and *Beauveria* species?. *Biocontrol Science and Technology.*,**10**: 717-735.

- 266-Strobel G.A.,Miller R.V.,Martinez-Miller C.,Condrón M.M.,Teplow D.B.,&Hess W.M.,1999.**Cryptocandin, a potent antimycotic from the endophytic fungus *Cryptosporiopsis cf. quercina*. *Microbiology.*,**145**:1919-1926.
- 267-Sturz A.V.,Christie B.,&Nowak J.,2000.**Bacterial endophytes: potential role in developing sustainable system of crop production. *Critical Reviews in Plant Sciences.*,**19**:1-30.
- 268-Subramanyam B.H.,&Hagstrum D.W., 1995.**Resistance Measurement and Management. In: Subramanyam B.,Hagstrum D.W.(Eds).Integrated Mngement of Insect in Stored Products. Marcel Decker, New York, pp: 331-398.
- 269-Sumarah M.W.,Puniani E.,Sørensen D.,Blackwell B.A.,&Miller J.D.,2010.**Secondary metabolites from anti insect extracts of endophytic fungi isolated from *Picea rubens*. *Phytochemistry .*,**71**:760-765.
- 270-Sun X.,Guo L.D.,&Hyde K.D.,2011.**Community composition of endophytic fungi in *Acer truncatum* and their role in decomposition. *Fungal Diversity.*,**47**:85-95.
- 271-Sutherland B.L.,&Hoglund J.H.,1989.**Effect of ryegrass containing the endophyte (*Acremonium lolii* ) on the performance of associated white clover and subsequent crops. *Proceeding of New Zeland Grassland Association.*,**50**:265-269.
- 272-Tan R.X.,&Zou W.X.,2001.**Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Natural Product Reports.*,**18**:448-459.
- 273-Tapondjou A.L.,Adler C.,Fontem D.A.,Bouda H.,&Reichmuth C.,2005.**Bioactivities of cymol and essential oils of *Cupressus sempervirens* and *Eucalyptus saligna* against *Sitophilus zeamais* Motschulsky and *Tribolium confusum* du Val. *Journal of Pest Science.*,**41**: 91-102.
- 274-Tapper B.,&Lane G.A.,2004.**Janthitrems in a *Neotyphodium* endophyte of perennial ryegrass. 5<sup>th</sup> international endophyte symposium, pp:105-108.
- 275-Taylor J.W.,1995.**Making the Deuteromycota redundant: a practical integration of mitosporic and meiosporic fungi. *Canadian Journal of Botany.*,**73**:754-759.
- 276-Tayung K., Barik B.P.,Jha D.K.,&Deka D.C.,2011.**Identification and characterization of antimicrobial metabolite from an endophytic fungus, *Fusarium solani* isolated from bark of Himalayan yew. *Mycosphere.*,**3**:203-213.
- 277-Thakur A.,Singh V.,Kaur A.,&Kaur S.,2013.**Insecticidal potential of an endophytic fungus, *Cladosporium uredinicola*, against *Spodoptera litura*. *Phytoparasitica .*,**41**:373-382.
- 278-Thumar R.K.,&Kapadia M.N.,1994.**Ovicidal control of *Aleurolobus barodensis* (Maskell) and its suppression by the entomophagous fungus. *Indian Sugar.*,**44**: 501-502.

- 279-Tilton E.W.,Vardell H.H.,&Jones R.D.,1983.**Infrared heating with vacuum for control of the lesser grain borer, (*Rhyzopertha dominica* F.) and rice weevil (*Sitophilus oryzae* (L.))infesting wheat. *Journal of the Georgia Entomological Society.*,**18**(1):61-64.
- 280-Ting A.S.Y.,2014.**Biosourcing Endophytes as biocontrol Agents of Wilt Diseases.*Advances in Endophytic Research.*,**15**:283-296.
- 281-Tiwari B.K.,Brennan C.S.,Curran T.,Gallagher E.,Cullen P.J.,&Donnell C.P.O.,2010.** Application of ozone in grain processing, *Journal of Cereal Science.*,**51**(3): 248-255.
- 282-Tripathi S.,Kamal S.,Sheramati I.,Oelmuller R.,&Varma A.,2008.**Mycorrhizal fungi and other root endophytes as biocontrol agents against root pathogens.*Mycorrhiza.*,**3**:281-306
- 283-Tripathi P.,Kukreja N.,Singh B.P.,&Arora N.,2009.**Serine Protease Activity of Cur l 1 from *Curvularia lunata* Augments Th2 Response in Mice.*Journal of Clinical Immunology* .,**29**:292-302.
- 284-Ueda M.,Kubo T.,Miyatake K.,&Nakamura T.,2007.**Purification and characterization of fibrinolytic alkaline protease from *Fusarium sp.* BLB.*Applied Microbiology and Biotechnology.*,**74**(2):331-338.
- 285-Ulhoa C.J.,&Peberdy J.F.,1991.**Regulation of chitinase synthesis in *Trichoderma harzianum*. *Journal of General Microbiology.*,**137**:2163-2169.
- 286-Unterseher M.,Gazis R.,Chaverri P.,Guarniz C.F.G.,&Tenorio D.H.Z.,2013.**Endophytic fungi from Peruvian highland and lowland habitats form distinctive and hostplant-specific assemblages.*Biodiversity and Conservation.*,**22**:999-1016.
- 287-Upadhyay R.K.,Jaiswal G.,&Yadav N.,2007.**Toxicity,repellency and oviposition inhibition activity of some essential oils against *Callosobruchus chinensis*.*Journal of Applied Biosciences.*,**33**(1): 21-26.
- 288-Upadhyay R.K.,&Ahmad S., 2011.** Management Strategies for Control of Stored Grain Insect Pests in Farmer Stores and Public Ware Houses.*World Journal of Agricultural Sciences.*,**7**(5): 527-549.
- 289-USDA ,1986.**Stored grain insects.USDA.Springfield,64 pp.
- 290-Vallejo L.F.,Soto S.U.,&Bernal T.D.V.,1996.**Identification of pathogenic fungi for *Lutzomyia sp.*(Diptera:Psychodidae),vectors of Leishmaniasis.*Revista Colombiana de Entomologia.*, **22**:13-17.

- 291-Van der Geest L.P.S.,De Moraes G.J.,Navia D.,&Tanzini M.R.,2002.**New records of pathogenic fungi in mites (Arachnida: Acari) from Brazil.*Neotropical Entomology.*,**31**:493-495.
- 292-Vega F.E., 2008.** Insect pathology and fungal endophytes. *Journal of Invertebrate Pathology* .,**98**: 277-279.
- 293-Vega F.E.,Posada F.,Aime M.C.,Ripoll M.P.,Infante F.,&Rehner S.A.,2008.** Entomopathogenic fungal endophytes. *Biological Control.*,**46**:72-82.
- 294-Vega F.E.,Goettel M.S.,Blackwell M.,Chandler D., Jackson M.A.,Keller S.,Koike M., Maniania N.K.,Monzon A.,Ownley B.H.,Pell J.K.,Rangel D.E.N.,&Roy H.E.,2009.**Fungal entomopathogens: new insights on their ecology. *Fungal Ecology.*,**2**: 149-159.
- 295-Verma N.,Tripathi A.K.,Prajapati V.,Bahl J.R.,Khanuja S.P.S.,&Kumar S., 2000.**Toxicity of essential oil from *Lippia alba* towards stored grain insects.*Journal of Medicinal and Aromatic Plant Science.*,**22**(1): 50-54.
- 296-Vesterlund S.R.,Helander M., Faeth S.,Hyvonen T.,&Saikkonen K.,2011.**Environmental conditions and host plant origin override endophyte effects on invertebrate communities. *Fungal Diversity.*,**47**:109-118.
- 297-Vey A.,1998.**Researches on insecticidal mycotoxins as a contribution to the development of biological control and sustainable agriculture. *Oilb Wprs.*,**21**: 71-76.
- 298-Vey A.,Hoagland R.,&Butt T.M.,2001.**Toxic metabolites of fungal biocontrol agents. In : Butt T.M., Jackson C.W., Magan N.(eds).Fungi as Biocontrol Agents Progress: problems and potential. CABI Publishing,Wallingford,pp: 311-346.
- 299-Vishwanatha K.S.,Rao A.,&Singh S.A.,2009.**Characterization of acid protease expressed from *Aspergillus oryzae* MTCC 5341.*Food Chemistry.*,**114**:402-407.
- 300-Wang Y.,&Dai C.C.,2011.**Endophytes:A potential resource for biosynthesis,biotransformation and biodegradation. *Annual Review of Microbiology.*,**61**:207-215.
- 301-Waller F.,Achatz B.,Baltruschat H.,Fodor J.,Becker K.,Fisher M., Heier T.,Huckelhoven R.,Neumann C.,Von Wettstein D.,Franken P.,&Kogel K.H.,2005.**The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance,disease resistance, and higher yield. . *Proceedings of the National Academy of Sciences.*,**102**:13386-13391.

- 302-Waller F.,Mukherjee K.,Deshmukh S.D.,Achatz B.,Sharma M.,Schäfer P.,&Kogel K.H.,2008.**Systemic and local modulation of plant responses by *Piriformospora indica* and related *Sebacinales* species.*Journal of Plant Physiology.*,**165**:60-70.
- 303-Wang C.,Typas M.A.,&Butt T.M.,2002.**Detection and Characterization of *Pr1* Virulent Gene Deficiencies in the Insect Pathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae*.*FEMS Microbiology Letters.*,**213**: 251-255
- 304-Wang Y.,&Dai C.C.,2011.**Endophytes:A potential resource for biosynthesis,biotransformation and biodegradation. *Annual Review of Microbiology.*,**61**:207-215.
- 305-Wang L.W.,Xu B.G.,Wang J.Y.,Su Z.Z.,Lin F.C.,Zhang C.L.,&Kubicek C.P.,2012.**Bioactive metabolites from *Phoma* species,an endophytic fungus from the Chinese medicinal plant *Arisaema erubescens*.*Applied Microbiology and Biotechnology.*,**93**:1231-1239.
- 306-Waqas M., Khan A.L.,Kamran M.,Hamayun M.,Kang S.M.,Kim Y.H.,&Lee I.J.,2012.** Endophytic fungi produce gibberellins and indoleacetic acid and promotes host-plant growth during stress. *Molecules.*,**17**:10754-10773.
- 307-Watjen W.,Debbab A.,Hohlfeld A.,ChovolouY., Kampkttter A.,Edrada R.A., Ebel R., Hakiki, A., Mosaddak M.,Totzke F., Kubbutat M.H.G.,&Proksch P.,2009.**Enniatins A1, B and B1 from an endophytic strain of *Fusarium tricinctum* induce apoptotic cell death in H4IIE hepatoma cells accompanied by inhibition of ERK phosphorylation.*Molecular Nutrition & Food Research.*,**53**:431-440.
- 308-Wei J.C.,1979.**Handbook of Fungi Identification.Technology Press.Shanghai,780p.
- 309-West C.P.,1994.** Physiology and drought tolerance of endophyte-infected grasses. In: Bacon C.W.,White J.F.(eds).Biotechnology of endophytic fungi of grasses.CRC Press,Boca Raton, pp: 87-99.
- 310-White R.H.,Engelke M.C.,Morton S.J.,Johnson-Cicalese J.M.,&Ruemmele B.A.,1992.***Acremonium* endophyte effects on tall fescue drought tolerance.*Crop Science* .,**32**:1392-1396.
- 311-Wicklrow D.T.,Roth S.,Deyrup S.T.,&Gloer J.B.,2005.**A protective endophyte of maize: *Acremonium zeae* antibiotics inhibitory to *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides*. *Mycological Research.*,**109**:610-618.
- 312-Wilkinson H.H.,Siegel M.R.,Blankenship J.D.,Mallory A.C.,Bush L.P.,&Schardl C.L.,2000.**Contribution of fungal loline alkaloids to protection from aphids in grassendophyte mutualism. *Molecular Plant Microbe Interaction.*,**13**:1027-1033.

- 313-Williams P.,&Amos T.G.,1974.**Some effects of synthetic juvenile hormones and hormone analogues on *Tribolium castaneum*. *Australian Journal of Zoology.*,**22**: 147-53.
- 312-Wolock-Madej C.,&Clay K.,1991.**Avian seed preference and weight loss experiment: The role of fungal-infected fescue seeds. *Oecologia.*,**88**:296-302.
- 313-Wright J.D.,1998.**The role of endophytes in Citrus stem and roots.These PHD,Hong kong 290 p.
- 314-Yamazaki H.,Tanaka A.,Kaneko J.,Ohta A.,&Horiuchi H.,2008.***Aspergillus nidulans* ChiA is a glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored chitinase specifically localized at polarized growth sites.*Fungal Genetics and Biology.*,**45**:963-972.
- 315-Yang J.,Tian B.,Liang L.,&Zhang K.Q.,2007.**Extracellular enzymes and the pathogenesis of nematophagous fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology.*,**75**(1):21-31.
- 316-Yang F.Z.,Li L.,&Yang B.,2012.***Alternaria* toxin-induced resistance against rose aphids and olfactory response of aphids to toxin-induced volatiles of rose plants.*Biomedecine & Biotechnology .*,**13**(2):126-135.
- 317-Yang J.,Yu Y.,Li J.,Zhu W.,Geng Z.,Jiang D.,Wang Y., & Zhang K.Q.2013.**Characterization and functional analyses of the chitinase-encoding genes in the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora*.*Archives of Microbiology.*,**195**:453-462.
- 318-Zabalgogezcoa I.,2008.**Fungal endophytes and their interaction with plant pathogens. *Spanish Journal of Agricultural Research.*,**6**:138-146.
- 319-Zaferanloo B.,Quang T.D.,Daumoo S.,Ghorbani M.M.,Mahon P.J.,&Palombo E.A.,2014.**Optimization of protease production by endophytic fungus,*Alternaria alternata*, isolated from an Australian native plant.*World Journal of Microbiol Biotechnology.*,**30**:1755-1762.
- 320-Zhang C.L.,Wang G.P.,Mao L.J.,Komon-Zelazowska M.,Yuan Z.L.,Lin F.C.,Druzhinina I.S.,&Kubicek C.P.,2010a.***Muscodor fengyangensis* sp. nov. from southeast China: morphology,physiology and production of volatile compounds.*Fungal Biology .*,**114**:797-808.
- 321-Zhang X.X.,Li C.J.,&Nan Z.B.,2010b.**Effects of cadmium stress on growth and anti-oxidative systems in *Achnatherum inebrians* symbiotic with *Neotyphodium gansuense*.*Journal of Hazardous Materials.*,**175**:703-709.
- 322-Zhang Z.B.,Zeng Q.G.,Yan R.M.,Wang Y.,Zou Z.R.,&Zhu D.,2011.**Endophytic fungus *Cladosporium cladosporioides* LF70 from *Huperzia serrata* produces Huperzine A.*World Journal of Microbiology Biotechnology.*,**27**:479-486.

**323-Zhu D., Wang J., Zeng Q., Zhang Z., & Yan R., 2010.** A novel endophytic Huperzine A producing fungus, *Shiraia* sp. Slf14, isolated from *Huperzia serrata*. *Journal of Applied Microbiology*, **109**:1479-1486.

**324-Zi-Chao L., & Zhuang-Tu Z., 1980.** Parasitisation of *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries on citrus red mites. *Acta Microbiologica Sinica*, **20**:72-75

**Sites internet (consultés le 03-02-2015).**

[http://ZipcodeZoo.com/index.php/Nerium\\_oleander](http://ZipcodeZoo.com/index.php/Nerium_oleander)

[http://ZipcodeZoo.com/index.php/Rhizopertha\\_dominica](http://ZipcodeZoo.com/index.php/Rhizopertha_dominica)

[http://ZipcodeZoo.com/index.php/Sitophilus\\_granarius](http://ZipcodeZoo.com/index.php/Sitophilus_granarius)

[http://ZipcodeZoo.com/index.php/Sitophilus\\_zeamais](http://ZipcodeZoo.com/index.php/Sitophilus_zeamais)

## Résumé

La présente étude a pour objet l'étude de l'activité insecticide des champignons endophytes isolés à partir des feuilles et des tiges de laurier rose *Nerium oleander* L. (Apocynaceae, Gentianales) vis-à-vis 3 coléoptères des denrées stockées *Rhizopertha dominica* Fab, 1792 (Coleoptera:Bostrichidae), *Sitophilus granarius* L, 1758 (Coleoptera:Curculionidae) et *Sitophilus zeamais* Motschulsky, 1855 (Coleoptera:Curculionidae).

L'activité insecticide est évaluée à l'aide d'une mesure de 3 paramètres : l'activité protéolytique, l'activité chitinolytique et l'effet des 2 types de filtrats issus de ces champignons avec 4 différentes concentrations : 25%, 50%, 75%, 100%.

Les résultats montrent que les champignons *Alternaria* sp5, *Cladosporium* sp, *Curvularia* sp, *Fusarium* sp1, *Fusarium* sp2, *Fusarium* sp3, *Fusarium* sp4, *Fusarium* sp5, *Fusarium* sp6 sont dotés d'une bonne activité protéolytique et /ou chitinolytique et une bonne activité insecticide contre ces insectes. *Torula* sp1, *Torula* sp2 sont dotés d'une bonne activité protéolytique mais aucune activité insecticide n'a été enregistrée pour ces 2 champignons.

L'effet des filtrats change selon la concentration utilisée, la concentration 100% semble la concentration la plus efficace contre ces insectes avec un taux de mortalité enregistré après 48 heures d'essai pour *Rhizopertha dominica* qui varie entre 84% pour le filtrat d'activité protéolytique de *Alternaria* sp5 et 94% pour le filtrat d'activité chitinolytique de *Fusarium* sp3

Pour *Sitophilus granarius* la mortalité enregistrée après 48 heures pour la même concentration varie entre 84% pour le filtrat d'activité protéolytique de *Alternaria* sp5 et 98% pour le filtrat d'activité chitinolytique de *Curvularia* sp

Pour *Sitophilus zeamais* la mortalité enregistrée après 48 heures pour la même concentration varie entre 80% pour le filtrat d'activité chitinolytique de *Fusarium* sp3 et 94% pour les 2 types de filtrats de *Curvularia* sp.

**Mots clés :** *Nerium oleander*, Activité insecticide, Champignons endophytes, *Rhizopertha dominica*, *Sitophilus granarius*, *Sitophilus zeamais*.

## ملخص

هذه المذكرة تهدف إلى دراسة قدرة الفطريات نابوت داخلي المعزولة من أوراق وسيقان نبات الدفلة (*Nerium oleander* L (Gentianales, Apocynaceae) على مكافحة 3 من خنافس المنتجات المخزنة:

*Rhizopertha dominica* Fab, 1792 (Coleoptera:Bostrichidae), *Sitophilus granarius* L, 1758 (Coleoptera:Curculionidae) و *Sitophilus zeamais* Motschulsky, 1855 (Coleoptera:Curculionidae).

هذه القدرة تم تقييمها عن طريق 3 معايير: النشاط البروتيني والنشاط الكيتيني وتأثير نوعين من رواشح هذه الفطريات بأربعة تركيزات مختلفة: 25%، 50%، 75%، 100%.

أظهرت النتائج بان الفطريات *Alternaria* sp5, *Cladosporium* sp, *Curvularia* sp, *Fusarium* sp1, *Fusarium* sp2, *Fusarium* sp3, *Fusarium* sp4, *Fusarium* sp5, *Fusarium* sp6, تمتلك نشاطين بروتيني وكيتيني جيدين وقدرة ممتازة على مكافحة هذه الحشرات.

*Torula* sp1, *Torula* sp2 يمتلكان نشاط بروتيني جيد لكن لا يمتلكان أي قدرة على مكافحة هذه الحشرات.

يختلف التأثير تبعاً لتركيز الراشح، التركيز الأعلى فعالية ضد هذه الحشرات بمعدل وفيات بعد 48 ساعة من الاختبارات يتراوح بين 84% بالنسبة لراشح النشاط البروتيني للفطر *Alternaria* sp5 و 94% بالنسبة لراشح النشاط الكيتيني للفطر *Fusarium* sp3

بالنسبة ل *Sitophilus granarius* معدل الوفيات بعد 48 ساعة من الاختبار لنفس التركيز المذكور سابقاً يتراوح بين 84% بالنسبة لراشح النشاط البروتيني للفطر *Alternaria* sp5 و 98% بالنسبة لراشح النشاط الكيتيني للفطر *Curvularia* sp

بالنسبة ل *Sitophilus zeamais* معدل الوفيات بعد 48 ساعة من الاختبار لنفس التركيز المذكور سابقاً يتراوح بين 80% بالنسبة لراشح النشاط الكيتيني للفطر *Fusarium* sp3 و 94% بالنسبة لراشح النشاط الكيتيني للفطر *Curvularia* sp.

**الكلمات المفتاحية:** *Nerium oleander*, القدرة على مكافحة الحشرات, الفطريات نابوت داخلي, *Sitophilus granarius*, *Rhizopertha dominica*, *Sitophilus zeamais*

## Abstract

This study focuses on the study of the insecticidal activity of endophytic fungus isolated from the leaves and stems of *Nerium oleander* L (Gentianales, Apocynaceae) against 3 stored product beetles *Rhizopertha dominica* Fab, 1792 (Coleoptera:Bostrichidae), *Sitophilus granarius* L, 1758 (Coleoptera:Curculionidae) and *Sitophilus zeamais* Motschulsky, 1855 (Coleoptera:Curculionidae).

Insecticidal activity was assessed by using three parameters; the measure of proteolytic activity, chitinolytic activity and the effect of the two types of culture filtrates from these fungus with four different concentrations: 25%, 50%, 75%, 100%.

The results shows that the fungus: *Alternaria* sp5, *Cladosporium* sp, *Curvularia* sp, *Fusarium* sp1, *Fusarium* sp2, *Fusarium* sp3, *Fusarium* sp4, *Fusarium* sp5, *Fusarium* sp6 have a good chitinolytic or or /and proteolytic activity and good insecticidal activity against these insects.

*Torula* sp1, *Torula* sp2 have a good proteolytic activity but they have not any insecticidal activity.

The effect varies depending on the culture filtrate concentration, the concentration 100% seems the most effective against these insects with a mortality rate after 48 hours of testing for *Rhizopertha dominica* ranging from 84% for the culture filtrate of proteolytic activity of and 94% for the culture filtrate of chitinolytic activity of *Fusarium* sp3 For *Sitophilus granarius* the mortality recorded after 48 hours for the same concentration ranging from for 84% the culture filtrate of proteolytic activity of *Alternaria* sp5 and 98% for the culture filtrate of chitinolytic activity of *Curvularia* sp For *Sitophilus zeamais* the mortality recorded after 48 hours for the same concentration ranging from 80% for culture filtrate of chitinolytic activity of *Fusarium* sp3 and 94% for the two types of culture filtrates of *Curvularia* sp.

**Keywords:** *Nerium oleander*, Insecticidal activity, Endophytic fungi, *Rhizopertha dominica*, *Sitophilus granarius*, *Sitophilus zeamais*.



