

Université du Québec  
INRS-Institut Armand-Frappier  
Mars 2017

**IMPACT DE LA TRANSMISSION HORIZONTALE D'UN CHAMPIGNON  
ENTOMOPATHOGENE CHEZ LE DENDROCTONE DU MÈLÈZE,  
*DENDROCTONUS SIMPLEX* LECONTE  
(COLEOPTERA : SCOLYTINAE)**

Par  
Narin Srei

Thèse présentée pour l'obtention du grade de  
*Philosophiæ doctor* (Ph.D.) en biologie

**Jury d'évaluation**

Président du jury et examineur interne	Dr Philippe Constant INRS-Institut Armand-Frappier
Examineur externe	Dr Gaston Laflamme Ressources Naturelles Canada
Examineur externe	Dr Richard Trudel RT enr.
Directeur de recherche	Dr Claude Guertin INRS-Institut Armand-Frappier
Codirecteur de recherche	Dr Robert Lavallée Ressources Naturelles Canada



# REMERCIEMENTS

La réalisation de cette thèse n'aurait pas été possible sans le bienveillant soutien de plusieurs personnes à qui je voudrais témoigner ma sincère reconnaissance.

J'aimerais tout d'abord exprimer mes chaleureux remerciements à mon directeur de thèse Pr Claude Guertin pour m'avoir fait confiance et accompagné tout au long de ma formation. Sa grande disponibilité, ses judicieux conseils, son écoute et ses encouragements, surtout pendant mes moments difficiles, ont été une très grande qualité et d'un immense réconfort. J'ai pris un grand plaisir à travailler avec lui. Merci infiniment Claude!

Je tiens également à remercier mon codirecteur de thèse, le Pr Robert Lavallée, pour son attention de tout instant sur mes travaux, pour ses conseils avisés et son écoute qui bonifie la bonne réussite de cette thèse. Son énergie et sa confiance ont été des éléments moteurs pour moi.

De même, j'adresse mes remerciements aux membres de mon comité d'évaluation, le Pr Philippe Constant et le Dr Richard Trudel, qui ont été présents à chaque étape de mon cursus de formation et qui m'ont fourni d'utiles conseils permettant de bien structurer mes études. Merci également au Dr Gaston Laflamme pour son temps et son énergie à évaluer ma thèse.

Je voudrais également remercier Gilles Bélanger et Martine Blais du Centre de foresterie des Laurentides pour leur soutien technique sur le terrain pendant les deux premières années d'études. Spéciaux remerciements à Kevin Gauthier pour avoir autorisé le prélèvement d'échantillons sur son terrain. Merci au Dr Krista Ryall du Centre de foresterie des Grands Lacs de m'avoir prêté l'appareil olfactométrique et au Dr. George Kyei-Poku de m'avoir fourni des séquences d'amorces pour détecter le champignon INRS-242. Merci également à Michel Courcelles pour son support bibliographique. Grand merci à mes collègues de laboratoire, notamment Valentin Popa, Audrey-Anne Durand, Vincent Peck, Amélie Bergeron, Jean-Philippe Buffet, Laurence Guertin et Julie Wilkin, pour leur support moral et intellectuel.

J'aimerais remercier infiniment ma mère Naren Em, mon mari Virak Hul et mon garçon Raksmeysokleap pour leur patience, leur force et leur énergie dans le support et l'accompagnement tout au long de mon parcours.

Finalement, j'aimerais dédier ce travail à mon père Sreng Srey. Merci papa pour vos précieux conseils ainsi que tous les moments inoubliables remplis de joie et de bonheur qu'on a passé ensemble.



## RÉSUMÉ

L'utilisation des champignons entomopathogènes contre les scolytes est une stratégie intéressante dans le domaine de la lutte biologique en foresterie. Cependant, les méthodes d'inoculation fongique restent un défi majeur en raison du comportement cryptique de ces insectes. Plusieurs expériences ont été effectuées afin de sélectionner un isolat fongique performant contre les adultes de *Dendroctonus simplex* et d'évaluer l'efficacité de son inoculation à l'aide d'un dispositif d'autodissémination. De plus, la capacité de l'insecte à détecter la présence du champignon entomopathogène et l'effet de celui-ci sur la biologie reproductive de *D. simplex* ont été également évalués. Parmi les neuf isolats fongiques testés, l'isolat INRS-242 de *Beauveria bassiana* a été sélectionné, puisqu'il cause une mortalité élevée chez les adultes de *D. simplex*. Une fois l'insecte tombé sur la pochette fongique présente dans le dispositif d'autodissémination, chaque adulte de *D. simplex* acquiert une dose létale moyenne de  $2,1 \times 10^9$  conidies, induisant une mortalité de 98,0% chez la population testée. Nos résultats confirment l'efficacité du dispositif d'autodissémination et révèlent son potentiel comme méthode d'inoculation du champignon INRS-242 chez *D. simplex*. Selon les tests chimiotactiques, les adultes de *D. simplex* ne sont pas en mesure de détecter la présence du champignon INRS-242. Plus précisément, la transmission fongique entre l'individu contaminé et celui non-contaminé a été observée lors du test de transmission horizontale. Cependant, l'efficacité de la transmission varie en fonction du sexe d'individus porteurs du champignon. Chez les parents de *D. simplex*, environ 95% des mâles sains ont été infectés lorsque les femelles étaient porteuses du pathogène, alors que seulement 61% des femelles ont été infectées lorsque les mâles ont été mis en contact avec le champignon avant leur introduction dans les demi-bûches. De plus, les galeries de ponte et larvaires étaient moins longues et les insectes de la nouvelle génération étaient moins abondants lorsque les femelles ont été mises en contact avec le champignon avant de pénétrer sous l'écorce. Ces résultats suggèrent que des efforts devraient être consentis afin de cibler davantage les femelles dans la stratégie de lutte contre *D. simplex*. Cette étude novatrice portant sur la stratégie de transmission horizontale nous a permis de mieux comprendre l'impact du champignon INRS-242 de *B. bassiana* sur la biologie reproductive de l'insecte monogame subcortical *D. simplex*.

Mots clés : *Dendroctonus simplex*; Scolytinae; champignons entomopathogènes; Hypocreales; lutte biologique; dispositif d'autodissémination; transmission horizontale.



## ABSTRACT

The use of entomopathogenic fungi against bark beetles is an attractive strategy of biological control in forestry. However, the methods of fungal inoculation remain a major challenge due to their cryptic behavior. In this study, many experiments have been performed in order to select a fungal isolate causing the highest mortality in *Dendroctonus simplex* adults and to evaluate the effectiveness of fungal inoculation using an assisted autodissemination device. Moreover, the insect's ability in detecting the presence of the entomopathogenic fungus and the effect of the fungus on reproductive biology of *D. simplex* have also been evaluated. Among the nine fungal isolates tested, an isolate INRS-242 of *Beauveria bassiana* was selected as the utmost isolate causing the highest mortality in *D. simplex*. Once it had fallen onto the pouch attached in the assisted autodissemination device, each *D. simplex* adult loaded an average lethal dose of  $2.1 \times 10^9$  conidia, which induced a mortality rate of 98.0%. Our results confirm the effectiveness of the device and reveal its potential as inoculation method of *B. bassiana* INRS-242 towards *D. simplex* adults. Eastern larch beetle seems not to recognize the odor of the fungus but they may possess a chemotactic gustative capacity that allows them to discriminate the contaminated and non-contaminated foods. However, no avoidance behavior has been observed during experimentations. Fungal transmission has occurred between the fungus-treated and fungus-free insect parents by using assisted autodissemination device. By the way, the efficiency of the horizontal transmission varies by sex of individuals carrying the fungus INRS-242. For *D. simplex* parents, about 95% of healthy males were infected while females were carriers of pathogen, whereas only 61% of females were infected when males were in contact with the fungus. Moreover, the infection by *B. bassiana* INRS-242 affects significantly on length of egg and larval galleries as well as the total number of offspring, especially when females were the carriers of the pathogens. Our results demonstrate the efforts should be targeted to females *D. simplex* to disseminate the fungus INRS-242 to their conspecific. By using horizontal transmission strategy, this research represents an inventive study to better understand the impact of the fungus INRS-242 on reproductive biology of a monogamous insect like *D. simplex*.

Keywords: *Dendroctonus simplex*; Scolytinae; biological control; entomopathogenic fungi; Hypocreales; assisted autodissemination; horizontal transmission.



# TABLE DES MATIÈRES

<b>REMERCIEMENTS</b> .....	<b>III</b>
<b>RÉSUMÉ</b> .....	<b>V</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>VII</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES</b> .....	<b>IX</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	<b>XI</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX</b> .....	<b>XIII</b>
<b>CHAPITRE 1 : INTRODUCTION</b> .....	<b>1</b>
<b>CHAPITRE 2 : DENDROCTONE DU MÉLÈZE</b> .....	<b>3</b>
2.1 CLASSIFICATION ET MORPHOLOGIE.....	3
2.2 DISTRIBUTION GÉOGRAPHIQUE.....	6
2.3 HISTORIQUE D'INFESTATIONS.....	6
2.4 SYMPTÔMES ET SIGNES D'ATTAQUE.....	7
2.5 DOMMAGES.....	9
2.6 CONSTRUCTION DES GALERIES.....	9
2.7 CYCLE BIOLOGIQUE.....	11
2.7.1 Maturation et période de vol.....	11
2.7.2 Reproduction et oviposition.....	11
2.7.3 Développement des larves, des pupes et des adultes.....	13
2.8 ASSOCIATION SYMBIOTIQUE CHEZ LES INSECTES SUBCORTICAUX.....	13
2.9 MÉTHODES DE LUTTE CONTRE LE DENDROCTONE DU MÉLÈZE.....	15
2.9.1 Lutte indirecte.....	15
2.9.2 Lutte directe.....	16
<b>CHAPITRE 3 : CHAMPIGNONS ENTOMOPATHOGÈNES</b> .....	<b>21</b>
3.1 UTILISATION EN LUTTE MICROBIOLOGIQUE.....	21
3.2 BIOLOGIE.....	22
3.3 SPECTRE D'HÔTES.....	23
3.4 MODE D'INFECTION.....	24
3.5 EFFICACITÉ DES CHAMPIGNONS ENTOMOPATHOGÈNES.....	28
3.6 TRANSMISSION DES CHAMPIGNONS ENTOMOPATHOGÈNES.....	30
3.7 DÉTECTION DE LA PRÉSENCE DES CHAMPIGNONS ENTOMOPATHOGÈNES.....	32
<b>CHAPITRE 4 : BUT ET HYPOTHÈSES</b> .....	<b>35</b>
<b>CHAPITRE 5 : MATÉRIEL ET MÉTHODES</b> .....	<b>37</b>
5.1 INSECTES.....	37
5.1.1 Sites de récolte.....	37

5.1.2 Degré-jour.....	37
5.1.3 Méthodes de récolte.....	38
5.1.4 Élevage des insectes.....	39
5.2 ISOLATS FONGIQUES.....	41
5.2.1 Production des suspensions mères.....	42
5.2.2 Viabilité des conidies.....	43
5.3 CRIBLAGE.....	45
5.4 PATHOGÉNICITÉ DE L'ISOLAT SÉLECTIONNÉ.....	46
5.5 DISPOSITIF D'AUTODISSÉMINATION.....	47
5.6 RÉPONSES CHIMIOTACTIQUES.....	49
5.6.1 Test olfactif.....	49
5.6.2 Test gustatif.....	51
5.7 EFFET DU CHAMPIGNON INRS-242 SUR LA BIOLOGIE REPRODUCTIVE DE <i>D. SIMPLEX</i> .....	52
5.7.1 Dispositif expérimental.....	53
5.7.2 Transmission horizontale.....	56
<b>CHAPITRE 6 : RÉSULTATS.....</b>	<b>59</b>
6.1 DEGRÉ-JOUR.....	59
6.2 ÉLEVAGE DE <i>D. SIMPLEX</i> .....	61
6.3 VIABILITÉ DES CONIDIES.....	61
6.4 CRIBLAGE.....	63
6.5 PATHOGÉNICITÉ DE L'ISOLAT INRS-242.....	66
6.6 DISPOSITIF D'AUTODISSÉMINATION.....	68
6.7 RÉPONSES CHIMIOTACTIQUES.....	69
6.8 EFFET DU CHAMPIGNON INRS-242 SUR LA BIOLOGIE REPRODUCTIVE DE <i>D. SIMPLEX</i> .....	70
<b>CHAPITRE 7 : DISCUSSION.....</b>	<b>79</b>
7.1 DEGRÉ-JOUR.....	79
7.2 ÉLEVAGE.....	80
7.3 PATHOGÉNICITÉ DES CHAMPIGNONS ENTOMOPATHOGÈNES.....	81
7.4 DISPOSITIF D'AUTODISSÉMINATION.....	85
7.5 RÉPONSES CHIMIOTACTIQUES DES ADULTES DE <i>D. SIMPLEX</i> .....	85
7.6 EFFET DU CHAMPIGNON INRS-242 SUR LA BIOLOGIE REPRODUCTIVE DE <i>D. SIMPLEX</i> .....	86
<b>CHAPITRE 8 : CONCLUSION.....</b>	<b>89</b>
<b>RÉFÉRENCES.....</b>	<b>91</b>
<b>ANNEXE.....</b>	<b>107</b>

# LISTE DES FIGURES

Figure 2.1 : Adultes de <i>Dendroctonus simplex</i> .....	4
Figure 2.2 : Différents stades du développement de <i>Dendroctonus simplex</i> .....	5
Figure 2.3 : Symptômes d'infestation et signes d'attaque par le dendroctone du mélèze .....	8
Figure 2.4 : Galerie principale creusée par une femelle de <i>Dendroctonus simplex</i> et galeries larvaires.....	10
Figure 3.1 : Schématisation d'une coupe transversale de la cuticule d'un insecte et le mode d'infection d'un champignon entomopathogène .....	24
Figure 5.1 : Différentes méthodes de récoltes des adultes de <i>Dendroctonus simplex</i> .....	39
Figure 5.2 : Différents substrats alimentaires utilisés pour élever les adultes de <i>D. simplex</i> .....	40
Figure 5.3 : Différentes étapes de la production des champignons entomopathogènes .....	43
Figure 5.4 : Germination des conidies de <i>Beauveria bassiana</i> après 36h d'incubation à 20°C.....	44
Figure 5.5 : Différentes étapes du test de criblage des isolats fongiques chez les adultes du dendroctone du mélèze.....	45
Figure 5.6 : Différentes parties du dispositif d'autodissémination.....	48
Figure 5.7 : Différentes parties du système olfactométrique .....	50
Figure 5.8 : Représentation schématique d'une arène utilisée pour le test de préférence alimentaire chez les adultes de <i>D. simplex</i> .....	51
Figure 5.9 : Différentes étapes liées aux expérimentations d'effet du champignon INRS-242 sur la biologie reproductive de <i>D. simplex</i> .....	55
Figure 6.1. Nombre d'adultes de dendroctone du mélèze capturés dans des pièges Lindgren et les degrés-jours cumulés selon la température à base 10 des années 2012, 2013 et 2014 .....	60
Figure 6.2 : Pourcentage de la viabilité des conidies des isolats fongiques utilisés lors du test de criblage .....	62
Figure 6.3 : Mortalité cumulée des adultes de <i>D. simplex</i> 10 jours suivant l'inoculation fongique.....	64
Figure 6.4 : Corrélacion entre la mortalité des adultes de <i>D. simplex</i> et la viabilité des conidies.....	65
Figure 6.5 : Mortalité cumulative des adultes de <i>D. simplex</i> après avoir soumis à différentes concentrations des conidies de l'isolat INRS-242 de <i>B. bassiana</i> .....	67
Figure 6.6 : Corrélacion entre la charge des conidies portées par adulte de <i>Dendroctonus simplex</i> et le temps d'exposition sur la pochette du champignon INRS-242 de <i>B. bassiana</i> .....	68
Figure 6.7 : Réponses chimiotactiques des adultes de <i>Dendroctonus simplex</i> à la présence ou l'absence du champignon INRS-242 de <i>Beauveria bassiana</i> .....	69
Figure 6.8 : Nombre de galeries de ponte observées sous l'écorce des demi-bûches du mélèze laricin. .	72
Figure 6.9 : Longueur des galeries de ponte creusées par des femelles de <i>D. simplex</i> après 50 jours d'incubation à 20°C .....	73
Figure 6.10 : Longueur des galeries larvaires creusées par des larves de <i>D. simplex</i> après 50 jours d'incubation à 20°C. ....	74
Figure 6.11 : Nombre total de dendroctone du mélèze récoltés après 50 jours d'incubation à 20°C .....	76

Figure 6.12 : Corrélation entre le nombre total de dendroctone du mélèze récoltés et la longueur des galeries de ponte ..... 77

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 5.1 : Liste des isolats de champignons Hypocreales utilisés pour le test de criblage. ....	41
Tableau 6.1 : Degrés-jours cumulés selon les différents seuils thermiques pour les trois années de l'étude .....	59
Tableau 6.2 : Concentrations des conidies de l'isolat INSR-242 de <i>B. bassiana</i> nécessaires pour tuer les adultes de <i>D. simplex</i> .....	66
Tableau 6.3 : Pourcentage de survie des parents de <i>D. simplex</i> après 50 jours d'incubation .....	70
Tableau 6.4 : Transmission fongique entre les parents de <i>D. simplex</i> après 50 jours d'incubation.....	71
Tableau 6.5 : Répartition des stades du développement de <i>D. simplex</i> .....	78



# CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

Les scolytes sont des coléoptères appartenant à la sous-famille des Scolytinae. Ce sont des insectes subcorticaux puisqu'ils ont un développement larvaire sous l'écorce de leur hôte. Les scolytes représentent une importante force de changements naturels contribuant à l'évolution des peuplements forestiers. La majorité des scolytes sont des insectes secondaires s'attaquant à des arbres stressés par l'âge, les maladies, les blessures, la défoliation par les insectes, la sécheresse, les inondations et le feu. Sous l'influence des changements climatiques et des activités anthropiques, une augmentation des populations de plusieurs espèces de scolytes est observée, notamment pour les genres *Dendroctonus*, *Ips* et *Scolytus* (Bentz *et al.*, 2010). Cela entraîne plusieurs impacts directs ou indirects sur les écosystèmes forestiers et socioéconomiques (Bentz *et al.*, 2010, Sambaraju *et al.*, 2012). Par exemple, l'épidémie de dendroctone du pin ponderosa, *Dendroctonus ponderosae* Hopkins, dans l'ouest de l'Amérique du Nord a affecté de nombreux services écosystémiques des forêts avec des effets directs sur la régulation des gaz atmosphériques, la perturbation des milieux, la qualité de l'air et de l'eau, la stabilisation du sol, le cycle des éléments nutritifs, la pollinisation et la biodiversité (Costanza *et al.*, 1997). Les pertes engendrées par l'atteinte des services écosystémiques découlant des attaques par *D. ponderosa* ont été estimées à 63,6 milliards de dollars américains par année (Abbott *et al.*, 2008). Selon les mêmes auteurs, en Colombie-Britannique, le déficit en volume de bois lié aux dommages par l'insecte a entraîné la perte de 27 000 emplois.

Le dendroctone du mélèze, *Dendroctonus simplex* LeConte, est un insecte monogame et phloémophage qui cause des dommages dans des peuplements du mélèze laricin, *Larix laricina* (Du Roi) K. Koch, en Amérique du Nord (Gagné, 2005, Seybold *et al.*, 2002). L'abondance des galeries sous l'écorce empêche la sève de circuler librement ce qui entraîne l'assèchement et la mort des arbres. Le dendroctone du mélèze a longtemps été considéré comme un insecte secondaire ne s'attaquant qu'aux arbres affaiblis ou morts récemment. Cependant, les infestations observées sur des grandes étendues dans son aire de distribution démontrent que cet insecte peut aussi être un déprédateur primaire lorsqu'ils sont abondants (Benoit & Blais, 1984, Langor, 1991, Mckee & Aukema, 2015). Très peu d'études se sont attardées à définir des prescriptions pour lutter contre les populations de dendroctone du mélèze. Cette situation s'explique probablement par le fait que, dans le passé, les peuplements du mélèze avaient une faible importance économique. Aujourd'hui, on remarque un intérêt

grandissant pour les essences à croissance rapide, et le mélèze ne ferait pas exception (Gagné, 2005, Ménétrier *et al.*, 2005). De plus, des mortalités étendues des mélèzes causées par *D. simplex* ont suscité de l'inquiétude auprès des gestionnaires forestiers, d'où l'importance de trouver des moyens de lutte contre ce ravageur.

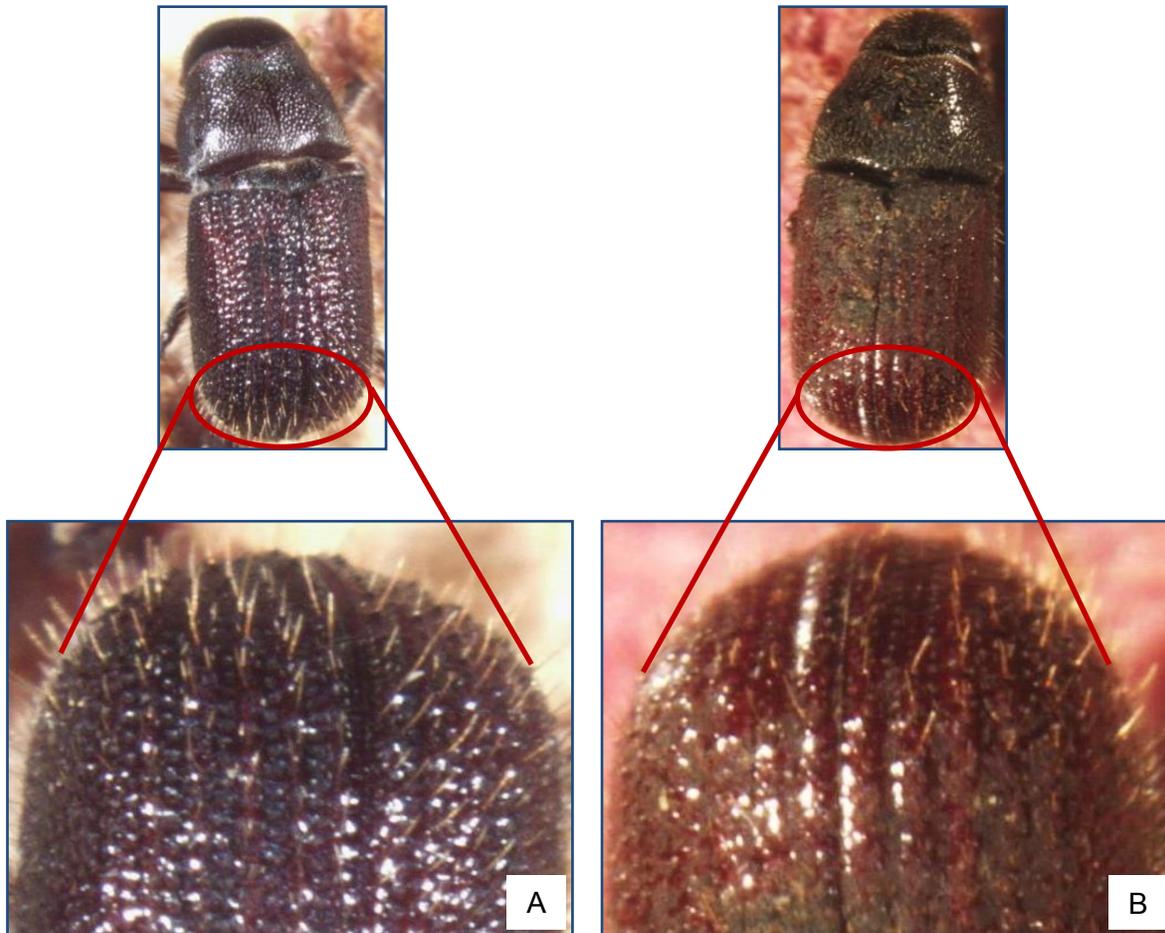
Les champignons entomopathogènes de l'ordre des Hypocreales sont reconnus comme des agents potentiels de lutte microbiologique contre les insectes ravageurs des secteurs forestiers et agricoles. Ce sont des champignons ubiquitaires qui présentent des risques réduits pour la santé humaine, animale et environnementale (Goettel & Hajek, 2001, Pell *et al.*, 2001). Il a été démontré que ces champignons peuvent être facilement intégrés aux pratiques phytosanitaires conventionnelles, puisqu'ils sont compatibles avec les équipements communs de pulvérisation d'insecticides. Cependant, leur utilisation en vaporisation insecticide a aussi pour conséquence de viser directement des organismes non ciblés, compte tenu de la relative spécificité des champignons entomopathogènes. De plus, comme mentionné précédemment, les scolytes incluant le dendroctone du mélèze ont des comportements cryptiques qui limitent l'application des préparations fongiques par les méthodes conventionnelles. L'objectif de cette recherche est de démontrer si les champignons entomopathogènes peuvent causer de la mortalité chez des adultes du dendroctone du mélèze, affecter leur biologie reproductive et de valider si une approche de lutte novatrice, basée sur le principe d'autodissémination, serait une stratégie de lutte appropriée contre cet insecte monogame subcortical.

## CHAPITRE 2 : DENDROCTONE DU MÉLÈZE

### 2.1 Classification et morphologie

Le dendroctone du mélèze est un petit coléoptère phloémophage appartenant à la famille des Curculionidae et la sous-famille des Scolytinae. Il s'agit d'un scolyte subcortical, puisqu'il s'attaque au phloème, un tissu conducteur important, situé entre l'écorce et le bois. L'adulte est de couleur brun foncée avec des élytres bruns rougeâtres (figure 2.1). Il mesure de 3,5 à 5 mm de long. La tête de *D. simplex* est large et de forme convexe. Le pronotum mesure en moyenne 1,71 mm chez les mâles et 1,94 mm chez les femelles. Le prothorax est court, fortement rétréci et resserré vers la tête. La ponctuation des élytres est large avec la déclivité postérieure convexe et plutôt profondément cannelée chez les mâles (Wood, 1963). Les interstries sont de forme convexe et de longs poils sont régulièrement dispersés sur la carapace. La femelle présente les tubercules sur les interstries, surtout au niveau de la déclivité postérieure (figure 2.1A), tandis que ces structures sont absentes ou moins prononcées chez les mâles (figure 2.1B).

Les œufs de *D. simplex* sont de couleur blanche et de forme ovale ou oblongue (figure 2.2A). Ils mesurent environ 0,9 mm de longueur et 0,5 mm de largeur (Seybold *et al.*, 2002). Pour leur part, les larves sont apodes et de couleur blanchâtre avec une tête brun clair (figure 2.2B). Les larves matures atteignent une longueur de 4,2 à 4,5 mm. Les pupes ont généralement une taille similaire à celle des larves matures (figure 2.2C). Elles sont initialement de couleur blanche et deviennent jaunâtres par la suite. Elles s'obscurcissent lorsqu'elles se préparent à se métamorphoser en adultes.



**Figure 2.1 : Adultes de *Dendroctonus simplex*.** (A) Femelle et (B) mâle. Chez les femelles, les tubercules sur les interstries de la déclivité postérieure des élytres sont très prononcés. Par contre, ces structures sont absentes ou moins prononcées chez les mâles.

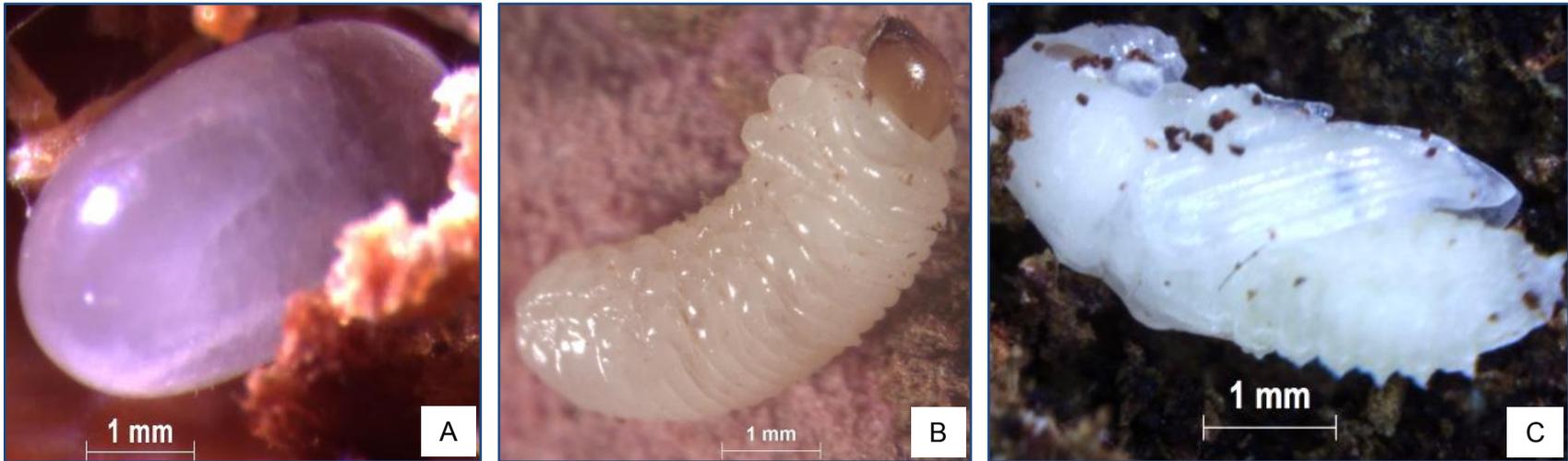


Figure 2.2 : Différents stades du développement de *Dendroctonus simplex*. (A) Œuf; (B) Larve; et (C) Pupa.

## 2.2 Distribution géographique

L'espèce de *D. simplex* se retrouve dans toute l'aire de répartition de son hôte principal, le mélèze laricin, qui est une espèce indigène de l'Amérique du nord (Sirois, 2000). Ce dernier occupe un vaste territoire au Canada, de Terre-Neuve jusqu'en Colombie-Britannique. Il présente aussi dans le nord-est des États-Unis et au sud des grands lacs et en Alaska. Le dendroctone du mélèze pourrait également infester d'autres espèces de mélèzes exotiques, notamment le mélèze d'Europe, *L. decidua* Mill., le mélèze japonais, *L. kaempferi* (Lamb.) Carr., et le mélèze hybride, *L. marschlinsii* Coaz. (Ménétrier *et al.*, 2005, Seybold *et al.*, 2002). De plus, en Europe, les populations de *D. simplex* représentent un risque potentiel aux peuplements de neuf espèces de mélèzes indigènes de la Sibérie orientale et de plusieurs espèces indigènes et exotiques en Europe (Seybold *et al.*, 2002). Selon les mêmes auteurs, l'introduction de cet insecte en Eurasie s'est probablement faite par inadvertance lors du transport de bois d'œuvre ou de produits de bois.

## 2.3 Historique d'infestations

Des infestations de peuplements des mélèzes par *D. simplex* ont été signalées pour la première fois en 1883 en Amérique du Nord; en 1926 au Québec; et en 1946 dans les provinces de l'Ouest canadien (Seybold *et al.*, 2002). Dans toutes ces régions, des infestations majeures ont été enregistrées vers la fin des années 70 et le début des années 80 (Langor & Raske, 1989a). Durant cette période, environ 1,4 million m<sup>3</sup> de mélèzes de toutes ces régions a été détruit par l'insecte. Entre les années 1974 et 1980, la mortalité du mélèze associée à *D. simplex* a particulièrement été estimée à environ 3,3 millions ha en Alaska (Seybold *et al.*, 2002). Selon les observations réalisées dans le sud du Québec par les équipes de Benoit et Blais (1984), plus de 50% des peuplements du mélèze ont été attaquées par *D. simplex*. L'âge avancé des peuplements et la défoliation causée par la tenthrède du mélèze, *Pristiphora erichsonii* Hartig, dans certaines régions pourraient être des prémisses à ces attaques (Langor & Raske, 1989a, b), mais la cause principale réelle est inconnue. De plus, le changement climatique pourrait être un élément important pouvant expliquer l'augmentation des populations de *D. simplex*. Au cours des dernières années, on observe d'importantes infestations en Amérique du Nord, notamment dans le nord de Minnesota (Mckee & Aukema, 2016, Minnesota Department of Natural Resources - Division of Forestry, 2014, Seybold *et al.*, 2002), en Ontario (Ontario Ministry of

Natural Resources, 2012), au Manitoba (Manitoba Conservation Forestry Branch, 2014) et en Alberta (Mckee & Aukema, 2015). Bien qu'au Québec, aucune donnée officielle ne fasse mention de mortalité dans des peuplements de mélèzes, on observe, depuis les cinq dernières années, d'importants dommages causés par des populations de *D. simplex* dans différentes régions, notamment dans le parc des Laurentides, au nord et au sud du Saint-Laurent près de la ville de Québec, au sud de Montréal et en Estrie.

## 2.4 Symptômes et signes d'attaque

Les arbres infestés par le dendroctone du mélèze peuvent être identifiés par la présence de certains symptômes et signes d'attaque (figure 2.3). Le symptôme le plus évident et observable à distance est certainement le changement précoce de la coloration des aiguilles. Plus de 50% des arbres infestés au printemps deviennent jaunes vers la fin de juillet et le début d'août (Langor & Raske, 1989b). Plus tard en saison, ces aiguilles tombent au sol ce qui donnera un tapis jaunâtre, alors que la cime demeure verte. L'arbre attaqué peut également subir des écoulements importants de résine qui s'observent facilement à la base du tronc et sur le sol aux alentours (Seybold *et al.*, 2002) (figure 2.3A). De plus, certaines espèces de pic-bois (figure 2.3B), notamment le pic à dos noir, *Picoides arcticus* Swain., et le pic chevelu, *P. villosus* L., retirent l'écorce des arbres en automne et en hiver pour se nourrir des adultes des dendroctones (Knight, 1958, Otvos & Stark, 1985, Shook & Baldwin, 1970).

La présence de trous ayant un diamètre d'environ deux millimètres sur l'écorce est un des signes d'attaque par *D. simplex*. Ces trous peuvent difficilement être remarqués, s'ils ne sont pas accompagnés d'un autre signe caractérisant une infestation. En effet, l'accumulation de la résine et la sciure de couleur brun rougeâtre au-dessous des trous entrés forment une structure caractéristique en forme de bénitier (figure 2.3C).



**Figure 2.3 : Symptômes d'infestation et signes d'attaque par le dendroctone du mélèze.** (A) Écoulement de résines accumulés sur le tronc d'arbre; (B) Présence de pic-bois; et (C) Trou d'entrée sur l'écorce avec un bénitier.

## 2.5 Dommages

Le dendroctone du mélèze est considéré comme un insecte secondaire puisqu'il ne s'attaque qu'aux arbres affaiblis ou récemment morts. Lorsque les conditions environnementales le permettent, la population de *D. simplex* peut rapidement augmenter (Mckee & Aukema, 2015) et les insectes pourront alors s'attaquer aux arbres sains. Les attaques de dendroctone du mélèze sont généralement initiées par les femelles. En se basant sur les études de Langor et Raske (1987a), ces femelles commencent généralement à coloniser la partie inférieure du tronc située entre 2,5 et 4,5 m. La partie du tronc situé entre 4,5 et 6,5 m sera attaquée après deux jours et après 10 jours pour la zone supérieure à 6,5 m. Selon les mêmes auteurs, la densité de trous d'entrée varie en fonction de l'épaisseur d'écorce. La densité moyenne est de 2,4 trous par 100 cm<sup>2</sup>. Cependant, elle n'atteint que 1,1 trou par 100 cm<sup>2</sup> à la partie supérieure du tronc lorsque l'épaisseur d'écorce est inférieure à 3,5 mm. Aucune attaque n'est réussie lorsque l'épaisseur d'écorce est inférieure à 2 mm. Ce comportement suggère que lorsque les femelles commencent à construire les galeries de ponte, elles sont en mesure de percevoir certains stimuli de l'écorce, notamment en ce qui a trait à son épaisseur et aux caractéristiques du phloème.

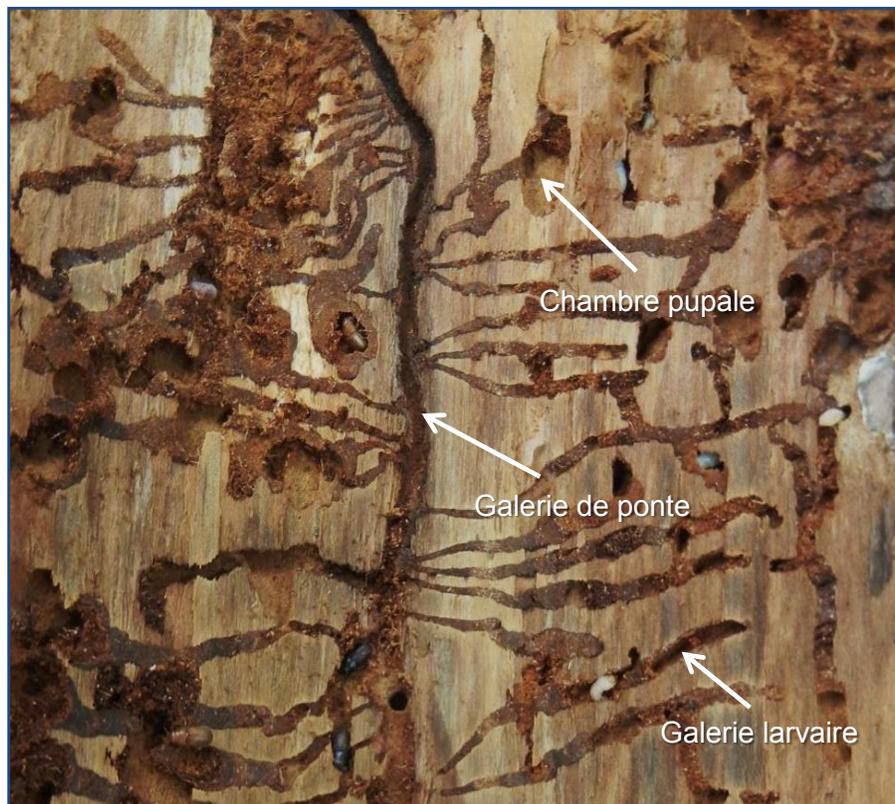
## 2.6 Construction des galeries

Comme chez la plupart des dendroctones, seules les femelles de *D. simplex* creusent un tunnel d'entrée horizontal d'une longueur de 6 à 8 mm selon l'épaisseur de l'écorce et du phloème. Cette ouverture permettrait aux champignons phytopathogènes de pénétrer dans l'arbre (Gagné, 2005). De plus, les adultes de *D. simplex* sont reconnus comme pouvant transporter certaines bactéries qui pourraient jouer un rôle important dans l'affaiblissement des mécanismes de défense des arbres (Durand *et al.*, 2015). Une fois entrée sous l'écorce, la femelle construit une galerie verticale, appelée galerie de ponte, où elle déposera ses œufs (figure 2.4).

Les galeries de ponte sont généralement parallèles au grain du bois, ce qui permet d'éviter le sectionnement des canaux résinifères verticaux et ainsi minimiser l'écoulement de résine. Quant à lui, le tunnel d'entrée horizontal sectionne possiblement ces canaux. Il servirait ainsi au drainage des canaux résinifères qui pourraient être rencontrés lors de l'aménagement subséquent des niches de ponte (Langor & Raske, 1987b). Ceci expliquerait l'accumulation de

la résine à l'entrée de certains trous où se forme le bénitier. En général, la longueur des galeries de ponte varie entre 15 et 40 cm (Seybold *et al.*, 2002). À Terre-Neuve, Langor et Raske (1987b) ont remarqué qu'il y avait deux périodes de vol, correspondant à l'émergence de deux couvées, chez *D. simplex*. La longueur moyenne des galeries de ponte de la première couvée serait de 42 cm, tandis qu'elles n'atteindraient que 26 cm à la deuxième couvée. Selon les mêmes auteurs, cette différence pourrait être causée par une diminution de la disponibilité du phloème lors de la deuxième couvée, par une perte de vigueur de la femelle ou par une production plus abondante de résine par les arbres.

Après l'éclosion des œufs, les larves commencent à s'alimenter du phloème en creusant leurs propres galeries qui sont perpendiculaires à la galerie de ponte (Langor & Raske, 1989b). Au dernier stade de développement larvaire, chaque larve creuse une chambre pupale à l'extrémité de sa galerie larvaire où il y aura une métamorphose en pupe et puis en adulte.



**Figure 2.4 : Galerie principale creusée par une femelle de *Dendroctonus simplex* et galeries larvaires.** Les galeries larvaires sont perpendiculaires à la galerie de ponte. Au dernier stade de développement larvaire, chaque larve creuse une chambre pupale à l'extrémité de sa galerie où il y aura une métamorphose en pupe et puis en adulte.

## 2.7 Cycle biologique

Le dendroctone du mélèze est un insecte holométabole ayant une métamorphose complète. Après la maturation des adultes, il y aura la reproduction et la ponte des œufs, le développement des larves, des pupes et des adultes de la nouvelle génération.

### 2.7.1 Maturation et période de vol

Le dendroctone du mélèze est un insecte généralement univoltin qui hiverne sous l'écorce au stade adulte. Au printemps, il recommence à se nourrir de 10 à 15 jours avant l'émergence. Durant cette période, il y a une maturation des individus qui se caractérise par une augmentation de la grosseur des muscles alaires et des corps gras. Chez les mâles, la grosseur des testicules a particulièrement augmenté, tandis qu'aucun changement des ovarioles n'est observé chez les femelles (Langor & Raske, 1987a).

Comme tous les insectes, les adultes de *D. simplex* sont poïkilothermes et donc tous les aspects de leur vie sont fortement influencés par la température. La température contrôle ainsi leur taux de développement dans l'écorce, notamment la durée du cycle de développement, l'émergence et la dispersion, les activités d'accouplement et le nombre d'œufs pondus (Six & Bracewell, 2015). À Terre-Neuve, les adultes matures émergent et attaquent les arbres-hôtes au printemps, lorsque la température est supérieure à 4°C mais les pics de vol sont observés à une température supérieure à 10°C (Langor & Raske, 1987a, b). Cependant, il n'existe aucune information sur la température requise pour l'émergence de *D. simplex* dans la province de Québec.

### 2.7.2 Reproduction et oviposition

Lors de la période de reproduction, les femelles émettent généralement des phéromones sexuelles et/ou des signaux acoustiques pour attirer les mâles. Les mâles arrivent donc au site d'attaque dans les deux jours suivant l'arrivée des femelles (Langor & Raske, 1987a, Seybold *et al.*, 2002). Lorsque le premier mâle se présente à l'entrée de la galerie, il reste à l'extérieur pendant environ 10 minutes en émettant des stridulations (Prendergast, 1991). L'émission des stridulations par le mâle est un comportement qui permettrait d'éloigner les autres mâles du site convoité, ou entraînerait la cessation de la production de phéromones d'agrégation par la femelle dans la galerie. Si la galerie de ponte est trop courte, le mâle attend à l'entrée jusqu'à

elle atteint environ 6 à 8 mm de longueur. Il peut avoir jusqu'à quatre couples qui utilisent le même trou d'entrée, mais chaque couple construit leur propre galerie de ponte (Langor & Raske, 1987b). Le partage d'un trou d'entrée semble être unique parmi les dendroctones. Ce fait pourrait aider les femelles qui arrivent plus tard à conserver le temps et l'énergie pour la ponte. À l'exception de l'aménagement des niches de revirement et des trous d'aération, la femelle est la seule à contribuer au forage de la galerie. Cependant, le mâle procède à l'évacuation des sciures. Les niches de revirement mesurent environ 3 mm de largeur et de 3 à 5 mm de longueur. Elles servent au retournement du mâle pour la copulation et à celui de la femelle pour l'oviposition (Langor & Raske, 1987b).

L'accouplement a lieu à l'extrémité de la partie distale des galeries de ponte, de 5 à 30 minutes après l'entrée du mâle. La durée d'accouplement est en moyenne de 92 secondes et ne dépasse jamais 3 minutes (Langor & Raske, 1987b). Comme chez la plupart des espèces de dendroctone, l'accouplement peut se répéter périodiquement durant la construction de la galerie. Langor et Raske (1987b) ont observé qu'un couple de *D. simplex* pouvait s'accoupler quatre fois en deux jours. Après la copulation, la femelle recommence l'élongation de la galerie et entreprend l'aménagement des niches de ponte le long de ses parois. Selon les mêmes auteurs, l'oviposition débute d'un à deux jours après l'accouplement et s'arrête de trois à cinq jours avant la réémergence. La femelle peut pondre en moyenne de 30 à 50 œufs par galerie de ponte. Il y a cependant un maximum de quatre œufs par niche, puisque les femelles possèdent quatre ovarioles lui permettant la maturation de quatre œufs à la fois (Seybold *et al.*, 2002).

Lors de la ponte, la femelle aménage des niches de 1,5 à 2,0 mm de profondeur dans les parois de la galerie dans lesquelles elle déposera ses œufs (Langor & Raske, 1987b). Ces derniers se retrouvent à intervalle régulier le long des parois de la galerie. Il est intéressant de noter que les premiers œufs déposés dans la partie basale de la galerie se situent à environ 4 cm du trou d'entrée. Ce comportement de ponte aurait comme fonction de protéger la progéniture contre une éventuelle accumulation de résine (Strak, 1982) puisque cette partie est généralement plus inondée de résine que la partie distale (Langor & Raske, 1987b).

Les insectes parents demeurent dans la galerie de ponte durant 30 jours en moyenne (Langor & Raske, 1987b). Il peut y avoir production de deux ou trois couvées par année si les conditions climatiques le permettent (Mckee & Aukema, 2016, Seybold *et al.*, 2002, Six & Bracewell, 2015). À Terre-Neuve, avant que le développement de la nouvelle génération ne soit complété, 90% des parents peuvent réémerger des arbres de la première couvée et initier les deuxièmes

couvées dans de nouveaux arbres. Dans des conditions très favorables, environ 60% des parents de la deuxième couvée peuvent réinitier un troisième cycle de ponte. Dans ce cas, les insectes de cette dernière couvée semblent passer l'hiver sous forme immature. Cependant, il n'y a qu'une seule génération par année. En Alaska, les adultes de la nouvelle génération restent dans les chambres pupales durant tout l'été jusqu'à l'émergence au printemps suivant. Par contre, de 30 à 40% des adultes de la nouvelle génération émergent en automne et creusent des galeries à la base des arbres pour les hiberner (Langor & Raske, 1987a, b, Seybold *et al.*, 2002). Cela leur permettrait de diminuer les attaques par les prédateurs et d'augmenter leur chance de survivre aux températures hivernales (Seybold *et al.*, 2002).

### **2.7.3 Développement des larves, des pupes et des adultes**

En milieu naturel, le développement de l'œuf à l'adulte dure de 60 à 70 jours (Langor & Raske, 1987b, Seybold *et al.*, 2002). De trois à six heures après l'éclosion, les larves se développent en se nourrissant d'un mélange de phloème et de champignons symbiotiques (les champignons filamenteux et les levures inoculés par les adultes) (Durand *et al.*, 2015, Seybold *et al.*, 2002, Six, 2013). Il existe quatre stades larvaires chez le dendroctone du mélèze. Leurs mues ont toujours lieu à l'extrémité distale des galeries larvaires. Au dernier stade du développement larvaire, les larves creusent une chambre pupale en bloquant l'entrée avec des sciures. Ce comportement est probablement pour se prémunir contre les attaques par des prédateurs, des parasitoïdes et des agents microbiens antagonistes. En général, les larves cessent de se nourrir et vident leur intestin environ deux jours avant d'entrer au stade pupal.

La pupa reste uniformément blanche de 4 à 5 jours. La cuticule de la pupa devient jaune pâle deux jours avant l'émergence en adulte prématuré. Les adultes prématurés sont caractérisés par un corps souple de couleur bronzé. Ils demeurent dans leur chambre pupale jusqu'à deux jours, le temps que leur cuticule durcisse. Ils se nourrissent ensuite de phloème jusqu'au début de l'hiver et doublent ainsi leur gras corporel (Langor & Raske, 1987b).

## **2.8 Association symbiotique chez les insectes subcorticaux**

Le terme symbiose fait référence à une association étroite entre deux organismes d'espèces différentes sur une portion significative de leur vie (Seipke *et al.*, 2012). Les organismes ayant des interactions symbiotiques sont appelés les symbiotes. La plupart des symbiotes retrouvés chez les insectes subcorticaux sont des bactéries et des champignons (Six, 2013, Six &

Wingfield, 2011). Ces deux groupes de microorganismes peuvent être retrouvés dans les galeries, à la surface de la cuticule et/ou à l'intérieur des insectes (Durand *et al.*, 2015). Ils jouent des rôles importants dans les mécanismes d'évolution et la coadaptation (Aanen *et al.*, 2009) ainsi que la dynamique des populations d'insectes (Hofstetter *et al.*, 2006).

Certaines espèces bactériennes du genre *Pseudomonas* ont été isolées chez trois espèces de *Dendroctonus*, soit *D. simplex* (Durand *et al.*, 2015), *D. ponderosae* et *D. valens* LeConte (Adams *et al.*, 2013, Adams *et al.*, 2011). Ces bactéries sont reconnues jouer des rôles importants dans la colonisation des arbres hôtes, notamment dans la détoxification des terpènes produits par les conifères. Certaines autres bactéries sont directement liées à la survie des insectes en étant impliquées dans le processus de la nutrition (Ayres *et al.*, 2000) en fournissant les acides aminés essentiels (Douglas, 2009, Miao *et al.*, 2003), les vitamines (Gibson & Hunter, 2010) et l'azote (Bridges, 1981, Morales-Jiménez *et al.*, 2009). Par exemple, les bactéries du genre *Enterobacter* associées aux adultes de *D. simplex*, aux larves et aux adultes de *D. terebrans* sont des bactéries fixatrices d'azote (Bridges, 1981). Plus particulièrement, certaines espèces bactériennes associées aux insectes subcorticaux pourraient jouer un rôle de protection des insectes en produisant les composés métabolites secondaires ayant des propriétés antifongiques (Durand *et al.*, 2015, Popa *et al.*, 2012, Scott *et al.*, 2008, Six, 2003). À titre d'exemple, les bactéries du genre *Serratia* et *Pseudomonas* retrouvées dans les sécrétions orales du dendroctone de l'épinette, *Dendroctonus rufipennis* Kirby inhibe la croissance du champignon saprophyte *Leptographium abietinum* (Peck) M. J. Wingfield (Cardoza *et al.*, 2006). Une bactérie actinomycète associée au dendroctone méridional du pin, *D. frontalis* Zimmerman, produit des antibiotiques qui inhibent particulièrement la croissance du champignon antagonisme de l'insecte, *Ophiostoma minus* (Hedgc.) Syd. & P. Syd (Scott *et al.*, 2008).

Certains insectes subcorticaux ont besoin de champignons filamenteux et de levures pendant leur développement. Ces champignons ont été inoculés dans le phloème par les insectes parents et ils ont continué à croître dans les galeries. Ils deviennent donc la source nutritive importante pour les larves (Adams & Six, 2007, Bleiker & Six, 2007) et les adultes (Six & Paine, 1996). Par exemple, les champignons mycangiaux sont nécessaires à l'émergence des larves de *D. frontalis* (Klepzig & Wilkens, 1997). Certains champignons produisent des composés de stérol comme l'ergosterol qui sont nécessaires pour l'ovogenèse et le développement larvaires (Bentz & Six, 2006, Janson *et al.*, 2008). Ces champignons pourraient également être impliqués dans les communications entre les insectes pendant la période de reproduction (Leufvén *et al.*, 1984) en les aidant à produire les phéromones (Brand *et al.*, 1976).

## 2.9 Méthodes de lutte contre le dendroctone du mélèze

Au Canada, les peuplements de mélèzes n'ont pas fait l'objet d'effort en matière de la gestion des ravageurs. Dans ces circonstances, il est normal de trouver peu d'information sur des stratégies de lutte ciblant directement le dendroctone du mélèze. Cependant, l'intérêt de plus en plus marqué pour l'utilisation d'essence à croissance rapide comme le mélèze pour la production de fibre pour l'industrie de la pâte à papier. Dans ce contexte, il va nécessiter le développement de pratiques qui mettent l'accent sur la lutte indirecte et la lutte directe afin de réduire les risques d'attaques par *D. simplex*. Par définition, la lutte indirecte est une stratégie préventive utilisée pour minimiser la probabilité des infestations futures par les insectes ravageurs. Des stratégies d'aménagements sont alors préconisées comme l'éclaircissement, la présence de différentes classes d'âge, la diversité dans la composition des essences d'arbres et le brûlage dirigé. Pour sa part, la lutte directe repose largement sur l'aménagement sanitaire, l'utilisation d'insecticides et de produits semiochimiques et d'agents biologiques de lutte afin de maintenir les populations d'insectes à de faibles niveaux.

### 2.9.1 Lutte indirecte

#### Éclaircissement et reboisement

L'éclaircissement est une méthode de lutte efficace permettant d'accroître la résilience écologique des forêts (Fettig *et al.*, 2007). Cette méthode provoque des changements du microclimat des forêts, notamment l'augmentation de l'intensité de la lumière, la circulation d'air, l'insolation et la température (Bartos & Amman, 1989). En effet, ces changements pourraient affecter la fécondité, l'aptitude au vol, la phénologie et le voltinisme des insectes. Les prédateurs, les parasitoïdes et les compétiteurs pourraient également être favorisés. Les changements au niveau de la densité des arbres pourraient également causer des perturbations de la diffusion des phéromones que les insectes utilisent pour recruter les conspécifiques pendant la phase initiale de la colonisation (Thistle *et al.*, 2004). Ces changements favorisent donc le renforcement de la vigueur des arbres non coupés avec des conséquences directes sur la baisse des populations de *D. simplex* et autres ravageurs subcorticaux.

L'éclaircissement des peuplements forestiers est particulièrement efficace pour le maintien des populations dans un état endémique. Par contre, elle peut également être une méthode intéressante lors d'épidémies, si elle est combinée avec le reboisement, la coupe sanitaire et d'autres méthodes de lutte directes (Waring & Pitman, 1985). En concomitance avec des pratiques de reboisement, l'utilisation de cette mesure pourrait favoriser une diversité dans la structure d'âge des peuplements et pourrait réduire les risques d'infestations majeures. Avec l'âge, les mélèzes matures auraient une tendance à perdre de la vigueur et ainsi à accroître leur susceptibilité aux attaques par *D. simplex* comparativement aux arbres plus jeunes (Langor & Raske, 1989a). Des cas similaires ont également été observés chez *D. ponderosae* (Taylor & Carroll, 2003, Whitehead *et al.*, 2003).

### **Brûlage dirigé**

Le brûlage dirigé est une méthode favorisant la régénération de certains secteurs forestiers. Une réduction de la masse de matériaux combustibles diminuera également les risques d'incendies majeurs. En bref, le brûlage dirigé contribue à restaurer l'équilibre de certains écosystèmes et de préserver l'intégrité de certaines espèces ayant besoin du feu pour se régénérer. Cette méthode a été grandement utilisée pour contrôler la population des scolytes de l'épinette, *Ips perturbatus* (Eichhoff), en Alaska où la forêt a été brûlée vers la fin de l'été et le début de l'automne afin de réduire les risques d'incendies et d'améliorer les habitats de la faune (Burnside *et al.*, 2011). Néanmoins, l'utilisation de cette mesure pour la suppression des populations des insectes subcorticaux est moins pratique et souvent inefficace (Carroll *et al.*, 2006). Selon Stephen *et al.* (2012), cette méthode pourrait augmenter la mortalité des arbres infestés par les insectes subcorticaux. Par contre, à long terme, les régions brûlées deviennent des espaces bénéfiques pour la croissance des nouveaux arbres, ce qui pourrait réduire la susceptibilité des forêts aux insectes subcorticaux (Fettig & Mckelvey, 2010, Fettig *et al.*, 2006).

### **2.9.2 Lutte directe**

#### **Coupe d'assainissement**

L'assainissement implique l'identification des arbres infestés par les insectes subcorticaux et leur abattage ou traitement avant la période d'émergence des insectes, afin de détruire les adultes et la couvée sous l'écorce. Par exemple, l'abattage des arbres de plus de 10 cm de

diamètre et le retrait rapide du bois coupé pourraient réduire les pertes engendrées par les attaques par *D. simplex*, surtout dans les milieux propices à l'augmentation des populations (Seybold *et al.*, 2002).

## **Pesticides**

Les pesticides chimiques systémiques pourraient être appliqués aux arbres infestés par *D. simplex*. Cependant, cette approche curative ne pourrait pas être appliquée sur de vastes superficies. De plus, en tenant compte du type de dommage infligé aux arbres, la détection des secteurs vulnérables est une prémisses à ce type d'intervention puisque la mortalité des arbres peut être relativement rapide. Plus particulièrement, ces pesticides chimiques sont nocifs pour la santé humaine, animale et environnementale (Muratoglu *et al.*, 2011, Sezen *et al.*, 2004). Sans compter que certains produits, comme le Diméthoate, injectés à la base des arbres, pourraient être phytotoxique et provoquer une décoloration et la perte précoce des aiguilles (Guertin, communication personnelle). L'utilisation de ces pesticides entraîne une perturbation du milieu qui se traduit par une diminution de la diversité génétique des organismes. De plus, l'exposition à des pesticides chimiques peut favoriser l'expression de mécanismes de résistance chez nombreuses espèces d'insectes ravageurs ou plus simplement favoriser d'autres ravageurs rendant ce procédé moins intéressant d'un point de vue environnemental (Wright & Chandler, 1991).

## **Produits semiochimiques**

Ce sont des produits de synthèse qui imitent les odeurs produites par un insecte pour attirer un congénère (la phéromone) ou celles produites par les plantes (le kairomone). Le kairomone permet aux insectes de reconnaître leurs plantes hôtes. Ces produits pourraient être installés directement sur les arbres ou accrochés aux pièges. Dans le cas de *D. simplex*, la phéromone sexuelle émise par les femelles pour attirer les mâles n'a pas encore été isolée. Malgré cela, le seudenol, une phéromone d'agrégation isolée chez *D. pseudotsugae* Hopkins, a montré un pouvoir attractif sur les populations de *D. simplex*. Son efficacité est accrue lorsqu'il est combiné avec l' $\alpha$ -pinène, un composé volatil émis par les mélèzes (Seybold *et al.*, 2002). Selon ces auteurs, d'autres monoterpènes du mélèze laricin, tels que le  $\beta$ -pinène, le camphène, les 3-carènes et le limonène, agissent aussi en synergie avec le seudenol et pourraient augmenter la chance de capture.

Il existe plusieurs avantages liés à l'utilisation des produits semiochimiques, notamment une faible probabilité du développement de la résistance chez les insectes, un risque réduit pour les utilisateurs et pour l'environnement. Cependant, leurs utilisations restent limitées à cause des coûts de production très élevés. De plus, les connaissances sur la biologie de l'insecte ciblé ainsi que l'impact sur les ennemis naturels sont nécessaires afin d'accroître l'efficacité de ces produits.

## **Lutte biologique**

Afin de réduire les risques reliés à l'utilisation des pesticides chimiques, plusieurs recherches soutiennent l'intégration de stratégies alternatives de lutte qui sont à risque réduit. La lutte biologique est une des avenues à explorer. Elle est principalement basée sur l'utilisation des organismes vivants, tels que les prédateurs, les parasitoïdes et les agents entomopathogènes, afin de prévenir ou de réduire les dégâts causés par des ravageurs. Ces organismes sont des ennemis naturels des insectes ciblés, qui jouent un rôle important dans la dynamique des populations de certains scolytes (Wegensteiner *et al.*, 2015).

L'utilisation de prédateurs et de parasitoïdes se sont avérés bénéfiques dans la gestion antiparasitaire afin de contrôler les populations de certains scolytes en phase endémique. Un exemple classique est certainement l'introduction d'un coléoptère prédateur, *Rhizophagus grandis* Gyllenhal, en Chine, en Europe et aux États-Unis pour contrôler les populations de dendroctone européen de l'épinette, *D. micans* Kugelann (Gregoire *et al.*, 1985, Yang *et al.*, 2014). Ainsi, ils ont observé que la densité de *R. grandis* était étroitement corrélée à celle de *D. micans*. Les adultes de ce prédateur pénètrent dans les galeries de *D. micans* où ils se nourrissent des œufs, des larves et des nymphes de leur proie. Suite à la reproduction, les larves de *R. grandis* s'attaquent également aux larves et aux nymphes de *D. micans*.

Le terme «entomopathogène» qualifie les microorganismes qui sont capables d'induire une maladie chez les insectes. L'utilisation des microorganismes en lutte biologique est connue sous le nom de la lutte microbiologique. Cette approche de lutte comprend quatre stratégies, soit la lutte biologique classique, la lutte biologique par inoculation (ou augmentation), par inondation et par conservation (Eilenberg *et al.*, 2001). La lutte classique implique l'importation intentionnelle, la libération et l'établissement des microorganismes entomopathogènes dans un nouvel environnement. La lutte biologique par inoculation est une libération d'un agent entomopathogène en espérant qu'il va se reproduire et fournir un contrôle temporaire de la

population d'insectes. Pour sa part, la lutte biologique par inondation réfère au contrôle immédiat de la population d'insectes à partir des microorganismes libérés massivement. La lutte biologique par conservation implique une modification de l'environnement afin de protéger et améliorer l'établissement d'entomopathogènes.

Il existe plusieurs avantages liés à l'utilisation d'agents microbiens entomopathogènes. Parmi ceux-ci, notons leur risque réduit vis-à-vis les vertébrés et les plantes, leur spécificité d'infections aux insectes ciblés, leur compatibilité avec les outils d'applications et d'autres agents de contrôles biologiques. Ces agents ont aussi la possibilité de contrôler les ravageurs à long terme. De plus, les risques que les organismes ciblés développent une résistance sont plus faibles que ceux liés à l'emploi de pesticides chimiques. Par contre, les microorganismes entomopathogènes présentent certains inconvénients. Ainsi, le temps d'action de ces microorganismes est généralement plus long que celui observé avec les pesticides chimiques, et leur niveau de virulence est souvent dépendant aux conditions environnementales (Inglis *et al.*, 2001, Thompson *et al.*, 2006). De plus, les applications multiples sont nécessaires afin d'augmenter leur efficacité. Finalement, certaines difficultés sont aussi rencontrées lors de la production à grande échelle pour certains microorganismes entomopathogènes, avec des conséquences directes sur les coûts de production.

Les microorganismes utilisés couramment en lutte microbiologiques sont des bactéries, des virus et des champignons microscopiques (Kreutz *et al.*, 2004a, Wegensteiner *et al.*, 2015). Ces agents sont principalement sélectionnés en se basant sur ses modes d'infection et la biologie des insectes ciblés. Depuis plus de 250 millions d'années, les bactéries et les insectes sont impliqués dans un processus coévolutif qui implique des relations complexes passant du commensalisme au parasitisme, incluant les relations hôtes-pathogènes. Ces relations peuvent être facultatives ou obligatoires. Les bactéries pathogènes obligatoires complètent leur cycle du développement à l'intérieur de l'insecte hôte, comme dans le cas de la bactérie *Paenibactillus* spp. qui affecte certains insectes, notamment les couvains d'abeille (Jurat-Fuentes & Jackson, 2012). Par contre, les bactéries pathogènes facultatives peuvent également se développer dans l'environnement (à l'extérieur de l'insecte hôte), comme par exemple certaines bactéries appartenant au genre *Bacillus*. Les bactéries *Bacillus thuringiensis* Berliner et *B. sphaericus* Neide sont les deux espèces les plus utilisées en lutte microbiologique. Ces bactéries possèdent un potentiel toxicogène puisqu'elles produisent des toxines cristallines lors du processus de sporulation. La cavité buccale de l'insecte hôte est une voie d'entrée unique de ces bactéries entomopathogènes. Suite à l'ingestion par l'insecte hôte, ces cristaux se

solubilisent dans le tractus intestinal où ils provoquent une toxémie qui peut entraîner la mort de l'insecte. De plus, ces bactéries entomopathogènes présentent un spectre d'hôte relativement large, surtout contre des espèces de lépidoptères (papillons) et de diptères (moustiques et mouches noires). Cependant, les applications répétitives de ces bactéries peuvent induire une résistance des insectes aux toxines bactériennes (Cory & Evans, 2007).

Les virus sont des parasites obligatoires qui requièrent la présence des cellules hôtes vivantes pour se multiplier. Il existe plus de 1 600 isolats de virus démontrant une virulence contre plus de 1 000 espèces d'insectes (Begon *et al.*, 1996). Parmi ceux-ci, les nucléopolyédrovirus et les granulovirus appartenant à la famille des baculovirus sont les genres les plus utilisés dans la lutte microbiologique de certaines espèces de lépidoptères (Szewczyk *et al.*, 2006). Contrairement aux autres microorganismes entomopathogènes, les baculovirus se caractérisent par une spécificité importante à leurs hôtes où ils ont été isolés (Armenta *et al.*, 2003). Le fait qu'ils ont une gamme d'hôtes étroits leur confère à la fois un avantage et un inconvénient. La gamme d'hôtes étroits permet aux baculovirus d'être des candidats de choix en lutte microbiologique. Par contre, leur spécificité étroite devient une restriction potentielle dans un contexte commercial. En effet, le développement d'une formulation à base de baculovirus n'est possible que si la problématique du ravageur qu'il cible a une incidence économique majeure. De plus, la production des particules virales se fait *in vivo*, ce qui implique des efforts et des coûts importants liés au maintien d'élevage d'insectes et aux aspects techniques d'extraction. Un autre facteur qui affecte l'efficacité d'application de baculovirus est l'inactivation rapide de particules infectieuses lorsqu'elles sont mises en contact avec les radiations ultraviolettes (Ignoffo *et al.*, 1977). Enfin, comme dans le cas des bactéries entomopathogènes, leur mode d'action requiert que les virus soient ingérés afin que l'infection prenne place.

Comme certaines espèces d'insectes présentent des comportements cryptiques tels dans le cas du dendroctone du mélèze, il est beaucoup moins accessible aux interventions pouvant impliquer l'application de virus ou de bactéries. Dans ce contexte, les champignons entomopathogènes peuvent représenter une avenue intéressante à considérer pour lutter contre ces populations d'insectes, notamment celles du dendroctone du mélèze, puisqu'ils agissent par contact pour infecter leurs hôtes.

## CHAPITRE 3 : CHAMPIGNONS ENTOMOPATHOGÈNES

### 3.1 Utilisation en lutte microbiologique

La plupart des champignons entomopathogènes appartiennent à l'ordre des Hypocreales. Il existe entre 700 et 1 000 espèces de champignons qui possèdent des effets pathogènes chez les insectes ravageurs agricoles et forestiers (St Leger & Wang, 2010). Certaines espèces de ces champignons pourraient être des candidats potentiels pour lutter contre des populations d'insectes subcorticaux (Liu & Bauer, 2006, Popa *et al.*, 2012, Wright *et al.*, 2007). Les genres les plus souvent utilisés en lutte microbiologique sont *Beauveria*, *Metarhizium* et *Lecanicillium* (anciennement *Verticillium*) (Kocacevik *et al.*, 2015, 2016, Kreutz *et al.*, 2004a, Tanyeli *et al.*, 2010, Wegensteiner, 2004), *Erynia*, *Hirsutella*, *Entomophthora* et *Entomophaga* (Goettel & Roberts, 1992, Kamp & Bidochka, 2002). Ils ont été utilisés pour contrôler certaines espèces appartenant aux ordres Lepidoptera, Hemiptera, Coleoptera, Homoptera, Isoptera et Diptera.

Certains facteurs pourraient limiter l'utilisation et la commercialisation de ces champignons sous forme des biopesticides, notamment le coût de production, le temps d'action et leur spécificité d'infection (St Leger & Wang, 2009). Malgré cela, certaines espèces de champignons ayant une grande gamme d'hôtes ont peu d'incidence sur les insectes bénéfiques et pourraient être avantageuses pour une commercialisation (Wraight & Carruthers, 1999). Selon de Faria et Wraight (2007), au total de 171 produits fongiques provenant de 12 espèces ont été identifiés et commercialisés partout dans le monde depuis les années 60. Quatre espèces sont particulièrement utilisées, soit *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (34%), *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin (34%), *Isaria fumosorosea* Wize (6%) et *Beauveria brongniartii* (Saccardo) Petch (4%). Les pays d'Amérique du Sud sont en premier rang de l'utilisation des produits fongiques (42,7%), suivis par ceux de l'Amérique du Nord (20,5%), de l'Europe et de l'Asie (12,3% chacun). Au Canada, quelques produits à base de champignons entomopathogènes sont actuellement commercialisés sous forme des biopesticides pour contrôler les insectes en serre. Ces produits sont le BotaniGard® (*B. bassiana*), le BioCeres® G WP et G WB (*B. bassiana*) et le Met 52® (à base de *Metarhizium*) (Agriculture and Agri-Food Canada, 2016).

## 3.2 Biologie

Les champignons de l'ordre des Hypocreales sont des eucaryotes hétérotrophes avec des noyaux, des organites bien définis et une paroi cellulaire chitineuse. Comme ces champignons sont incapables de fixer le carbone et l'azote, ils doivent donc absorber les composés organiques provenant d'autres organismes. Ils peuvent avoir deux modes de vies, soit comme saprophytes, en consommant les matières organiques mortes, ou comme parasites des animaux, des plantes et autres champignons. Ces champignons sont caractérisés par deux types de reproduction, soit la reproduction asexuée (stade anamorphique) et la reproduction sexuée (stade téléomorphique). La reproduction sexuée est la fusion de deux noyaux par le processus méiotique qui permet d'obtenir une nouvelle combinaison de gènes. Cette possibilité de combinaison n'existe pas dans le cas de la reproduction asexuée. Cependant, la majorité des espèces de champignons utilisées en lutte microbiologique sont en mesure de faire une reproduction asexuée.

Ces champignons sont dimorphiques, puisqu'ils possèdent deux morphologies distinctes qui sont tributaires des conditions environnementales dans lesquelles ils croissent. Dans un cas, on retrouve les hyphes, un appareil végétatif sous forme des filaments, qui sont composés de plusieurs cellules ayant une paroi cylindrique autour de leur membrane plasmique. La ramification des hyphes forme le mycélium. D'autre part, on retrouve les conidiophores qui se forment sur la partie aérienne du mycélium. Ces structures contiennent des cellules infectieuses de forme sphérique ou ovale que l'on appelle les spores aériennes ou plus spécifiquement les conidies. Quelques champignons peuvent produire des cellules végétatives unicellulaires formées par le bourgeonnement des hyphes que l'on appelle les blastospores. Lorsqu'elles sont produites en milieu liquide riche en nutriments, on les appelle les blastospores *in vitro*, tandis que lorsqu'elles sont formées dans l'hémocèle des insectes on parle de blastospores *in vivo*. De plus, ces champignons peuvent également produire un autre type de spores en milieu liquide, les conidies submergées. Ces conidies sont issues du mycélium provenant d'une culture liquide, et elles sont similaires aux conidies aériennes en taille et en forme, mais leur morphologie de surface est différente (Thomas *et al.*, 1987).

Les champignons entomopathogènes sont ubiquitaires et peuvent être retrouvés dans presque tous les habitats où évoluent les insectes, incluant le sol et la litière forestière (Meyling & Eilenberg, 2007), sous l'écorce et dans l'eau (Vega *et al.*, 2012). La diversité de ces champignons varie selon les régions et les habitats. Par exemple, ils sont moins diversifiés

dans les forêts tempérées que celles tropicales (Aung *et al.*, 2008). En région tempérée, la diversité des champignons entomopathogènes en milieu forestier est relativement plus élevée que celle en milieu agricole. Quelques études ont démontré que *B. bassiana* est fréquemment retrouvé dans des milieux forestiers, tandis que *M. anisopliae* est souvent associé en milieu agricole (Quesada-Moraga *et al.*, 2007). Certains champignons appartenant aux genres *Beauveria*, *Metarhizium* et *Isaria* sont dominants chez les insectes du sol (Keller & Zimmerman, 1989).

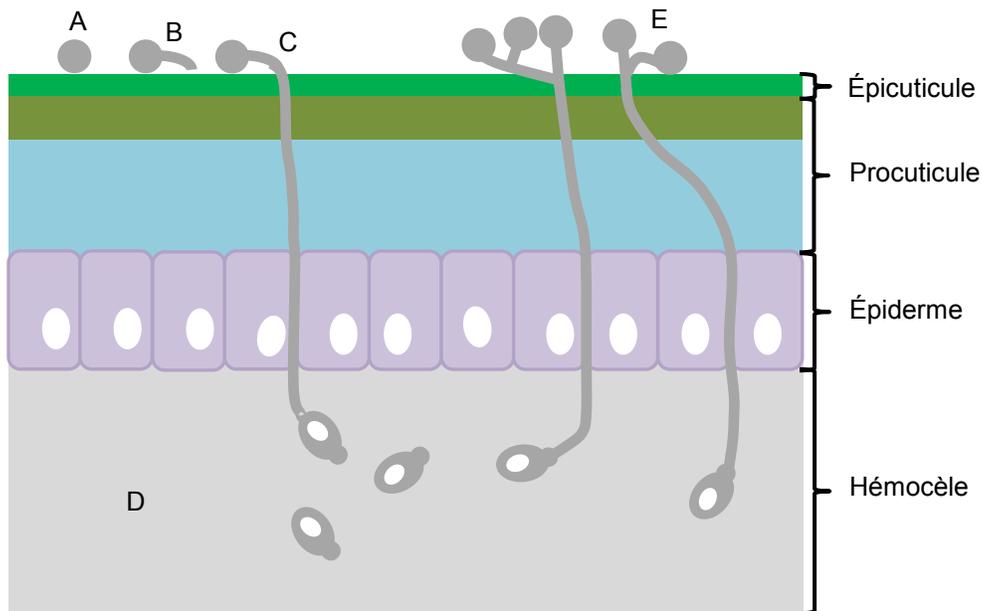
### 3.3 Spectre d'hôtes

La détermination d'un spectre d'hôtes des champignons entomopathogènes est nécessaire en lutte microbiologique. Hajek et Butler (2000) ont défini deux types de spectres d'hôtes : les spectres d'hôtes écologique et physiologique. Un spectre d'hôtes écologique réfère aux hôtes qui sont infectés par les champignons entomopathogènes en milieu naturel, tandis que le spectre d'hôtes physiologique fait référence aux insectes hôtes qui pourraient être infectés au laboratoire. Le spectre d'hôtes physiologique est couramment utilisé pour trouver un isolat fongique le plus virulent pour une espèce d'insecte en particulier. Cependant, il faut bien comprendre que les conditions expérimentales en laboratoire sont optimales, notamment en ce qui concerne l'humidité, la température et la photopériode, et qu'elles favorisent l'infection. Ainsi, les réponses observées en laboratoire ne sont pas toujours reproductibles sur le terrain.

Il est généralement admis que les champignons entomopathogènes montrent une grande variabilité sur la spécificité de leurs hôtes. Certains champignons ont un spectre d'hôte étroit et certains autres, notamment *B. bassiana* et *M. anisopliae*, présentent un spectre plus large. Selon Goettle (1995), un champignon entomopathogène ayant un spectre d'hôte étroit est souvent très virulent et obligatoire, et nécessitera qu'un petit nombre de conidies pour infecter l'hôte. En absence de ce dernier, il produit généralement des structures particulières, des spores dormantes, pour assurer sa survie. Dans les cas des champignons à large spectre d'hôtes, ils sont souvent capables de survivre comme saprophyte, et sont donc en mesure d'exploiter les ressources que leur procure des cadavres d'insectes (Vega *et al.*, 2009). En absence de leurs hôtes vivants, ils ne produisent aucune structure spéciale mais leurs conidies peuvent persister longtemps dans l'environnement.

### 3.4 Mode d'infection

Le mode d'infection principal des champignons entomopathogènes se fait par contact direct entre les conidies et la cuticule de l'insecte. La cuticule est une couche exosquelettique qui recouvre le corps des insectes. La cuticule est généralement constituée de deux parties principales, soit l'épicuticule et la procuticule (figure 3.1) (Klowden, 2007). Ces couches sont percées des canalicules qui débouchent sur l'extérieur pour former des pores. L'épicuticule est une couche mince (de 1 à 4  $\mu\text{m}$ ) mais complexe. Elle est fortement résistante à l'eau et aux solvants parce qu'elle est formée de lipides, de cires, de ciment, d'acides gras et de certains composés phénoliques (Nation, 2016). La procuticule est une couche épaisse composée de chitine dans une matrice de protéine. Elle représente jusqu'à 70% du poids sec de la cuticule (Clarkson & Charnley, 1996). La procuticule est divisée en deux couches distinctes, soit l'exocuticule et l'endocuticule.



**Figure 3.1 : Schématisation d'une coupe transversale de la cuticule d'un insecte et le mode d'infection d'un champignon entomopathogène.** L'infection fongique se fait directement par contact des conidies avec la cuticule des insectes. En effet, ce mode d'infection peut être résumé en quatre étapes principales, soit (A) l'adhésion des conidies; (B) la germination; (C) la pénétration des hyphes; (D) la prolifération interne par la formation des blastospores *in vivo*; et (E) la formation de la muscardine.

L'exocuticule est une couche très rigide qui se retrouve immédiatement au-dessous de l'épicuticule. L'endocuticule est une couche souple et flexible qui est composée de nombreuses fibrilles de chitines, des quinones et des protéines ayant une épaisseur qui varie de 10 à 20  $\mu\text{m}$  (Nation, 2016). Les types et la quantité des protéines cuticulaires peuvent varier selon les zones anatomiques de l'insecte ainsi que de son stades du développement (Willis *et al.*, 2005). Il existe une autre couche qui se trouve à la base de l'endocuticule appelée l'épiderme et qui est formée de deux couches de phospholipides. L'hémocèle, une cavité interne de l'insecte, se trouve juste au-dessous de l'épiderme.

L'infection fongique s'effectue en deux phases principales, soit la phase saprophytique et la phase pathogène. La phase saprophytique inclue l'adhésion des conidies à la surface de la cuticule des insectes et la formation de la muscardine. La phase pathogène comprend la germination des conidies, la pénétration des hyphes à travers les différentes couches de la cuticule et la prolifération interne (figure 3.1).

## **Adhésion**

L'adhésion des conidies est l'étape initiale de la mycose. En milieu naturel, les conidies fongiques entrent généralement en contact avec la cuticule des insectes par un processus passif, soit à l'aide du vent ou de l'eau. Selon Ortiz-Urquiza et Keyhani (2013), l'adhésion pourrait se réaliser en trois étapes consécutives, soit l'adsorption des conidies à la surface de la cuticule, l'adhésion de l'interface entre les conidies et l'épicuticule, la germination et le développement des conidies à la surface de la cuticule d'insectes. Les conidies adhèrent à la surface de la cuticule d'insectes grâce à des forces hydrophobes et des charges électrostatiques (Boucias *et al.*, 1988, Holder & Keyhani, 2005). De plus, certaines protéines, notamment la protéine adhésive MAD1 produite par les conidies de *M. anisoplaie* et l'hydrophobine produite par *B. bassiana*, jouent un rôle de médiatrice lors de l'adhésion des conidies à la surface de la cuticule (Hegedus *et al.*, 1992, Wang & St Leger, 2007). La protéine MAD1 participe également à la germination des conidies et à la formation des blastospores *in vivo*. Certains champignons entomopathogènes produisent des conidies recouvertes d'une substance gélatineuse de type polysaccharide, appelée le mucilage. Cette substance aide les conidies à s'attacher à leur substrat (Boucias *et al.*, 1988), les protège de la dessiccation et des toxines produites par les plantes (Nicholson *et al.*, 1989).

## Germination des conidies

La germination des conidies est une étape cruciale après l'adhésion. Lorsque les conditions sont favorables, les conidies commencent à germer en formant une des structures spécifiques, soit un tube germinatif ou un *appressorium*. Ces structures sont variées selon les espèces de champignons Hypocreales. Par exemple, les hyphes de *Lecanicillium lecanii* R. Zare & W. Gams (anciennement *Verticillium lecanii* (Zimmerman) Viegas) sont formés de tubes germinatifs, tandis que *M. anisopliae* et *B. bassiana* produisent l'hyphes à partir d'un *appressorium*. Un *appressorium* est formé à l'extrémité du tube germinatif, lequel sert de point d'ancrage, facilitant ainsi la pénétration des hyphes à travers la cuticule des insectes. Des signaux moléculaires intracellulaires, notamment l'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) et  $Ca^{++}$  peuvent jouer un rôle important dans le développement de l'*appressorium* chez certains champignons Hypocreales (St Leger *et al.*, 1990). De plus, certaines enzymes comme les endoprotéases et les aminopeptidases, sont également produites lors de la germination des conidies. Cependant, plusieurs facteurs peuvent influencer la germination. Ces facteurs incluent la température, l'humidité, les éléments nutritifs, ainsi que les facteurs physico-chimiques de l'hôte (Smith & Grula, 1981).

## Pénétration

Les champignons entomopathogènes ont besoin de pénétrer à travers la cuticule d'insectes jusqu'à l'hémocèle afin d'obtenir les nutriments requis pour leur développement et leur reproduction. La pénétration des hyphes s'effectue à l'aide des pressions mécaniques et enzymatiques (St Leger, 1993). Plusieurs enzymes extracellulaires, telles que les endonucléases, les protéases, les chitinases, les lipases, chitobiases et les estérases peuvent également être sécrétées par les hyphes afin de dégrader la cuticule de l'insecte (Boucias *et al.*, 1988, Schrank & Vainstein, 2010, St Leger, 1995). Par exemple, les protéines Pr1 et Pr2 sécrétées par *B. bassiana* possèdent une activité protéolytique contre plusieurs protéines produites par la cuticule des insectes (Campos *et al.*, 2005). Chez ce champignon, la chitinase est une enzyme essentielle pour la formation des hyphes et la conidiogenèse (Fan *et al.*, 2007, Peng *et al.*, 2009). De plus, ces enzymes permettent aux champignons d'absorber les éléments nutritifs et éventuellement coloniser les insectes.

## **Prolifération interne**

Lorsque les hyphes ont traversé les différentes couches de la cuticule et l'épiderme de l'insecte, ils forment des blastospores *in vivo* qui seront ensuite libérés à l'intérieur de l'hémocèle. Ces blastospores ont des structures unicellulaires où leur membrane cellulaire est remplacée par une couche mince au-dessus de la membrane plasmique. Pour que les champignons puissent proliférer dans l'hémocèle, ils doivent se confronter aux défenses immunitaires ainsi qu'à la compétition extra-spécifique avec la flore bactérienne et fongique de l'intestin de l'insecte (Boucias *et al.*, 1988). Au cours de l'évolution, les champignons ont acquis la capacité de produire plusieurs enzymes et toxines ayant des propriétés antibactériennes, antifongiques et insecticides. Parmi ceux-ci, on trouve la beauvericine, la bassianolide, les peptides cycliques beauverolides et les anniatines (Vey *et al.*, 2001), les destruxines et les cytochalasins (Bradfish & Harmer, 1990), les isarolides, le diketomorpholine bassiatine et l'oosporine (Xu *et al.*, 2008). Finalement, la mortalité des insectes peut être influencée par de nombreux facteurs, notamment les dommages mécaniques provoquant une invasion des tissus, l'épuisement des ressources nutritives et l'intoxication induite par les toxines des champignons entomopathogènes.

## **Formation de la muscardine**

Une fois que l'insecte meure et lorsque les conditions sont favorables, des hyphes émergent à travers les couches de l'exosquelette et les soudent ensemble. Ils traversent donc le tégument aux points d'articulation de l'insecte où l'exosquelette est plus souple. Éventuellement, ces hyphes recouvrent et entourent complètement l'insecte, structure que l'on nomme la muscardine. La présence de muscardine est un signe permettant de diagnostiquer une mycose chez l'insecte. Il existe plusieurs types de muscardines selon les espèces fongiques. Par exemple, la muscardine blanche pour *B. bassiana* et la muscardine verte pour *M. anisopliae*. Comme indiqué précédemment, il y a la formation des conidies à l'extrémité aérienne des hyphes. À maturité, ces conidies seront libérées dans l'environnement, leur permettant ainsi d'entreprendre le nouveau cycle d'infection.

### 3.5 Efficacité des champignons entomopathogènes

La susceptibilité des insectes aux champignons entomopathogènes est influencée par plusieurs facteurs par exemple la morphologie, la physiologie de l'hôte et l'environnement (Inglis *et al.*, 2001). Les insectes stressés sont généralement plus susceptibles aux pathogènes que ceux non stressés (Vago, 1963). Ces stressés peuvent être causés par le manque de nourriture ainsi que par les blessures mécaniques ou chimiques. De plus, la susceptibilité des insectes peut varier selon les stades de développement des insectes. Les insectes immatures sont souvent plus susceptibles aux infections fongiques que les insectes matures (Feng *et al.*, 1985). Par exemple, les jeunes larves des pyrales du maïs, *Ostrinia nubilalis* Hübner, sont plus susceptibles à *B. bassiana* que les larves du dernier stade. Contrairement aux observations de l'équipe de Feng (1985), les adultes des thrips des petits fruits, *Frankliniella occidentalis* Pergande, sont plus susceptibles à *V. lecanii* que les larves (Vestergaard *et al.*, 1995). La densité d'insectes semble aussi être un facteur important dans la propagation de mycose au sein d'une population d'insectes. Plus la densité est élevée, plus la probabilité que ces insectes entrent en contact avec un pathogène fongique augmente. Par exemple, les insectes sociaux tels que les termites présentent théoriquement un risque élevé d'infection par un pathogène parce que plusieurs individus cohabitent dans le même habitat.

Les insectes possèdent généralement plusieurs récepteurs sensoriels, notamment les chimiorécepteurs (gustatif et olfactif), les mécanorécepteurs (tactile et vibration) et les récepteurs de température, etc. (Nation, 2016). Ces récepteurs peuvent fournir de l'information sur plusieurs changements dans leur environnement, incluant la présence d'agents microbiens à la surface de leur. Cette capacité de reconnaître ces informations est un des facteurs importants qui peut influencer l'efficacité d'applications des champignons entomopathogènes en lutte biologique (Baverstock *et al.*, 2010). C'est notamment le cas du scarabée japonais, *Popillia japonica* Newman, dont les larves sont capables de détecter la présence du champignon *M. anisopliae* dans le sol. D'autres insectes vont modifier leur comportement afin de réduire le succès de l'établissement de l'infection fongique (Chouvenc *et al.*, 2008). Par exemple, plusieurs espèces de termites sont susceptibles aux champignons *B. bassiana* et *M. anisopliae*, mais l'utilisation de ces deux champignons comme agents de lutte microbiologique est encore problématique à cause du style de vie et des comportements de ces termites (Staples & Milner, 2000). En effet, elles sont capables de se débarrasser des conidies en se faisant un toilettage que l'on nomme «*grooming*» en anglais. D'autre part, des insectes ont développés des stratégies de défense contre certains isolats fongiques (Cremer *et al.*,

2007), laissant sous-entendre que la réponse des insectes aux champignons entomopathogènes est modulée par leur reconnaissance. Ainsi, le cricket *Scapteriscus vicinus* Scudder soumis à *B. bassiana* évite l'isolat DB-2 en creusant un tunnel de détours, mais ce comportement n'est pas observé en présence de l'isolat 10-22 (Thompson & Brandenburg, 2005).

L'efficacité de l'infection fongique chez les insectes est également influencée par certains facteurs environnementaux. Ces facteurs sont les radiations solaires, la température, la teneur en eau, les précipitations et le vent. Le spectre solaire contient des radiations électromagnétiques à différentes longueurs d'onde. Les conidies et les hyphes des champignons entomopathogènes sont très sensibles aux radiations solaires, surtout aux ultraviolets B (UVB) avec un spectre de 285 à 315 nm. Cependant, cette sensibilité varie entre les espèces fongiques et les conidies d'un même isolat. En effet, les conidies de *M. flavoviridae* Gam & Roszypal sont les plus résistantes aux UVB artificiel d'un spectre variant de 230 à 1100 nm, suivi des isolats de *B. bassiana*, *M. anisopliae* et *I. fumosoroseus* Wize (Fargues *et al.*, 1996).

La température ambiante est un des facteurs importants qui influence l'efficacité des champignons entomopathogènes. La température optimale pour la germination, le développement et la sporulation de la plupart de ces champignons se situe entre 20 et 30°C (Fargues *et al.*, 1997a), mais l'infection peut avoir lieu à des températures variant entre 15 et 30°C (Inglis *et al.*, 2001). Certains isolats fongiques sont actifs à de très basses températures, où les insectes sont souvent inactifs. Par exemple, Doberski (1981) a traité des scolytes des ormes avec un isolat de *B. bassiana* et a observé une infection même à une température de 2°C. Bien que les champignons entomopathogènes puissent infecter les insectes à différentes températures, leur degré de virulence peut aussi varier. L'équipe de Fargues (1997b) a démontré que quatre isolats de *M. anisopliae* var. *acridum* induisaient les mêmes mortalités chez le criquet pèlerin, *Schistocerca gregaria* Forsskal, soit entre 98 et 100%, à 25 et 30°C. Cependant, aucune mortalité n'était observée à 40°C. Par contre, à 35°C, la mortalité de ces insectes variait significativement entre les quatre isolats testés.

L'humidité peut influencer l'efficacité des champignons entomopathogènes de plusieurs façons. En combinaison avec la température, l'humidité peut affecter la germination des conidies, le développement des hyphes et la sporulation sur les cadavres d'insectes (Jaronski, 2010). Cependant, le pourcentage d'humidité nécessaire pour le processus d'infection varie selon les espèces et les isolats (Benz, 1987, Roberts & Campbell, 1977). Par exemple, certains isolats de

*B. bassiana* requièrent une humidité de 92% et plus pour la croissance du mycélium sur la cuticule d'insecte (Ferron, 1977), alors que d'autres isolats peuvent croître dans des conditions plus arides. Dans certains cas, uniquement l'humidité présente à la surface de la cuticule est suffisante pour faire croître certains isolats de *B. bassiana* (Fargues *et al.*, 1997b, Faria & Wraight, 2001).

### 3.6 Transmission des champignons entomopathogènes

La transmission est un phénomène essentiel qui détermine le taux de propagation des champignons entomopathogènes dans une population d'insectes (Steinkraus, 2006). Cette dispersion est la partie la plus périlleuse du cycle biologique d'un champignon (Hajek & St Leger, 1994). Elle peut se faire horizontalement au sein d'une même d'espèce d'insectes ou d'espèces différentes de la même génération ou verticalement entre les générations d'une même espèce. Cette transmission repose largement sur le fait que les champignons agissent par contact avec la cuticule d'insectes. La transmission horizontale de champignons entomopathogènes entre les espèces différentes est possible par la présence d'insectes vecteurs qui sont susceptibles ou non à l'infection fongique. Par exemple, certaines espèces d'hyménoptères telles que le bourdon fébrile, *Bombus impatiens* Cresson et les abeilles à miel, *Apis mellifera* L., ont été utilisées comme vecteurs de champignons entomopathogènes pour lutter contre les insectes ravageurs dans les serres (Al-Mazra'awi *et al.*, 2006, Carreck *et al.*, 2007).

La transmission horizontale effectuée entre les individus d'une même espèce peut se faire par le contact direct, c'est-à-dire entre les individus contaminés et ceux non contaminés, ou indirectement via les conidies déposées sur le substrat (Quesada-Moraga *et al.*, 2008, Roy & Pell, 2000, Vega *et al.*, 2000). Néanmoins, la transmission directe semble plus efficace que la transmission indirecte. De Kesel (1995) a comparé ces deux méthodes de transmission du champignon *Laboulbenia slackensis* Cépède & Picard chez le carabe, *Pogonus chalceus* (Marsham). Il a remarqué que le taux de dissémination fongique était plus élevé en transmission directe qu'indirecte, puisque la probabilité que les insectes contaminés entrent en contact avec les insectes sains est beaucoup plus grande que lorsque les conidies sont déposées dans le sol. De plus, en 2004, Kreutz et son équipe (2004b) ont démontré que la transmission de *B. bassiana* par un mâle de scolyte européen de l'épinette, *I. typographus*, à une femelle saine s'effectuait dès le premier contact. La mortalité observée était de 75% lorsque le ratio des individus traités : non-traités était de 1 pour 20. Le taux de mortalité a

augmenté à 90% avec un ratio traité : non-traité de 1 pour 1 (Kreutz *et al.*, 2004b). De Kesel (1995) a obtenu des résultats similaires chez les termites, *C. formosanus*. La transmission directe entre les mâles et les femelles peut être potentiellement exploitée en lutte microbiologique en libérant des mâles traités avec un champignon entomopathogène au sein d'une population (Toledo *et al.*, 2007).

Même si les champignons entomopathogènes envahissent leurs hôtes directement à travers la cuticule, les méthodes d'inoculation fongique restent un défi majeur. La méthode d'inoculation la plus utilisée est certainement par la pulvérisation; les conidies étant généralement formulées en suspension liquide ou en poudre (Behle, 2006, Hajek *et al.*, 2006, Kreutz *et al.*, 2004b, Liu & Bauer, 2006). Ces méthodes sont efficaces contre les insectes du feuillage ou de surface. Par contre, elle ne peut être déployée pour des insectes ayant des comportements cryptiques. Dans ce contexte, plusieurs recherches ont porté sur le développement de méthodes d'inoculation directe en utilisant un dispositif d'autodissémination (Baverstock *et al.*, 2010). Ces approches visent à attirer les insectes dans un dispositif contenant une chambre de contamination afin d'être inoculés par le champignon entomopathogène.

Dans les dernières années, en se basant sur le comportement de certains insectes cibles, quelques dispositifs d'autodissémination ont été développés. Ces dispositifs présentent plusieurs avantages surtout lorsque les phéromones spécifiques à l'hôte sont intégrées (Lyons *et al.*, 2012, Vega *et al.*, 2000, 2007, Vickers *et al.*, 2004, Yasuda, 1999). Ces avantages comprennent leur spécificité à l'espèce ciblée, leur simplicité de construction et d'entretien, leur faible coût de production ainsi que la possibilité d'une dispersion de l'agent fongique au sein de la population à partir d'insectes infectés. Ainsi, un dispositif d'autodissémination a été utilisé pour contrôler les populations de certaines espèces des coléoptères (Dowd & Vega, 2003, Lyons *et al.*, 2012, Shimazu, 2004, Vega *et al.*, 1995, Vega *et al.*, 2007), des diptères (Maniania *et al.*, 2011) et des lépidoptères (Pell *et al.*, 1993). Par exemple, en Europe, l'équipe de Kreutz (2004b) a utilisé des pièges modifiés contenant des poudres de *B. bassiana* pour inoculer les populations du scolyte européen de l'épinette, *I. typographus*. De plus, les pièges Lindgren modifiés ont été utilisés pour inoculer *B. bassiana* chez l'agrile du frêne, *Agilus planipennis* Fairmaire (Lyons *et al.*, 2012), chez les dendrotones de l'épinette, *D. rufipennis*, et chez les grands hylésines des pins, *Tomicus piniperda* L. (Lavallée *et al.*, 2010).

### 3.7 Détection de la présence des champignons entomopathogènes

Le diagnostic d'une mycose causée par un champignon entomopathogène est généralement basé sur la présence de la muscardine à la surface de la cuticule des insectes. Dans le contexte du suivi des infestations, cette méthode requiert beaucoup de temps d'attente puisque la formation de la muscardine est un processus lent, lequel nécessite des conditions favorables à son expression. De plus, ce délai peut favoriser la croissance d'autres champignons, tels que les champignons saprophytes. Ce phénomène peut compromettre l'identification de l'agent causant la mortalité puisque son absence à la surface de l'insecte n'est pas gage d'absence de la contamination par un champignon entomopathogène. D'autre part, si les conditions requises à l'expression de la muscardine ne sont pas présentes, son absence à la surface de la cuticule des insectes n'est pas un gage de l'absence d'une contamination par un champignon entomopathogène traité. En conséquence, l'utilisation d'un test de diagnostic basé sur les outils de biologie moléculaire s'avère essentielle.

Le diagnostic par la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) est une méthode performante et polyvalente permettant d'identifier et de caractériser des champignons entomopathogènes. Cette méthode de diagnostic peut être utilisée pour l'identification et la différenciation des champignons au niveau des espèces (Entz, 2005), des genres (Castrillo *et al.*, 2003, Destéfano *et al.*, 2004) ou des isolats (Schneider *et al.*, 2011). À l'aide d'amorces spécifiques, la PCR amplifie un gène (un locus) ou des gènes (les multiloci) ou un fragment d'un gène d'un champignon cible.

Les gènes codants pour les ARN ribosomiaux sont des marqueurs moléculaires importants largement utilisés pour les analyses phylogénétiques des champignons (Bruns *et al.*, 1991, Destéfano *et al.*, 2004). Ces gènes sont présents en plusieurs copies dans le génome, et ils sont regroupés en unités. Chaque unité est composée des gènes 18S, 5,8S et 28S et deux régions de l'espaceur interne transcrit (ITS1 et ITS2). Ces unités de gènes sont reliées les unes aux autres par une région intergénique (IGS). Les gènes de chaque unité contiennent des régions conservées et variables (Fouly *et al.*, 1997). Par exemple, les gènes 18S et 28S sont des régions les plus conservées et sont largement utilisées pour différencier les genres et les espèces, tandis que les ITS et IGS présentent beaucoup de variabilités et sont utilisés pour identifier les espèces ou les isolats de la même espèce (Babu *et al.*, 2007, Destéfano *et al.*, 2004, Garrido-Jurado *et al.*, 2011, Karobecna, 2007, Martin & Rygielwicz, 2005, Sabbahi *et al.*, 2009). D'autres loci, tels que le facteur d'élongation 1- $\alpha$  (EF-1 $\alpha$ ),  $\beta$ -tubulin (Inglis *et al.*, 2012) ou

le locus B de la région intergénique (Kyei-Poku, communication personnelle), ont également été utilisés pour différencier plusieurs espèces ou isolats des champignons de l'ordre des Hypocreales.



## CHAPITRE 4 : BUT ET HYPOTHÈSES

Le but de ce projet de recherche consiste à évaluer l'impact de la transmission horizontale d'un champignon entomopathogène sur la biologie reproductive d'une espèce d'insecte monogame subcortical, *Dendroctonus simplex*.

L'hypothèse principale du projet de recherche est que la transmission horizontale des champignons entomopathogènes est une stratégie de lutte permettant de contrôler les populations d'insectes subcorticaux. Plus précisément, les travaux de recherche visent à vérifier si :

- La susceptibilité des adultes de *D. simplex* aux champignons entomopathogènes varie en fonction des isolats auxquels ils sont soumis;
- L'utilisation d'un dispositif d'autodissémination est une méthode d'inoculation fongique induisant la mortalité chez *D. simplex*;
- Les adultes de *D. simplex* peuvent détecter la présence de champignons entomopathogènes;
- La contamination des adultes par un champignon entomopathogène induit des changements sur la biologie reproductive de *D. simplex*.

Plusieurs objectifs ont été émis afin de répondre à ces hypothèses :

- Sélectionner l'isolat potentiel des champignons entomopathogènes appartenant à l'ordre des Hypocreales pour lutter contre les adultes de *D. simplex*;
- Évaluer la pathogénicité et la virulence de l'isolat sélectionné chez les adultes de *D. simplex*;
- Évaluer la charge fongique et le taux d'infection des adultes de *D. simplex* suite à leur passage à travers une chambre de contamination;
- Évaluer les réponses chimiotactiques des adultes de *D. simplex* aux champignons entomopathogènes;
- Évaluer l'effet de l'infection par les champignons entomopathogènes sur la biologie reproductive de *D. simplex*.



# CHAPITRE 5 : MATÉRIEL ET MÉTHODES

## 5.1 Insectes

### 5.1.1 Sites de récolte

Deux sites de récolte des insectes ont été sélectionnés lors de cette étude sur la base des attaques observées sur les arbres. Le premier est une plantation de mélèze âgée d'une trentaine d'années, situé à l'arboretum de Cleveland appartenant au ministère des Ressources naturelles et de la Faune et Parc du Québec (Saint-Claude, Qc, Canada; latitude 45,6809 et longitude -71,9969). Le deuxième site est situé sur un terrain privé à Sainte-Catherine-de-la-Jacques-Cartier (Qc, Canada; latitude 46,830810 et longitude -71,571361). Dans les deux cas, le prélèvement d'insectes et de sections de bûches s'est fait avec le consentement des autorités gouvernementales et du propriétaire.

### 5.1.2 Degré-jour

Le degré-jour (DJ) est un modèle mathématique utilisé pour calculer l'accumulation de chaleur et permettant entre autres de prédire les activités de vol des insectes. La mesure de la valeur de degré-jour est calculé en se basant sur la formule standard d'Arnold (1959) :

$$\text{Degré-jour} = (T_{\max} + T_{\min})/2 - T_{\text{base}}$$

Où  $T_{\max}$  est la température ambiante journalière maximum;  $T_{\min}$  est la température ambiante journalière minimum; et  $T_{\text{base}}$  est la température du seuil de développement minimum des insectes.

Les bases de données de la température ambiante du site web d'Environnement Canada ([https://meteo.gc.ca/city/pages/qc-136\\_metric\\_f.html](https://meteo.gc.ca/city/pages/qc-136_metric_f.html)) pour la station météorologique de la ville de Sherbrooke ont été utilisées pour le calcul des degrés- jours. Afin d'obtenir les informations plus précises, plusieurs  $T_{\text{base}}$  ont été utilisées lors de ces calculs, soit aux bases 4, 5, 7,5 et 10.

Ces  $T_{base}$  sont fréquemment utilisées comme température seuil de développement de plusieurs espèces d'insectes subcorticaux (Langor & Raske, 1987a, Mckee & Aukema, 2015, Pruess, 1983). Parallèlement, les degrés-jours cumulés (DJC) ont aussi été calculés pour chaque  $T_{base}$ , afin de déterminer le début de la période de vol des adultes de *D. simplex*. Du côté terrain, 13 pièges du type Lindgren composés de 12 entonnoirs (Synergy Semiochemicals, Colombie-Britannique) appâtés de seudenol (Synergy Semiochemicals, Colombie-Britannique) et d' $\alpha$ -pinène ont été aléatoirement installés dans l'arboretum de Cleveland au cours de trois années consécutives, soit du printemps à la fin de l'été des années de 2012, 2013 et 2014. Les insectes ont été récoltés et dénombrés sur une base quotidienne.

### 5.1.3 Méthodes de récolte

Deux types de récoltes ont été effectuées durant ce projet, soit par le piégeage et le décortilage. Pour la première méthode, les pièges du type Lindgren appâtés de seudenol et d' $\alpha$ -pinène ont été aléatoirement installés afin de capturer les insectes durant la période de vol du printemps (figure 5.1A). La mise en place des pièges a été déterminée en fonction de l'accumulation de degrés-jour. Les insectes capturés ont été conservés à 4°C au laboratoire jusqu'à leur utilisation. La seconde méthode consistait à sélectionner aléatoirement des arbres infestés, les couper en tronçons et les transporter au laboratoire. Une fois au laboratoire, chaque extrémité des tronçons a été ciré avec de la cire à greff (Dilmont Inc., Montréal, Toronto), afin de réduire la dessiccation du bois. Les tronçons ont été conservés à 4°C jusqu'au décortilage permettant d'extraire les adultes de *D. simplex*. Lors du décortilage, l'écorce du mélèze a été soigneusement enlevée et les insectes ont été récoltés à l'aide d'une pince entomologique, laquelle était stérilisée à l'éthanol 70% entre chaque individus (figure 5.1B).



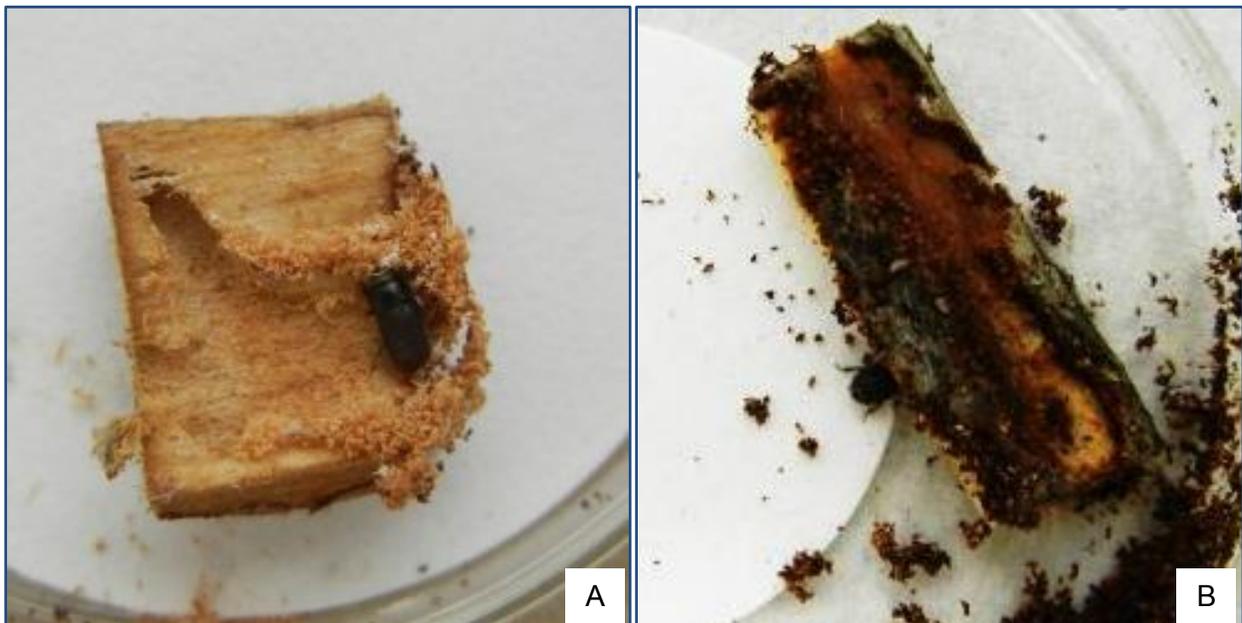
**Figure 5.1 : Différentes méthodes de récoltes des adultes de *Dendroctonus simplex*.** (A) Piégeage et (B) Décortiquage.

#### 5.1.4 Élevage des insectes

Deux volets méthodologiques ont eu à être développés afin de faire l'élevage des adultes de *D. simplex* au laboratoire. Le premier volet était de sélectionner la nourriture idéale permettant d'assurer la bonne survie des insectes et ce le plus longtemps possible, afin de réduire la variabilité causée par la mortalité entre les répliques expérimentaux. L'élevage a été effectué avec deux substrats alimentaires : les écorces du tronc d'arbre et les branches du mélèze laricin. Les écorces ont été coupées en petits morceaux (1,2 cm de longueur et 1,2 cm de largeur) et en section de 1,2 cm de longueur et 0,6 cm de diamètre pour les branches. Pour chaque substrat, 24 insectes ont été placés individuellement dans des boîtes de Petri (50 x 9mm, BD Falcon™) contenant un papier filtre (3,2 cm, Whatman International Ltd, Midstone, USA) humecté avec 120 µl d'eau distillée stérile, permettant ainsi de maintenir l'humidité (figure 5.2). L'élevage a été réalisé dans une chambre environnementale (MLR-350, Sanyo, Osaka, Japon) en conditions contrôlées (20°C, 70% d'humidité et à la noirceur). Ces

expériences ont été effectuées en triplicatas. Le nombre d'adultes de *D. simplex* ayant survécus dans les deux conditions de régimes alimentaires a été enregistré à chaque 24 heures. Les données recueillies suite aux tests d'élevage ont été analysées à l'aide d'un test de comparaison de Student (test de *t*), afin de déterminer s'il existe des différences significatives de la survie des adultes de *D. simplex* entre les deux régimes alimentaires (écorce versus branche du mélèze) (SAS version 9.2, SAS Institute Inc.). Pour l'ensemble des analyses, le seuil de signification a été établi à une valeur  $\alpha < 0,05$ .

Le deuxième volet était d'étudier le développement complet du dendroctone du mélèze. Pour ce faire, un mâle et une femelle de *D. simplex* ont été introduits dans une boîte de Petri contenant un papier filtre humide et une section de branche du mélèze agissant comme substrat alimentaire. Ces insectes ont été placés dans les mêmes conditions que le test d'élevage. Le nombre d'œufs pondus, de larves, de pupes et d'adultes a été enregistré. Pendant la période d'observation, la nourriture et 120  $\mu$ l d'eau distillée stérile ont été ajoutés hebdomadairement et les expériences ont été répétées 25 fois.



**Figure 5.2 : Différents substrats alimentaires utilisés pour élever les adultes de *D. simplex*.** (A) Écorce du mélèze et (B) Section de branche du mélèze.

## 5.2 Isolats fongiques

Les isolats des champignons entomopathogènes utilisés lors de cette étude proviennent de la banque de champignons de l'INRS-Institut Armand-Frappier (Laval, Canada), qui compte plus de 400 isolats. Ces isolats sont conservés à -80°C dans du glycérol 70%. Sur la base d'un test préliminaire sur la virulence de 18 isolats fongiques (résultats non publiés), neuf ont été considérés pour sélectionner celui le plus virulent. Ces champignons font partie de trois espèces différentes, soit *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* et *Lecanicillium attenuatum* (tableau 5.1). Le choix de ces espèces et de ces isolats est basé sur leur origine géographique et leur hôte principal.

**Tableau 5.1 : Liste des isolats de champignons Hypocreales utilisés pour le test de criblage.** Ces isolats ont été choisis en fonction d'origines géographiques ou d'hôtes sur lesquels ils ont été isolés.

Espèce	Isolat	Hôte/Substrat	Autres références	Origine géographique
<i>Beauveria bassiana</i>	INRS-200	<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	252 ARSEF	Maine, États-Unis
<i>Beauveria bassiana</i>	INRS-242	<i>Tomicus piniperda</i>	INRS-CFL	Québec, Canada
<i>Beauveria bassiana</i>	INRS-243	<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	INRS-IP	Québec, Canada
<i>Beauveria bassiana</i>	INRS-452	<i>Dendroctonus simplex</i>	NRCAN-Val.Bb2	Québec, Canada
<i>Beauveria bassiana</i>	INRS-453	<i>Dendroctonus simplex</i>	NRCAN-TN6-Bb	Québec, Canada
<i>Beauveria bassiana</i>	INRS-462	<i>Dendroctonus simplex</i>	-	Québec, Canada
<i>Metarhizium anisopliae</i>	INRS-704	Sol	UAMH 9197	Ontario, Canada
<i>Lecanicillium attenuatum</i>	INRS-1506	<i>Dendroctonus simplex</i>	NRCAN-PN069A	Québec, Canada
<i>Lecanicillium attenuatum</i>	INRS-1511	<i>Dendroctonus simplex</i>	NRCAN-PN077C	Québec, Canada

ARSEF : Agriculture Research Service of Entomopathogenic Fungi, USDA, Ithaca, New York, USA.

INRS : Institut National de la Recherche Scientifique, Laval, Québec, Canada.

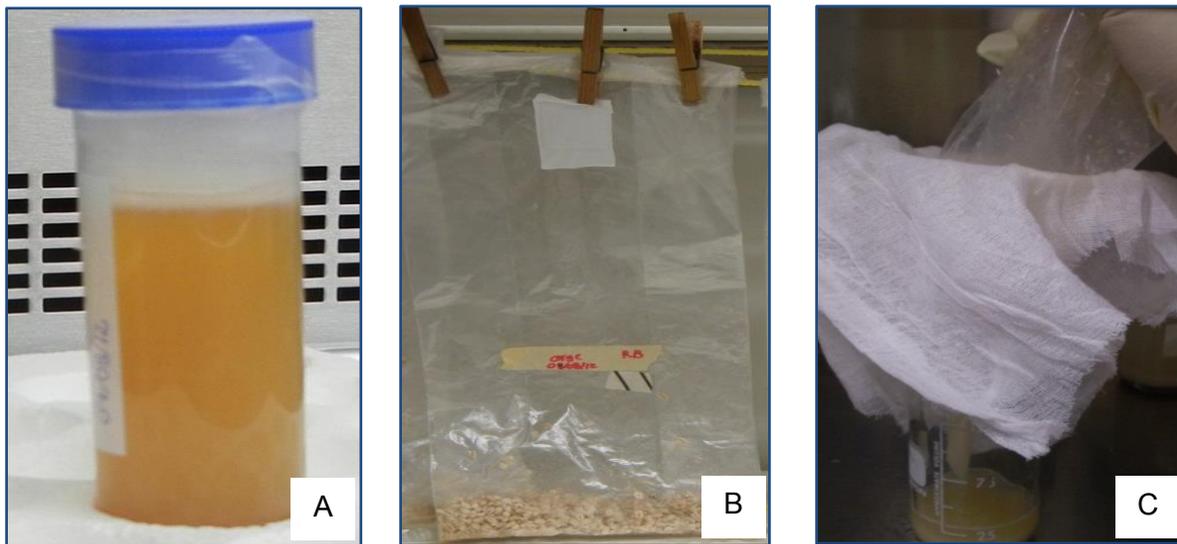
NRCAN : Natural Resources Canada, Sainte-Foy, Québec, Canada.

UAMH : University of Alberta Microfungus Collection and Herbarium, Edmonton, Alberta, Canada.

### 5.2.1 Production des suspensions mères

Plusieurs milieux de culture peuvent être utilisés pour la production des champignons entomopathogènes. Les milieux liquides sont fréquemment utilisés lors de la première phase de la production de masse. De son côté, la production sur des milieux solides est très avantageuse lorsqu'une grande quantité de matériel est requise. Dans ce contexte, la méthode de production fongique a été réalisée en modifiant celle décrite par Srei (2011). Il s'agit d'une production en deux phases, soit la production dans un milieu dextrosé à la pomme de terre (*Yeast Extract Potato Dextrose*, YPD : 10 g d'extrait de levure, 20 g de peptone et 20 g de dextrose; Alpha Biosciences Inc., USA) (figure 5.3A) suivi d'une production de masse des conidies par une fermentation sur un milieu solide (figure 5.3B). La production en milieu YPD permet aux champignons de produire des blastospores. Ces champignons ont été incubés pendant quatre jours sous agitation (150 rpm) à une température de 25°C. Le matériel a été conservé à 4°C jusqu'à son utilisation pour la production des conidies. Par fermentation en milieu solide, la production a été réalisée dans des sacs stérilisables munis d'un filtre de 0,22 µm, permettant les échanges gazeux durant la production (Fungi Perfecti, Olympia, WA, USA). Pour chacun des isolats, trois sacs contenant chacun 100 g d'orge perlé (Nith River Milling Inc., Linwood, Ontario, Canada) et 100 ml d'eau distillée ont été stérilisés à 121°C durant 20 minutes.

Après une nuit de refroidissement à la température de la pièce, les substrats ont été incubés avec 10 ml des blastospores de chacun des isolats sélectionnés. Ils ont par la suite été incubés dans une chambre environnementale en conditions contrôlées (25°C, 70% d'humidité et obscurité complète). Après 14 jours d'incubation, un volume de 200 ml d'eau distillée stérile a été ajouté dans chacun des sacs de production. Suite à un brassage vigoureux, les conidies ont été extraites à travers de trois couches d'étamines afin d'enlever le résidu d'hyphe et d'orge (figure 5.3C). La concentration des conidies de chaque isolat fongique a été déterminée sous le microscope en utilisant un hématimètre avant leur utilisation pour les différentes expériences.

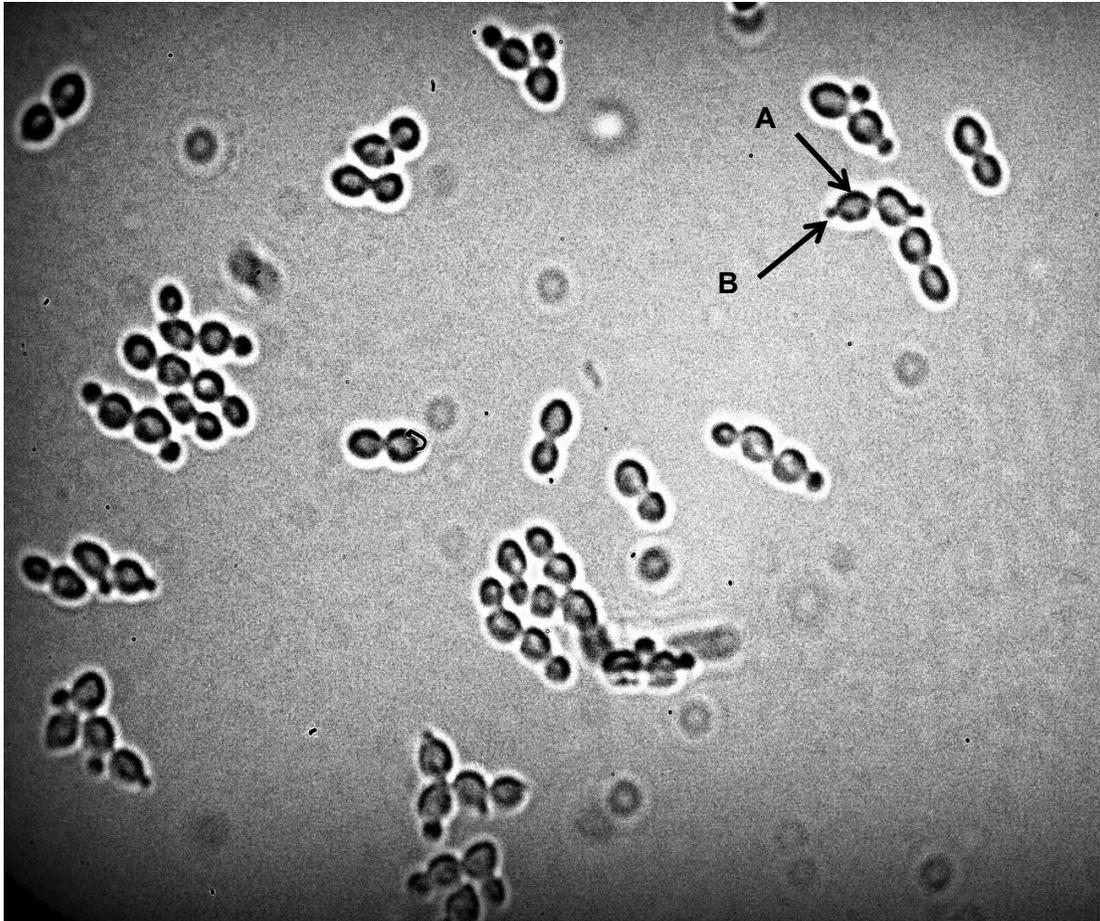


**Figure 5.3 : Différentes étapes de la production des champignons entomopathogènes.** (A) Production en milieu liquide; (B) Production par la fermentation; et (C) Extraction des conidies.

### 5.2.2 Viabilité des conidies

La viabilité des conidies de chaque isolat a été évaluée par le décompte des conidies germées et non germées en suivant la méthode de Meylin et Pell (2006). Pour chaque isolat, 20  $\mu\text{l}$  d'une concentration de  $1 \times 10^8$  conidies  $\text{ml}^{-1}$  a été étalé sur un milieu gélosé au dextrose (*Sabouraud Dextrose Agar*, SDA : 10 g de peptone, 40 g de dextrose, 2 g d'extrait de levure et 15 g d'agar-agar; Difco Laboratoires, Mannheim, Allemagne), suivi par une incubation pendant 36 heures à 20°C et à la noirceur. Pour chaque boîte, trois zones différentes ont été aléatoirement sélectionnées. Afin d'augmenter l'efficacité de la visualisation, une goutte d'eau distillée a été déposée sur chacune des zones sélectionnées. Pour chaque zone, 100 conidies (incluant les conidies germées et non germées) ont été comptées sous le microscope. De façon générale, les conidies sont considérées germées lorsque le tube germinatif atteint une longueur équivalente ou supérieure au diamètre de la conidie examinée (Inglis *et al.*, 2012). Plus particulièrement chez les isolats de *B. bassiana*, la présence d'une structure gonflée sur les conidies est considérée comme conidies germées (figure 5.4). Cette structure ressemble au bourgeonnement chez les levures. Pour chacun des isolats, trois boîtes ont été incubées et le pourcentage des conidies germées a été calculé afin d'évaluer la viabilité des conidies.

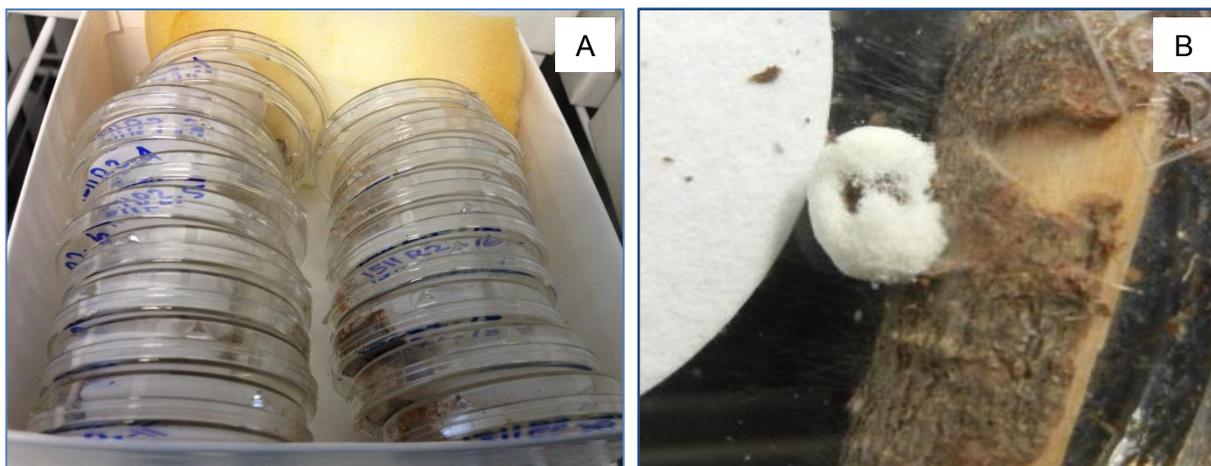
Les données du pourcentage de germination ont été soumises à une analyse de variance, ANOVA, afin de vérifier s'il y a une variation significative de viabilité entre les isolats testés (SAS version 9.2, SAS Institute Inc.). Les moyennes de viabilité a ensuite été assujettie à des comparaisons multiples du type Duncan afin d'identifier les variations. Lors de ces analyses, le seuil de signification a été établi à une valeur  $\alpha < 0,05$ .



**Figure 5.4 : Germination des conidies de *Beauveria bassiana* après 36h d'incubation à 20°C.** Une conidie dite germée lorsqu'elle présente une structure gonflée qui ressemble au bourgeonnement chez les levures. (A) Conidie et (B) Tube germinatif.

### 5.3 Criblage

Afin de sélectionner le champignon le plus virulent contre les adultes de *D. simplex*, un criblage a été réalisé en utilisant neuf isolats fongiques (tableau 5.1). Les différentes étapes effectuées lors du test sont résumées dans la figure 5.5. Pour chaque isolat, 20 insectes issus de l'élevage ont été inoculés par immersion pendant 10 secondes dans 10 ml de suspensions fongiques avec une concentration de  $1 \times 10^8$  conidies  $\text{ml}^{-1}$ . Après l'inoculation fongique, les insectes ont été individuellement placés dans des boîtes de Petri (50 x 9 mm, BD Falcon™) contenant une section de branche du mélèze et un papier filtre (3,2 cm, Whatman International Ltd., Maidstone, USA). Les papiers filtres ont été humectés avec 120  $\mu\text{l}$  d'eau distillée stérile afin de maintenir l'humidité à l'intérieur de la boîte. Ces boîtes de Petri ont ensuite été regroupées et rangées verticalement dans des boîtes de carton (20 insectes/isolat/boîte) (figure 5.5A). Pour l'ensemble des expériences, les insectes traités ont été incubés dans la chambre de croissance en conditions contrôlées (20°C, 70% d'humidité, noirceur complète). La mortalité de *D. simplex* a été enregistrée quotidiennement pendant 10 jours. La mycose a été confirmée en plaçant les cadavres de *D. simplex* dans une chambre de croissance pour un autre 14 jours.



**Figure 5.5 : Différentes étapes du test de criblage des isolats fongiques chez les adultes du dendroctone du mélèze.** (A) Incubation en position vertical dans une chambre environnementale et (B) Insecte couvert par la muscardine.

L'apparition de la muscardine sur les cadavres, symptôme d'une infection mycosique (Vandenberg *et al.*, 1998), a été notée après cette période (figure 5.5B). Les insectes du groupe témoin, constitués de 20 insectes, ont été immergés dans 10 ml d'eau distillée stérile. Ils ont été maintenus dans les mêmes conditions décrites précédemment. Toutes les expériences ont été répétées trois fois. La sélection de l'isolat fongique le plus performant est basée sur le résultat du pourcentage de mortalité cumulée observé après 10 jours de l'inoculation et sur le pourcentage de viabilité des conidies.

Pour chaque isolat testé, le pourcentage de mortalité cumulée a été corrigé en appliquant la formule Abbott (1925), afin de tenir compte de la mortalité naturelle observée dans la cohorte des insectes témoins. Les données corrigées ont été ensuite soumises à une analyse de variance, ANOVA, afin de vérifier s'il y a une variation significative de mortalité entre les données observées pour tous les isolats testés (SAS version 9.2, SAS Institute Inc.). La moyenne de mortalité a ensuite été soumise à des comparaisons multiples du type Duncan dans le but d'identifier les variations significatives pouvant exister entre les isolats testés. L'analyse de corrélation du type Pearson a aussi été appliquée, afin d'identifier la covariation pouvant exister entre la mortalité des adultes de *D. simplex* et la viabilité des conidies des isolats testés. Pour l'ensemble des analyses, le seuil de signification a été établi à une valeur  $\alpha < 0,05$ .

## 5.4 Pathogénicité de l'isolat sélectionné

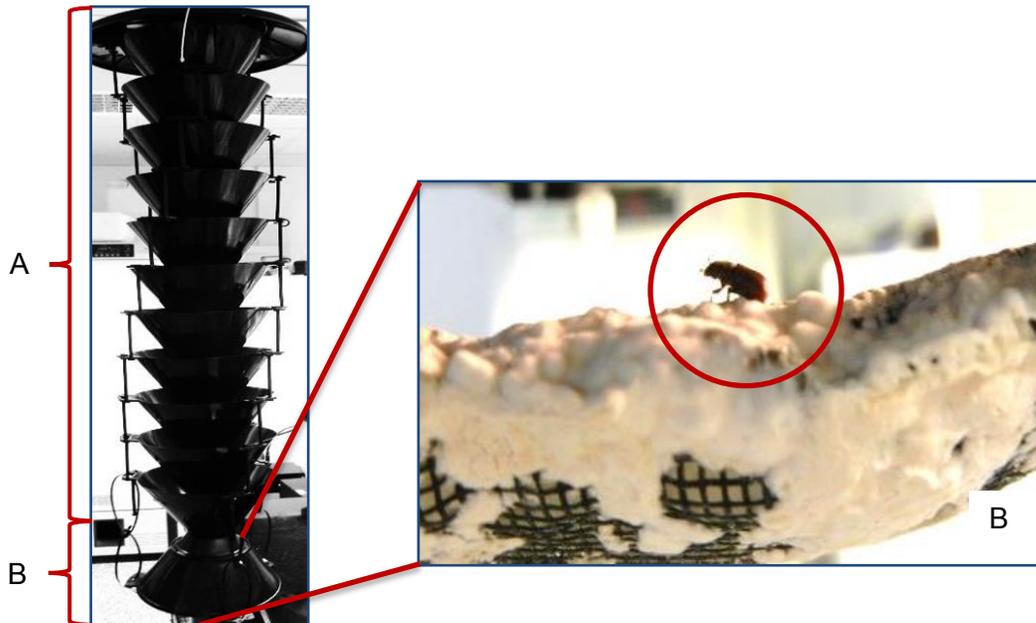
Selon les résultats du criblage, l'isolat INRS-242 de *B. bassiana* a été sélectionné pour la suite des expériences. Ainsi, la virulence de l'isolat a été déterminée afin d'évaluer son potentiel insecticide chez les adultes de *D. simplex*. Deux variables ont été utilisées pour établir ce test, soit la concentration létale et le temps moyen de survie de *D. simplex* après l'inoculation fongique. À partir d'une suspension mère de conidies de l'isolat INRS-242, une série de dilution a été réalisée afin d'obtenir six concentrations variant entre  $1 \times 10^6$  à  $1 \times 10^{11}$  conidies ml<sup>-1</sup>. Pour chaque concentration, 28 insectes ont été immergés pendant 10 secondes dans 10 ml de la suspension de conidies. Ils ont ensuite été transférés individuellement dans des boîtes de Petri et la mortalité a été évaluée dans les mêmes conditions que celles décrites à la section 5.3. Les insectes du groupe témoin ont été traités avec 10 ml d'eau distillée stérile. Pour toutes les concentrations, les expériences ont été réalisées en triplicatas. La mycose a été confirmée par la présence de la muscardine.

Afin de mieux comprendre la relation existant entre la mortalité des insectes et la concentration fongique appliquée, une analyse *Probit* (Finney, 1971) a été réalisée permettant d'estimer la concentration létale. L'estimateur de Kaplan Meier de la fonction de survie des insectes soumis à la concentration létale induisant 50% de mortalité dans la population a été utilisé afin de déterminer le temps moyen de survie de *D. simplex* traité avec l'isolat INRS-242 de *B. bassiana* (*Proc Lifetest*, SAS version 9.2, SAS Institute Inc.).

## 5.5 Dispositif d'autodissémination

Un dispositif d'autodissémination développé par Guertin et Lavallée et publié par Lyons *et al.* (2012) a été utilisé pour évaluer l'efficacité de l'inoculation fongique chez les adultes de *D. simplex*. Ce dispositif est constitué de deux éléments : un piège du type Lindgren à 12 entonnoirs (Synergy Semiochemicals, Colombie-Britannique) et une chambre de dissémination qui y est attachée à sa base de ce dernier (figure 5.6). La chambre de dissémination renferme une pochette (14,5 x 1 cm) dans laquelle on retrouve de l'orge perlé servant comme substrat pour la croissance de l'isolat 242 de *B. bassiana*. À cette étape, deux variables ont été mesurées : le nombre de conidies chargées par adulte de *D. simplex* et l'efficacité d'infection fongique après le passage de l'insecte à travers le dispositif d'autodissémination.

Afin de déterminer si le temps d'exposition sur la pochette pouvait avoir une incidence sur la charge en conidies portées par insecte, chaque insecte a été lâché au haut du piège et laissé libre de marcher sur la pochette pendant 15, 30, 45, 60 et 120 secondes. Une cohorte de 15 insectes a été utilisée pour chaque temps d'exposition. Les expériences ont été répétées trois fois pour un total de 45 insectes par temps d'exposition. Chaque insecte a été exposé de façon individuelle et retiré de la pochette à l'aide de pince stérile, puis transféré dans un tube Eppendorf de 600 µl contenant 100 µl de solution Tween 80 à une concentration de 0,1%. Chaque tube a été agité à deux reprises à l'aide d'un Vortex Genie 2 pendant 2 minutes et laissé décanter pendant 2 minutes entre les agitations. Les insectes ont été ensuite retirés du tube et la suspension des conidies a été comptée sous un microscope à l'aide d'un hématimètre.



**Figure 5.6 : Différentes parties d'un dispositif d'autodissémination.** (A) Piège Lindgren; (B) Chambre de contamination avec la pochette fongique et (Cercle) adulte de *D. simplex* tombé sur la pochette.

Afin d'évaluer l'efficacité du dispositif d'autodissémination à induire une mycose chez les adultes du dendroctone du mélèze, 26 coléoptères ont été individuellement déposés au haut du piège Lindgren et laissés libre de circuler sur la pochette fongique pendant 1min. Pour le groupe témoin, les insectes ont été individuellement lâchés au haut du piège avec une pochette dépourvue de champignon. Ensuite, chaque insecte a été transféré dans une boîte de Petri stérile contenant un papier filtre humide et de la nourriture. Les boîtes ont été incubées dans une chambre de croissance en conditions contrôlées (20°C, 70% d'humidité et obscurité complète). La mortalité des insectes et la présence de la muscardine sur les cadavres ont été enregistrées toutes les 24 heures pendant 11 jours. Les expériences ont été répétées 4 fois.

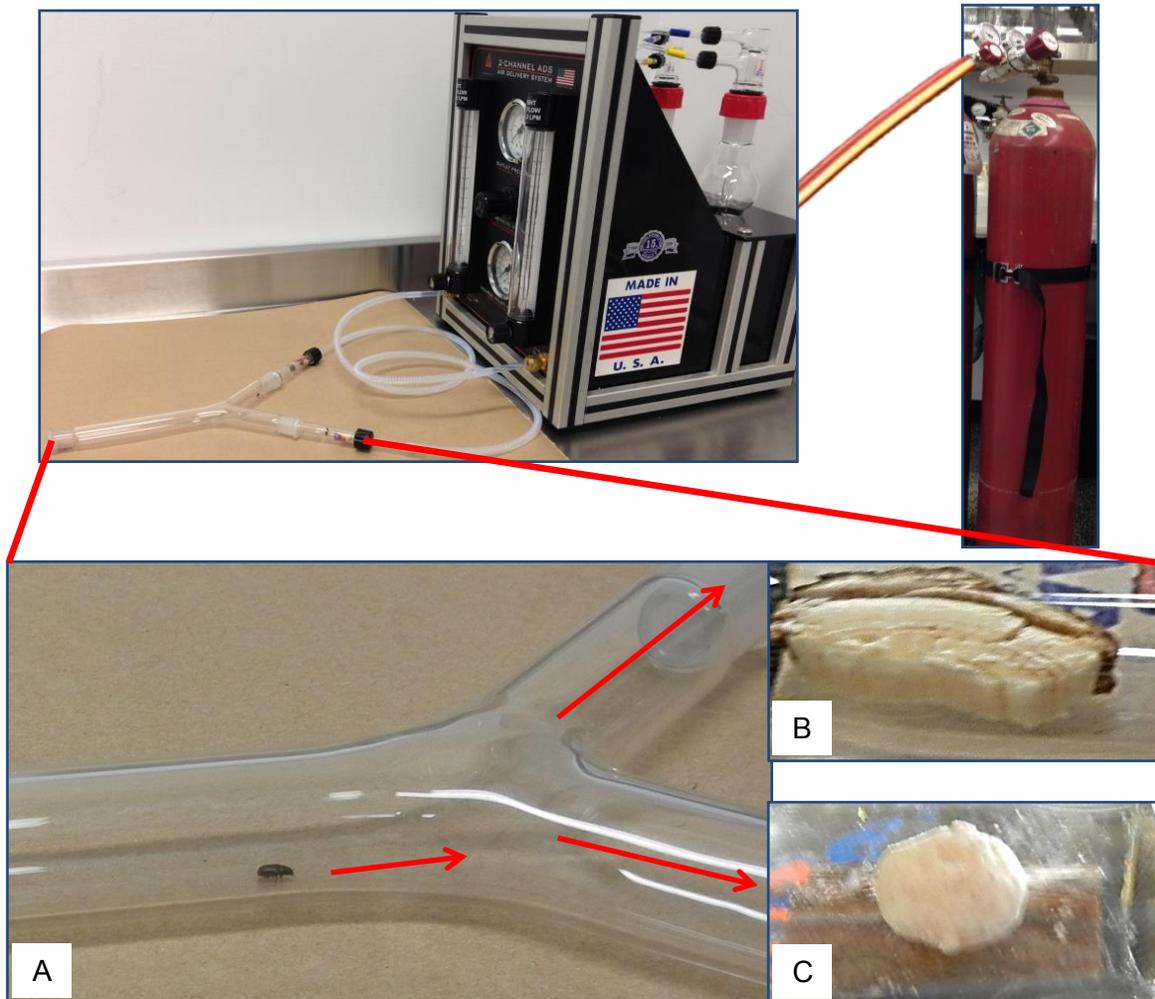
L'analyse de corrélation du type Pearson a été appliquée pour déterminer l'absence ou la présence d'une relation linéaire significative entre le temps d'exposition des insectes sur la pochette et la charge en conidies portées par l'insecte (SAS version 9.2, SAS Institute Inc.). Le test de  $t$  a été utilisé afin de comparer la mycose chez les adultes de *D. simplex* après leur contact avec la pochette fongique et celle du témoin. La valeur  $\alpha < 0,05$  a été déterminée comme seuil de signification.

## 5.6 Réponses chimiotactiques

Afin de documenter si les adultes de *D. simplex* étaient en mesure de reconnaître la présence de l'isolat INRS-242 de *B. bassiana*, des réponses chimiotactiques ont été évaluées par des tests olfactifs et gustatifs.

### 5.6.1 Test olfactif

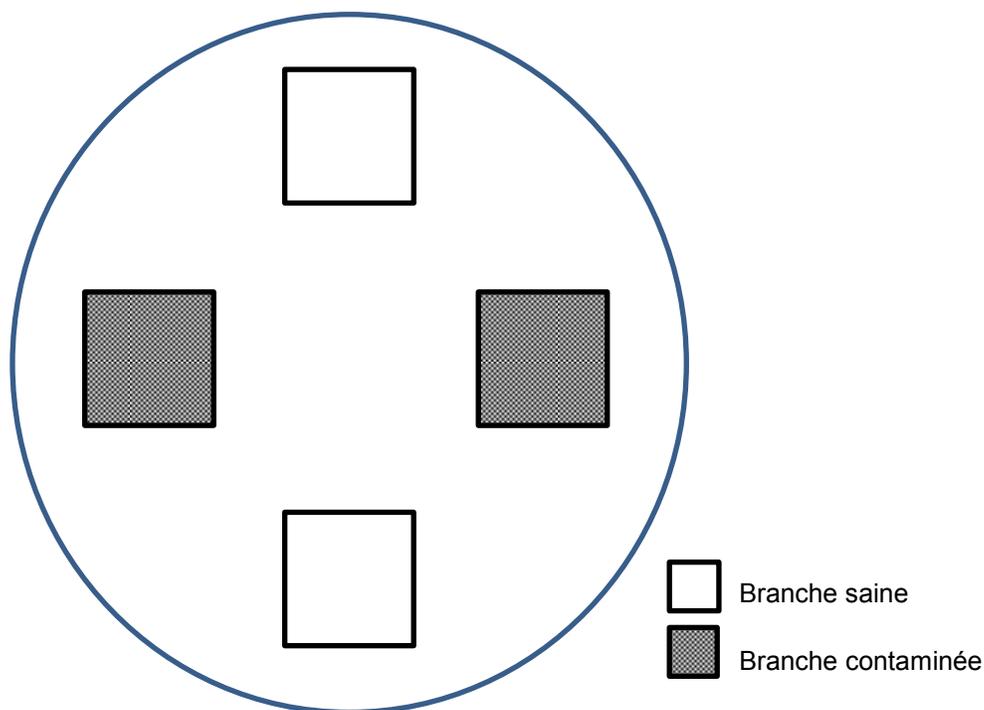
Un système olfactométrique (Two-choice Y-tube olfactometer; Analytical Research Systems Inc., Gainesville, FL, USA) a été utilisé pour évaluer si les insectes étaient en mesure de reconnaître l'odeur dégagée de l'isolat fongique. Le système comprend deux parties, soit un tube en Y et un système de distribution d'air à deux canaux connectés à une alimentation par gaz comprimé (figure 5.7). Le tube en Y possède un tube central en verre et deux bras latéraux. Chaque bras latéral relie à un tube d'extension muni d'un maillage pour empêcher la sortie des insectes. Pendant l'expérimentation, l'air humidifié et purifié était pompé afin qu'il puisse traverser chacun des bras d'extension avec un débit de 1 litre par minute et 15 psi d'air effluent. Un des bras d'extension contenait un morceau de branche du mélèze (4 mm de diamètre et 8 mm de longueur) et un cadavre de *D. simplex* couvert de la muscardine de l'isolat INRS-242 de *B. bassiana* (traitement), tandis que l'autre bras ne contenait qu'une section de branche (témoin). L'assignation des traitements à chacun des tubes l'a été de façon aléatoire. Pour ces expériences, chaque insecte a été individuellement introduit dans le tube en Y. Les insectes ayant atteint l'un des bras latéraux et y ayant séjourné pendant un minimum de 10 secondes ont été considérés avoir fait un choix entre le traitement et le contrôle. Les insectes qui n'ont pas fait de choix au bout de cinq minutes dans l'enceinte ont été éliminés du test. Au final, un total de 40 insectes (20 mâles et 20 femelles) ont été considérés dans l'analyse.



**Figure 5.7 : Différentes parties du système olfactométrique.** Ce système comprend deux grandes parties : un système de distribution d'air qui est connecté à une alimentation par gaz comprimé et un tube en Y (A) Le tube en Y possède deux bras latéraux, dont un contient une branche du mélèze saine (B) et l'autre contient une branche du mélèze et un cadavre de *D. simplex* rempli du champignon INRS-242 de *B. bassiana* (C).

### 5.6.2 Test gustatif

Le test gustatif permet d'évaluer la préférence alimentaire des adultes de *D. simplex*. Pour ce faire, des branches de mélèze ont été coupées en petits morceaux (1 cm de longueur et 1 cm de diamètre). Des arènes constituées d'une boîte de Petri de 50 mm de diamètre dans laquelle deux branches contaminées et deux branches saines ont été placées en alternance ont été utilisées lors de l'expérience (figure 5.8). La contamination des branches a été effectuée en les plaçant dans un sac contenant la pochette fongique suivi par un léger brassage avant d'être transférées dans des arènes. Les branches saines ont été placées dans un sac de pochette sans champignon INRS-242 (témoin). Afin de s'assurer d'une prise alimentaire par les adultes de *D. simplex*, les insectes ont été placés individuellement dans des tubes Eppendorf dépourvus de la nourriture pendant 24 heures avant d'être transférés dans leur arène. Cette expérience a été effectuée sur un total de 110 insectes (55 mâles et 55 femelles).



**Figure 5.8 :** Représentation schématique d'une arène utilisée pour le test de préférence alimentaire chez les adultes de *D. simplex*. Chaque arène contenait quatre morceaux de branches, dont deux étaient contaminées par les conidies du champignon INRS-242 de *B. bassiana* et deux autres étaient placées dans la pochette sans champignon (témoin).

Après une incubation de 24 heures en conditions contrôlées (20°C, 70% d'humidité et à la noirceur), la longueur et le diamètre d'écorce consommée par insecte ont été mesurées et calculées selon la formule ci-dessous.

$$E = [(\pi r^2 \times E_{\text{Long}})/E_T] \times 100$$

où E égale au pourcentage de la section de branche consommé par un insecte après 24h d'incubation (%);  $E_{\text{Long}}$  correspond à la longueur de la section de branche consommée après 24h d'incubation (mm); r est le rayon de la section de branche consommée après 24h d'incubation (mm); et  $E_T$  représente le volume total de la section de branche avant l'exposition à un insecte ( $\text{mm}^3$ ).

Les données des tests olfactif et gustatif ont été analysées à l'aide du test non paramétrique de Wilcoxon basé sur les rangs pour les échantillons appariés. Le seuil de signification a été établi à une valeur  $\alpha < 0,05$ .

## **5.7 Effet du champignon INRS-242 sur la biologie reproductive de *D. simplex***

L'isolat INRS-242 de *B. bassiana* possède un potentiel insecticide contre les adultes de *D. simplex*. On cherchait à étudier l'impact de la transmission horizontale du champignon entre les adultes de *D. simplex*. Le nombre et la longueur des galeries de ponte, ainsi que la longueur des galeries larvaires ont également été mesurés afin de documenter son effet sur le comportement reproductif. De plus, l'effet de l'exposition au champignon sur la structure de la population d'insectes a aussi été évalué par la mesure de la distribution du nombre de larves, de pupes et d'adultes et de la durée du développement des insectes.

### 5.7.1 Dispositif expérimental

Des boîtes de plastique de 58,9 x 39,0 x 15,5 cm (KIS<sup>®</sup>, Walmart) pouvant contenir des demi-bûches de mélèze ont été percés de six trous (trois de chaque côté) ayant un diamètre de 6,4 cm. Chaque trou a été bloqué par une moustiquaire (Woven wire mesh # 40, The Mesh Company (Warrington) Ltd., Creshire, United Kingdom) afin d'assurer une bonne circulation de l'air à l'intérieur des boîtes et d'empêcher la sortie des insectes. Des rubans autocollants du type néoprène (3,2 x 9,5 x 15,2 cm; Jacobs & Thompson, RCR International Inc.) a aussi été collé à la bordure des couvercles des boîtes, afin de les rendre hermétique et d'empêcher la sortie des insectes. Dans chacune des boîtes, une demi-section de tronc du mélèze laricin sain d'une longueur de 45 cm a été placée afin de servir de support biologique permettant aux insectes de se nourrir et de se reproduire. Les surfaces coupées ont été conditionnées en appliquant une couche de cire de greffe chaude afin de réduire la croissance des champignons saprophytes et la dessiccation du bois. Elles ont été entreposées à 4°C jusqu'à leur utilisation.

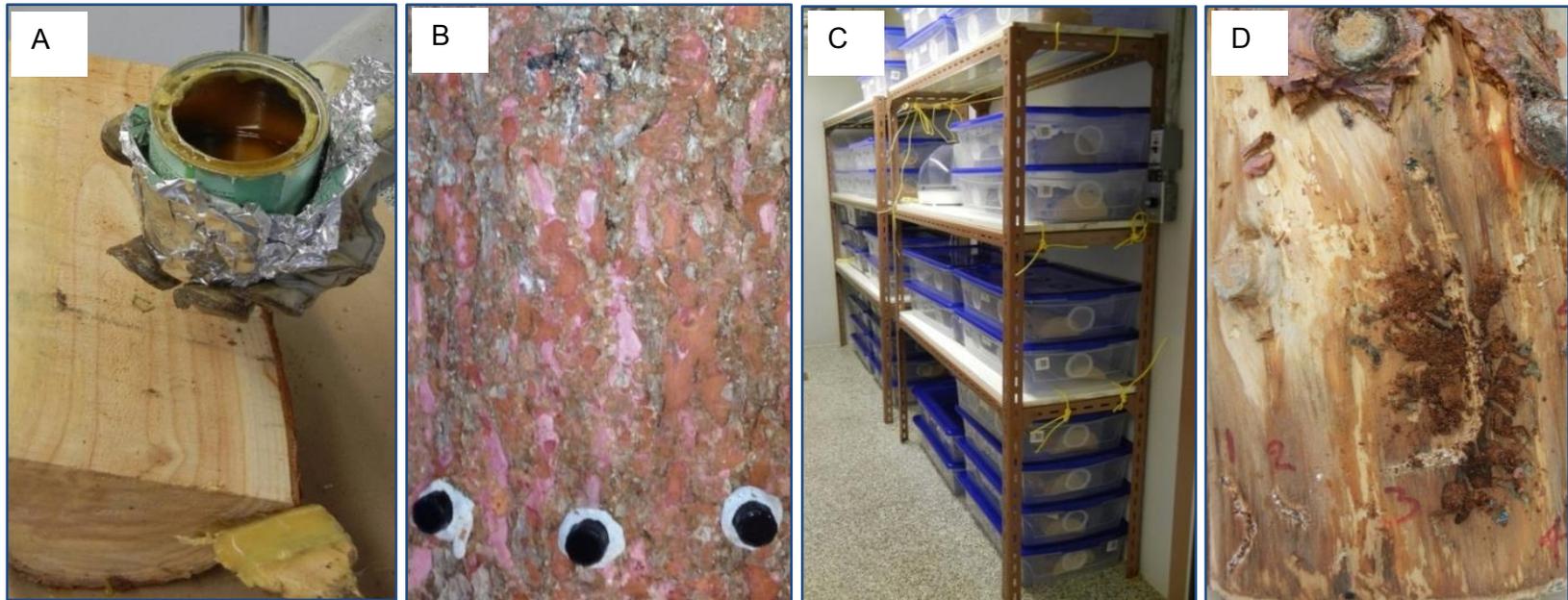
Des adultes de *D. simplex* ont été sexés en se basant sur les critères décrits par Wood (1963). Les expériences ont été effectuées en dix blocs expérimentaux. Chaque bloc comprenait quatre traitements : le Traitement 1 correspondait au témoin, où les mâles et les femelles adultes de *D. simplex* introduits dans le contenant n'ont pas été mis en contact avec la préparation fongique; le Traitement 2, où seuls les mâles ont été contaminés par l'isolat INRS-242 de *B. bassiana*; le Traitement 3, où seules les femelles ont été inoculées par le champignon; et le Traitement 4, où les mâles et les femelles adultes ont été contaminés avec le champignon. Chaque traitement contient cinq mâles et cinq femelles. Le dispositif d'autodissémination a été utilisé pour inoculer les insectes avec l'isolat fongique.

Afin de faciliter le processus d'introduction des insectes, une fine couche d'écorce a été enlevée à la surface des demi-bûches. En imitant les comportements naturels des insectes, pour chaque traitement, seules les femelles ont été initialement introduites sur l'écorce des demi-bûches. Lors de l'introduction d'insectes, chaque femelle a été placée sous un couvercle en plastique (figure 5.9). Ce couvercle a par la suite été collé à la surface de l'écorce à l'aide d'une gommette, empêchant ainsi la sortie des insectes. En attendant son partenaire, chaque femelle creuse sa propre trou d'entrée, au cas échéance, la galerie de ponte. Deux jours plus tard, les mâles ont été introduits à l'endroit désigné (un mâle par couvercle).

Les bûches ont été conservées dans des contenants et maintenues en condition contrôlées (température de 20°C, humidité de 55 ± 5°C et noirceur totale). Plusieurs paramètres ont été

mesurés lors de cette expérience, notamment la transmission fongique des parents contaminés à ceux non contaminés (voir section 7.5.2), le nombre et la longueur des galeries de ponte, la longueur des galeries larvaires, et le nombre de larves, de pupes et de nouveaux adultes. Il est important de noter que seules les galeries de ponte dont le creusage vertical a été initié ont été considérées.

Toutes les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel SAS 9.2 (SAS Institute Inc.). Les résultats obtenus des insectes parents qui ont survécu du champignon INRS-242 et de la transmission fongique ont été soumis à l'analyse non paramétrique de type Kruskal-Wallis, suivi par une analyse de comparaison du type Tukey. Les données des autres paramètres mesurés ont été soumises à l'analyse de variance multiple, MANOVA, en accompagnant par une analyse de comparaison multiple du type Duncan afin de vérifier s'il y a de différence significative entre les traitements. Pour sa part, le test de khi-carré a été appliqué afin d'analyser la distribution des stades du développement de *D. simplex*. L'analyse de corrélation de type Pearson a été appliquée pour déterminer l'absence ou la présence d'une relation linéaire significative entre la longueur des galeries de ponte et le nombre total de la progéniture récolté de chaque traitement. Le seuil de signification a été établi à une valeur  $\alpha < 0,05$  pour l'ensemble des analyses statistiques.



**Figure 5.9 : Différentes étapes liées aux expérimentations d'effet du champignon INRS-242 sur la biologie reproductive de *D. simplex*.** (A) Conditionnement des demi-bûches avec la cire de greffe; (B) Introduction des insectes (cinq femelles et cinq mâles; contaminés ou non contaminés selon les traitements); (C) Incubation; et (D) Collecte des données par décortication.

## 5.7.2 Transmission horizontale

À la fin des expériences de la section 5.7.1, les parents de *D. simplex* ont été récupérés aux fins d'un diagnostic moléculaire permettant de détecter la présence de l'isolat INRS-242 de *B. bassiana*, et ainsi de documenter la transmission fongique. À l'aide d'un bâton d'homogénéisation (VWR, Mont-Royal, QC, Canada), tous les insectes parents retrouvés dans les galeries de ponte ont été individuellement broyés dans 100 µl d'une solution saline tamponnée au phosphate (PBS : 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4) et 0,1% de triton X-100. Chaque insecte broyé a par la suite été transféré dans un tube à vis de 2 ml contenant 200mg de billes de silice 0,1 mm (BioSpecs, Bartlesville, OK, USA) pour l'extraction de l'ADN.

L'ADN totale a été extrait par une méthode de lyse mécanique. Pour ce faire, 1 ml de tampon d'extraction (50 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA-2Na, 3% SDS, pH 8.0) contenant 20 mg/µl d'ARNase A a été ajouté dans des tubes contenant les insectes broyés. À l'aide du *FastPrep-24* (MP Biomedicals, Solon, OH, USA), les lyses cellulaires ont été effectuées en deux cycles où la vitesse configurée à 6,0ms pendant 60 secondes, suivis par 5 minutes sur la glace. Les tubes ont été ensuite centrifugés à 13 000 rpm pendant 10 minutes à la température de la pièce afin de permettre aux débris de se retrouver au culot. Le surnageant a été récupéré avant la seconde lyse. L'acétate d'ammonium a été ajouté dans chaque surnageant à une concentration finale de 2 M. Les tubes ont été brièvement agités par inversion et laissés sur la glace pendant 5 minutes avant une centrifugation à 14 000 rpm pendant 15 minutes à 4°C. Le surnageant a été récupéré et placé sur la glace pendant 5 minutes avant une deuxième centrifugation aux mêmes conditions. Après avoir ajouté un volume égal d'isopropanol au surnageant récupéré, le tube a été placé à 4°C toute la nuit, afin de permettre la précipitation de l'ADN. Après une centrifugation à 14 000 rpm pendant 30 minutes à 4°C, le surnageant a été enlevé. Le culot d'ADN a été ensuite lavé deux fois avec de l'éthanol 70% froid suivi par une centrifugation à 14 000 rpm pendant 15 minutes à 4°C entre chaque lavage. L'ADN a été séché à l'air et solubilisé dans l'eau distillée stérile. La quantité d'ADN a été quantifiée à l'aide de Nanodrop (ND-1000 Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific Inc.).

Afin de détecter la présence de l'isolat fongique, les régions intergéniques du locus B ont été amplifiées en utilisant les amorces spécifiques, soit CF1B1F2 (5'-AAAAGGGACAATGGCTTGTA-3') et INRSRO (5'-TTGAGTTGGGCGAACTGATGCCCTCTT-3'). Ces amorces ont été développées et

gracieusement fournies par le Dr George Kyei-Poku de Ressources naturelles Canada. Elles sont en mesure de fournir une signature spécifique de l'isolat INRS242 de *B. bassiana*. Toutes les réactions PCR ont été effectuées dans un volume de 50 µl contenant 50 mM de MgCl<sub>2</sub>, 20 µg de BSA, 10 mM de dNTP, 10 mM de chaque amorce, 5 unités de l'ADN polymérase Taq, 10x du tampon ThermoPol® (New England Biolabs, Whitby, ON, Canada) et 100 ng d'ADN total. Les conditions d'amplification étaient les suivantes : la dénaturation initiale pendant 3 minutes à 94°C suivie de 40 cycles de dénaturation pendant 30 secondes à 94°C, d'hybridation pendant 30 secondes à 62°C et d'élongation pendant 1 minute à 72°C. Une élongation supplémentaire de 10 minutes à 72°C a été effectuée. La présence d'amplicons a été confirmée par une électrophorèse sur gel d'agarose 2%. Sous l'exposition aux UV, une coloration du gel au bromure d'éthidium a permis la révélation des bandes d'ADN.



# CHAPITRE 6 : RÉSULTATS

## 6.1 Degré-jour

Le cumul des degrés-jours a été effectué, afin de déterminer le début de la période de vol des insectes. Les données météorologiques du début mars à la fin août de trois années consécutives, soit en 2012, 2013 et 2014 ont ainsi été utilisées. Le profil des températures maximum et minimum à l'arboretum de Cleveland varie considérablement entre les années étudiées. En conséquence, les degrés-jours cumulés pour les températures de référence (entre 4 et 10°C) sont différents (tableau 6.1). Cependant, la température sur la base 10 ( $T_{10}$ ) sont celles montrant le moins de variabilités. Ainsi, les résultats montrent qu'au printemps, l'activité de vol des adultes de *D. simplex* semble être directement influencée par la température. Pour l'ensemble des observations, ces activités ont commencé lorsque les degrés-jours cumulés sont en moyenne de 45°C sur la base 10. De plus, le suivi des populations indique que cette activité est d'une durée environ 15 jours (figure 6.1).

**Tableau 6.1 : Degrés-jours cumulés selon les différents seuils thermiques pour les trois années de l'étude.** Ce suivi a permis de déterminer le début de l'activité de vol de *D. simplex*.

Années	Degrés-jours cumulés			
	$T_4$	$T_5$	$T_{7,5}$	$T_{10}$
2012	203,8	167,6	90,2	40,3
2013	126,5	106,7	71,4	43,3
2014	193,5	161,6	96,7	51,6

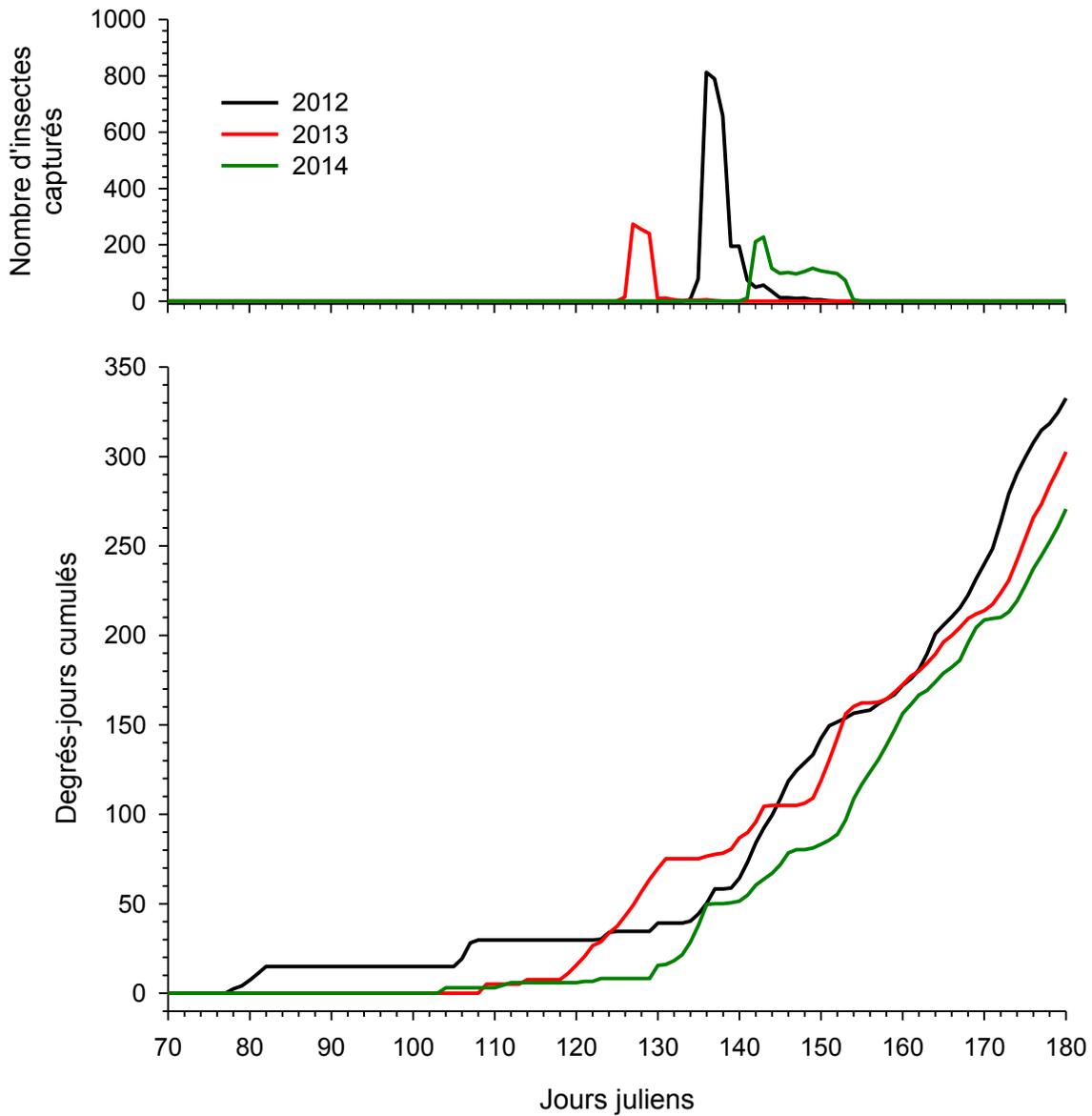


Figure 6.1. Nombre d'adultes de dendroctone du mélèze capturés dans des pièges Lindgren (Haut) et les degrés-jours cumulés selon la température à base 10 des années 2012, 2013 et 2014 (Bas).

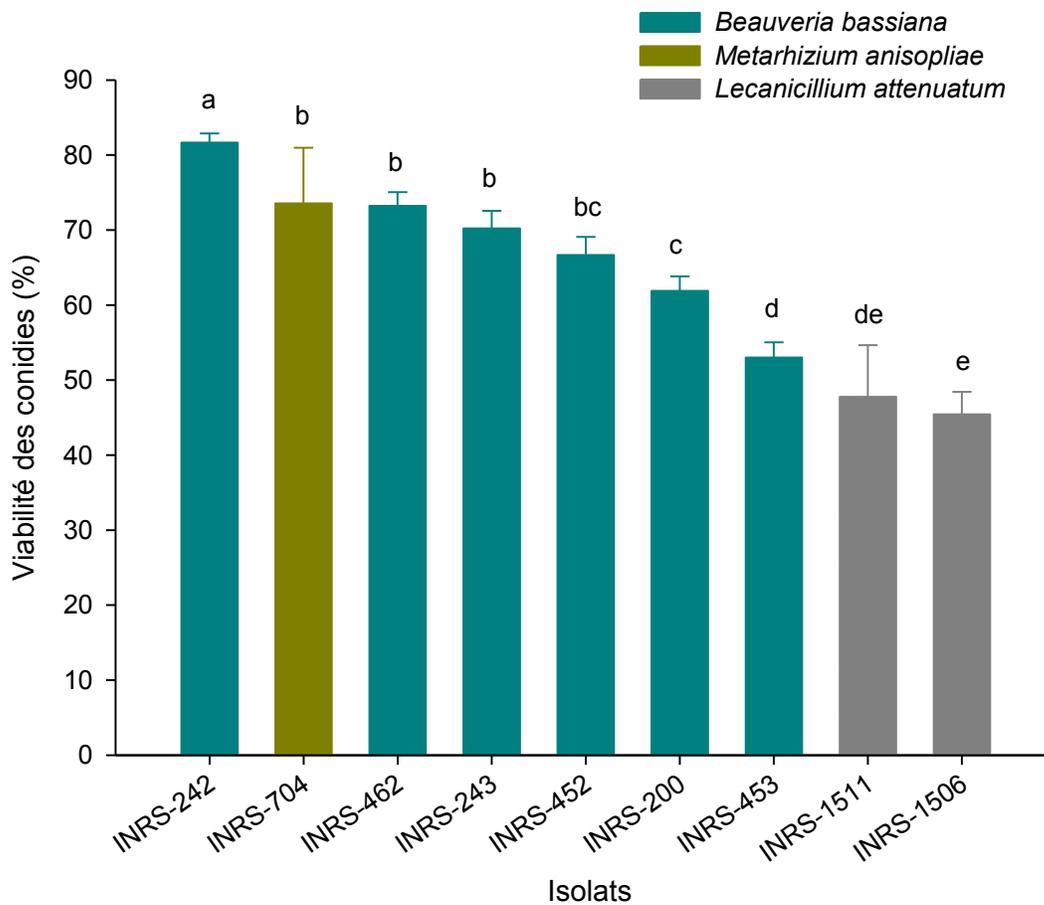
## 6.2 Élevage de *D. simplex*

Différentes approches ont été essayées afin de réduire la mortalité enregistrée dans les témoins lors de la mise au point de la méthodologie pour les épreuves biologiques. Après plusieurs essais, les résultats ont démontré que le taux de survie des adultes de *D. simplex* augmentait lorsqu'ils étaient placés à 20°C en présence de morceaux d'écorce de mélèze ou de section de branches utilisés comme sources de nourriture. Aucune différence significative de la survie de ces adultes n'a été observée entre les insectes placés en présence de branches ou de sections d'écorce, avec une survie en moyenne de 79% et 75% respectivement (test de *t*,  $p > 0,05$ ). En tenant compte des aspects logistiques, l'utilisation des branches a donc été préconisée.

Une série d'expériences a été ensuite effectuée afin de documenter si les insectes pouvaient compléter un cycle complet de développement dans les conditions décrites précédemment. Les observations montrent qu'il y avait une grande variation au niveau du nombre d'œufs pondus par les femelles. Après les accouplements, chaque femelle a pondu une moyenne de six œufs. Tous les œufs ont éclos mais les larves semblaient avoir de la difficulté à se développer. Seulement 1% des larves ont pu compléter leur développement jusqu'à la puppe et finalement atteindre le stade adulte.

## 6.3 Viabilité des conidies

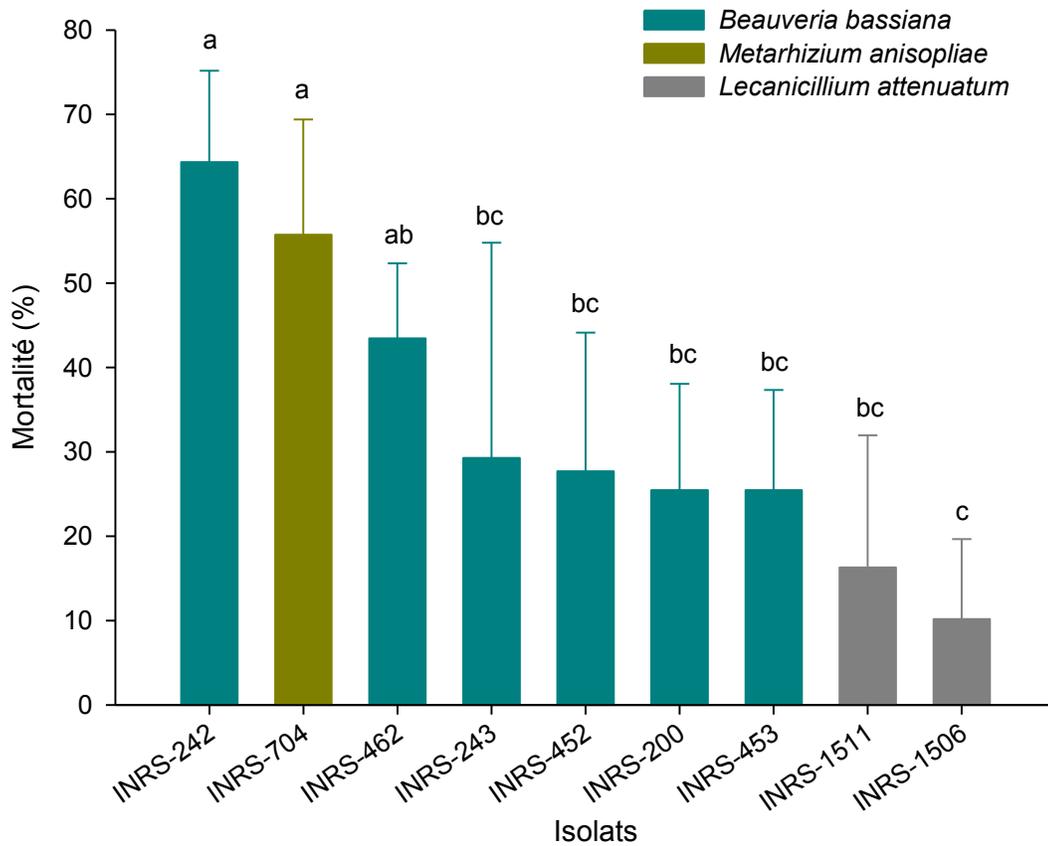
La viabilité des conidies des neuf isolats fongiques utilisés a été évaluée et présentée en pourcentage des conidies germées (figure 6.2). Après une incubation de 36h à 20°C, le taux de germination des conidies est significativement différent entre les isolats testés (ANOVA,  $n = 27$ ,  $df = 8$ ,  $F = 31,69$ ,  $p < 0,0001$ ). Ainsi, l'isolat INRS-242 de *B. bassiana* présentait le meilleur taux de germination avec une valeur de  $81,7 \pm 1,2\%$  (moyenne  $\pm$  écart-type). À l'opposé, de faibles pourcentages de germination ont été observés chez les deux isolats INRS-1506 et INRS-1511 de *L. attenuatum*, avec des valeurs respectives de  $45,44 \pm 2,99\%$  et  $47,48 \pm 6,87\%$ . Les autres isolats de *B. bassiana*, soit INRS-453, INRS-200, INRS-452, INRS-243 et INRS-462, et l'isolat INRS-704 de *M. anisopliae*, ont obtenu des pourcentages de germination variant de 53% à 73%.



**Figure 6.2 : Pourcentage de la viabilité des conidies (moyenne  $\pm$  écart-type) des isolats fongiques utilisés lors du test de criblage.** Pour chaque isolat, la viabilité des conidies a été évaluée en dénombrant les conidies germées après 36h d'incubation à 20°C. Les barres ayant la même lettre ne diffèrent pas de façon significative (Duncan,  $p > 0,05$ ).

## 6.4 Criblage

Le pourcentage de mortalité des adultes de *D. simplex* (moyenne  $\pm$  écart-type) exposés aux différents isolats fongiques est présenté dans la figure 6.3. Les résultats du criblage ont démontré que les adultes de *D. simplex* étaient susceptibles à tous les isolats testés à une concentration de  $1 \times 10^8$  conidies  $\text{ml}^{-1}$ . Par contre, cette susceptibilité varie significativement en fonction des différents isolats (ANOVA,  $n = 27$ ,  $df = 8$ ,  $F = 4,46$ ,  $p = 0,004$ ). L'isolat INRS-242 de *B. bassiana* était celui induisant la plus forte mortalité chez les adultes de *D. simplex* avec une valeur de  $64,4 \pm 10,8\%$ , suivi par l'isolat INRS-704 de *M. anisopliae* causant la mortalité de  $55,7 \pm 13,7\%$ . Pour sa part, l'isolat INRS-462 de *B. bassiana* induit une mortalité de  $43,5 \pm 8,9\%$ . Cependant, pour ces trois isolats, le taux de mortalité des insectes ne diffère pas de façon significative (Duncan,  $p > 0,05$ ). Les autres isolats de *B. bassiana* tels que INRS-200, INRS-243, INRS-452, ont causé la mortalité de 25 à 30% aux adultes de *D. simplex*. De plus, les insectes montrent de plus grandes résistances lorsqu'ils sont exposés aux isolats INRS-1506 et INRS-1511 de *L. attenuatum* avec une mortalité inférieure à 25%. Aucune différence significative n'a été observée entre ces deux derniers isolats. Pour l'ensemble des résultats du criblage, de grands écarts à la moyenne ont été notés indiquant une variation intrinsèque de la susceptibilité des cohortes d'adultes de *D. simplex* entre les répliques. Par ailleurs, une corrélation a été observée entre la viabilité des conidies des isolats et la mortalité observée chez les adultes du dendroctone (Pearson,  $n = 27$ ,  $r^2 = 0,6$ ) (figure 6.4). En se basant sur les résultats de viabilité des conidies et du criblage, l'isolat INRS-242 de *B. bassiana* a été sélectionné pour la suite des expériences.



**Figure 6.3 : Mortalité cumulée des adultes de *D. simplex* (% ± écart-type) 10 jours suivant l'inoculation fongique.** Pour chaque isolat, les insectes ont été soumis à une suspension de  $1 \times 10^8$  conidies  $\text{ml}^{-1}$ . La formule Abbott a été appliquée afin de tenir compte la mortalité naturelle des insectes. Les barres ayant la même lettre ne diffèrent pas de façon significative (Duncan,  $p > 0,05$ ).

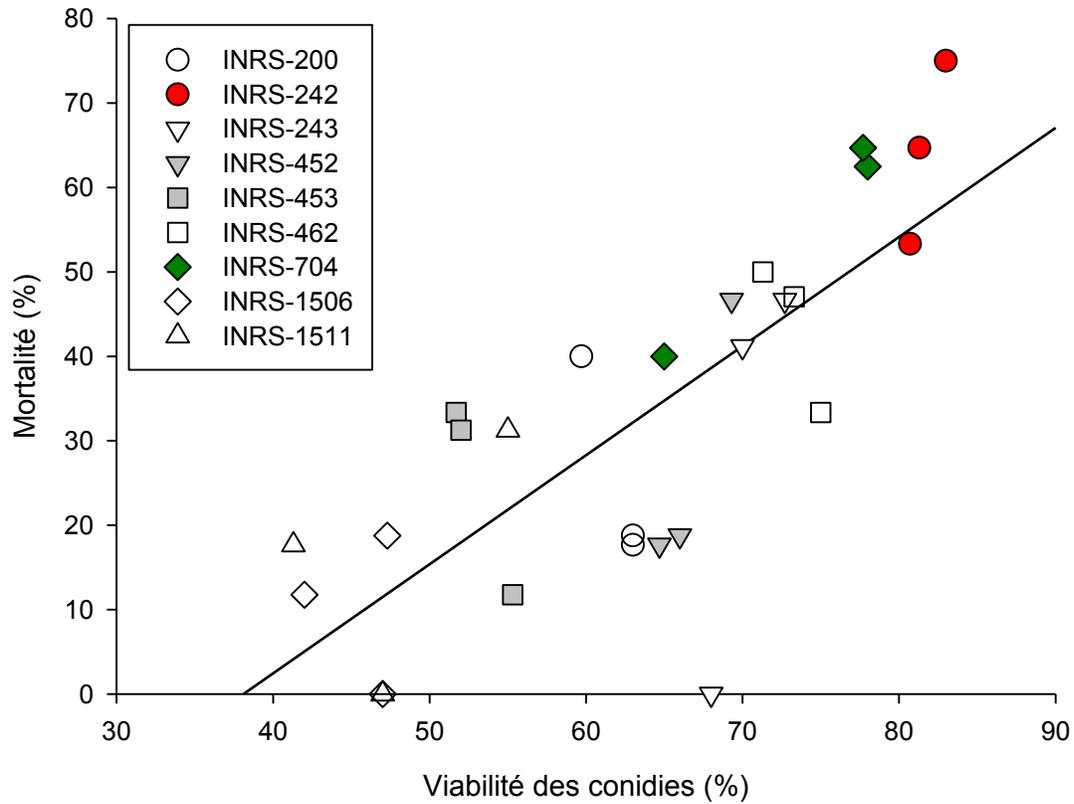


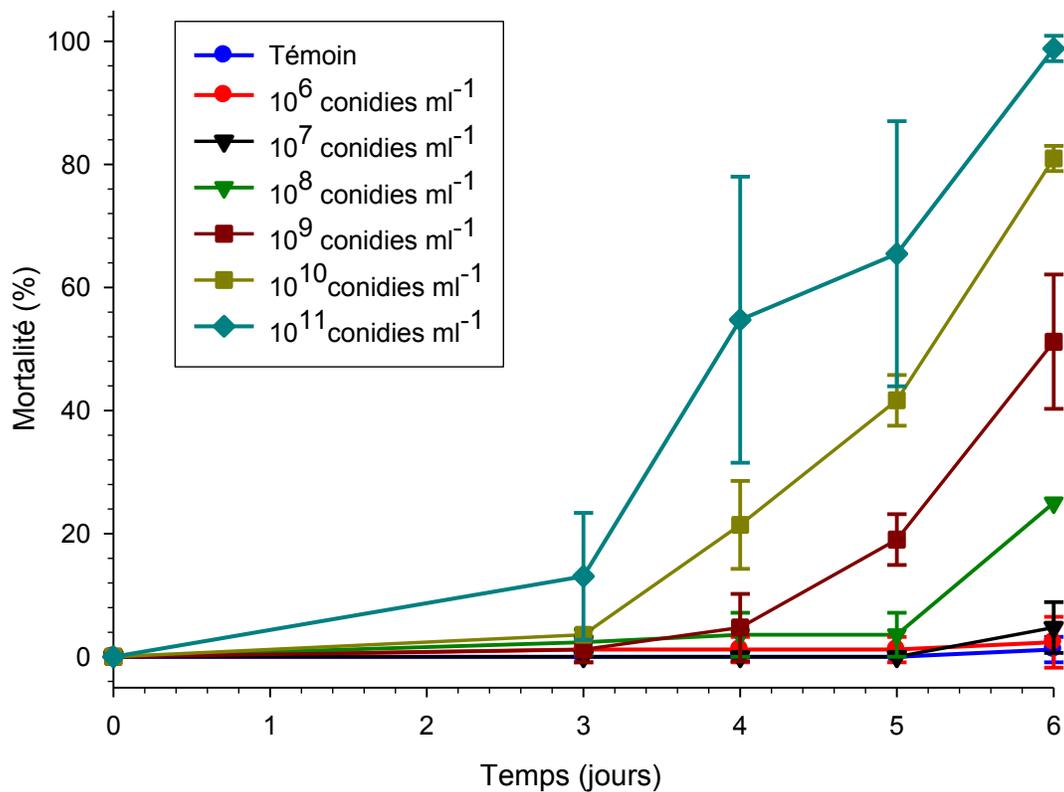
Figure 6.4 : Corrélation entre la mortalité des adultes de *D. simplex* et la viabilité des conidies (test de Pearson,  $n = 27$  ;  $r^2 = 0,6$  ;  $p < 0,001$ ).

## 6.5 Pathogénicité de l'isolat INRS-242

La pathogénicité de l'isolat INRS-242 de *B. bassiana* a été évaluée en calculant la concentration permettant de tuer 50% de la population d'insectes (CL<sub>50</sub>) et le temps moyen de survie des insectes suite à l'inoculation avec la suspension fongique. Comme attendu, plus la concentration fongique est élevée, plus la mortalité des adultes de *D. simplex* est importante (tableau 6.2). Selon l'analyse de probabilité *Probit*, la concentration de conidies causant 50% de mortalité chez les insectes après 6 jours a été estimée à  $7,4 \times 10^8$  conidies ml<sup>-1</sup>. Une concentration de  $2,6 \times 10^{10}$  conidies ml<sup>-1</sup>, le champignon peut entraîner la mort de 90% de la population pour la même période. D'autre part, le temps moyen de survie de *D. simplex* soumis à une concentration de  $1 \times 10^{10}$  conidies ml<sup>-1</sup> de l'isolat INRS-242 de *B. bassiana* se situait entre 5 et 6 jours (*Lifetest*) (figure 6.5). Nos résultats ont également démontré qu'il y avait une période de latence de trois jours avant que l'action pathogène de l'isolat se manifeste au sein de la population.

**Tableau 6.2 : Concentrations des conidies de l'isolat INRS-242 de *B. bassiana* nécessaires pour tuer les adultes de *D. simplex*.** Trois concentrations létales différentes après six jours d'infection fongique ont été estimées par une analyse de probabilité *Probit*.

Concentration létale	Conidies ml <sup>-1</sup>	Intervalle de confiance à 95%	
		Inférieur	Supérieur
CL <sub>10</sub>	$2,1 \times 10^6$	$9,3 \times 10^6$	$3,9 \times 10^7$
CL <sub>50</sub>	$7,4 \times 10^8$	$4,8 \times 10^8$	$1,1 \times 10^9$
CL <sub>90</sub>	$2,6 \times 10^{10}$	$1,4 \times 10^{10}$	$6,0 \times 10^{10}$



**Figure 6.5 : Mortalité cumulative des adultes de *D. simplex* (% ± écart-type) après avoir soumis à différentes concentrations des conidies de l'isolat INRS-242 de *B. bassiana*.** Pour toutes les concentrations, l'action pathogène a été observée à partir de troisième jour suivant l'inoculation fongique. De plus, le temps moyen de survie des insectes se situe entre 5 et 6 jours lorsqu'ils sont soumis à une concentration de  $1 \times 10^{10}$  conidies ml<sup>-1</sup> (*Lifetest*).

## 6.6 Dispositif d'autodissémination

En utilisant le dispositif d'autodissémination, aucune corrélation n'a été observée entre la charge en conidies par adulte *D. simplex* et le temps d'exposition des insectes sur les pochettes (test Pearson,  $n = 75$ ,  $r^2 = 0,08$ ) (figure 6.6). Dans tous les cas, la moyenne du nombre de conidies par insecte a été estimée à  $2,1 \times 10^9$ . De plus, l'efficacité du dispositif a été évaluée en observant le nombre de cadavres ayant le symptôme de mycose sur une période de 11 jours suivant leur passage à travers la pochette fongique contenant l'isolat INRS-242. Les résultats ont démontré qu'il y avait une différence significative du nombre d'insectes montrant une mycose chez les insectes exposés au champignon et ceux du groupe témoin (test de  $t$ ,  $n = 208$ ,  $p < 0.0001$ ). En effet, la présence de muscardine a été observée sur 98% des insectes exposés aux pochettes fongiques ( $n = 104$ ), tandis qu'aucun symptôme de mycose n'a été observé sur les adultes du groupe témoin ( $n = 104$ ).

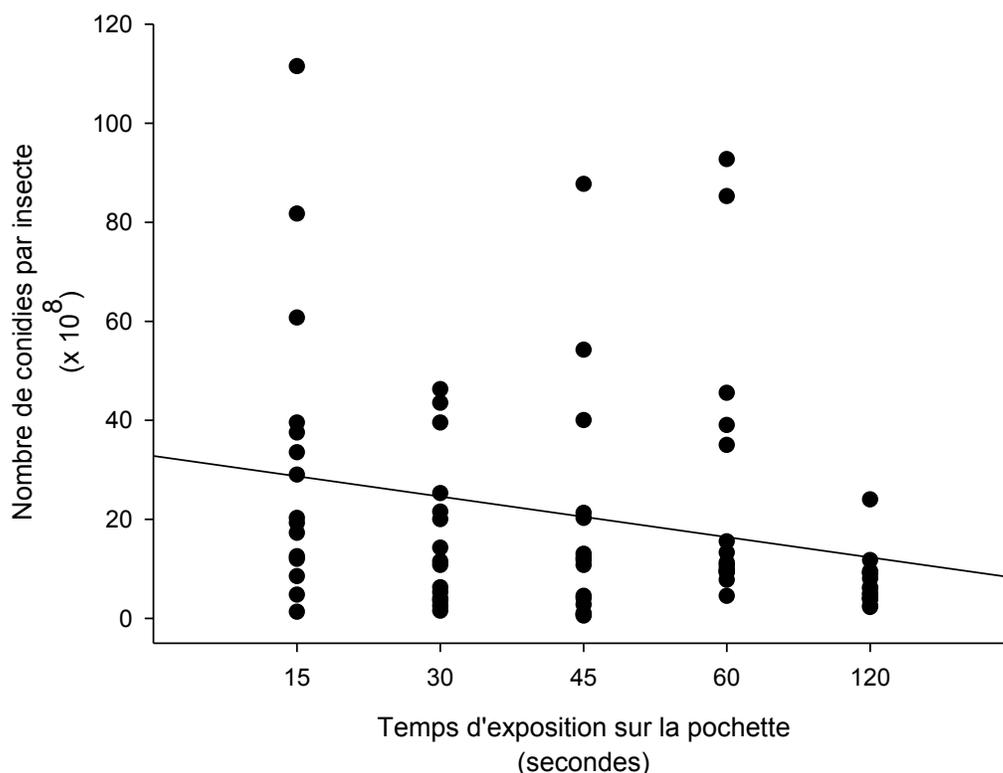
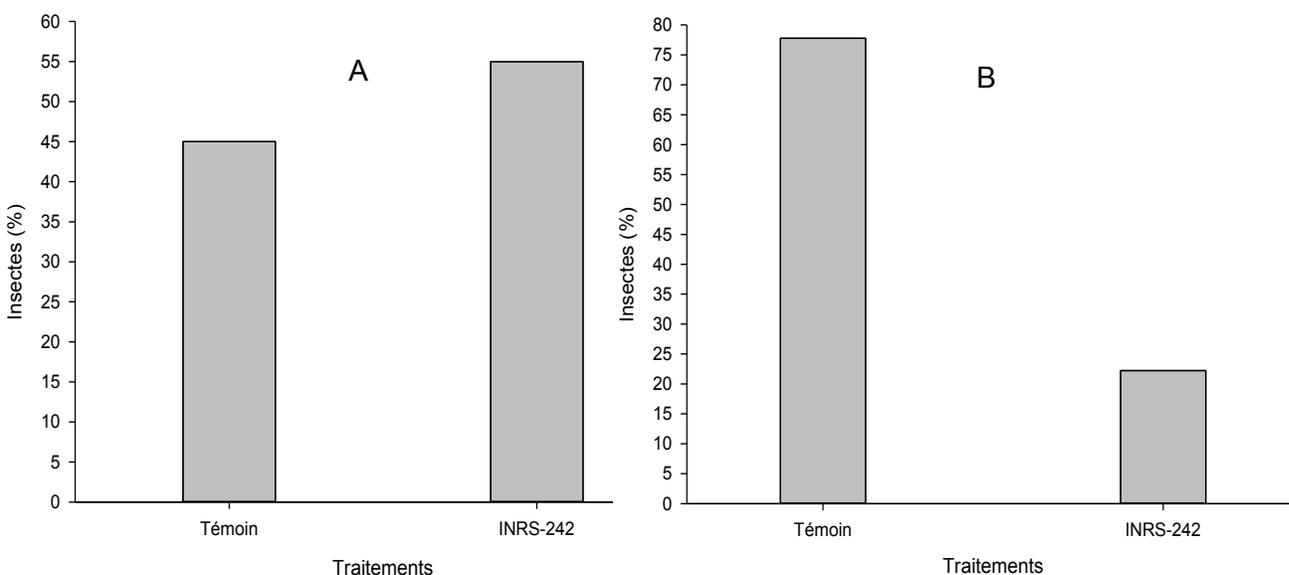


Figure 6.6 : Corrélation entre la charge de conidies portées par adulte de *Dendroctonus simplex* et le temps d'exposition sur les pochettes du champignon INRS-242 de *B. bassiana* (test de Pearson,  $n = 75$ ;  $r^2 = 0,08$ ;  $p < 0,05$ ).

## 6.7 Réponses chimiotactiques

Parmi les 40 adultes de *D. simplex* testés lors de l'expérience olfactive (figure 6.7A), l'analyse statistique à l'aide du test de Wilcoxon basé sur les rangs a démontré que ces insectes ne sont pas en mesure de reconnaître l'odeur émise par l'isolat INRS-242 de *B. bassiana* ( $df = 1$ ,  $p > 0.05$ ). Par contre, les résultats du test gustatif montrent que les insectes ont une préférence alimentaire vers les sections de branche saine. Certes, seulement 22,7% d'adultes de *D. simplex* ont consommé l'écorce contaminée par le champignon (figure 6.7B). Cette consommation est significativement différente à celle de l'écorce saine (Test Wilcoxon basé sur les rangs,  $n = 110$ ,  $df = 1$ ,  $p < 0.001$ ).



**Figure 6.7 : Réponses chimiotactiques des adultes de *Dendroctonus simplex* à la présence ou l'absence du champignon INRS-242 de *Beauveria bassiana*.** (A) Test olfactif. Le nombre d'adultes de *D. simplex* ayant fait le choix du côté témoin n'a pas de différence de celui du côté champignon (Test Wilcoxon basé sur les rangs,  $n = 40$ ,  $df = 1$ ,  $p > 0.05$ ). (B) Test gustatif. Les adultes de *D. simplex* ont consommé plus de branches saines que celles contaminées (Test Wilcoxon basé sur les rangs,  $n = 110$ ,  $df = 1$ ,  $p < 0.001$ ).

## 6.8 Effet du champignon INRS-242 sur la biologie reproductive de *D. simplex*

Dans un premier volet on cherchait à documenter la transmission horizontale du champignon INRS-242 de *B. bassiana* à partir d'un individu infecté vers un individu sain. Les résultats montrent que les traitements ont des effets significatifs sur la survie des parents (test de Kruskal-Wallis;  $p < 0,0001$ ). La majorité des individus vivants est associée au Traitement 1, où les femelles et les mâles n'ont pas été exposés aux pochettes fongiques (tableau 6.3). La moyenne du pourcentage de survie des femelles exposées (Traitement 2) au champignon était de 1%, et de 6,5% lorsque les mâles étaient inoculés par le champignon. Selon les résultats du test de diagnostic moléculaire, aucun champignon INRS-242 de *B. bassiana* n'a été détecté chez les parents du Traitement 1 (tableau 6.4). Cela démontre que l'approche déployée ne favorisait pas la contamination croisée entre les traitements.

**Tableau 6.3 : Pourcentage de survie des parents de *D. simplex* (moyenne  $\pm$  erreur type) après 50 jours d'incubation.** Les symboles foncés indiquent que les insectes ont été mis en contact avec le champignon INRS-242 avant leur introduction dans les demi-bûches. Les lettres différentes dans chaque colonne indiquent une différence significative entre les traitements (Tukey,  $p < 0,05$ ).

Traitements	% survie (erreur type)	
	Femelles	Mâles
1 ♀ + ♂	37,3 (11,7) <sup>a</sup>	41,0 (20,2) <sup>a</sup>
2 ♀ + ♂	15,5 (18,6) <sup>b</sup>	9,0 (12,6) <sup>b</sup>
3 ♀ + ♂	0,0 (0,0) <sup>c</sup>	2,0 (3,6) <sup>b</sup>
4 ♀ + ♂	2,0 (3,6) <sup>c</sup>	4,0 (7,2) <sup>b</sup>

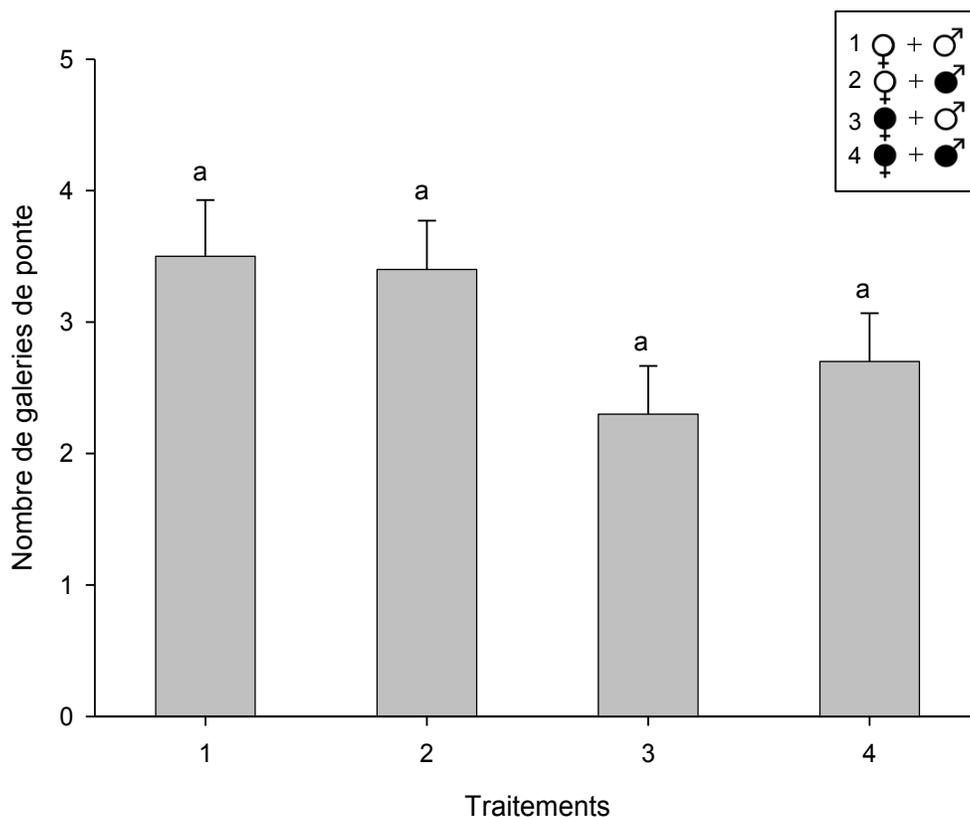
En ce qui a trait à la transmission du champignon de parents infectés vers des partenaires sains, on observe que les mâles contaminés (Traitement 2) ont transmis le champignon aux femelles saines dans un pourcentage moyen de 61%. Cette transmission atteignait 95% chez les mâles sains mis en présence de femelles contaminées suite à leur passage dans le dispositif d'autodissémination (Traitement 3). À titre comparatif, plus de 98% des insectes étaient porteurs du champignon lorsque les mâles et les femelles étaient mis en contact avec le champignon (Traitement 4).

**Tableau 6.4 : Transmission fongique entre les parents de *D. simplex* après 50 jours d'incubation.** Les symboles foncés indiquent que les insectes ont été mis en contact avec le champignon INRS-242 avant leur introduction dans les demi-bûches. Les lettres différentes dans chaque colonne indiquent une différence significative entre les traitements (Tukey,  $p < 0,05$ ).

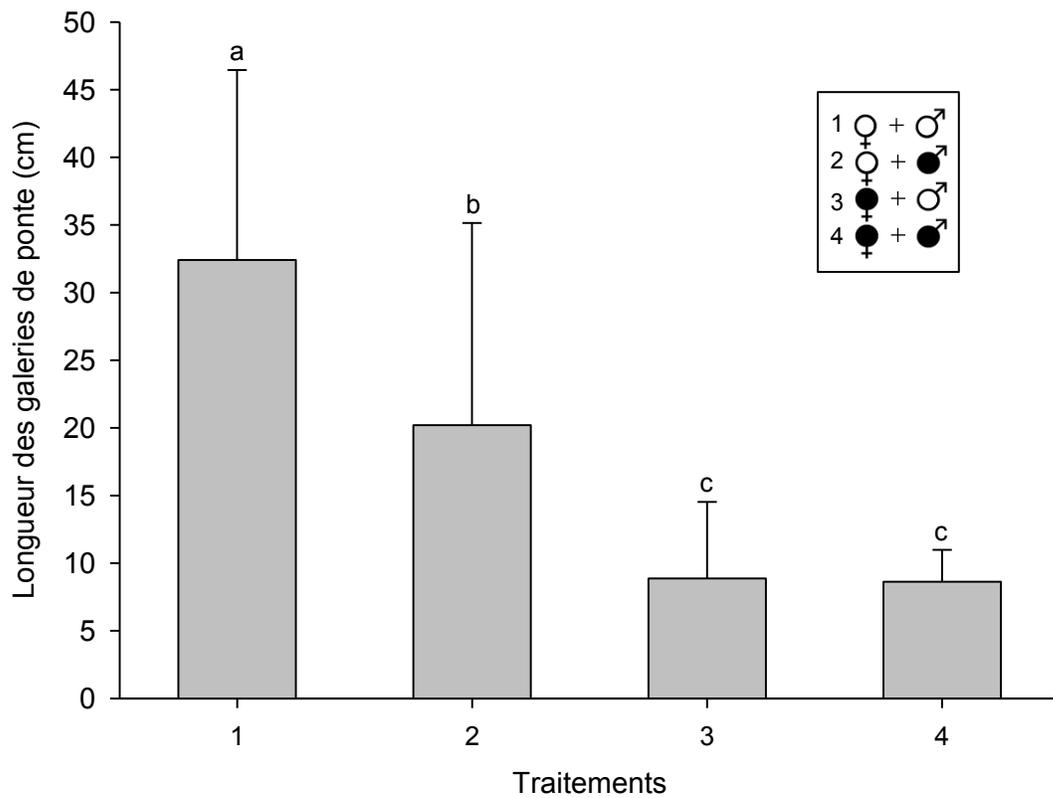
Traitements	% contamination (erreur type)	
	Femelles	Mâles
1 ♀ + ♂	0,0 (0,0) <sup>a</sup>	0,0 (0,0) <sup>a</sup>
2 ♀ + ●♂	61,0 (34,4) <sup>b</sup>	89,0 (13,2) <sup>b</sup>
3 ●♀ + ♂	95,0 (7,2) <sup>c</sup>	83,5 (16,5) <sup>b</sup>
4 ●♀ + ●♂	98,0 (3,6) <sup>c</sup>	91,5 (11,9) <sup>b</sup>

Dans un deuxième volet on cherchait à évaluer les effets de l'exposition à l'isolat INRS-242 de *B. bassiana* sur les comportements reproductifs de *D. simplex*, notamment en ce qui concerne le nombre et la longueur des galeries de ponte ainsi que la longueur des galeries larvaires. Après 50 jours d'incubation à 20°C, le nombre des galeries de ponte ne diffère pas de façon significative entre les traitements testés (figure 6.8). Par contre, le champignon INRS-242 de *B. bassiana* semble posséder des effets importants et significatifs sur la longueur des galeries de ponte (MANOVA,  $n = 117$ ,  $df = 3$ ,  $F = 20,1$ ,  $p < 0,0001$ ) (figure 6.9). Les femelles des groupes témoins ont une tendance à creuser de plus longues galeries de ponte ( $32,4 \pm 14,0$  cm), suivi par les femelles du Traitement 2, lorsque seulement les mâles ont été disposés sur les pochettes contenant l'isolat fongique, avec une moyenne de  $20,2 \pm 14,9$  cm. Par contre, les

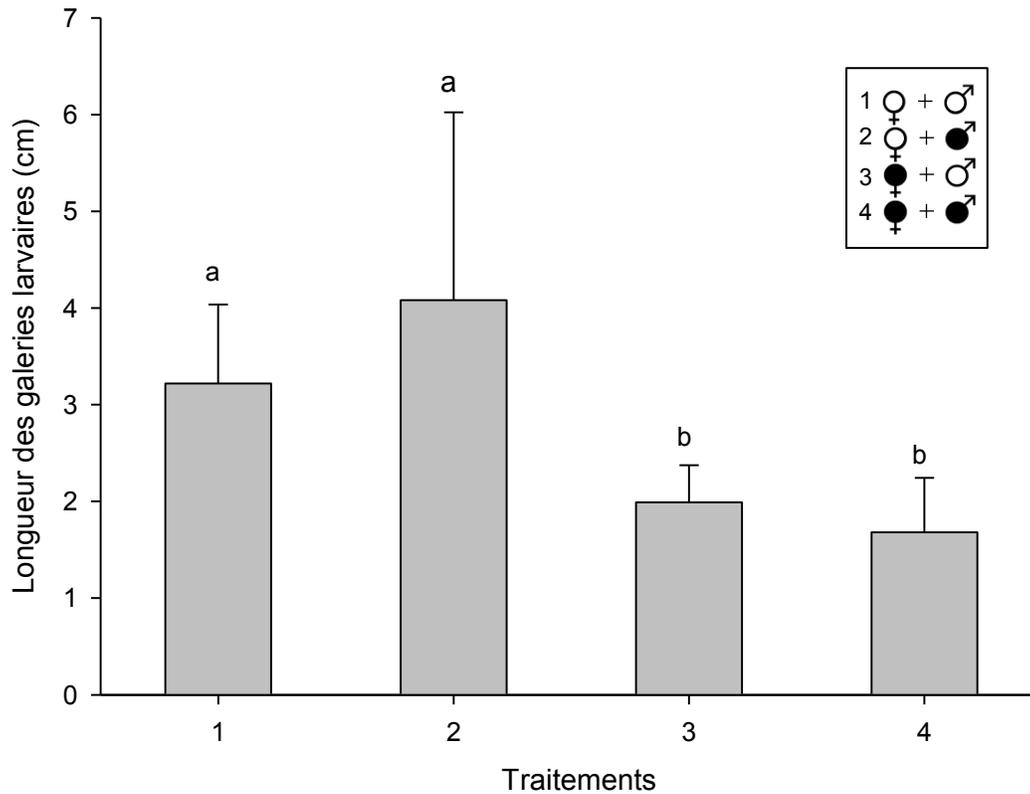
plus courtes galeries de ponte ont été remarquées chez les Traitements 3 et 4, lorsque les femelles ont été mises en contact avec les pochettes fongiques ( $8,87 \pm 5,65$  cm et  $8,62 \pm 2,36$  cm). De plus, l'infection fongique chez les parents influence significativement sur la longueur des galeries larvaires (MANOVA,  $n = 40$ ,  $df = 3$ ,  $F = 10,1$ ,  $p < 0,0001$ ). Les plus longues galeries larvaires ont été observées chez les Traitements 1 et 2 avec une moyenne de  $3,22 \pm 0,66$  cm et de  $4,08 \pm 1,60$  cm (figure 6.10), tandis que les larves des Traitements 3 et 4 ont creusé des galeries plus courtes ( $1,99 \pm 0,29$  cm et  $1,68 \pm 0,29$  cm).



**Figure 6.8 : Nombre de galeries de ponte (moyenne  $\pm$  erreur type) observées sous l'écorce des demi-bûches du mélèze laricin.** Après 50 jours d'incubation à  $20^{\circ}\text{C}$ , les femelles de *D. simplex* de chaque traitement ont creusé un nombre similaire des galeries de ponte (Duncan,  $p > 0,05$ ). Les symboles foncés indiquent que les insectes ont été mis en contact avec le champignon INRS-242 avant leur introduction dans les demi-bûches.



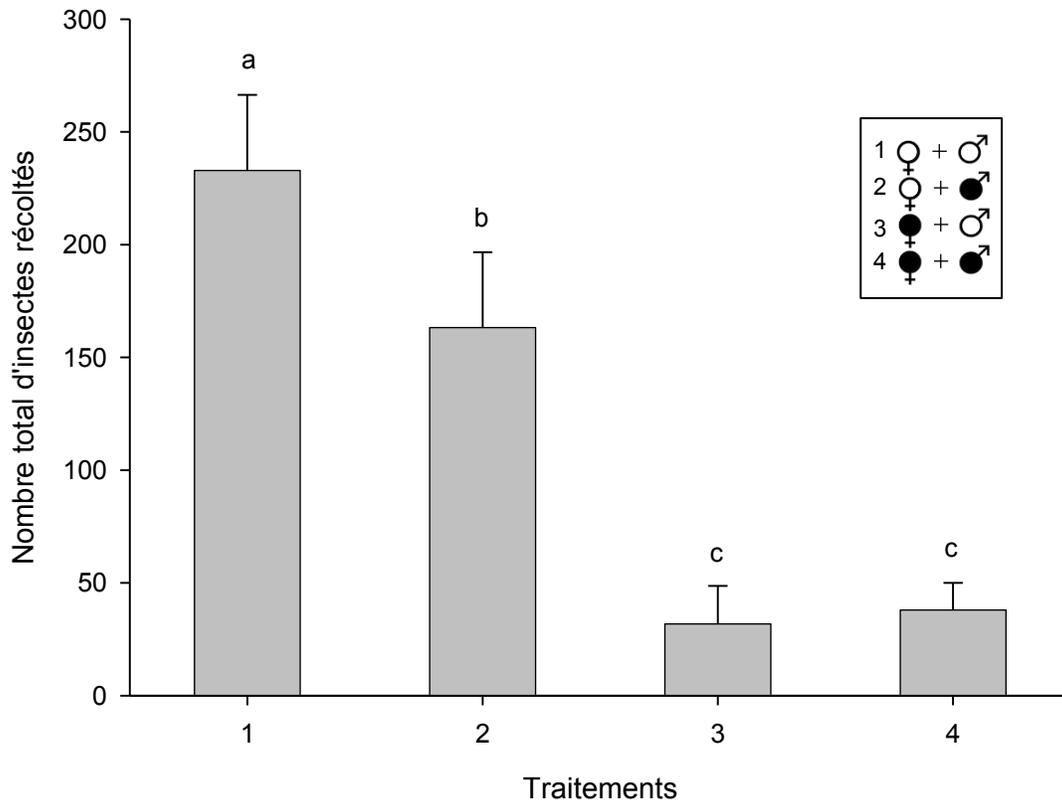
**Figure 6.9 : Longueur des galeries de ponte (moyenne  $\pm$  erreur type) creusées par des femelles de *D. simplex* après 50 jours d'incubation à 20°C. Les symboles foncés indiquent que les insectes ont été mis en contact avec le champignon INRS-242 avant leur introduction dans les demi-bûches. Pour chacun des traitements, les barres ayant la même lettre ne diffèrent pas de façon significative (Duncan,  $p > 0,05$ ).**



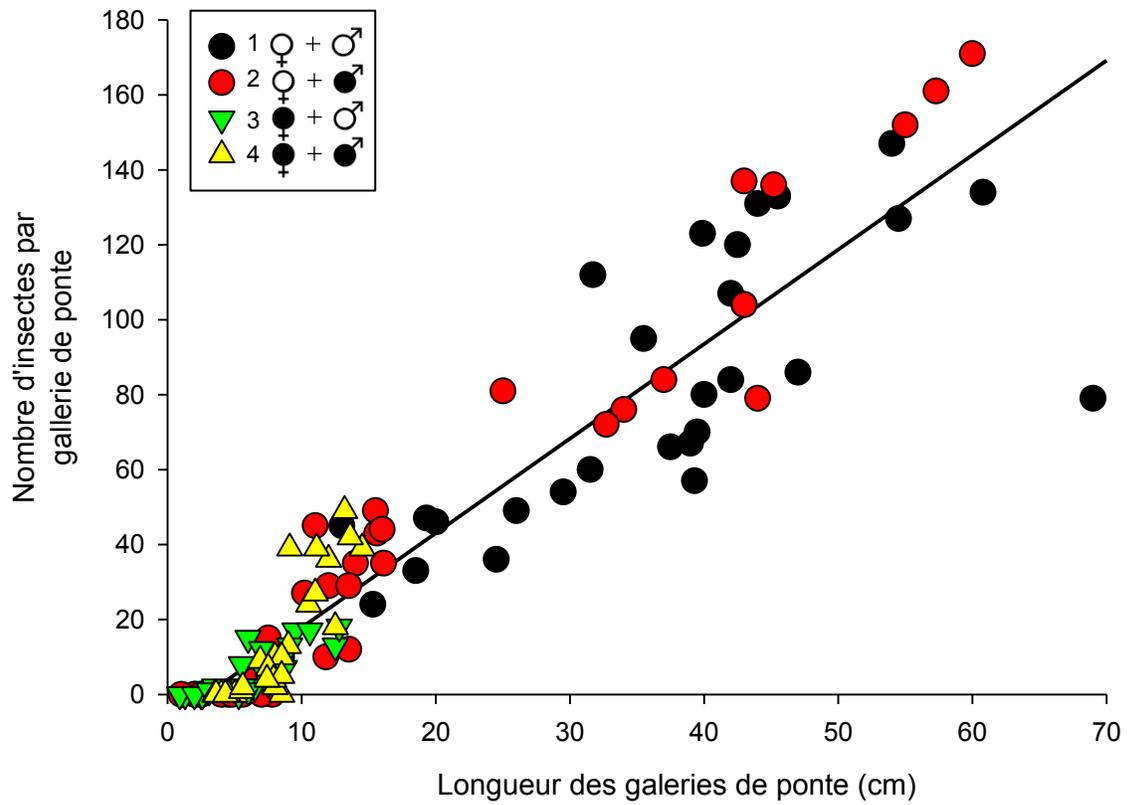
**Figure 6.10 : Longueur des galeries larvaires (moyenne  $\pm$  erreur type) creusées par des larves de *D. simplex* après 50 jours d'incubation à 20°C. Les symboles foncés indiquent que les insectes ont été mis en contact avec le champignon INRS-242 avant leur introduction dans les demi-bûches. Pour chacun des traitements, les barres ayant la même lettre ne diffèrent pas de façon significative (Duncan,  $p > 0,05$ ).**

Le troisième volet consistait à documenter les effets du champignon INRS-242 sur la structure de la population d'insectes, notamment le nombre de la progéniture, la distribution des stades du développement et la durée du cycle de développement d'insectes. Certes, les résultats ont démontré que le champignon causait des effets négatifs et significatifs sur la progéniture (MANOVA,  $n = 4664$ ,  $df = 3$ ,  $F = 12,6$ ,  $p < 0,0001$ ) (figure 6.11). Ainsi, le nombre total d'insectes était plus important dans le cas où les insectes parents n'ont pas été soumis au champignon (Traitement 1). Dans ce cas, le nombre moyen d'insectes par demi-bûche était de  $232,9 \pm 33,5$  individus. Ce nombre diminuait à  $163,2 \pm 33,4$  individus lorsque les parents mâles étaient contaminés par l'isolat INRS-242. Plus particulièrement, peu d'insectes de la progéniture ont été récoltés chez les Traitements 3 et 4, avec une moyenne de  $31,8 \pm 16,9$  et  $38,0 \pm 12,0$  respectivement.

Une corrélation entre le nombre d'insectes récoltés et la longueur des galeries de ponte a été observée (test Pearson,  $n = 117$ ;  $r^2 = 0,87$ ;  $p < 0,0001$ ) (figure 6.12). Par contre, même si le nombre d'insectes varie en fonction du traitement, aucune différence significative n'a été observée dans le patron de distribution des stades du développement de la progéniture de *D. simplex* (test de khi-carré,  $p > 0,05$ ) (tableau 6.5). De plus, en comparaison avec les résultats chez les témoins (Traitement 1), le champignon INRS-242 ne semblent pas avoir d'effet sur la durée du cycle de développement du dendroctone du mélèze.



**Figure 6.11 : Nombre total de dendroctone du mélèze récoltés après 50 jours d'incubation à 20°C.** Les symboles foncés indiquent que les insectes ont été mis en contact avec le champignon INRS-242 avant leur introduction dans les demi-bûches. Pour chacun des traitements, les barres ayant la même lettre ne diffèrent pas de façon significative (Duncan,  $p > 0,05$ ).



**Figure 6.12 : Corrélation entre le nombre total de dendroctone du mélèze récoltés et la longueur des galeries de ponte (test de Pearson,  $n = 117$  ;  $r^2 = 0,88$  ;  $p < 0,0001$ ). Les symboles foncés indiquent que les insectes ont été mis en contact avec le champignon INRS-242 avant leur introduction dans les demi-bûches.**

**Tableau 6.5 : Répartition des stades du développement de *D. simplex*.** Le développement de *D. simplex* suit la même distribution pour tous les traitements (test de khi-carré,  $p > 0,05$ ).

Traitements	Répartition (% $\pm$ erreur type)			Nombre total d'insectes
	Larves	Pupes	Adultes	
1 ♀ + ♂	9,6 $\pm$ 2,0	8,2 $\pm$ 1,8	82,2 $\pm$ 3,2	2330
2 ♀ + ♂	5,9 $\pm$ 1,6	5,6 $\pm$ 1,8	88,5 $\pm$ 3,2	1636
3 ♀ + ♂	0,8 $\pm$ 0,8	1,3 $\pm$ 1,0	97,9 $\pm$ 1,8	318
4 ♀ + ♂	10,9 $\pm$ 9,9	1,5 $\pm$ 1,5	87,6 $\pm$ 9,9	380

# CHAPITRE 7 : DISCUSSION

## 7.1 Degré-jour

Les insectes sont des organismes poïkilothermes ce qui implique que la température est un facteur important qui régule certains aspects de leurs comportements. Dans le cas des insectes subcorticaux, la température est une contrainte majeure sur leur développement et influence leur émergence (Powell & Bentz, 2009, Régnière & Bentz, 2007), leur activité d'accouplement et la ponte (Six & Bracewell, 2015). Des mortalités élevées ont été observées lorsque les insectes sont exposés à des températures hivernales extrêmes (Bentz *et al.*, 1991, Rousseau *et al.*, 2012). Chez les insectes multivoltins comme *D. frontalis*, la température peut influencer le nombre de générations par année (Raffa *et al.*, 2015). Chez certaines espèces telles que *D. rufipennis* et *D. ponderosae*, c'est la température qui détermine si la reproduction est univoltine ou semivoltine. Pour sa part, *D. simplex* est généralement considéré comme un insecte univoltin, mais les femelles peuvent produire plusieurs couvées par année si les conditions climatiques le permettent. Ainsi, il y a deux couvées à Terre-Neuve (Langor & Raske, 1987a, b), trois en Alaska (Seybold *et al.*, 2002) et au Minnesota (Mckee & Aukema, 2016). Au Québec, à l'arboretum de Cleveland, lors de l'étude, les multi-couvées n'ont jamais été observées. Les adultes de *D. simplex* émergent au printemps entre la première et la troisième semaine de mai, généralement lorsque les degrés-jours cumulés atteignent en moyenne de 45°C pour la température  $T_{base}$  10°C. Ces données sont similaires à celles observées par Mckee et Aukema (2015). Plus intéressant, la durée de vol de cet insecte varie entre 12 et 17 jours pour les trois années d'études. Cette courte période de vol permettrait aux adultes de *D. simplex* de coloniser les mélèzes et de se reproduire rapidement. Sous les scénarios de changement climatique, il ne serait pas surprenant d'observer des multi-couvées au Québec. De plus, dans le cas où le développement complet de toutes les couvées est synchronisé, cela pourrait favoriser les attaques massives des peuplements de mélèzes dans les prochaines années.

## 7.2 Élevage

Lors des premières récoltes des adultes de *D. simplex*, une forte mortalité a été enregistrée dans la population. Les conditions pour le maintien des insectes étaient certainement déficientes. Afin de pallier à cette situation, des efforts ont été consentis afin d'identifier des conditions d'élevage permettant d'améliorer la survie des insectes. Il est à noter qu'il n'existe aucune nourriture commerciale disponible pour élever ces insectes au laboratoire. Langor et Raske (1987b) ont utilisé le « *Bark sandwich* », tandis que McKee et Aukema (2015) ont choisi des demi-bûches du mélèze pour élever *D. simplex*. Ces méthodes sont particulièrement invasives pour l'environnement forestier, puisqu'il faut couper des arbres pour chaque cycle d'élevage. Après plusieurs essais, nos résultats ont démontré que le taux de survie des adultes de *D. simplex* a significativement augmenté lorsqu'ils sont nourris d'écorce provenant des branches ou du tronc du mélèze. En tenant compte des impacts environnementaux, l'utilisation de sections de branches a été préconisée comme source de nourriture pour les adultes. Dans le même sens, un volet de l'étude a porté sur la mise au point d'une technique favorisant le développement complet de l'insecte. Selon les équipes de Langor (1987b) et McKee (2015), les adultes de *D. simplex* peuvent se reproduire et réussir leur développement complet sous l'écorce en utilisant la technique du *Bark sandwich* ou l'introduction d'insectes sur des demi-bûches. Par curiosité, quelques adultes de *D. simplex* ont été maintenus sur des petites sections de branche de mélèze dans une boîte de Petri. Après l'accouplement, chaque femelle a pondu de 3 à 10 œufs. Suite à une incubation pendant 50 jours à 20°C, seulement 1% des œufs ont réussi à se développer pour atteindre le stade de l'adulte. Plusieurs facteurs pourraient expliquer ce faible rendement, soit la longueur des branches du mélèze, l'épaisseur du phloème et la lacune des éléments nutritifs favorables au développement des larves.

Différentes espèces de scolytes semblent exiger différentes épaisseurs du phloème pour leur développement (Raffa *et al.*, 2015). Il semble exister une relation directe entre l'épaisseur du phloème et la capacité reproductive des insectes (Amman, 1972). Les tissus de phloème contiennent une faible quantité d'azote ce qui devient un facteur limitant pour le développement des insectes herbivores, surtout au niveau de la durée du développement et la fécondité (Mattson, 1980). En milieu naturel, une association étroite avec leurs symbiotes, soit les champignons et les bactéries, permettrait aux scolytes de compenser pour les déficiences nutritives du phloème (Ayres *et al.*, 2000, Bleiker & Six, 2007, Popa *et al.*, 2012). Certaines espèces des champignons filamenteux provenant des genres *Ophiostoma*, *Ceratocystiopsis*, *Grosmania*, *Ceratocystis*, *Leptographium* et *Entomocorticium* ont été retrouvées dans les

galeries et/ou sur les insectes. Ces champignons ont été inoculés dans les galeries par les insectes parents (Langor & Raske, 1987b, Six, 2013). Il semble que certains entre eux jouent un rôle important dans le développement et l'émergence de certains stades d'insectes. Certaines familles bactériennes provenant de Proteobacteria, notamment Enterobacteriaceae et Gammaproteobacteria ont été retrouvées à l'intérieur du dendroctone du mélèze (Durand *et al.*, 2015). Les bactéries Enterobacteriaceae pourraient jouer le rôle important dans le processus de fixation d'azote et les activités cellulolytiques. Ainsi, la technique d'élevage développée dans la présente étude permettrait de mieux comprendre la biologie et le rôle des microorganismes dans la biologie du dendroctone du mélèze.

### **7.3 Pathogénicité des champignons entomopathogènes**

L'utilisation des champignons entomopathogènes comme agents de lutte biologique est une approche très prometteuse et écologiquement acceptable puisqu'ils sont à risque réduit pour les vertébrés, les plantes et l'environnement (Goettel & Hajek, 2001, Pell *et al.*, 2001). Plusieurs études ont montré la susceptibilité de plusieurs espèces d'insectes ravageurs agricoles et forestiers aux champignons, notamment certaines appartenant aux ordres des Lepidoptera (Asi *et al.*, 2013, Pell *et al.*, 1993), des Coleoptera (Giroux *et al.*, 2015, Johny *et al.*, 2012, Lavallée *et al.*, 2010), des Hemiptera (Sabbahi *et al.*, 2008b) et des Diptera (Achonduh & Tondje, 2008, Myrand *et al.*, 2015). Dû aux changements climatiques importants observés au cours des dernières années, les populations des scolytes ont progressivement augmentés dans les forêts conifères (Bentz *et al.*, 2010). Dans ce contexte, des études ont été réalisées afin d'évaluer la susceptibilité de certaines espèces d'insectes subcorticaux aux champignons entomopathogènes de l'ordre des Hypocreales (Batta, 2007, Draganova *et al.*, 2006, Kreutz *et al.*, 2004a, Lavallée *et al.*, 2005, Sevim *et al.*, 2010, Steinwender *et al.*, 2010). Cependant, aucune étude n'avait documentée l'efficacité de ces champignons contre les adultes du dendroctone du mélèze.

Ainsi, un des objectifs de cette étude était justement de documenter la susceptibilité des adultes de *D. simplex* à neuf isolats fongiques. Il s'agit d'une première étape cruciale permettant d'identifier et de sélectionner un isolat montrant un potentiel en tant qu'outil de lutte biologique contre les adultes du dendroctone du mélèze. Les résultats du criblage ont démontré que tous les isolats testés induisaient une mortalité chez les adultes du dendroctone. Cependant, cette susceptibilité varie en fonction des isolats fongiques auxquels ils sont soumis. De telles variations ont déjà été observées avec d'autres espèces de coléoptères (Devi *et al.*, 2008,

Latifian & Rad, 2012, Sabbahi *et al.*, 2009, Sabbahi *et al.*, 2008a). Parmi les isolats testés dans la présente étude, les adultes de *D. simplex* ont montré une susceptibilité particulière à trois isolats, notamment les isolats INRS-242 et INRS-462 de *B. bassiana* et l'isolat INRS-704 de *M. anisopliae* avec des mortalités respectivement de 64,4%, 43,5% et 55,7%. Les autres isolats de *B. bassiana*, notamment les isolats INRS-453, INRS-200, INRS-452 et INRS-243, ont induit une mortalité variant entre 25 et 30%. Cependant, les insectes ont montré une grande résistance lorsqu'ils étaient exposés aux deux isolats de *L. attenuatum*, INRS-1506 et INRS-1511.

Le degré de virulence des champignons entomopathogènes semble étroitement lié à la viabilité des conidies (Castrillo *et al.*, 2010, Inglis *et al.*, 1993, Sabbahi *et al.*, 2008a, b). Parmi les neuf isolats testés, les conidies de l'isolat INRS-242 de *B. bassiana* sont ceux ayant présenté le taux de germination le plus élevé. En fait, la corrélation entre la viabilité des conidies et leur virulence a permis d'identifier l'isolat INRS-242 de *B. bassiana* comme celui montrant un potentiel intéressant pour le développement d'une stratégie de lutte contre les adultes de *D. simplex*. Il s'agit d'un isolat indigène du Québec qui a été isolé pour la première fois sur des cadavres d'une autre espèce de scolyte, le grand hylésine du pin (*Tomicus piniperda*), montrant des signes d'une infection mycosique. Ainsi, nos résultats semblent supporter l'hypothèse voulant que les isolats ayant été collectés sur les mêmes espèces hôtes ou d'espèces phylogénétiquement proches soient généralement plus virulents que ceux issus d'espèces non apparentées (Jandricic *et al.*, 2014, Steinwender *et al.*, 2010). Au Canada, l'isolat INRS-242 de *B. bassiana* a démontré son efficacité contre plusieurs espèces de coléoptères, notamment l'agrile du frêne, *Agrilus planipennis* (Johny *et al.*, 2012, Lyons *et al.*, 2012), l'anthonome de la fleur du fraisier, *Anthonomus signatus* Say, et le charançon de la racine du fraisier, *Otirhychus ovatus* L. (Sabbahi *et al.*, 2008a, b), le charançon du pin blanc, *Pissodes strobi* W. D. Peck (Trudel *et al.*, 2007) et le grand hylésine du pin, *T. piniperda* (Lavallée *et al.*, 2005). Toutefois, pour chacune des espèces, la concentration létale (CL<sub>50</sub>) semble être spécifique. Par exemple, avec une concentration de  $7,4 \times 10^8$  conidies ml<sup>-1</sup>, l'isolat INRS-242 cause une mortalité de 50% des adultes de *D. simplex*. Par contre, 10 fois moins de conidies sont nécessaires pour obtenir le même résultat chez le charançon du pin blanc (Trudel *et al.*, 2007) et le grand hylésine du pin (Lavallée *et al.*, 2005).

Les variations de la pathogénicité des champignons pourraient être influencées par plusieurs facteurs, y compris la structure chimique de la cuticule d'insectes, les facteurs abiotiques sur la cuticule (Bogus *et al.*, 2010), les microbiotes associés aux insectes (Durand *et al.*, 2015, Popa

*et al.*, 2012, Wegensteiner, 2004) et le mode d'application fongique. La cuticule d'insectes est un point d'entrée pour tous les champignons entomopathogènes. L'abondance des composés hydrocarbures de la cuticule varie entre les insectes ainsi qu'entre les stades du développement de chaque insecte (Ortiz-Urquiza & Keyhani, 2013). Même si l'inhibition de l'adhésion des conidies à la surface de la cuticule est un mécanisme de défense assez rare, il est bien connu que la différence en abondance des composés hydrocarbures de la cuticule et la variété des composés antimicrobiens sécrétés à la surface de la cuticule peuvent avoir des effets sur la pathogénicité des préparations fongiques. Par exemple, les composés lipidiques et les aldéhydes de la cuticule de la punaise *Nezara viridula* L. ont des effets d'inhibition sur l'adhésion et la germination des conidies de *M. anisopliae* (Sosa-Gomez *et al.*, 1997). Pour sa part, le scarabée de feuille de saule cuivré, *Phratora vitellinae* L., sécrète les substances volatiles granulaires avec le salicylaldéhyde qui présentent une toxicité contre les champignons entomopathogènes (Gross *et al.*, 2008). Plus particulièrement, les larves et les adultes de la chrysomèle de la moutarde, *Phaedon cochleariae* Fabricius, transsudent des sécrétions glandulaires contenant les monoterpènes iridoïdes qui présentent les activités antifongiques contre *B. bassiana* (Gross *et al.*, 1998). De plus, la germination des conidies et le développement des hyphes sont profondément influencés par certains facteurs abiotiques à la surface de la cuticule d'insecte, notamment les nutriments, la teneur en eau, l'oxygène, la température et le pH (Sandhu *et al.*, 2012). Ainsi, les besoins nutritionnels des champignons entomopathogènes semblent dépendre de leur spectre d'hôtes. Sandhu (1995) a démontré que les champignons entomopathogènes ayant de larges spectres d'hôtes pourraient croître sur plusieurs milieux avec une grande variation des sources de carbone et d'azote non spécifiques. Par contre, ceux ayant des hôtes restreints semblent requérir des nutriments spécifiques pour leur développement (St Leger *et al.*, 1989).

Srei (2011) a démontré que différents isolats fongiques avaient besoin de conditions environnementales et de sources nutritives intrinsèques même s'ils sont de la même espèce. La plupart des champignons Hypocreales, notamment *B. bassiana* et *M. anisoplaie*, exigent une humidité relative supérieure à 92% pour la germination des conidies, l'expansion de l'appressorium et l'infection (Hallsworth & Magan, 1999). En revanche, certains champignons peuvent croître dans des conditions plus arides. Par exemple, juste l'humidité existant à la surface de la cuticule est suffisante pour la croissance de certains isolats de *B. bassiana* (Fargues *et al.*, 1997b, Faria & Wraight, 2001). D'ailleurs, la présence ou l'absence d'oxygène influence le type de spores produites. L'oxygène est nécessaire pour la formation des conidies

à la surface de la cuticule d'insecte, mais il devient facultatif pour la formation des blastospores *in vivo*, c'est-à-dire dans l'hémocèle de l'insecte. Pour sa part, la température joue un rôle important sur l'efficacité des champignons de l'ordre des Hypocreales. La température optimale pour la plupart des champignons se situe entre 20 et 25°C, mais l'infection et la mycose pourraient prendre place à des températures variant de 15 à 30°C. Le développement des hyphes est ralenti à une température supérieure à 30°C et ils arrêtent de croître à une température d'environ de 37°C (Inglis *et al.*, 2001). En effet, la température idéale pour la croissance des champignons semble être tributaire de leur origine géographique. Le pH pourrait affecter les expressions de gènes codant pour les différentes enzymes qui nécessitent pour le processus d'infection. Par exemple, lors de l'adhésion des conidies de *M. anisopliae*, les hydrophobines sont exprimées à pH 5 et 8 et ne le sont pas à pH 3 (St Leger *et al.*, 1998). Selon les mêmes auteurs, le pH de la cuticule requis pour la pénétration des hyphes de *M. anisopliae* devrait se situer entre 6,3 et 7,7.

Comme mentionné précédemment, outre la structure de la cuticule et les composés défensifs sécrétés à la surface de la cuticule, les communautés microbiennes exogènes et endogènes des insectes semblent jouer un rôle potentiel et important dans la défense contre les champignons entomopathogènes (Popa *et al.*, 2012, Wegensteiner, 2004, Zindel *et al.*, 2011). L'équipe de Davis (2015) a indiqué que les composés volatils sécrétés par les levures associés aux insectes pourraient inhiber la croissance de *B. bassiana*. Cependant, leurs effets antagonismes ne sont pas encore bien compris. Certaines espèces de bactéries appartenant au genre *Pseudomonas* ont été retrouvées sur la cuticule de *D. simplex* (Durand *et al.*, 2015). Ces bactéries sécrètent certains composés antifongiques, notamment des protéases et des chitinases, qui seraient impliqués dans la dégradation des membranes cellulaires des champignons (Naik & Sakthivel, 2006). D'ailleurs, l'équipe de Park (2012) a isolé trois autres métabolites à partir d'une souche de *Pseudomonas aurantiaca* qui possèdent des propriétés antifongiques contre trois espèces des champignons phytopathogènes, soit *Phytophthora capsici* Leonian, *Rhizoctonia solani* AG-1(IA) J. G. Kühn et *Pythium ultimum* Trow. Cependant, leurs effets antifongiques contre les champignons de l'ordre des Hypocreales n'ont pas été bien documentés. Même si plusieurs investigations devraient être entreprises, nos résultats suggèrent que l'isolat INRS-242 de *B. bassiana* est un bon candidat pour la lutte microbiologique contre les adultes du dendroctone du mélèze.

## 7.4 Dispositif d'autodissémination

L'utilisation d'un dispositif d'autodissémination comme méthode d'inoculation directe des champignons entomopathogènes n'est pas une nouvelle approche. Ainsi plusieurs dispositifs ont été fabriqués en considérant les particularités des insectes ciblés (Dowd & Vega, 2003, Liu & Bauer, 2008). Toutefois, ces systèmes utilisent généralement les conidies sous la forme de poudre. Pour sa part, la pochette d'autodissémination proposée par Guertin et Lavallée, est placée dans une chambre qui protège les conidies d'un lessivage par la pluie et d'une inactivation liée à l'exposition par des rayons UV, tout en conservant les conditions pour leur production. Ce dispositif d'autodissémination a été démontré efficace lorsqu'il a été utilisé comme source de dissémination des conidies de l'isolat INRS-242 de *B. bassiana* chez l'agrile du frêne (Lyons *et al.*, 2012). Les insectes marchant sur la surface des pochettes sont contaminés par l'isolat fongique. Dans le cas du dendroctone du mélèze, les résultats montrent que l'utilisation de la chambre d'autodissémination fongique permettait d'induire une mortalité de 98% des adultes de *D. simplex*. De plus, la charge de conidies portées par les individus exposés est en moyenne de  $2,1 \times 10^9$  conidies par insecte. À titre informatif, si une méthode d'immersion avait été utilisée, une suspension supérieure à  $10^{12}$  conidies  $\text{ml}^{-1}$  aurait été nécessaire, afin d'obtenir des résultats similaires. Les résultats ont démontré pour la première fois l'efficacité de l'isolat INRS-242 de *B. bassiana* et du dispositif d'autodissémination comme méthode d'inoculation fongique pouvant cibler les adultes de *D. simplex*.

## 7.5 Réponses chimiotactiques des adultes de *D. simplex*

La capacité de pouvoir détecter la présence des champignons entomopathogènes par les insectes est un élément nécessaire à documenter puisqu'il doit être considéré dans la sélection définitive d'un isolat fongique devant être intégré en lutte biologique. Plusieurs comportements d'évitement, notamment les alarmes, les agrégations, les toilettages et les défenses, sont bien connus chez certaines espèces d'insectes appartenant aux ordres des Isoptera et des Orthoptera (Chouvenc *et al.*, 2008, Meyling & Pell, 2006). En 2002, l'équipe de Villani (2002) a démontré que les courtilières, *Scapteriscus vicinus* Scudder, sont capables d'éviter le contact avec du sol contaminé par un isolat de *M. anisopliae* en creusant des tunnels verticaux dans le sol. Pour leur part, certaines espèces de termites, telles que *Coptotermes lacteus* Froggaut, *C. formosanus* Shiraki et *Reticulitermes flavipes* Kollar, sont en mesure de reconnaître les individus infectés par le champignon *M. anisopliae* (Staples & Milner, 2000). Selon Myles

(2002), les adultes de *R. flavipes* sains ont montré une combinaison de comportements d'alarmes, d'agrégations, de toilettages et de défenses envers les individus contaminés par *M. anisopliae*. Contrairement à ces observations, aucun comportement d'évitement fongique n'a été observé chez les adultes de doryphore de la pomme de terre, *Leptinotarsa decemlineata* (Klinger *et al.*, 2006, Long *et al.*, 2000). Nos résultats du test olfactif supportent ces dernières observations. En émettant l'hypothèse que les adultes de *D. simplex* possèdent les récepteurs requis pour la détection des champignons antagonistes, nos résultats semblent indiquer qu'ils ne sont pas activés par l'isolat INRS-242.

Selon les résultats du test gustatif, il semble que les insectes possèdent des capacités chimiotactiques gustatives leur permettant de discriminer leurs nourritures contaminées et non contaminées. Par contre, aucun comportement d'évitement n'a été observé pendant les expérimentations. L'incapacité dans la détection de l'odeur fongique et l'absence du comportement d'évitement chez les adultes de *D. simplex* seraient des éléments bénéfiques dans l'application de la stratégie de transmission des conidies du champignon INRS-242 entre les individus infectés et les individus sains via le dispositif d'autodissémination.

## **7.6 Effet du champignon INRS-242 sur la biologie reproductive de *D. simplex***

Dans le cadre de l'étude, on cherchait à documenter la capacité de transmission horizontale du champignon d'un partenaire à l'autre. La transmission fongique chez les insectes durant la copulation est assez bien documentée (Quesada-Moraga *et al.*, 2008, Toledo *et al.*, 2007). Ainsi, Toledo *et al.* (2007) proposait d'exploiter la libération d'individus contaminés par un champignon entomopathogène en lutte biologique, afin qu'ils puissent assurer sa dissémination au sein d'une population d'insectes ravageurs. En 1990, Kaaya et Okech (1990) ont démontré que les mâles d'une mouche tsé-tsé du genre *Glossina* étaient capables de transmettre des conidies de *B. bassiana* et de *M. anisopliae* lors de l'accouplement avec des femelles. De plus, la transmission par les mâles aux femelles d'une infection par *M. anisopliae* durant l'accouplement a également été observée chez une espèce de moustique, *Anopheles gambiae* s.s. Giles (Scholte *et al.*, 2004). Plus récemment, ce phénomène a aussi été noté chez la mouche à fruit mexicaine, *Anastrepha ludens* Loew, dans la transmission des conidies de *B. bassiana* (Toledo *et al.*, 2007) et chez le foreur de la tige de céréales, *Busseola fusca* Fuller, dans la transmission des conidies de *M. anisopliae* et de *B. bassiana* (Maniania *et al.*, 2011).

Cependant, l'efficacité de la transmission fongique pendant la copulation peut varier en fonction du sexe de l'individu porteur. Par exemple, le taux de transmission de *M. anisopliae* entre les mâles et les femelles au sein de la population de la mouche méditerranéenne, *Ceratitis capitata* Wiedemann, était plus élevé lorsque les mâles étaient porteurs du pathogène (Quesada-Moraga *et al.*, 2008). Contrairement à cette observation, nos résultats du test de diagnostic par PCR démontrent que l'infection des femelles de *D. simplex* induit une mycose plus importante chez les partenaires mâles que l'inverse. La maladie fongique pourrait être transmise dès le premier contact entre les individus infectés et les individus sains (Kreutz *et al.*, 2004b). Considérant que l'accouplement des adultes de *D. simplex* dure en moyenne 92 secondes et au maximum 3 minutes (Langor & Raske, 1987b), l'utilisation d'un dispositif d'autodissémination des conidies fongiques pourrait être une approche à préconiser pour lutter contre les populations cryptiques du dendroctone du mélèze. De plus, ces résultats permettent de confirmer la performance du dispositif expérimental employé pour évaluer la dissémination du champignon INRS-242 entre les parents infectés aux parents sains. Les femelles de *D. simplex* pourraient être des candidats cibles importants pour disséminer de ce champignon.

Comme mentionné, l'exposition des adultes du dendroctone du mélèze à l'isolat INRS-242 provoque une mortalité élevée des individus. Dans le cadre de l'étude, on cherchait aussi à documenter si cette exposition pouvait avoir des impacts significatifs sur certains paramètres liés aux comportements reproductifs et par le fait même sur la structure de la population de l'insecte. Nos résultats ont démontré que le champignon INRS-242 n'avait pas d'effet sur la distribution des stades (larves, pupes et adultes) et la durée du développement de *D. simplex* et ni sur le nombre de galeries de ponte. Par contre, l'exposition des femelles à la préparation fongique entraînait des effets significatifs sur la longueur des galeries de ponte et des galeries larvaires qui étaient plus courtes ainsi que sur le nombre total d'insectes de la nouvelle génération qui était moindre. La virulence du champignon INRS-242 chez les adultes de *D. simplex* commence son action pathogène au 3<sup>ème</sup> jour après la contamination. Ce délai permettrait aux femelles de creuser une bonne longueur des galeries de ponte et de libérer les phéromones pour attirer les mâles aux sites d'infestation. Habituellement, les mâles de *D. simplex* arrivent aux sites deux jours après l'arrivée des femelles et ils attendent à l'entrée jusqu'à quand la longueur des galeries de ponte atteignent au minimum de 6 mm (Langor & Raske, 1987b). Chez les insectes monogames, les femelles dépensent beaucoup d'énergie dans l'initiation des attaques en creusant les trous d'entrées et les galeries de ponte (Langor & Raske, 1987a, Seybold *et al.*, 2002). Dans ce contexte, les femelles infectées par l'isolat INRS-242 semblent moins actives dans ces activités. Par ailleurs, le temps moyen de survie des

adultes de *D. simplex* après une infection par le champignon est entre 5 et 6 jours. En outre, le nombre d'insectes de la progéniture est particulièrement corrélé avec la longueur des galeries de ponte. Par conséquent, plus les galeries de pontes sont courtes, moins d'insectes de la progéniture ont été récoltés. En effet, ces résultats suggèrent que les efforts doivent cibler les femelles de *D. simplex* comme porteuse du champignon INRS-242 de *B. bassiana* dans l'application de la stratégie de transmission horizontale.

## CHAPITRE 8 : CONCLUSION

Sous les scénarios de réchauffements climatiques, la durée du développement du dendroctone du mélèze est plus courte qu'observée par le passé, influençant ainsi les multi-couvées et le voltinisme de l'insecte, pouvant entraîner une augmentation des populations de *D. simplex*. De plus, ces changements peuvent causer d'importantes perturbations des écosystèmes forestiers, exerçant alors des impacts au niveau économique, social et environnemental. Nos recherches démontrent pour la première fois le développement d'une stratégie de lutte biologique efficace et à risque réduit pour la santé humaine, animale et environnementale contre les populations *D. simplex*.

Le dendroctone du mélèze est un insecte ravageur forestier très peu étudié. Grâce à la mise en élevage à 20°C sur des petites sections de branche du mélèze, les adultes de *D. simplex* récoltés du terrain, soit par piégeage ou par décortilage, peuvent survivre plus longtemps que ceux conservés à 4°C. Suite à cet élevage, nous pouvons sélectionner que des insectes rigoureux pour des fins d'expérimentations au laboratoire. Par contre, cette méthode devrait être améliorée afin d'accroître l'effectif de la reproduction de *D. simplex*. Ainsi, plusieurs facteurs qui pourraient influencer la métamorphose de l'insecte, notamment la longueur des branches, l'épaisseur du phloème ainsi que les microorganismes associés à l'insecte, devraient être considérés. En tenant compte l'aspect du changement climatique, une étude sur l'effet de température sur le voltinisme de *D. simplex* au Québec devrait être envisagée.

L'application fongique par les approches conventionnelles basées sur la pulvérisation d'insecticides chez *D. simplex* est moins efficace puisque ces insectes se développent sous l'écorce. En utilisant le dispositif d'autodissémination, l'isolat INRS-242 de *B. bassiana* a démontré être un agent pathogène prometteur pour contrôler les populations de *D. simplex*. En outre, les résultats ont démontré que cette approche permettait d'accroître la probabilité que les insectes soient en contact avec ce champignon et ainsi acquièrent une dose létale de l'agent entomopathogène. D'ailleurs, les résultats d'études antérieures ont démontré que la viabilité et la persistance de l'activité insecticide des conidies de l'isolat INRS-242 placés dans une chambre de dissémination étaient plus longue que celles retrouvées lors d'application par pulvérisation sur le feuillage. Moins dommageables que les pesticides chimiques, l'utilisation d'un pathogène fongique sélectionné est écologiquement plus acceptable. Étant relativement

spécifique, le dispositif d'autodissémination ne ciblera que les espèces d'insectes attirés dans le piège par les leurres, ce qui cause moins d'effets néfastes aux autres populations d'insectes.

Lors de la présente étude, nous avons observé que les adultes de *D. simplex* ne démontrent aucun comportement d'évitement en présence du champignon INRS-242. En conséquence, les parents de *D. simplex* contaminés ont réussi à transmettre le pathogène fongique aux individus non contaminés, entraînant ainsi une mortalité élevée chez ces derniers. En plus de ce qui a observé chez les parents, le champignon INRS-242 affecte également certains paramètres liés aux comportements reproductifs et à la structure de la population de *D. simplex*. Par exemple la longueur de la galerie de ponte diminue et moins d'insectes ont été récoltés lors que les parents ont été soumis à la préparation fongique. En se basant sur ces résultats, une question pourrait se poser si le champignon a un effet négatif sur la physiologie de l'insecte. De plus, l'efficacité du champignon *B. bassiana* et le dispositif d'autodissémination sur les populations de *D. simplex* en milieu naturel devrait être évaluée afin de comparer avec les résultats obtenus au laboratoire. Plusieurs paramètres pourraient être considérés, notamment la température, l'humidité, la précipitation, la position des pièges d'autodissémination, l'utilisation des leurres afin d'attirer plus d'insectes cibles, la viabilité des conidies sur le terrain, l'âge et l'épaisseur d'écorce des arbres hôtes, la période de vol, la physiologie d'insectes avant et après l'infection fongique, la fécondité, le développement des insectes sous l'écorce ainsi que l'effectif de la progéniture. Il serait aussi intéressant d'inclure dans l'étude le rôle des microorganismes symbiotiques sur l'établissement des insectes ainsi que l'effet antagonisme de certains microorganismes associés à l'insecte sur la pathogénicité des champignons entomopathogènes afin d'obtenir les résultats plus concrets.

En conclusion, cette étude novatrice portant sur la stratégie de transmission horizontale nous a permis de mieux comprendre l'impact du champignon entomopathogène INRS-242 sur la biologie reproductive de *D. simplex*. Les connaissances acquises durant cette étude permettront d'élaborer un outil de lutte microbiologique simple et efficace et de l'intégrer aux régies de phytoprotection contre d'autres ravageurs subcorticaux. Toutefois, les connaissances sur la biologie de l'insecte cible, de l'hôte et de l'agent entomopathogène devraient être considérées afin d'accroître l'efficacité du piège d'autodissémination et de la stratégie de transmission horizontale.

## RÉFÉRENCES

- Aanen DK, Slippers B & Wingfield MJ (2009) Biological pest control in beetle agriculture. *Trends in Microbiology* 17: 1978-1982.
- Abbott B, Stennes B & van Kooten CG (2008) *An economic analysis of mountain pine beetle impacts in a global context*. Working paper (University of Victoria). 29 p.
- Abbott WS (1925) A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology* 18: 265-267.
- Achonduh OA & Tondje PR (2008) First report of pathogenicity of *Beauveria bassiana* RBL1034 to the malaria vector, *Anopheles gambiae* s.l. (Diptera; Culicidae) in Cameroon. *African Journal of Biotechnology* 7: 931-935.
- Adams AS, Aylward FO, Adams SM, Erbilgin N, Aukema BH, Currie CR, Suen G & Raffa KF (2013) Mountain pine beetles colonizing historical and naïve host trees are associated with a bacterial community highly enriched in genes contributing to terpene metabolism. *Applied and Environmental Microbiology* 79: 3468-3475.
- Adams AS, Boone CK, Bohlmann J & Raffa KF (2011) Responses of bark beetle-associated bacteria to host monoterpenes and their relationship to insect life histories. *Journal of Chemical Ecology* 37: 808–817.
- Adams AS & Six DL (2007) Temporal variation in mycophagy and prevalence of fungi associated with developmental stages of *Dendroctonus ponderosae* (Coleoptera: Curculionidae). *Environmental Entomology* 36: 64-72.
- Agriculture and Agri-Food Canada (2016) *Biopesticides*. Government of Canada, <http://www.agr.gc.ca/eng/?id=1392136770253> (Consulté le 14 juillet 2016)
- Al-mazra'awi MS, Shipp L, Broadbent B & Kevan P (2006) Biological control of *Lygus lineolaris* (Hemiptera: Miridae) and *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae) by *Bombus impatiens* (Hymenoptera: Apidae) vectored *Beauveria bassiana* in greenhouse sweet pepper. *Biological Control* 37: 89-97.
- Amman GD (1972) Mountain pine beetle brood production in relation to thickness of lodgepole pine phloem. *Journal of Economic Entomology* 65: 138-140.
- Armenta R, Martínez AM, Chapman JW, Magallanes R, Goulson D, Caballero P, Cave RD, Cisneros J, Valle J, Castillejos V, Penagos DI, García LF & Williams T (2003) Impact of a nucleopolyhedrovirus bioinsecticide and selected synthetic insecticides on the abundance of insect natural enemies on maize in Southern Mexico. *Journal of Economic Entomology* 96: 649-661.
- Arnold CY (1959) The determination and significance of the base temperature in a linear heat unit system. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science* 74: 430-445.
- Asi MR, Bashir MH, Afzal M, Zia K & Akram M (2013) Potential of entomopathogenic fungi for biocontrol of *Spodoptera litura* Fabricius (Lepidoptera: Noctuidae). *The Journal of Animal and Plant Sciences* 23: 913-918.
- Aung OM, Soyong K & Hyde KD (2008) Diversity of entomopathogenic fungi in rainforests of Chiang Mai province, Thailand. *Fungal Diversity* 30: 15-22.

- Ayres MP, Wilkens RT, Ruel JJ, Lombardero MJ & Vallery E (2000) Nitrogen budgets of phloem-feeding bark beetles with and without symbiotic fungi. *Ecology* 81: 2198-2210.
- Babu BK, Saxena AK, Srivastava AK & Arora DK (2007) Identification and detection of *Macrophomina phaseolina* by using species-specific oligonucleotide primers and probe. *Mycologia* 99: 797-803.
- Bartos DL & Amman GD (1989) *Microclimate: an alternative to tree vigor as a basis for mountain pine beetle infestations*. USDA Forest Service, Intermountain Forest and Range Experiment Station. 10 p.
- Batta YA (2007) Biocontrol of almond bark beetle (*Scolytus amygdali* Geurin-Meneville, Coleoptera: Scolytidae) using *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Deuteromycotina: Hyphomycetes). *Journal of Applied Microbiology* 103: 1406-1414.
- Baverstock J, Roy HE & Pell JK (2010) Entomopathogenic fungi and insect behaviour: from unsuspecting hosts to targeted vectors. *BioControl* 55: 89-102.
- Begon M, Harper JL & Townsend CR (1996) *Ecology: individuals, populations and communities*. Blackwell Science, Third Ed. 1068 p.
- Behle RW (2006) Importance of direct spray and spray residue contact for infection of *Trichoplusia ni* larvae by field applications of *Beauveria bassiana*. *Journal of Economic Entomology* 99: 1120-1128.
- Benoit BJ & Blais JR (1984) Pertes de bois causées par le dendroctone du mélèze. *Phytoprotection* 65: 89-94.
- Bentz BJ, Logan JA & Amman GD (1991) Temperature-dependent development of the mountain pine beetle (Coleoptera : Scolytidae) and simulation of its phenology. *Canadian Entomologist* 123: 1083-1094.
- Bentz BJ, Régnière J, Fettig CJ, Hansen EM, Hayes JL, Hicke JA, Kelsey RG, Negrón JF & Seybold SJ (2010) Climate change and bark beetles of the Western United States and Canada: direct and indirect effects. *BioScience* 60: 602-613.
- Bentz BJ & Six DL (2006) Ergosterol content of fungi associated with *Dendroctonus ponderosae* and *Dendroctonus rufipennis* (Coleoptera: Curculionidae, Scolytinae). *Annals of the Entomological Society of America* 99: 189-194.
- Benz G (1987) Environment. *Epizootiology of insect diseases*, Fuxa JR & Tanada Y (Édit.) Wiley-Interscience, New York, USA. p 177-214.
- Bleiker KP & Six DL (2007) Dietary benefits of fungal associates to an eruptive herbivore: potential implications of multiple associates on host population dynamics. *Environmental Entomology* 36: 1384-1396.
- Boguś MI, Czygier M, Gołębiowski M, Kędra E, Kucińska J, Mazgajska J, Samborski J, Wieloch W & Włóka E (2010) Effects of insect cuticular fatty acids on in vitro growth and pathogenicity of the entomopathogenic fungus *Conidiobolus coronatus*. *Experimental Parasitology* 125: 400-408.
- Boucias DG, Pendland JC & Latge JP (1988) Nonspecific factors involved in attachment of entomopathogenic deuteromycetes to host insect cuticle. *Applied and Environmental Microbiology* 54: 1795-1805.
- Bradfish GA & Harmer SL (1990)  $\omega$ -Conotoxin GVIA and nifedipine inhibit the depolarizing action of the fungal metabolite, destruxin B on muscle from the tobacco budworm (*Heliothis virescens*). *Toxicon* 28: 1249-1254.

- Brand JM, Bracke JW, Britton LN, Markovetz AJ & Barras SJ (1976) Bark beetle pheromones: production of verbenone by a mycangial fungus of *Dendroctonus frontalis*. *Journal of Chemical Ecology* 2: 195-199.
- Bridges JR (1981) Nitrogen-fixing bacteria associated with bark beetles. *Microbial Ecology* 7: 131-137.
- Bruns TD, White TJ & Taylor JW (1991) Fungal molecular systematics *Annual Review of Ecology and Systematics* 22: 525-564.
- Burnside RE, Holsten EH, Fettig CJ, Kruse JJ, Schultz ME, Hayes CJ, Graves AD & Seybold SJ (2011) *Northern spruce engraver*. U. S. Department of Agriculture, Forest Service, Portland, OR. 13 p.
- Campos RA, Arruda W, Boldo JT, da Silva MV, de Barros NM, de Azevedo JL, Schrank A & Vainstein MH (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.
- Cardoza YJ, Klepzig KD & Raffa KF (2006) Bacteria in oral secretions of an endophytic insect inhibit antagonistic fungi. *Ecological Entomology* 31: 636-645.
- Carreck NL, Butt TM, Clark SJ, Ibrahim L, Isger EA, Pell JK & Williams IH (2007) Honey bees can disseminate a microbial control agent to more than one inflorescence pest of oilseed rape. *Biocontrol Science and Technology* 17: 179-191.
- Carroll AL, Shore TL & Safranyik L (2006) Direct control: theory and practice. *The mountain pine beetle – A synthesis of biology, management, and impacts in lodgepole pine*, Safranyik L & Wilson WR (Édit.) Natural Resources Canada, Canadian Forest Service, Pacific Forestry Centre, Victoria, BC, Canada. p 155-172.
- Castrillo LA, Griggs MH, Liu H, Bauer LS & Vandenberg JD (2010) Assessing deposition and persistence of *Beauveria bassiana* GHA (Ascomycota: Hypocreales) applied for control of the emerald ash borer, *Agrilus planipennis* (Coleoptera: Buprestidae), in a commercial tree nursery. *Biological Control* 54: 61-67.
- Castrillo LA, Vandenberg JD & Wraight SP (2003) Strain-specific detection of introduced *Beauveria bassiana* in agricultural fields by use of sequence-characterized amplified region markers. *Journal of Invertebrate Pathology* 82: 75-83.
- Chouvenc T, Su N-Y & Elliott ML (2008) Interaction between the subterranean termite *Reticulitermes flavipes* (Isoptera: Rhinotermitidae) and the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* in foraging arenas. *Journal of Economic Entomology* 101: 885-893.
- Clarkson JM & Charnley AK (1996) New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects. *Trends in Microbiology* 4: 197-203.
- Cory JS & Evans HF (2007) Viruses. *Field manual of techniques in invertebrate pathology*, Lacey LA & Kaya HK (Édit.) Springer, Dordrecht, The Netherlands, Second Ed. p 149-174.
- Costanza R, d'Arge R, de Groot R, Farber S, Grasso M, Hannon B, Limburg K, Naeem S, O'Neill RV, Paruelo J, Raskin RG, Sutton P & van den Belt M (1997) The value of the world's ecosystem services and natural capital. *Nature* 387: 253-260.
- Cremer S, Armitage SAO & Schmid-Hempel P (2007) Social immunity. *Current Biology* 17: R693-R702.

- Davis TS (2015) The ecology of yeasts in the bark beetle holobiont: a century of research revisited. *Microbial Ecology* 69: 723-732.
- de Faria MR & Wraight SP (2007) Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biological Control* 43: 237-256.
- De Kesel A (1995) Relative importance of direct and indirect infection in the transmission of *Laboulbenia slackensis* (Ascomycetes, Laboulbeniales). *Belgian Journal of Botany* 128: 124-130.
- Destéfano RHR, Destéfano SAL & Messias CL (2004) Detection of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* within infected sugarcane borer *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera, Pyralidae) using specific primers. *Genetics and Molecular Biology* 27: 245-252.
- Devi KU, Padmavathi J, Rao CUM, Khan AAP & Mohan MC (2008) A study of host specificity in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Hypocreales, Clavicipitaceae). *Biocontrol Science and Technology* 18: 975-989.
- Doberski JW (1981) Comparative laboratory studies on three fungal pathogens of the elm bark beetle *Scolytus scolytus*: pathogenicity of *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, and *Paecilomyces farinosus* to Larvae and Adults of *S. scolytus*. *Journal of Invertebrate Pathology* 37: 188-194.
- Douglas AE (2009) The microbial dimension in insect nutritional ecology. *Functional Ecology* 23: 38-47
- Dowd PF & Vega FE (2003) Autodissemination of *Beauveria bassiana* by sap beetles (Coleoptera: Nitidulidae) to overwintering sites. *Biocontrol Science and Technology* 13: 65-75.
- Draganova S, Takov D & Doychev D (2006) Bioassays with isolates of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. and *Paecilomyces farinosus* (Holm.) Brown & Smith against *Ips sexdentatus* Boerner and *Ips acuminatus* Gyll. (Coleoptera: Scolytidae). *Plant Science* 44: 24-28.
- Durand A-A, Bergeron A, Constant P, Buffet JP, Déziel E & Guertin C (2015) Surveying the endomicrobiome and ectomicrobiome of bark beetles: the case of *Dendroctonus simplex*. *Scientific Reports* 5: 17190.
- Eilenberg J, Hajek A & Lomer C (2001) Suggestions for unifying the terminology in biological control. *BioControl* 46: 387-400.
- Entz SC (2005) *Molecular methods and isolates of the entomopathogenic fungus Metarhizium anisopliae for environmentally sustainable control of grasshoppers in Canada*. Master of Science (University of Letgbridge). 127 p.
- Fan Y, Fang W, Guo S, Pei X, Zhang Y, Xiao Y, Li D, Jin K, Bidochka MJ & Pei Y (2007) Increased insect virulence in *Beauveria bassiana* strains overexpressing an engineered chitinase. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 295-302.
- Fargues J, Goettel MS, Smits N, Ouedraogo A & Rougier M (1997a) Effect of temperature on vegetative growth of *Beauveria bassiana* isolates from different origins. *Mycologia* 89: 383-392.
- Fargues J, Goettel MS, Smits N, Ouedraogo A, Vidal C, Lacey LA, Lomer CJ & Rougier M (1996) Variability in susceptibility to simulated sunlight of conidia among isolates of entomopathogenic hyphomycetes. *Mycopathologia* 135: 171-181.

- Fargues J, Ouedraogo A, Goettel MS & Lomer CJ (1997b) Effects of temperature, humidity and inoculation method on susceptibility of *Schistocerca gregaria* to *Metarhizium flavoviride*. *Biocontrol Science and Technology* 7: 345-356.
- Faria M & Wraight SP (2001) Biological control of *Bemisia tabaci* with fungi. *Crop Protection* 20: 767-778.
- Feng Z, Carruthers RI, Roberts DW & Robson DS (1985) Age-specific dose-mortality effects of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) on the european corn borer, *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Invertebrate Pathology* 46: 259-264.
- Ferron P (1977) Influence of relative humidity on the development of fungal infection caused by *Beauveria bassiana* [fungi imperfecti, Moniliales] in imagines of *Acanthoscelides obtectus* [Col.: Bruchidae]. *Entomophaga* 22: 393-396.
- Fettig CJ, Klepzig KD, Billings RF, Munson AS, Nebeker TV, Negrón JF & Nowak JT (2007) The effectiveness of vegetation management practices for prevention and control of bark beetle infestations in coniferous forests of the western and southern United States. *Forest Ecology and Management* 238: 24-53.
- Fettig CJ & McKelvey SR (2010) Bark beetle responses to stand structure and prescribed fire at Blacks mountain experimental forest, California, USA: 5-year data. *Fire Ecology* 6: 26-42.
- Fettig CJ, McMillin JD, Anhold JA, Hamud SM, Borys RR, Dabney CP & Seybold SJ (2006) The effects of mechanical fuel reduction treatments on the activity of bark beetles (Coleoptera: Scolytidae) infesting ponderosa pine. *Forest Ecology and Management* 230: 55-68.
- Finney DJ (1971) *Probit analysis*. Cambridge University Press, New York, USA, Third Ed. 333 p.
- Fouly HM, Wilkinson HT & Chen W (1997) Restriction analysis of internal transcribed spacers and the small subunit gene of ribosomal DNA among four *Gaeumannomyces* species. *Mycologia* 89: 590-597.
- Gagné P (2005) *Maladies et ravageurs des arbres à croissance rapide au Québec: revue de littérature*. Réseau Ligniculture Québec. 32 p.
- Garrido-Jurado I, Márquez M, Ortiz-Urquiza A, Santiago-Álvarez C, Iturriaga EA, Quesada-Moraga E, Monte E & Hermosa R (2011) Genetic analyses place most spanish isolates of *Beauveria bassiana* in a molecular group with world-wide distribution. *BMC Microbiology* 11: 84.
- Gibson CM & Hunter MS (2010) Extraordinarily widespread and fantastically complex: comparative biology of endosymbiotic bacterial and fungal mutualists of insects. *Ecology Letters* 13: 223-234.
- Giroux F, Lavallée R, Bauce É & Guertin C (2015) Susceptibility of the japanese beetle, *Popillia japonica* (Newman) (Coleoptera: Scarabaeidae), to entomopathogenic Hypocreales fungi. *Phytoprotection* 95: 1-6.
- Goettel MS & Hajek AE (2001) Evaluation of non-target effects of pathogens used for management of arthropods. *Evaluating indirect ecological effects of biological control*, Wajnberg E, Scott JK & Quimby PC (Édit.) CABI Publishing, Wallingford, USA. p 81-97.

- Goettel MS & Roberts DW (1992) Mass production, formulation and field application of entomopathogenic fungi. *Biological control of locusts and grasshoppers*, Lomer CJ & Prior C (Édit.) CABI, Wallingford, UK. p 230-238.
- Goettle MS (1995) The utility of bioassays in the risk assessment of entomopathogenic fungi. *Biotechnology Risk Assessment: USEPA/USDA/Environment Canada/Agriculture and Agri-Food Canada. Risk Assessment Methodologies*. (College Park: University of Maryland Biotechnology, June 6-8, 1995) Pensacola, FL, p 2-8.
- Gregoire J-C, Merlin J, Pasteels JM, Jaffuel R, Vouland G & Schvester D (1985) Biocontrol of *Dendroctonus micans* by *Rhizophagus grandis* Gyll. (Col., Rhizophagidae) in the Massif Central (France). A first appraisal of the mass-rearing and release methods. *Zeitschrift für Angewandte Entomologie* 99: 182-190.
- Gross J, Müller C, Vilcinskis A & Hilker M (1998) Antimicrobial activity of exocrine glandular secretions, hemolymph, and larval regurgitate of the mustard leaf beetle *Phaedon cochleariae*. *Journal of Invertebrate Pathology* 72: 296–303.
- Gross J, Schumacher K, Schmidtberg H & Vilcinskis A (2008) Protected by fumigants: beetle perfumes in antimicrobial defense. *Journal of Chemical Ecology* 34: 179-188.
- Hajek AE & Butler L (2000) Predicting the host range of entomopathogenic fungi. *Nontarget effects of biological control*, Follett PA & Duan JJ (Édit.) Springer Sciences + Business Media, LLC, New York, USA. p 263-276.
- Hajek AE, Huang B, Dubois T, Smith MT & Li Z (2006) Field studies of control of *Anoplophora glabripennis* (Coleoptera: Cerambycidae) using fiber bands containing the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria brongniartii*. *Biocontrol Science and Technology* 16: 329-343.
- Hajek AE & St Leger RJ (1994) Interactions between fungal pathogens and insect hosts. *Annual Review of Entomology* 39: 293-322.
- Hallsworth JE & Magan N (1999) Water and temperature relations of growth of the entomogenous fungi *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, and *Paecilomyces farinosus*. *Journal of Invertebrate Pathology* 74: 261-266.
- Hegedus, D. D., Bidochka MJ, Miranpuri GS & Khachatourians GG (1992) A comparison of the virulence, stability and cell-wall-surface characteristics of three spore types produced by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 36: 785-789.
- Hofstetter RW, Cronin JT, Klepzig KD, Moser JC & Moser MP (2006) Antagonisms, mutualisms and commensalisms affect outbreak dynamics of the southern pine beetle. *Oecologia* 147: 679-691.
- Holder DJ & Keyhani NO (2005) Adhesion of the entomopathogenic fungus *Beauveria* (Cordyceps) *bassiana* to substrata. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 5260-5266.
- Ignoffo CM, Hostetter DL, Sikorowski PP, Sutter G & Brooks WM (1977) Inactivation of representative species of entomopathogenic viruses, a bacterium, fungus, and protozoan by an ultraviolet light source. *Environmental Entomology* 6: 411-415.
- Inglis GD, Enkerli J & Goettel MS (2012) Laboratory techniques used for entomopathogenic fungi: Hypocreales. *Manual of techniques in invertebrate pathology*, Lacey LA (Édit.) Academic Press, San Diego, CA, USA, Second Ed. p 189-253.

- Inglis GD, Goettel MS, Butt TM & Strasser H (2001) Use of hyphomycetous fungi for managing insect pests. *Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential*, Butt TM, Jackson CW & Magan N (Édit.) CABI Publishing, Wallingford, USA. p 23-69.
- Inglis GD, Goettel MS & Johnson DL (1993) Persistence of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*, on phylloplanes of crested wheatgrass and alfalfa. *Biological Control* 3: 258-270.
- Jandricic SE, Filotas M, Sanderson JP & Wraight SP (2014) Pathogenicity of conidia-based preparations of entomopathogenic fungi against the greenhouse pest aphids *Myzus persicae*, *Aphis gossypii*, and *Aulacorthum solani* (Hemiptera: Aphididae). *Journal of Invertebrate Pathology* 118: 34-46.
- Janson EM, Stireman JO, Singer MS & Abbot P (2008) Phytophagous insect–microbe mutualisms and adaptive evolutionary diversification. *Evolution* 62: 997–1012.
- Jaronski ST (2010) Ecological factors in the inundative use of fungal entomopathogens. *BioControl* 55: 159–185.
- Johny S, Kyei-Poku G, Gauthier D, van Frankenhuyzen K & Krell PJ (2012) Characterization and virulence of *Beauveria* spp. recovered from emerald ash borer in southwestern Ontario, Canada. *Journal of Invertebrate Pathology* 111: 41-49.
- Jurat-Fuentes JL & Jackson TA (2012) Bacterial entomopathogens. *Insect pathology*, Vega FE & Kaya HK (Édit.) Academic Press, San Diego, CA, Second Ed. p 265-349.
- Kaaya GP & Okech MA (1990) Horizontal transmission of mycotic infection in adult tsetse, *Glossina morsitans morsitans*. *Entomophaga* 35: 589-600.
- Kamp AM & Bidochka MJ (2002) Conidium production by insect pathogenic fungi on commercially available agars. *Letters in Applied Microbiology* 35: 74-77.
- Karobecna M (2007) The variability in the fungal ribosomal DNA (ITS1, ITS2, and 5.8 S rRNA gene): its biological meaning and application in medical mycology. *Communicating current research and educational topics and trends in applied microbiology*, Méndez-Vilas A (Édit.) Formatex, Badajoz, Spain Vol 2. p 783-787.
- Keller S & Zimmerman G (1989) Mycopathogens of soil insects. *Insect-fungus interactions*, Wilding N, Collins NM, Hammond PM & Webber JF (Édit.) Academic Press, San Diego, CA, USA. p 239–270.
- Klepzig KD & Wilkens RT (1997) Competitive interactions among symbiotic fungi of the southern pine beetle. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 621-627.
- Klinger E, Groden E & Drummond F (2006) *Beauveria bassiana* horizontal infection between cadavers and adults of the colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Say). *Environmental Entomology* 35: 992-1000.
- Klowden MJ (2007) *Physiological systems in insects*. Academic Press, San Diego, CA, USA, Second Ed. 688 p.  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123694935500031>
- Knight FB (1958) The effects of woodpeckers on populations of the engelmann spruce beetle. *Journal of Economic Entomology* 51: 603-607.
- Kocacevik S, Sevim A, Eroglu M, Demirbag Z & Demir I (2015) Molecular characterization, virulence and horizontal transmission of *Beauveria pseudobassiana* from *Dendroctonus micans* (Kug.) (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Applied Entomology* 139: 381–389.

- Kocacevik S, Sevim A, Eroglu M, Demirbag Z & Demir I (2016) Virulence and horizontal transmission of *Beauveria pseudobassiana* S.A. Rehner & Humber in *Ips sexdentatus* and *Ips typographus* (Coleoptera: Curculionidae). *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 40: 241-248.
- Kreutz J, Vaupel O & Zimmermann G (2004a) Efficacy of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. against the spruce bark beetle, *Ips typographus* L., in the laboratory under various conditions. *Journal of Entomology and Nematology* 128: 384-389.
- Kreutz J, Zimmermann G & Vaupel O (2004b) Horizontal transmission of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* among the spruce bark beetle, *Ips typographus* (Col., Scolytidae) in the laboratory and under field conditions. *Biocontrol Science and Technology* 14: 837-848.
- Langor DW (1991) Arthropods and nematodes co-occurring with the eastern larch beetle, *Dendroctonus simplex* [Col.: Scolytidae], in Newfoundland. *Entomophaga* 36: 303-313.
- Langor DW & Raske AG (1987a) Emergence, host attack, and overwintering behaviour of the eastern larch beetle, *Dendroctonus simplex* LeConte (Coleoptera: Scolytidae) in Newfoundland. *The Canadian Entomologist* 119: 975-983.
- Langor DW & Raske AG (1987b) Reproduction and development of the eastern larch beetle, *Dendroctonus Simplex* LeConte (Coleoptera: Scolytidae), in Newfoundland. *The Canadian Entomologist* 119: 985-992.
- Langor DW & Raske AG (1989a) The eastern larch beetle, another threat to our forests (Coleoptera: Scolytidae). *The Forestry Chronicle* 65: 276-279.
- Langor DW & Raske AG (1989b) A history of the eastern larch beetle, *Dendroctonus simplex* (Coleoptera: Scolytidae), in North America. *The Great Lakes Entomologist* 22: 139-154.
- Latifian M & Rad B (2012) Pathogenicity of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillmin, *Beauveria brongniartii* Saccardo and *Metarhizium anisopliae* Metsch to adult *Oryctes elegans* Prell and effects on feeding and fecundity. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences* 4: 1026-1032.
- Lavallée R, Guertin C & Thurston G (2010) *The use of Beauveria bassiana as a mycoinsecticide against native and exotic beetles*. SERG short report, Halifax, Canada. 6 p.
- Lavallée R, Trudel R, Guertin C, Côté C, Coulombe C, Desrochers P, de Groot P, Alfaro R, Kope H, Sweeney J & Thurston G (2005) The use of *Beauveria bassiana* as a potential control method against the pine shoot beetle (*Tomicus piniperda*). *IUFRO Meeting, Chapter S7.03.05, «Forest insect epidemics: Population dynamics, dispersal, and ecosystem impacts»*. (University of Northern British Columbia, Canada, July 11-14), p 12-13.
- Leufvén A, Bergström G & Falsen E (1984) Interconversion of verbenols and verbenone by identified yeasts isolated from the spruce bark beetle *Ips typograsphus*. *Journal of Chemical Ecology* 10: 1349-1361.
- Liu H & Bauer LS (2006) Susceptibility of *Agrilus planipennis* (Coleoptera: Buprestidae) to *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Economic Entomology* 99: 1096-1103.
- Liu H & Bauer LS (2008) Microbial control of emerald ash borer, *Agrilus planipennis* (Coleoptera: Buprestidae) with *Beauveria bassiana* strain GHA: greenhouse and field trials. *Biological Control* 45: 124-132.

- Long DW, Groden E & Drummond FA (2000) Horizontal transmission of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. *Agricultural and Forest Entomology* 2: 11-17.
- Lyons DB, Lavallée R, Kyei-Poku G, Van Frankenhuyzen K, Johny S, Guertin G, Francese JA, Jones GC & Blais M (2012) Towards the development of an autocontamination trap system to manage populations of emerald ash borer (Coleoptera: Buprestidae) with the native entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*. *Journal of Economic Entomology* 105: 1929-1939.
- Maniania NK, Ouna E, Ahuya P, Frérot B, Félix A-E, Ru BL & Calatayud PA (2011) Dissemination of entomopathogenic fungi using *Busseola fusca* male as vector. *Biological Control* 58: 374-378.
- Manitoba Conservation Forestry Branch (2014) *Eastern larch beetle outbreak in Manitoba*. Forestry Branch, <http://www.gov.mb.ca/conservation/forestry/health/eastern-larch.html> (Consulté le 8 October 2015)
- Martin KJ & Rygielwicz PT (2005) Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts. *BMC Microbiology* 5: 28.
- Mattson WJ (1980) Herbivory in relation to plant nitrogen content. *Annual Review of Ecology and Systematics* 11: 119-161.
- McKee FR & Aukema BH (2015) Influence of temperature on the reproductive success, brood development and brood fitness of the eastern larch beetle *Dendroctonus simplex* LeConte. *Agricultural and Forest Entomology* 17: 102–112.
- McKee FR & Aukema BH (2016) Seasonal phenology and life-history of *Dendroctonus simplex* (Coleoptera: Curculionidae) in the Great Lakes region of North America. *Environmental Entomology* 45: 812-828.
- Ménétrier J, Perron M, Daoust G & Sirois G (2005) *Le boisement de friches*. Direction de la recherche forestière du ministère des Ressources naturelles et de la Faune et Centre de foresterie des Laurentides de Ressources naturelles Canada. 29 p.
- Meyling NV & Eilenberg J (2007) Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: potential for conservation biological control. *Biological Control* 43: 145–155.
- Meyling NV & Pell JK (2006) Detection and avoidance of an entomopathogenic fungus by a generalist insect predator. *Ecological Entomology* 31: 162-171.
- Miao X-X, Gan M & Ding D-C (2003) The role of bacterial symbionts in amino acid composition of black bean aphids. *Entomologia Sinica* 10: 167-171.
- Minnesota Department of Natural Resources - Division of Forestry, Forest Health Unit (2014) *Minnesota forest health report*. St-Paul, Minnesota. 86 p.
- Morales-Jiménez J, Zúñiga G, Villa-Tanaca L & Hernández-Rodríguez C (2009) Bacterial community and nitrogen fixation in the red turpentine beetle, *Dendroctonus valens* LeConte (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). *Microbial Ecology* 58: 879–891.
- Muratoglu H, Demirbag Z & Sezen K (2011) The first investigation of the diversity of bacteria associated with *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Biologia* 66: 288-293.
- Myles TG (2002) Alarm, aggregation, and defense by *Reticulitermes flavipes* in response to a naturally occurring isolate of *Metarhizium anisopliae*. *Sociobiology* 40: 243-255.

- Myrand V, Buffet JP & Guertin C (2015) Susceptibility of cabbage maggot larvae (Diptera: Anthomyiidae) to Hypocreales entomopathogenic fungi. *Journal of Economic Entomology* 108: 1–11.
- Naik PR & Sakthivel N (2006) Functional characterization of a novel hydrocarbonoclastic *Pseudomonas* sp. strain PUP6 with plant-growth-promoting traits and antifungal potential. *Research in Microbiology* 157: 538–546.
- Nation JL (2016) *Insect physiology and biochemistry*. CRC Press, Boca Raton, FL, Third Ed. 690 p.
- Nicholson RL, Hipskind H & Hanau RM (1989) Protection against phenol toxicity by the spore mucilage of *Colletotrichum graminicola*, an aid to secondary spread. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 35: 243-252.
- Ontario Ministry of Natural Resources (2012) *Forest health conditions in Ontario*. Ontario, Canada. 91 p.
- Ortiz-Urquiza A & Keyhani NO (2013) Action on the surface: entomopathogenic fungi versus the insect cuticle. *Insects* 4: 357-374.
- Otvos IS & Stark RW (1985) Arthropod food of some forest inhabiting birds. *The Canadian Entomologist* 117: 971-990.
- Park GK, Lim J-H, Kim S-D & Shim SH (2012) Elucidation of antifungal metabolites produced by *Pseudomonas aurantiaca* IB5-10 with broad-spectrum antifungal activity. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 22: 326–330.
- Pell JK, Eilenberg J, Hajek AE & Steinkraus DC (2001) Biology, ecology and pest management potential of Entomophthorales. *Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential*, Butt TM, Jackson C & Magan N (Édit.) CABI Publishing, Wallingford, USA. p 71-153.
- Pell JK, MaCaulay EDM & Wilding N (1993) A pheromone trap for dispersal of the pathogen *Zoophthora radicans* Brefeld. (Zygomycetes: Entomophthorales) amongst populations of the diamondback moth, *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Yponomeutidae). *Biocontrol Science and Technology* 3: 315-320.
- Peng G, Xie L, Hu J & Xia Y (2009) Identification of genes that are preferentially expressed in conidiogenous cell development of *Metarhizium anisopliae* by suppression subtractive hybridization. *Current Genetics* 55: 263-271.
- Popa V, Déziel E, Lavallée R, Bauce E & Guertin C (2012) The complex symbiotic relationships of bark beetles with microorganisms: a potential practical approach for biological control in forestry. *Pest Management Science* 68: 963-975.
- Powell JA & Bentz BJ (2009) Connecting phenological predictions with population growth rates for mountain pine beetle, an outbreak insect. *Landscape Ecology* 24: 657–672.
- Prendergast BF (1991) *The chemical ecology of the eastern larch beetle, Dendroctonus simplex* LeConte, and the spruce beetle, *D. rufipennis* (Kirby). Master of Sciences (State University of New York, Syracuse). 144 p.
- Pruess KP (1983) Day-degree methods for pest management. *Environmental Entomology* 12: 613-619.
- Quesada-Moraga E, Martin-Carballo I, Garrido-Jurado I & Santiago-Álvarez C (2008) Horizontal transmission of *Metarhizium anisopliae* among laboratory populations of *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae). *Biological Control* 47: 115-124.

- Quesada-Moraga E, Navas-Cortés JA, Maranhao EAA, Ortiz-Urquiza A & Santiago-Álvarez C (2007) Factors affecting the occurrence and distribution of entomopathogenic fungi in natural and cultivated soils. *Mycological Research* 111: 947–966.
- Raffa KF, Grégoire J-C & Lindgren BS (2015) Natural history and ecology of bark beetles. *Bark beetles: biology and ecology of native and invasive species*, Vega FE & Hofstetter RW (Édit.) Elsevier, San Diego, CA, USA. p 1-40.
- Régnière J & Bentz B (2007) Modeling cold tolerance in the mountain pine beetle, *Dendroctonus ponderosae*. *Journal of Insect Physiology* 53: 559-572.
- Roberts DW & Campbell AS (1977) Stability of entomopathogenic fungi. *Miscellaneous Publications of the Entomological Society of America* 10: 19-76.
- Rousseau J, Bauce É, Lavallée R & Guertin C (2012) Winter mortality and supercooling point of the spruce beetle (Coleoptera: Curculionidae) not affected by host tree vigor in Nova Scotia, Canada 2012. *Journal of the Acadian Entomological Society* 8: 1-10.
- Roy HE & Pell JK (2000) Interactions between entomopathogenic fungi and other natural enemies: implications for biological control. *Biocontrol Science and Technology* 10: 737-752.
- Sabbahi R, Lavallée R, Merzouki A & Guertin C (2009) Differentiation of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Ascomycetes: Hypocreales) isolates by PCR-RFLP. *Phytoprotection* 90: 49-56.
- Sabbahi R, Merzouki A & Guertin C (2008a) Efficacy of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. against the tarnished plant bug, *Lygus lineolaris* L., in strawberries. *Journal of Applied Entomology* 132: 124-134.
- Sabbahi R, Merzouki A & Guertin C (2008b) Efficacy of *Beauveria bassiana* against the strawberry pests, *Lygus lineolaris*, *Anthonomus signatus* and *Otiorhynchus ovatus*. *Journal of Applied Entomology* 132: 151-160.
- Sambaraju KR, Carroll AL, Zhu J, Stahl K, Moore RD & Aukema BH (2012) Climate change could alter the distribution of mountain pine beetle outbreaks in western Canada. *Ecography* 35: 211-223.
- Sandhu SS (1995) Effect of physical factors on germination of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* conidia. *National Academic of Science Letters* 18: 1-5.
- Sandhu SS, Sharma AK, Beniwal V, Goel G, Batra P, Kumar A, Jaglan S, Sharma AK & Malhotra S (2012) Myco-biocontrol of insect pests: factors involved, mechanism and regulation. *Journal of Pathogens* 2012: 1-10.
- Schneider S, Rehner SA, Widmer F & Enkerli J (2011) A PCR-based tool for cultivation-independent detection and quantification of *Metarhizium* clade 1. *Journal of Invertebrate Pathology* 108: 106-114.
- Scholte E-J, Knols BGJ & Takken W (2004) Autodissemination of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* amongst adults of the malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. *Malaria Journal* 3: 45.
- Schrank A & Vainstein MH (2010) *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins. *Toxicon* 56: 1267–1274.
- Scott JJ, Oh D-C, Yuceer MC, Klepzig KD, Clardy J & Currie CR (2008) Bacterial protection of beetle-fungus mutualism. *Science* 322: 63.

- Seipke RF, Kaltenpoth M & Hutchings MI (2012) *Streptomyces* as symbionts: an emerging and widespread theme? *FEMS Microbiology Reviews* 36: 862-876.
- Sevim A, Demir I, Tanyeli E & Demirbağ Z (2010) Screening of entomopathogenic fungi against the European spruce bark beetle, *Dendroctonus micans* (Coleoptera: Scolytidae). *Biocontrol Science and Technology* 20: 3-11.
- Seybold SJ, Albers MA & Katovich SA (2002) *Eastern larch beetle*. U.S. Department of Agriculture Forest Service. 10 p.
- Sezen K, Demir I & Demirbağ Z (2004) Study of the bacterial flora as a biological control agent of *Agelastica alni* L. (Coleoptera: Chrysomelidae). *Biologia* 59: 327-331.
- Shimazu M (2004) A novel technique to inoculate conidia of entomopathogenic fungi and its application for investigation of susceptibility of the japanese pine sawyer, *Monochamus alternatus*, to *Beauveria bassiana*. *Applied Entomology and Zoology* 39: 485-490.
- Shook RS & Baldwin PH (1970) Woodpecker predation on bark beetles in engelmann spruce logs as related to stand density. *The Canadian Entomologist* 102: 1345-1354.
- Sirois G (2000) *Étude sur la culture d'essences à croissance rapide dans Charlevoix*. Québec, SADC de Charlevoix. 80 p.
- Six DL (2003) Bark beetle- fungus symbioses. *Insect symbiosis*, (Contemporary topics in entomology, Bourtzis K & Miller TA (Édit.) CRC Press, Boca Raton, FL, USA. p 97-114.
- Six DL (2013) The bark beetle holobiont: why microbes matter. *Journal of Chemical Ecology* 39: 989-1002.
- Six DL & Bracewell R (2015) *Dendroctonus. Bark beetles: biology and ecology of native and invasive species*, Vega FE & Hofstetter RW (Édit.) Academic Press, San Diego, CA, USA. p 305-350.
- Six DL & Paine TD (1996) *Leptographium pyrinum* is a mycangial fungus of *Dendroctonus adjunctus*. *Mycologia* 88: 739-744.
- Six DL & Wingfield MJ (2011) The role of phytopathogenicity in bark beetle–fungus symbioses: a challenge to the classic paradigm. *Annual Review of Entomology* 56: 255-272.
- Smith RJ & Grula EA (1981) Nutritional requirements for conidial germination and hyphal growth of *Beauveria bassiana*. *Journal of Invertebrate Pathology* 37: 222-230.
- Sosa-Gomez DR, Boucias DG & Nation JL (1997) Attachment of *Metarhizium anisopliae* to the southern green stink bug *Nezara viridula* cuticle and fungistatic effect of cuticular lipids and aldehydes. *Journal of Invertebrate Pathology* 69: 31-39.
- Srei N (2011) *Identification des facteurs permettant d'optimiser la production de Beauveria bassiana et les impacts sur la virulence* Master of Science (INRS-Institut Armand-frappier). 135 p.
- St Leger RJ (1993) Biology and mechanisms of insect-cuticle invasion by Deuteromycete fungal pathogens. *Parasites and pathogens of insects*, Beckage NE, Thompson SA & Federici BA (Édit.) Academic Press, New York, USA Vol 2. p 211-225.
- St Leger RJ (1995) The role of cuticle-degrading proteases in fungal pathogenesis of insects. *Canadian Journal of Botany* 73: S1119-S1125.
- St Leger RJ, Butt TM, Goettel MS, Staples RC & Roberts DW (1989) Production *in vitro* of appressoria by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Experimental Mycology* 13: 274-288.

- St Leger RJ, Butt TM, Staples RC & Roberts RW (1990) Second messenger involvement in differentiation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Journal of General Microbiology* 136: 1779-1789.
- St Leger RJ, Joshi L & Roberts D (1998) Ambient pH is a major determinant in the expression of cuticle-degrading enzymes and hydrophobin by *Metarhizium anisopliae*. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 709–713.
- St Leger RJ & Wang C (2009) Entomopathogenic fungi and the genomics era. *Insect pathogens: molecular approaches and techniques*, Stock SP, Vandenberg J, Glazer I & Boemare N (Édit.) CABI, Wallingford, UK. p 365-400.
- St Leger RJ & Wang C (2010) Genetic engineering of fungal biocontrol agents to achieve greater efficacy against insect pests. *Applied Microbiology and Biotechnology* 85: 901-907.
- Staples JA & Milner RJ (2000) A laboratory evaluation of the repellency of *Metarhizium anisopliae* conidia to *Coptotermes lacteus* (Isoptera: Rhinotermitidae). *Sociobiology* 36: 133-148.
- Steinkraus DC (2006) Factors affecting transmission of fungal pathogens of aphids. *Journal of Invertebrate Pathology* 92: 125–131.
- Steinwender BM, Krenn HW & Wegensteiner R (2010) Different effects of the insectpathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Deuteromycota) on the bark beetle *Ips sexdentatus* (Coleoptera: Curculionidae) and on its predator *Thanasimus formicarius* (Coleoptera: Cleridae). *Journal of Plant Diseases and Protection* 117: 33-38.
- Stephens SL, McIver JD, Boerner REJ, Fettig CJ, Fontaine JB, Hartsough BR, Kennedy PL & Schwilk DW (2012) The effects of forest fuel-reduction treatments in the United States. *BioScience* 62: 549-560.
- Strak RW (1982) Generalized ecology and life cycles of bark beetles. *Bark beetles in North American conifers: a system for the study of evolutionary biology*, Mitton JB & Sturgeon KB (Édit.) University of Texas Press, Austin. p 21-45.
- Szewczyk B, Hoyos-Carvajal L, Paluszek M, Skrzecz I & de Souza ML (2006) Baculoviruses—re-emerging biopesticides. *Biotechnology Advances* 24: 143-160.
- Tanyeli E, Sevim A, Demirbag Z, Eroglu M & Demir I (2010) Isolation and virulence of entomopathogenic fungi against the great spruce bark beetle, *Dendroctonus micans* (Kugelann) (Coleoptera: Scolytidae). *Biocontrol Science and Technology* 20: 695-701.
- Taylor SW & Carroll AL (2003) Disturbance, forest age, and mountain pine beetle outbreak dynamics in BC: a historical perspective. *Mountain Pine Beetle Symposium: Challenges and Solutions*. (Kelowna, British Columbia, Shore TL, Brooks JE & Stone JE (Édit.) Natural Resources Canada, Canadian Forest Service, Pacific Forestry Centre, p 41-51.
- Thistle HW, Peterson H, Allwine G, Lamb B, Strand T, Holsten EH & Shea PJ (2004) Surrogate pheromone plumes in three forest trunk spaces: composite statistics and case studies. *Forest Science* 50: 610-625.
- Thomas KC, Khachatourians GG & Ingledew WM (1987) Production and properties of *Beauveria bassiana* conidia cultivated in submerged culture. *Canadian Journal of Microbiology* 33: 12-20.

- Thompson SR & Brandenburg RL (2005) Tunneling responses of mole crickets (Orthoptera: Gryllotalpidae) to the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*. *Environmental Entomology* 34: 140-147.
- Thompson SR, Brandenburg RL & Arends JJ (2006) Impact of moisture and UV degradation on *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin conidial viability in turfgrass. *Biological Control* 39: 401-407.
- Toledo J, Campos SE, Flores S, Liedo P, Barrera JF, Villaseñor A & Montoya P (2007) Horizontal transmission of *Beauveria bassiana* in *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae) under laboratory and field cage conditions. *Journal of Economic Entomology* 100: 291-297.
- Trudel R, Lavallée R, Guertin C, Côté C, Todorova SI, Alfaro R & Kope H (2007) Potential of *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes: Moniliales) for controlling the white pine weevil, *Pissodes strobi* (Col., Curculionidae). *Journal of Applied Entomology* 131: 90-97.
- Vago C (1963) Predispositions and interrelations in insect diseases. *Insect pathology: an advanced treatise*, Steinhaus EA (Édit.) Academic Press, New York, USA, First Ed Vol 1. p 339-379.
- Vandenberg JD, Shelton AM, Wilsey WT & Ramos M (1998) Assessment of *Beauveria bassiana* sprays for control of diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) on crucifers. *Journal of Economic Entomology* 91: 624-630.
- Vega FE, Dowd PF & Bartelt RJ (1995) Dissemination of microbial agents using an autoinoculating device and several insect species as vectors. *Biological Control* 5: 545-552.
- Vega FE, Dowd PF, Lacey LA, Pell JK, Jackson DM & Klein MG (2000) Dissemination of beneficial microbial agents by insects. *Field manual of techniques in invertebrate pathology*, Lacey LA & Kaya HK (Édit.) Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. p 153-177.
- Vega FE, Dowd PF, Lacey LA, Pell JK, Jackson DM & Klein MG (2007) Dissemination of beneficial microbial agents by insects. *Field manual of techniques in invertebrate pathology*, Lacey LA & Kaya HK (Édit.) Springer, Dordrecht, The Netherlands, Seconde Ed. p 127-146.
- Vega FE, Goettel MS, Blackwell M, Chandler D, Jackson MA, Keller S, Koike M, Maniania NK, Monzón A, Ownley BH, Pell JK, Rangel DEN & Roy HE (2009) Fungal entomopathogens: new insights on their ecology. *Fungal Ecology* 2: 149–159.
- Vega FE, Meyling NV, Luangsa-ard JJ & Blackwell M (2012) Fungal entomopathogens. *Insect pathology*, Vega FE & Kaya HK (Édit.) Academic Press, San Diego, CA, USA, Second Ed. p 171-220.
- Vestergaard S, Gillespie AT, Butt TM, Schreiter G & Eilenberg J (1995) Pathogenicity of the hyphomycete fungi *Verticillium lecanii* and *Metarhizium anisopliae* to the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*. *Biocontrol Science and Technology* 5: 185-192.
- Vey A, Hoagland RE & Butt TM (2001) Toxic metabolites of fungal biocontrol agents. *Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential*, Butt TM, Jackson C & Magan N (Édit.) CABI, Cambridge, MA, USA. p 311-346.
- Vickers RA, Furlong MJ, White A & Pell JK (2004) Initiation of fungal epizootics in diamondback moth populations within a large field cage: proof of concept for auto-dissemination. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 111: 7-17.

- Villani MG, Allee LL, Preston-Wilsey LA, Consolie N, Xia Y & Brandenburg RL (2002) Use of radiography and tunnel castings for observing mole cricket (Orthoptera: Gryllotalpidae) behavior in soil. *American Entomologist* 48: 42-50.
- Wang C & St Leger RJ (2007) The MAD1 adhesin of *Metarhizium anisopliae* links adhesion with blastospore production and virulence to insects, and the MAD2 adhesin enables attachment to plants. *Eukaryotic Cell* 6: 808-816.
- Waring RH & Pitman GB (1985) Modifying lodgepole pine stands to change susceptibility to mountain pine beetle attack. *Ecology* 66: 889-897.
- Wegensteiner R (2004) Pathogens in bark beetles. *Bark and wood boring insects in living trees in Europe, a synthesis*, Lieutier F, Day KR, Battisti A, Grégoire J-C & Evans HF (Édit.) Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, The Netherlands. p 291-313.
- Wegensteiner R, Wermelinger B & Herrmann M (2015) Natural enemies of bark beetles: predators, parasitoids, pathogens, and nematodes. *Bark beetles: biology and ecology of native and invasive species*, Vega FE & Hofstetter RW (Édit.) Academic Press, San Diego, CA, USA, First Ed. p 247-304.
- Whitehead RJ, Safranyik L, Russo GL, Shore TL & Carroll AL (2003) Silviculture to reduce landscape and stand susceptibility to the mountain pine beetle. *Mountain Pine Beetle Symposium: Challenges and Solutions*. (Kelowna, British Columbia, Shore TL, Brooks JE & Stone JE (Édit.) Natural Resources Canada, Canadian Forest Service, Pacific Forestry Centre, p 233-244.
- Willis JH, Iconomidou VA, Smith RF & Hamodrakas SJ (2005) Cuticular proteins. *Comprehensive molecular insect science*, Gilbert LI, Iatrou K & Gill SS (Édit.) Elsevier, Oxford, UK, First Ed Vol 4. p 79-109.
- Wood SL (1963) A revision of the bark beetle genus *Dendroctonus* Erichson (Coleoptera: Scolytidae). *The Great Basin Naturalist* 23: 1-116.
- Wraight SP & Carruthers RI (1999) Production, delivery, and use of mycoinsecticides for control of insect pests of field crops. *Biopesticides: use and delivery*, Hall FR & Menn JJ (Édit.) Humana Press, Totowa, New Jersey Vol 5. p 233-269.
- Wright JE & Chandler LD (1991) Laboratory evaluation of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* against the boll weevil (Curculionidae: Coleoptera). *Journal of Invertebrate Pathology* 58: 448-449.
- Wright SP, Inglis GD & Goettle MS (2007) Fungi. *Field manual of techniques in invertebrate pathology*, Lacey LA & Kaya HK (Édit.) Springer, Dordrecht, The Netherlands, Second Ed. p 223-248.
- Xu Y, Orozco R, Wijeratne EMK, Gunatilaka AAL, Stock SP & Molnár I (2008) Biosynthesis of the cyclooligomer depsipeptide beauvericin, a virulence factor of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Chemistry & Biology* 15: 898-907.
- Yang Z-Q, Wang X-Y & Zhang Y-N (2014) Recent advances in biological control of important native and invasive forest pests in China. *Biological Control* 68: 117-128.
- Yasuda K (1999) Auto-infection system for the sweet potato weevil, *Cylas formicarius* (Fabricius) (Coleoptera : Curculionidae) with entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* using a modified sex pheromone trap in the field. *Applied Entomology and Zoology* 34: 501-505.

Zindel R, Gottlieb Y & Aebi A (2011) Arthropod symbioses: a neglected parameter in pest- and disease-control programmes. *Journal of Applied Ecology* 48: 864–872.

# ANNEXE

















