

Université du Québec
INRS- Institut Armand-Frappier
Février 2011

IDENTIFICATION DES FACTEURS PERMETTANT D'OPTIMISER
LA PRODUCTION DE *BEAVERIA BASSIANA*
ET LES IMPACTS SUR LA VIRULENCE

Par
Narin Srei

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de Maîtrise ès sciences
(M.Sc.) en microbiologie appliquée

Jury d'évaluation

Dre Caroline Provost, examinatrice externe
Dr Robert Lavallée, examinateur interne
Dr Claude Guertin, directeur de recherche

© droits réservés Narin Srei, 2011

Résumé

Beauveria bassiana est un candidat intéressant pour la lutte microbiologique. Plusieurs isolats, notamment les isolats *INRS-IP* et *INRS-CFL*, sont utilisés pour contrôler les insectes nuisibles forestiers et agricoles. Afin de répondre aux besoins de conidies lors de l'application sur le terrain de *B. bassiana*, une optimisation des conditions de production à grande échelle doit être considérée. Comme tous les champignons imparfaits, *B. bassiana* exige des conditions particulières, des substrats appropriés, ainsi que des conditions abiotiques spécifiques, notamment la température, la lumière, l'humidité et les substances nutritionnelles qui optimiseront sa croissance.

Deux isolats de *B. bassiana* (*INRS-IP* & *INRS-CFL*) ont été choisis pour cette étude. Ce sont des isolats indigènes du Québec. L'isolat *INRS-IP* a été isolé à partir d'un adulte du doryphore de la pomme de terre, *Leptinotarsa decemlineata* Say, récolté sur L'Île-Perrot et l'isolat *INRS-CFL* a été retrouvé sur un adulte du grand hylésine du pin, *Tomicus piniperda* L., provenant de la région de Cookshire. Ces deux isolats ont été conservés dans la banque des champignons du Laboratoire d'entomologie expérimentale de l'INRS-Institut Armand-Frappier.

Dans une première étape, cinq céréales ont été étudiées afin de déterminer celle utilisée comme milieu de culture. Les analyses ont montré que l'orge et le riz étaient les céréales donnant des rendements soutenus et constants. Sur la base de considération économique et de sa disponibilité au Canada, l'orge a été retenue comme milieu de culture durant les études de la production des isolats *INRS-IP* et *INRS-CFL* de *B. bassiana*. Des facteurs pouvant influencer la production des conidies des deux isolats de *B. bassiana* ont été évalués à l'aide d'une analyse factorielle fractionnée de type Plackett-Burmen et d'une modélisation de la surface de réponse de type Central Composite Design. Ces approches ont été choisies pour déterminer les conditions permettant d'optimiser la production. Les variables mesurées ont été la concentration des conidies par ml, le volume de filtrat récolté (ml) et le rendement total en conidies.

Pour les isolats *INRS-IP* et *INRS-CFL* de *B. bassiana*, les résultats de l'analyse factorielle fractionnée de type Plackett-Burmen ont permis d'identifier certains facteurs environnementaux tels que la température et la lumière, ainsi que des facteurs nutritifs tels que la peptone, la chitine et l'extrait de levure pouvaient influencer la production des conidies. Les résultats ont aussi démontré que chaque isolat avait des besoins spécifiques même s'ils sont de la même espèce.

L'analyse de la modélisation de la surface de réponse, Central Composite Design, a fourni des indications plus précises sur les valeurs des facteurs sélectionnés devant permettre une production optimale de chacun des deux isolats. Les résultats ont démontré que les rendements optimaux des isolats *INRS-IP* et *INRS-CFL* pouvaient atteindre, respectivement, $1,14 \times 10^{14}$ et $1,15 \times 10^{15}$ conidies par 100g d'orge.

Finalement, pour chaque isolat, la virulence des différentes préparations fongiques a été testée. Cette étape devait permettre de vérifier si les conditions de production des champignons pouvaient affecter la virulence. Pour chaque isolat, aucune différence significative n'a été observée entre les données de mortalité et la présence de muscardine des larves soumises aux différentes préparations.



Narin Srei



Claude Guertin

Remerciements

Je tiens tout d'abord à exprimer toutes mes reconnaissances à mon directeur de recherche Dr Claude Guertin qui m'a accueilli dans son laboratoire même s'il ne m'avait jamais rencontré auparavant. Merci pour son soutien, ses encouragements et ses précieux conseils qui m'ont permis de mener à terme ce projet.

De même, je voudrais exprimer mes remerciements à ceux et celles qui ont contribué de près ou de loin à mes travaux de maîtrise et à la rédaction de mon mémoire. Merci à mes collègues du laboratoire de l'INRS-Institut Armand-Frappier, notamment Valentin Popa, Karoline St-Martin Crites, François Giroux-Quesnel, Galen Guo, Vincent Myrand, Hajbou Iguiliz, Jamal Ziani et Rachid Sabbahi pour leur aide aux travaux et leur commentaire.

J'aimerais également remercier le recteur de l'Université Royale de Phnom Penh, Professeur Lav Chhiv Eav, le doyen de la Faculté des sciences monsieur Hang Chan Thon, le directeur du Département de biologie de l'URPP monsieur Thao Sokunthia qui m'ont permis de poursuivre mes études de maîtrise au Canada. Un grand merci à tous les professeurs du département de biologie de l'URPP pour vos efforts de transférer les connaissances aux étudiants d'une génération à l'autre incluant la mienne.

J'aimerais également adresser mes remerciements au Programme canadien de bourses de la francophonie (PCBF) et au Conseil de recherche en sciences naturelles et en génie (CRSNG) consortium iFor pour leurs soutiens financiers durant mes études.

Je voudrais finalement exprimer toutes mes reconnaissances envers mon papa Srey Sreng et maman Em Naren de m'avoir donné la chance de voir le monde et d'acquérir les connaissances à travers le globe. Merci énormément à mon mari Hul Virak, à mes frères et mes sœurs pour vos aides, vos encouragements et vos confiances. Grâce à vos supports, j'ai pu venir faire des études ici au Canada.

Table des matières

Résumé.....	i
Remerciements.....	iii
Table des matières.....	iv
Liste des figures.....	vi
Liste des tableaux.....	viii
Introduction.....	1
Revue bibliographique.....	7
1. <i>Beauveria bassiana</i>	8
1.1. <i>Morphologie</i>	8
1.2. <i>Mode d'infection</i>	11
1.2.1. <i>Morphologie de la cuticule d'insectes</i>	11
1.2.2. <i>Mode d'infection de B. bassiana</i>	12
1.2.2.1. <i>Adhésion</i>	12
1.2.2.2. <i>Pénétration</i>	13
1.2.2.3. <i>Prolifération</i>	14
2. <i>Beauveria bassiana</i> et lutte microbiologique	18
3. Variation de la virulence	20
4. Production de <i>B. bassiana</i>	21
4.1. <i>Milieus de culture</i>	21
4.2. <i>Facteurs influençant la production des conidies de B. bassiana</i>	22
4.2.1. <i>Température</i>	23
4.2.2. <i>Humidité et eau</i>	24
4.2.3. <i>pH</i>	26
4.2.4. <i>Substances nutritives</i>	27
5. Fermentation en milieu solide.....	28
6. Modélisation et production	29
6.1. <i>Plan d'expériences factorielles fractionnées</i>	30
6.2. <i>Modélisation de la surface de réponse</i>	31

Problématique	35
Hypothèse	37
Matériel et méthodes	39
1. <i>Beauveria bassiana</i>	40
2. Production des suspensions mères	40
3. Optimisation de la production	44
3.1. <i>Choix du milieu de culture</i>	44
3.2. <i>Modélisations mathématiques</i>	54
3.2.1. <i>Plackett-Burmen</i>	54
3.2.2. <i>Central Composite Design</i>	55
4. Évaluation de la virulence des préparations fongiques	61
4.1. <i>Insecte</i>	61
4.2. <i>Suspensions fongiques</i>	61
4.3. <i>Épreuves biologiques</i>	61
Résultats	65
1. Choix du milieu de culture	66
1.1. <i>Étape 1</i>	66
1.2. <i>Étape 2</i>	72
2. Modélisation mathématique	72
2.1. <i>Plackett-Burmen</i>	72
2.2. <i>Central composite design</i>	78
3. Évaluation de la virulence des préparations fongiques	92
Discussion	97
Conclusion	105
Références	108

Liste des figures

Figure 1. Vue microscopique des spores asexuées de <i>B. bassiana</i>	9
Figure 2. Cuticule d'insecte et le mode d'infection du champignon entomopathogène <i>B. bassiana</i>	15
Figure 3. Production des conidies du champignon entomopathogène <i>B. bassiana</i> dans différents types de supports	41
Figure 4. Filtration des conidies d'un isolat du champignon entomopathogène <i>B. bassiana</i> à travers trois couches d'étamines afin de retenir les résidus	45
Figure 5. Méthode de dénombrement des conidies à partir d'un hématimètre	47
Figure 6. Différentes étapes entrant dans la production des conidies de <i>B. bassiana</i>	51
Figure 7. Différentes étapes entrant dans la réalisation des épreuves biologiques permettant d'évaluer la virulence des préparations de conidies de <i>B. bassiana</i> contre les larves de <i>G. mellonella</i>	63
Figure 8. Cinétique du rendement des isolats <i>INRS-IP</i> (A) et <i>INRS-CFL</i> (B) de <i>B. bassiana</i> soumis à différents substrats céréaliers	68
Figure 9. Comparaison du rendement des isolats <i>INRS-IP</i> (A) et <i>INRS-CFL</i> (B) de <i>B. bassiana</i> produites sur deux substrats, l'orge et le riz	74
Figure 10. Variation du rendement des isolats <i>INRS-IP</i> et <i>INRS-CFL</i> en fonction des expériences générées par le modèle Plackett-Burmen, 14 jours suivant l'inoculation du substrat	76
Figure 11. Effets des facteurs nutritifs, environnementaux et leurs interactions sur l'optimisation de la production des conidies de l'isolat <i>INRS-IP</i> de <i>B. bassiana</i> en utilisant le modèle CCD	81

Figure 12. Effets des facteurs nutritifs et environnementaux et leurs interactions sur l'optimisation du volume de filtrat de l'isolat <i>INRS-IP</i> de <i>B. bassiana</i> en utilisant le modèle CCD	83
Figure 13. Effets des facteurs nutritifs et environnementaux et leurs interactions sur l'optimisation de la production de conidies de l'isolat <i>INRS-CFL</i> de <i>B. bassiana</i> en utilisant le modèle CCD	87
Figure 14. Effets des facteurs nutritifs et environnementaux et leurs interactions sur l'optimisation du volume de filtrat de l'isolat <i>INRS-IP</i> en utilisant le modèle CCD	89
Figure 15. Larves de <i>G. mellonella</i> recouvertes de muscardine suite a une inoculation par un des isolats de <i>B. bassiana</i>	93
Figure 16. Pourcentage des moyennes de survie des larves de <i>G. mellonella</i> dix jours suivant l'immersion dans les différentes suspensions de conidies d'isolat <i>INRS-IP</i> (A) et d'isolat <i>INRS-CFL</i> (B) avec une concentration de 1×10^9 conidies ml^{-1}	95

Liste des tableaux

Tableau 1. Différents milieux de culture utilisés pour la production de champignons entomopathogènes	25
Tableau 2. Matrice théorique générée par le modèle Plackett-Burmen	33
Tableau 3. Matrice théorique générée par le modèle Central Composite Design	34
Tableau 4. Dispositif expérimental à bloc aléatoire utilisé pour l'étude des cinq céréales et de la production des isolats <i>INRS-IP</i> et <i>INRS-CFL</i> de <i>B. bassiana</i>	50
Tableau 5. Matrice expérimentale donnant les conditions des expériences selon le plan factoriel fractionné de type Plackett-Burmen permettant de sélectionner les facteurs ayant des effets à la production des isolats de <i>B. bassiana INRS-IP</i> et <i>INRS-CFL</i>	56
Tableau 6. Valeurs de chacun des facteurs sélectionnés générées par Central Composite Design	58
Tableau 7. Matrice expérimentale donnant les conditions des expériences selon le modèle CCD afin de déterminer les conditions optimales de production des isolats <i>INRS-IP</i> de <i>B. bassiana</i>	59
Tableau 8. Matrice expérimentale donnant les conditions des expériences selon le modèle CCD afin de déterminer les conditions optimales de production des isolats <i>INRS-CFL</i> de <i>B. bassiana</i>	60
Tableau 9. Concentrations moyennes des conidies et volumes moyens obtenus lors de la production de l'isolat <i>INRS-IP</i> de <i>B. bassiana</i> huit jours suivant l'inoculation de cinq substrats céréaliers	67
Tableau 10. Concentration moyennes des conidies et volumes moyens obtenus lors de la production de l'isolat <i>INRS-CFL</i> de <i>B. bassiana</i> huit jours suivant l'inoculation de cinq substrats céréaliers	71

Tableau 11. Pourcentage de contribution de chacun des facteurs et leur effet sur la concentration et le volume lors des expériences de modélisation Plackett-Burmen de la production d'isolat <i>INRS-IP</i> de <i>B. bassiana</i>	79
Tableau 12. Pourcentage de contribution de chaun des facteurs et leur effet sur la concentration et le volume lors des expériences de modélisation Plackett-Burmen de la production de l'isolat <i>INRS-CFL</i> de <i>B. bassiana</i>	80
Tableau 13. Combinaisons possibles des valeurs de chacun des facteurs et les rendements optimaux obtenus lors des expériences de modélisation Central Composite Design de la production de l'isolat <i>INRS-IP</i> de <i>B. bassiana</i>	85
Tableau 14. Combinaisons possibles des valeurs de chacun des facteurs et les rendements obtenus lors des expériences de modélisation Central Composite Design de la production de l'isolat <i>INRS-CFL</i> de <i>B. bassiana</i>	91

Introduction

La protection de l'intégrité environnementale, notamment au niveau de la préservation de la biodiversité des écosystèmes, est une préoccupation de plus en plus importante en phytoprotection. Les activités liées aux secteurs agricoles et forestiers et qui visent la lutte contre les espèces nuisibles sollicitent l'utilisation d'une vaste gamme de pesticides chimiques qui nuisent à l'atteinte de cet objectif. Parmi ces produits, les insecticides sont largement utilisés pour contrer les dommages causés par les insectes nuisibles. Il est généralement admis que leur utilisation est nocive du point de vue de la santé humaine, animale et environnementale. Selon Pimentel (1986), les dommages causés par les organismes nuisibles auraient doublé depuis la fin de la Seconde Guerre mondiale. L'utilisation de ces produits entraîne une perturbation du milieu qui se traduit par une diminution de la diversité génétique des organismes. De plus, l'exposition à ces produits chimiques favorise l'expression de mécanismes de résistance de nombreuses espèces d'insectes nuisibles (Wright et Chandler, 1991). Afin de réduire les risques liés 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 explorées. Elle est principalement basée sur l'utilisation d'organismes vivants, tels que les parasitoïdes, les parasites, les prédateurs et les agents pathogènes afin de prévenir ou réduire les dégâts causés par des ravageurs.

Du point de vue de l'écologie et de l'économie, le pesticide idéal serait un agent de lutte biologique bien implanté qui permettrait de maintenir les populations d'un organisme nuisible indéfiniment (Lomer *et al.*, 2001). Selon les mêmes auteurs, plusieurs facteurs doivent être considérés dans le choix d'un organisme comme agent de lutte biologique. La connaissance de la biologie, ses conditions de survie et de développement, sa distribution géographique et ses impacts sur la biodiversité ne sont que quelques facteurs à considérer dans le choix d'un organisme. Plusieurs approches de luttes biologiques peuvent être intégrées dans les régies de phytoprotection, notamment la lutte microbiologique.

La lutte microbiologique est une des solutions de rechange étudiées pour lutter contre certaines populations d'insectes ravageurs. Cette approche mise sur l'utilisation

d'agents microbiens, tels que les bactéries, les virus et les champignons microscopiques (Bo *et al.*, 2002; Kamp et Bidochka, 2002) qui viendront réduire le nombre d'insectes ravageurs. En les comparant aux pesticides chimiques, plusieurs avantages sont liés à l'utilisation des agents microbiens. Parmi ceux-ci, on retrouve leur innocuité aux vertébrés et plantes, leur spécificité d'infections aux insectes cibles, leur compatibilité avec les outils d'applications et d'autres agents de contrôles biologiques, leur possibilité de contrôler les ravageurs à long terme. De plus, les risques de développement d'une résistance des organismes ciblés sont plus faibles. Finalement, ces organismes peuvent aussi être modifiés génétiquement afin d'accroître leur efficacité. Même s'il existe plusieurs avantages, certains agents entomopathogènes présentent aussi des inconvénients. Le temps d'action qui est souvent plus long que celui observé avec les produits chimiques, la nécessité d'effectuer des applications multiples et la virulence qui est souvent dépendante des conditions environnementales sont souvent cités (Khetan, 2001; Inglis *et al.*, 2001; Fargues *et al.*, 2003; Thompson *et al.*, 2006). Finalement, certaines difficultés sont liées à la production à grande échelle pour certains agents entomopathogènes, avec des conséquences directes sur les coûts de production.

Certaines d'espèces bactériennes détiennent un pouvoir pathogène sur les insectes. Elles possèdent ainsi un potentiel intrinsèque très intéressant pour la lutte microbiologique. Parmi ces bactéries, plusieurs font partie des familles *Bacillaceae*, *Enterobacteriaceae* et *Pseudomonaceae* (Greathead *et al.*, 1994; Starnes *et al.*, 1993), *Streptococcaceae* et *Micrococcaceae* (Tanada et Kaya, 1993). Les bactéries *Bacillus thuringiensis* et *B. sphaericus* sont les microorganismes entomopathogènes les plus utilisées comme insecticides biologiques. Elles sont utilisées pour contrôler les populations d'insectes tant dans les secteurs de l'agriculture, de la foresterie et du milieu aquatique (Lacey et Siegel, 2000). Ces bactéries ont un potentiel toxicogène puisqu'elles produisent, des toxines cristallines, notamment les δ -endotoxines, durant le processus de sporulation. Lors de l'ingestion par l'insecte de ces préparations insecticides, les cristaux se solubilisent au niveau du tract intestinal et provoquent une toxicémie qui entraîne la mort de l'animal. Par la suite, la germination des spores bactériennes est engagée et les bactéries envahissent et se reproduisent dans le cadavre de l'insecte.

Plusieurs avantages et inconvénients sont associés à l'utilisation de ces bactéries entomopathogènes. Elles sont largement utilisées, notamment grâce à leur spectre d'hôte relativement large, leur efficacité contre certaines populations d'insectes ravageurs comme les lépidoptères et d'autres insectes nuisibles comme les moustiques, leur facilité de production sur des milieux artificiels divers et leur facilité d'application utilisant les équipements conventionnels. Par contre, elles ont un inconvénient majeur qui est le risque d'apparition de résistance chez certaines espèces d'insectes suite à l'exposition répétée aux toxines bactériennes (Dunphy et Tibelius, 1992). Cette résistance a été observée avec *B. thuringiensis* et *B. sphaericus* (Lacey et Kaya, 2000). De plus, on observe une perte importante de la viabilité des spores de *B. thuringiensis* exposées aux rayons ultra-violet (Ignoffo, 1992).

Les virus sont des parasites obligatoires requérant la présence des cellules hôtes vivantes d'un organisme pour se multiplier (Cory et Hoover, 2006). Les virus sont classifiés selon la composition de leur matériel génétique (ADN ou ARN), la structure de l'acide nucléique (monocaténaire ou bicaténaire) et la forme de l'acide nucléique (linéaire, circulaire, segmenté ou non). De plus, le caractère morphologique (présence ou absence de corps d'inclusion ou d'enveloppe) est souvent considéré dans la classification des virus. Begon *et al.* (1996) indiquent qu'il a plus de 1 600 isolats de virus démontrant une virulence contre plus de 1 000 espèces d'insectes. Ces virus entomopathogènes se trouvent dans plusieurs familles, telles que les *Baculoviridae*, les *Reoviridae*, les *Poxviridae*, les *Iridoviridae*, les *Parvoviridae*, les *Picornoviridae*, les *Tetraviridae*, les *Nodaviridae*, les *Poxviridae*, les *Caliciviridae* et les *Rhabdoviridae*. Parmi elles, les virus de la famille de *Baculoviridae*, notamment les nucléopolyédrovirus (NPV) et les granulovirus (GV) sont utilisés à grande échelle dans la lutte microbiologique, les autres y sont peu ou non applicables (Evans, 2000; Szewczyk *et al.*, 2006).

Les virus utilisés en lutte biologique doivent nécessairement avoir une innocuité sur les vertébrés, les plantes et les autres organismes non ciblés (Burgess *et al.*, 1980). Contrairement aux autres agents microbiens, les virus se caractérisent par une spécificité importante à l'hôte infecté. Ils ont une gamme étroite d'hôtes qui leur confère à la fois un

avantage et un inconvénient. La gamme étroite d'hôtes est une clé importante permettant sans doute de les considérer comme agents de lutte microbiologique. Les effets directs sur les organismes non ciblés sont limités, même si ces derniers appartiennent à la même famille. Cependant, un désavantage principal de la gamme étroite d'hôtes est la restriction potentielle dans leur intérêt commercial. En effet, les compagnies cherchent à développer des produits pour une culture qui aura un spectre lui permettant d'atteindre tous les ravageurs comme dans le cas des crucifères (Tatchell, 1997). Un autre facteur qui limite l'utilisation des virus est la production *in vivo* des particules virales. Ainsi, la production requiert le maintien d'élevage d'insectes et des techniques d'extraction qui impliquent des efforts et des coûts importants. Finalement, l'infection virale ne peut être enclenchée sans qu'il y ait ingestion préalable du virus par l'insecte. Par la suite, il doit y avoir multiplications virales dans l'hôte avant d'observer une mortalité. Tout le processus est un facteur limitant, puisqu'il implique un temps de réponse plus long que les pesticides chimiques. Finalement, comme plusieurs micro-organismes entomopathogènes, la persistance des virus dans l'environnement est largement affectée par les radiations ultraviolettes (Franz, 1971).

Au cours des dernières années, l'utilisation des champignons entomopathogènes pour contrôler les populations d'insectes nuisibles a attiré l'attention. Il existe plus de 700 espèces de champignons susceptibles d'infecter des insectes (Hajek et St Leger, 1994). Les genres les plus souvent utilisés en lutte microbiologique sont *Beauveria*, *Metarhizium*, *Lecanicillium* (anciennement *Verticillium*), *Erynia*, *Hirsutella*, *Entomophthora* et *Entomophaga* (Kamp et Bidochka, 2002; Goettel et Robert, 1992). Ces champignons entomopathogènes présentent plusieurs avantages, notamment une facilité de production sur des substrats différents, un mode d'action impliquant une pénétration de la cuticule (insecticide de contact), un large spectre d'hôtes, notamment contre plusieurs espèces d'insectes pour lesquelles il n'existe pas de bactérie ou de virus efficaces, une innocuité pour les humains, les animaux et l'environnement. Shimazu (2004) a montré que la température favorable à la production de *B. bassiana* est un indicateur de son innocuité envers les vertébrés. De façon naturelle, les champignons

entomopathogènes jouent un rôle significatif dans la régulation des populations d'insectes (Bidochka *et al.*, 2000; McCoy, 1990).

La capacité d'infecter les insectes par contact est certainement la caractéristique la plus intéressante des champignons. Les autres agents entomopathogènes, comme les bactéries et les virus, doivent préalablement être ingérés par les insectes. En effet, les champignons entomopathogènes ont une capacité de produire de grandes quantités de protéases, de lipases et de chitinases, qui permettent de scinder la cuticule d'insectes facilitant ainsi leur pénétration dans l'organisme.

Les isolats de champignons entomopathogènes peuvent être produits sur plusieurs substrats incluant les substrats des milieux solides et liquides dans différentes conditions environnementales et nutritives en utilisant des méthodes de production diverses. L'étude de la production des conidies des deux isolats *INRS-IP* et *INRS-CFL* du champignon entomopathogène *B. bassiana* a été réalisée en utilisant la modélisation mathématique permettant d'étudier plusieurs facteurs en un seul coup. À ce jour, peu d'études ont considéré les effets combinés des facteurs sur la production des conidies des isolats de *B. bassiana*.

Au cours de cette recherche différents éléments ont été abordés dans une optique visant l'optimisation de la production des isolats *INRS-IP* et *INRS-CFL* de *B. bassiana*. Dans un premier temps, des expériences ont été menées afin de sélectionner le substrat céréalier le plus performant pour la production des isolats. Dans un deuxième temps, une approche mathématique basée sur l'utilisation des modèles Plackett-Burmen et Central Composite Design (CCD) a été utilisée afin d'étudier les effets des facteurs environnementaux et nutritifs sur le rendement de la production des isolats *INRS-IP* et *INRS-CFL*. Finalement, l'impact des conditions de production sur la virulence des conidies des deux isolats de *B. bassiana* a été étudié sur la larve de la fausse teigne de la cire.

Revue bibliographique

1. *Beauveria bassiana*

Le champignon *Beauveria bassiana* (Balsamo) Veuillemin fait partie de la flore microbienne normale du sol et il est fréquemment rencontré (Boucias *et al.*, 1998). Il est un champignon cosmopolite et ubiquiste qui peut être isolé à partir d'insectes, d'ascaris et du sol (Fuxa et Kunimi, 1997). Il a été décrit pour la première fois en 1835 par un chercheur italien du nom d'Agostino Bassi de Lodi, d'où son nom, qui reconnut le champignon comme la source du « *mal de segno* » chez les vers à soie. Au cours des années, il a porté différents noms. Balsamo lui donna le nom de *Botrytis bassiana* en l'honneur de Bassi. Par la suite, il fut désigné comme *Sporotrichum goboforum* par Spegazzini, et comme *Isaria vexans* par Pettit. En 1911, Jean Beauverie l'identifia comme *Botrytis bassiana* et en 1912, Veuillemin changera son nom en *Beauveria* en l'honneur des travaux de Beauverie.

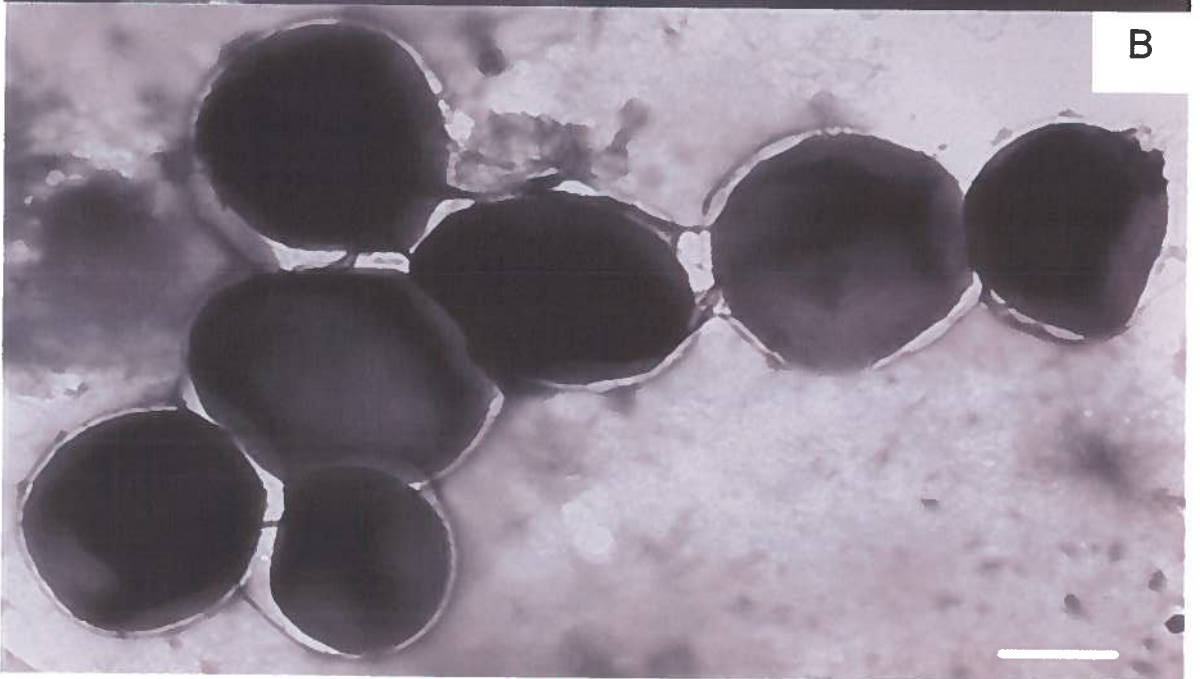
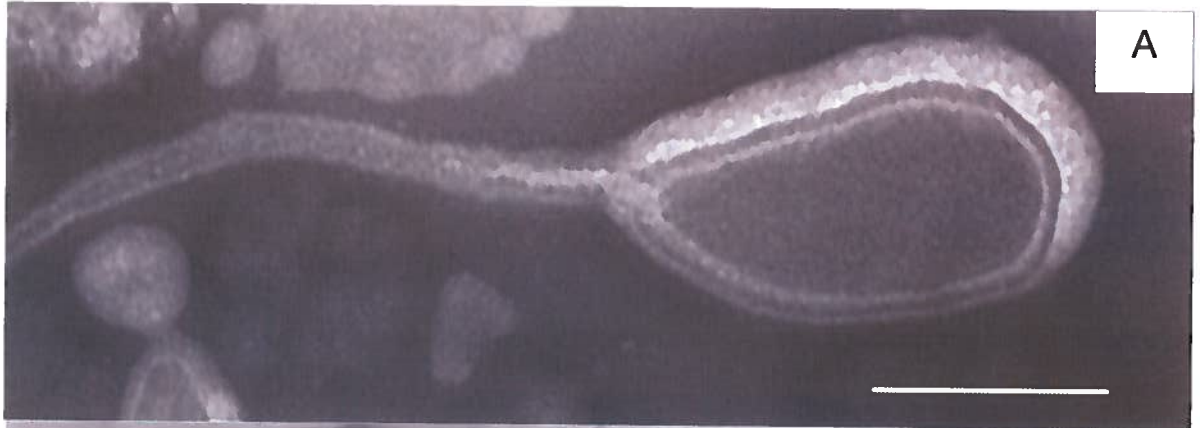
Selon Viaud *et al.* (1996), *B. bassiana* a un génome de taille variant entre 34,3 et 44,1 Mb (ADNr 28s). Il a un spectre d'hôtes très large et diversifié. Il affecterait plus de 750 espèces d'insectes (Inglis *et al.*, 2001) et certaines espèces d'ascaris (Santa *et al.*, 2005). Ce champignon est classé dans l'embranchement *Deuteromycota*, la classe *Sordariomycetes*, l'ordre *Hypocreales* et la famille *Cordycipitaceae*.

1.1. Morphologie

Le champignon *B. bassiana* semble être dimorphe puisqu'on rencontre deux morphologies distinctes qui sont tributaires des conditions environnementales dans lesquelles le champignon croît. Lorsqu'il se retrouve dans un hôte, la croissance du champignon se fait en cellules uniques lui permettant de se disperser dans tout l'organisme. Lorsque les tissus de l'hôte meurent, il colonise le corps de l'insecte sous forme mycélienne. La transmission du champignon se fait par l'entremise de spores qui sont formées par bourgeonnement. En fait, cette espèce est caractérisée par la production de deux types de spores asexuées : les blastospores et les conidiospores (figure 1). Ces deux types de spores sont différentes les unes des autres de par leur forme et leur taille. Les blastospores sont des structures unicellulaires ayant une paroi mince, lisse, ellipsoïde

Figure 1. Vue microscopique des spores asexuées de *B. bassiana*.

Les photos ont été prises sous microscopie électronique : la blastospore (A) à un grossissement de 50000X (barre de dimension 100nm) et les conidiospores (B) à un grossissement de 5000X (barre de dimension 500nm).



et hyaline. Elles ont la forme ovale de 5 à 7,4 μm de long et de 2 à 2,6 μm de large (Bidochka *et al.*, 1987). Elles sont produites en condition anaérobie par *B. bassiana* en présence d'un milieu liquide riche en nutriment (Bidochka *et al.*, 1987). Les conidiospores ou conidies sont produites en condition aérobie lorsque le mycélium puise ses nutriments à partir d'un milieu solide ou semi-solide (MacLeod, 1954). Les conidiospores ont en général deux formes. La première forme est sphérique avec un diamètre de 1 à 4 μm , tandis que la deuxième est ovale avec des dimensions de 1,5 à 5,5 μm par 1 à 3 μm . Ce sont les conidiospores qui sont normalement utilisées lors des applications sur le terrain puisque leur structure leur confère plus de stabilité à l'exposition de certaines conditions environnementales telles que la température, les rayons ultra-violets et l'humidité (Adamek, 1965; Van Winkelkoff et McCoy, 1984). Par contre, les blastospores sont aussi infectieuses que les conidiospores (Lipa, 1975).

1.2. Mode d'infection

1.2.1. Morphologie de la cuticule d'insectes

La cuticule est un recouvrement chitineux qui constitue l'exosquelette des insectes. Cette structure est composée d'environ 30,1 % de chitine, de 61,4 % de protéines, de 1,1 % de substances cendreuses et de 7,4 % d'acides gras et de lipides (Bidochka et Khachatourians, 1992). Elle est formée par deux couches principales: l'épicuticule et la procuticule (figure 2). L'épicuticule est une couche mince formée par des lipides, des acides gras et des stérols. Elle est fortement résistante à l'eau et aux autres solvants. La procuticule est une couche épaisse qui peut représenter jusqu'à 70 % du poids sec de la cuticule (Sabbahi, 2008). Celle-ci se divise en deux couches distinctes : l'exocuticule qui se trouve immédiatement au-dessous de l'épicuticule et une autre couche appelée l'endocuticule contenant de nombreuses fibrilles de chitine, des quinones et des protéines. Au dessous de la cuticule, il existe une autre couche appelée l'épiderme et qui est formée de deux couches de phospholipides. Sous l'épiderme se retrouve l'haemolymphe qui est l'équivalent du sang chez les insectes.

La cuticule est une barrière très efficace pour protéger les insectes contre les organismes, comme les bactéries et les virus, qui ne possèdent pas de mécanisme de pénétration (St Leger, 1993). Cependant, la pénétration à travers la cuticule des insectes est le mode d'entrée de la plupart des champignons entomopathogènes. C'est sous des actions enzymatiques et/ou physiques que ces champignons réussissent à provoquer des brèches sur cette structure.

1.2.2. Mode d'infection de B. bassiana

Comme indiqué précédemment, l'infection de *B. bassiana* se fait directement en contact avec les insectes cibles. En effet, le champignon est capable de pénétrer et se déplacer à travers la cuticule d'hôtes, forçant la barrière physiologique de l'hôte par des mécanismes enzymatique et physique. L'infection fongique implique une cascade d'événements incluant l'adhésion à la cuticule, la pénétration et la prolifération (figure 2).

1.2.2.1. Adhésion

L'adhésion est la première étape du processus d'infection. Les conidies (conidiospores) entrent en contact avec la cuticule sous l'action de certains facteurs comme le vent et l'eau. Les spores adhèrent à la cuticule des insectes grâce à des forces hydrophobiques (Boucias *et al.*, 1991) et des charges électrostatiques (Boucias *et al.*, 1998). Inglis *et al.* (2001) ont montré que les conidies de *B. bassiana* possèdent des propriétés hydrophobiques liées à la présence de protéines riches en cystéine, appelées hydrophobines. L'hydrophobicité des spores joue un rôle important non seulement dans l'attachement, mais aussi dans la protection des conidies contre le dessèchement (Hegedus *et al.*, 1992). De plus, certains polysaccharides fongiques extracellulaires, des lectines et des enzymes extracellulaires retrouvés à la surface des spores seraient impliqués dans l'attachement de conidies à la surface de la cuticule (Boucias *et al.*, 1991).

1.2.2.2. Pénétration

Lorsque le champignon entomopathogène atteint et adhère à la surface de la cuticule d'un insecte, une séquence d'événements est enclenchée qui conduira à une infection chez l'hôte.

Germination. La germination est la seconde étape d'infection des champignons entomopathogènes. Les spores germent et les hyphes pénètrent à travers la cuticule d'insecte (Begon *et al.*, 1996; Bidochka *et al.*, 2000; Szewczyk *et al.*, 2006). Lors de la germination, les spores sécrètent une substance gélatineuse, le mucilage, qui modifie de la structure épicuticulaire déclenchant ainsi leur germination. À ce stade, il y a formation d'un *appressorium* (tube germinatif) qui sert de point d'arrimage et qui favorise le ramollissement de la cuticule et la pénétration éventuelle du champignon. La formation d'*appressorium* semblerait dépendre des éléments nutritifs retrouvés à la surface de la cuticule d'insectes (St Leger *et al.*, 1989). La germination semble requérir la présence de certains nutriments exogènes solubles à l'eau (Boucias et Pendland, 1984; Fargues, 1981), et elle peut être fortement influencée par la teneur en oxygène, le pH, l'eau, la température, la présence de composés toxiques, comme les phénols et de courtes chaînes d'acides gras, à la surface de la cuticule (Charnley, 1984; St Leger 1991). Cependant, Ferron *et al.* (1993) ont montré que la substance nutritive de la cuticule favoriserait la croissance mycélienne plutôt que sa pénétration. Des signaux moléculaires intracellulaires tels que l'activation de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) et la libération de Ca^{++} seraient aussi impliquées dans le développement de l'*appressorium* (St Leger *et al.*, 1990).

Pénétration. La pénétration est la troisième étape d'infection qui résulte de l'action combinée des pressions mécaniques et de l'hydrolyse enzymatique de certaines hydrolases sur la cuticule (St Leger, 1993). Plusieurs enzymes extracellulaires telles que des protéases, des chitinases et des lipases peuvent être sécrétées par les hyphes (St Leger, 1995). Ces enzymes possèdent des affinités avec certains polymères de la cuticule, des protéines, des chitines et des lipides de l'insecte affaiblissant la structure de la cuticule.

Parmi celles-ci, les protéases joueraient le rôle très important dans la pénétration (St Leger, 1993). Des enzymes protéolytiques extracellulaires diverses peuvent être produites à ce stade, notamment les endoprotéases, l'aminopeptidase, N-acétylglucosaminidase, la protéase analogue de la subtilistine, Pr1 et l'enzyme trypsine-like Pr2 (St Leger *et al.*, 1996). La protéase Pr1 de *B. bassiana* est semblable à celle de *M. anisopliae*. Elle est codée par le gène *cdep I* et serait produite lors de la formation de l'appressorium (St Leger *et al.*, 1987). La protéase Pr1 aurait une activité protéolytique contre plusieurs protéines sécrétées par la cuticule d'insectes, telles que la caséine, l'élastine et le collagène. Campos *et al.* (2005) ont mentionné que la Pr1 est la protéine majeure produite lors de la formation de l'appressorium. La Pr2 appartenant à la protéase sérine est aussi sécrétée durant le commencement de la colonisation de cuticule. St Leger *et al.* (1996) ont suggéré qu'il y ait un certain rôle de Pr2 dans la dégradation des protéines extracellulaires de la cuticule, complémentairement de Pr1. Gupta *et al.* (1992) ont montré que la production des protéases Pr1 et Pr2 augmente lorsque *B. bassiana* est cultivé sur la cuticule d'insecte. Pour la plupart des champignons filamenteux, la chitine est un composé principal de la membrane cellulaire (Fujiwara *et al.*, 2000; Ichinomiya *et al.*, 2002a; Ichinomiya *et al.*, 2002b). La chitinase, codée par gène *Bbchit I* de *B. bassiana*, est essentielle pour la formation des hyphes et le processus de conidiogenèse (Fan *et al.*, 2007; Peng *et al.*, 2009).

1.2.2.3. Prolifération

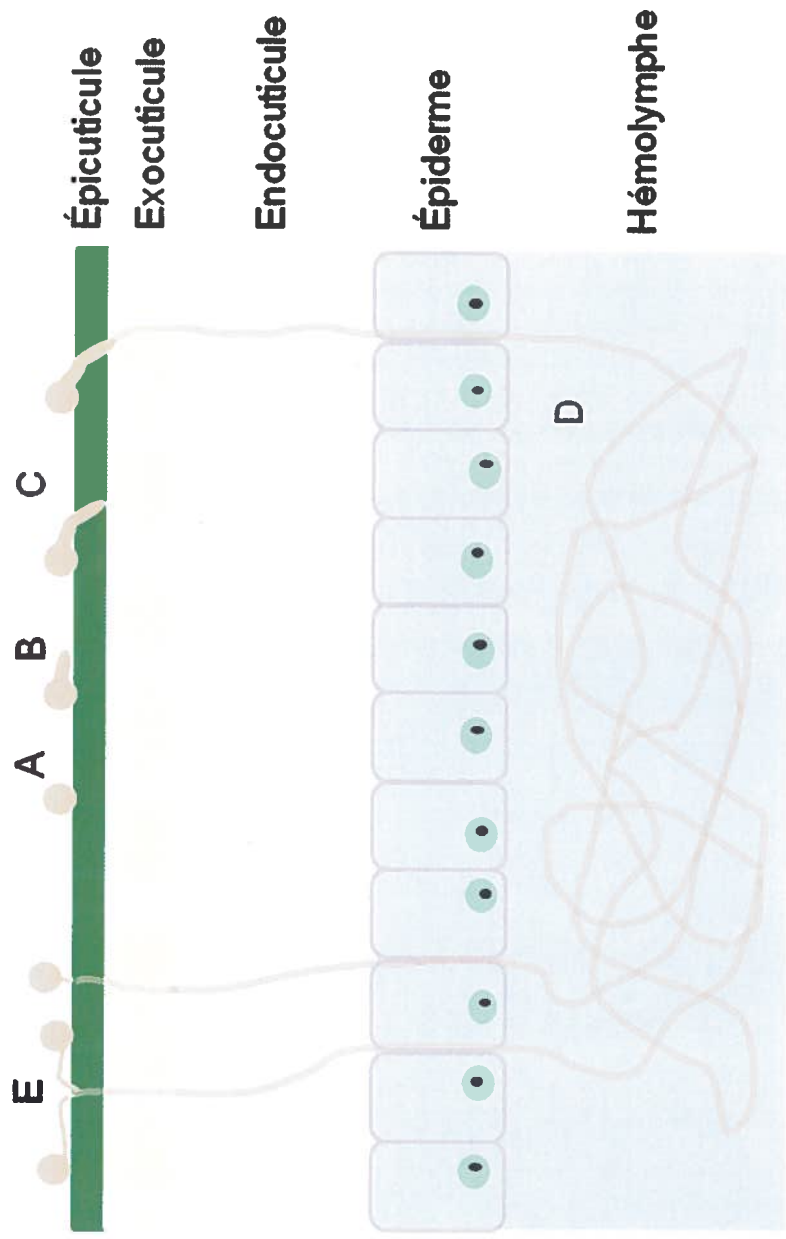
La prolifération est la dernière phase du cycle de développement du champignon. Elle comprend deux étapes qui sont la prolifération interne et la formation de la muscardine.

Prolifération interne. Lorsque les appressoriums ont pénétré la cuticule, le champignon forme les blastospores et les libère dans l'hémolymphe. Dans l'abdomen de l'insecte, les hyphes se développent de chaque côté des blastospores et sont confrontés à une compétition extra spécifique provenant des bactéries intestinales (Boucias *et al.*, 1998). Au cours de l'évolution, *B. bassiana* a acquis la capacité de produire plusieurs

Figure 2. Cuticule d'insecte et le mode d'infection du champignon entomopathogène *B. bassiana*.

La cuticule d'insecte est formée par une couche mince, l'épicuticule et une couche épaisse, la procuticule. La procuticule comprend deux couches distinctes notamment l'exocuticule et l'endocuticule. L'épiderme est une couche située au dessous de la cuticule qui sépare la cuticule et l'hémolymphe.

L'infection de *B. bassiana* se fait directement en contacte avec des insectes cibles. Le mode d'infection comprend plusieurs étapes incluant l'adhésion des spores à la cuticule (A), la germination des spores (B), la pénétration des hyphes à travers la cuticule (C), la prolifération à l'intérieur de l'abdomen (D) et la formation de la muscardine à la surface de la cuticule (E).



enzymes et toxines ayant des propriétés antibactériennes, antifongiques et insecticides, qui favorisent leur colonisation du milieu. Parmi ceux-ci, on trouve les cyclooligomères non ribosomiaux, les depsipeptides, la beauvericine et la bassianolide, les peptides cycliques beauverolides, les enniatines (Vey *et al.*, 2001), les isarolides, le diketomorpholine bassiatine et l'oosporine, un dibenzoquinone de couleur rouge (Xu *et al.*, 2008). La mycotoxine beauvericine codée par le gène *bbBeas* de *B. bassiana* est toxique pour certaines larves d'insectes comme les vers à soie (*Bombix mori*, L) (Xu *et al.*, 2008). Les cyclosporines A et B et des peptides cycliques comprennent les activités immunodéprimées contre les larves de moustiques (Weiser et Matha, 1998). Durant le développement des hyphes, le champignon sécrète un antibiotique, l'oosporine, qui maintient et accélère le processus d'infection en lui permettant de surmonter la compétition des bactéries intestinales de l'insecte (Strasser *et al.*, 2000). Cet antibiotique est très actif contre les bactéries Gram positif et a été détecté dans de nombreux cadavres d'insectes infectés par *B. bassiana*.

Formation de la muscardine. Une fois que le champignon a envahi avec succès l'hémolymphe d'un insecte et que les conditions sont favorables, les hyphes croissent à travers les couches de l'exosquelette et les soudent ensemble, ce qui permet d'éviter la mue de l'insecte, qui pourrait ainsi se débarrasser des cellules fongiques infectieuses (Carlile *et al.*, 2001). Les hyphes traversent le tégument aux points intersegmentaires de la cuticule, correspondant à des régions plus souples permettant l'articulation de l'insecte. Les hyphes recouvrent alors la surface de l'insecte et forment un mycélium blanc cotonneux qui entourera complètement l'insecte. La muscardine blanche est le symptôme permettant de déterminer la maladie chez les insectes. Il y a la formation des conidies à l'extrémité des hyphes. Lorsqu'elles atteignent la maturité, les conidies sont libérées dans l'environnement en présence de condition favorable.

2. *Beauveria bassiana* et lutte microbiologique

Plusieurs espèces de champignons, dont certains isolats de *B. bassiana*, ont été utilisées pour contrôler des populations d'insectes (Goettel *et al.*, 2000; Liu et Bauer, 2006; Yun, 2003). Le champignon entomopathogène *B. bassiana* est utilisé mondialement comme agent microbien de lutte contre certaines espèces d'insectes grâce, notamment, à la facilité de le produire à grande échelle et à l'innocuité envers les vertébrés (Boucias *et al.*, 1998). Différentes préparations de *B. bassiana* ont été utilisées tant au niveau de la protection de la santé humaine que la protection des végétaux dans les secteurs agricole et forestier. Les chercheurs ont montré la performance de ce champignon entomopathogène contre les insectes nuisibles de plusieurs ordres, notamment chez des lépidoptères, hémiptères, coléoptères, homoptères, isoptères et diptères.

Dans le domaine de la santé humaine, plusieurs études montrent l'efficacité insecticide de certains isolats de *B. bassiana* en milieu aquatique pour lutter contre les populations d'espèces de moustiques jouant le rôle de vecteur de microorganismes pathogènes. Ainsi, Clark *et al.* (1968) ont montré la susceptibilité des larves des moustiques *Culex tarsalis* L., un vecteur de certains arbovirus en Amérique du Nord, à certains isolats de *B. bassiana*. Il en va de même des espèces *C. pipiens* L., un vecteur du virus causant les encéphalites de Saint-Louis et *Anopheles albimanus* Wiedemman, un vecteur de la malaria dans les régions tropicales (Bejarano, 2003), *Aedes aegypti* L., un vecteur principal de la fièvre jaune et de la dengue dans la région tropicale (Bancroft, 1906; Miranpuri et Khachaturian, 1991) et le phlébotome, *Lutzomyia longipalpis* Lutz et Neiva, le vecteur principal de *Leishmania chigasi* Cunha & Chagasi (Amora *et al.*, 2009) qui est l'agent étiologique de leishmaniose viscérale en Amérique (Soares et Turco, 2003).

En agriculture, certaines préparations à base de *B. bassiana* ont été utilisées comme mycoinsecticides depuis 1965 dans l'ancienne URSS. Ces préparations étaient employées pour réprimer les populations de certaines espèces de lépidoptères, comme

dans le cas du carpocapse de la pomme, *Cydia pomonella* L., un important ravageur des vergers (Faria et Wraight, 2007) et le papillon nocturne du tubercule de pommes de terre, *Phthorimaea operculella* Zeller, un ravageur de la pomme de terre (Hafez *et al.*, 1994). D'autres isolats de *B. bassiana* ont aussi été testés pour lutter contre les pullulations de certaines espèces d'hyménoptère, comme la punaise du blé, *Eurygaster integriceps* Puton, un insecte ravageur affectant plusieurs cultures de céréales en Asie Centrale, en Asie de l'Ouest et en Afrique du Nord (Parker *et al.*, 2003), la punaise terne, *Lygus rugulipennis* Popius (Kouassi *et al.*, 2003) et *Lygus lineolaris* Palisot de Beauvois (Sabbahi, 2008; Sabbahi *et al.*, 2008a,b) qui affectent les cultures maraîchères comme l'amarante (Leland et McGuire, 2006) et le céleri (Kouassi, 2004), la punaise noire du riz, *Scotinophara coarctata* Fabricius (Rombach *et al.*, 1986), la punaise de céréales, *Blissus leucopterus* Say, un insecte indigène de l'Amérique du Nord (Krueger *et al.*, 1991). Il y a aussi des études qui montrent les effets du champignon *B. bassiana* contre certaines espèces de coléoptères, notamment le doryphore de la pomme de terre, *Leptinotarsa decemlineata* Say, un important défoliateur des cultures de pomme de terre (Faria et Wraight, 2007), l'anthonome de la fleur du fraisier, *Anthonomus signatus* Say (Sabbahi, 2008; Sabbahi *et al.*, 2008b), du charançon de la racine du fraisier, *Otiorhynchus ovatus* L. (Sabbahi, 2008; Sabbahi *et al.*, 2008b), du charançon de la prune, *Conotrachelus nenuphar* Herbst, un important ravageur des fruits à noyaux et à pépins (Fréchette *et al.*, 2009), du charançon de la banane, *Cosmopolites sordidus* Germar (Akello *et al.*, 2009) et des scolytes des grains du café, *Hypothenemus hampei* Ferrari en Colombie (Posada-Florez, 2008).

Dans le secteur forestier, plusieurs travaux montrent le potentiel de certains isolats de *B. bassiana* comme agent de lutte biologique contre des populations d'insectes ravageurs. De façon plus particulière, la susceptibilité de certaines espèces de coléoptères causant d'importants dommages a été étudiée. C'est le cas du scieur du pin japonais, *Monochamus alternatus* Steiner et Buhner (Shimazu, 2004), un vecteur des nématodes du pin, *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner et Buhner) Nickle, qui cause l'affaiblissement des pins (Rutherford *et al.*, 1987), l'agrile du frêne, *Agrilus planipennis* Fairmaire, un insecte exotique causant d'importants dommages aux frênes du Canada et des États-Unis (Liu et Bauer, 2006), le charançon du pin blanc, *Pissodes strobi* Peck, qui affecte

particulièrement les plantations de pin blanc (*Picea glauca* [(Moench) Voss.]) (Trudel *et al.*, 2007), le scolyte birayé, *Trypodendron lineatum* Oliv. (Prazak, 1991) et le longicorne brun de l'épinette, *Tetropium fuscum* Fabr., un insecte exotique retrouvé dans l'est du Canada (Sweeny *et al.*, 2005), l'ips typographe, *Ips typographus* L., un important ravageur de l'épicéa commun, *Picea abies* (L.) Karsten, en Europe (Kreutz *et al.*, 2004). Au niveau des lépidoptères, notons les travaux sur la chenille du pin, *Dendrolimus punctatus* Walker, un défoliateur des pins en Chine (Wang *et al.*, 1999).

3. Variation de la virulence

Les isolats du champignon entomopathogène *B. bassiana* semblent posséder une diversité génétique qui se traduit par une variation de leur spécificité à l'hôte et de leur viabilité (Almeida *et al.*, 1997; Daniel et Wyss, 2009 ; Moino *et al.*, 1998 ; Sabbahi, 2008; Sabbahi *et al.*, 2008 a,b). Plus précisément, Maketon *et al.* (2009) ont réalisé des épreuves de criblage en laboratoire avec douze isolats de *B. bassiana* avant leur application sur le terrain dans un projet sur la mouche blanche de la mûre, *Pealus mori* Takahashi. Les résultats montraient que parmi les douze isolats, un seul, le CKB-048, était efficace avec une mortalité de 87 % à une concentration de 1×10^6 conidies ml^{-1} . Dans une approche similaire, huit isolats de *B. bassiana* et de *M. anisopliae*, indigène du Bénin, ont été criblés pour lutter contre les larves de la fausse-teigne des crucifères, *Plutella xylostella* L.. Seul l'isolat Bba 5653 de *B. bassiana* a causé une mortalité significative de 94 % chez les larves (Godonou *et al.*, 2009). Les effets de six isolats de champignons entomopathogènes sur la mortalité de différents stades de la mouche européenne des cerises, *Rhagoletis cerasi* L. (Diptera : Tephritidae), ont été évalués dans une série d'expériences de laboratoire pour trouver un isolat approprié pour la lutte biologique (Daniel et Wyss, 2009). Les auteurs ont constaté que les jeunes adultes avaient une mortalité inférieure aux mouches plus vieilles. Cependant, les effets débilissants étaient plus importants chez les jeunes mouches que chez les mouches plus vieilles, notamment au niveau des œufs pondus. De plus, ils indiquaient que les larves du troisième stade et les pupes n'étaient pas susceptibles aux isolats testés. Ainsi, la virulence des conidies semble spécifiquement associée à certaines espèces et voir même à

certaines stades du développement des insectes. Sabbahi *et al.* (2008b) ont évalué l'efficacité insecticide de seize isolats de *B. bassiana* pour lutter contre trois espèces d'insectes agricoles, la punaise terne, *L. lineolaris*, l'anthonome de la fleur du fraisier, *A. signatus* et le charançon de la racine du fraisier, *O. ovatus*. Ils ont constaté que tous les isolats de *B. bassiana* étudiés provoquaient une pathologie entraînant la mort des adultes de ces trois espèces. Parmi ces isolats, les isolats *INRS-CFL*, *ARSEF2988* et *LRS49* causaient une importante mortalité chez la punaise terne (90 %), l'isolat *INRS-CFL* était le plus efficace chez l'anthonome de la fleur du fraisier (88 %) et trois isolats, *ARSEF2988*, *INRS-CFL* et *ARSEF1395* étaient les plus virulents chez le charançon de la racine du fraisier (90 %).

4. Production de *B. bassiana*

4.1. Milieux de culture

Différents milieux peuvent être utilisés pour la production des isolats de *B. bassiana* (tableau 1). Les milieux liquides sont fréquemment utilisés lors de la première phase de la production de masse (Goettel et Roberts, 1992). Lorsqu'une grande quantité de matériel est requise, la production de masse sur des milieux solides devient très avantageuse. Divers substrats ont été évalués pour la production des champignons entomopathogènes, comme le sorgho, la fève de haricot, la bagasse de manioc, la farine de seigle, la farine de manioc, les différents types de riz et des résidus comme la bagasse de canne à sucre enrichie du sirop de canne et des résidus de levure torula (Calderon *et al.*, 1995; Soccol *et al.*, 1997), le blé, l'orge et l'avoine (Jenkins *et al.*, 1998), les carcasses de crevettes séchées (Suresh et Chandrasekaran, 1998) et le son de riz (Arcas *et al.*, 1999, Goettel, 1984). Le choix du substrat de production varie en fonction des espèces de champignons et des isolats. Par exemple, *M. anisopliae* peut être produit sur le riz (Kaaya et Hassan, 2000) et des grains écrasés ou entiers de maïs (Shashi *et al.*, 1999). Nelson *et al.* (1996) ont montré les effets de trois céréales, le riz, le blé et l'orge, sur la production de conidies de *M. anisopliae*, de *B. bassiana* et de *B. brongniartii* (Saccardo). Ils concluaient que ces champignons produisent plus de spores sur le riz que les deux

autres céréales. Une autre étude montrait que la production des spores de *M. anisopliae* était significativement plus importante à partir de grains que de cosses de riz (Dorta *et al.*, 1990). Avec une combinaison de sciure de bois, de cosse de riz et de riz dans un ratio de 75 :25 :100, il était possible d'obtenir une concentration de *B. bassiana* de $3,9 \times 10^8$ conidies ml^{-1} (Puzari *et al.*, 1997) et de $4,9 \times 10^8$ conidies ml^{-1} à base du riz (Kang *et al.*, 2005).

4.2. Facteurs influençant la production des conidies de *B. bassiana*

Comme tous les autres champignons asexués (champignons imparfaits), *B. bassiana* forme des conidies qui sont stables dans l'environnement et comporte une étape d'infection dans leur cycle de développement. Pour passer à l'étape infectieuse, les conidies exigent des conditions particulières, des substrats appropriés, ainsi que des conditions abiotiques spécifiques, notamment la température, la lumière et l'humidité (Arthurs et Thomas, 2001; Carruthers et Hural, 1990; Fargues *et al.*, 1997; James *et al.*, 1995; Sivasankaran *et al.*, 1998). En effet, Steinkratus et Slaymaker (1994) ont montré que la température et l'humidité relative avaient une influence sur la capacité de germination de certains champignons entomopathogènes. L'exposition de la lumière lors de la production de *B. bassiana* pourrait interférer avec les propriétés physiologiques de ce dernier. Zhang *et al.* (2009) ont remarqué que, en présence de la lumière, il y avait un changement au niveau de la morphogénétique de *B. bassiana*. De plus, pour produire des conidiospores, ces champignons ont besoin de conditions aérobies, de sources de carbone et d'azote inorganique et d'éléments minéraux. Le saccharose ou le glucose est habituellement utilisé comme source de carbone et d'énergie (Iskandarov *et al.*, 2006). Par contre, en présence de protéines, le glucose n'exercerait aucun effet sur le taux de germination des spores de *B. bassiana*, ainsi que sur la croissance et le développement du champignon (Smith et Grula, 1981). Dans le cas de certains hyphomycètes, en particulier *B. bassiana* et *M. anisopliae*, on peut observer une croissance sur des milieux contenant seulement du saccharose, de l'azote et des éléments minéraux (Iskandarov *et al.*, 2006).

4.2.1. Température

La température est un élément important qui influence la production des conidies. La croissance du champignon *B. bassiana* sera ralentie lorsque la température est défavorable (Roberts et Hajek, 1992). La température optimale de croissance peut varier en fonction des besoins spécifiques de chaque isolat (Sato *et al.*, 1993). Shimazu (2004) mentionnait que la température optimale pour la croissance des champignons entomopathogènes pouvait dépendre de leur origine géographique. Par exemple, les isolats de *B. bassiana* isolés de régions plus chaudes avaient des taux de croissance plus élevés à 30°C que ceux provenant de zones plus froides. La production de conidies de *B. bassiana* sur des cadavres de la punaise hématophage, *Rhodnius prolixus* (Stal), un vecteur de la maladie Chagas, étaient optimale à la température variant entre 15 et 25°C, mais diminuait entre 28 et 30°C et était nulle à une température supérieure à 35°C (Luz et Fargues, 1998). De plus, la germination des conidies était maximale à des températures variant entre 25 et 30°C, et le processus était retardé aux températures de 15 et 35 °C (Luz et Fargues 1997). Parker *et al.* (2003) ont étudié les effets de la variation de la température sur la croissance et la sporulation de 31 isolats de trois genres de champignons entomopathogènes, *Beauveria*, *Lecanicillium* et *Paecilomyces*. Ils ont aussi observé qu'aucun isolat ne peut croître à 35°C puisqu'il n'y avait aucun développement d'hyphes. Il n'y a que quelques champignons qui peuvent croître à une température supérieure à 32°C (Devi *et al.*, 2005). De façon générale, les isolats de *B. bassiana* poussent à une température optimale se situant près de 25°C (Fargues *et al.*, 1992). Le taux de la germination optimale des spores de *B. bassiana* serait de 25°C selon Feng *et al.* (1994), mais varierait entre 20 et 35°C selon Iskandarov *et al.* (2006). Arcas *et al.* (1999) indiquaient qu'ils produisaient leur suspension de spores de *B. bassiana* à une température de 26 ± 1°C sur une gélose Sabouraud glucosée (SDA, *Sabouraud Dextrose Agar*).

4.2.2. Humidité et eau

L'humidité joue un rôle essentiel pour la germination, l'infection et la sporulation des champignons entomopathogènes (Glare et Milner, 1991; Luz et Fagues, 1998; Sivasankaran *et al.*, 1998). Cependant, des études montrent que des isolats de *B. bassiana* peuvent croître dans des conditions plus arides. Fargues *et al.* (1997) et Faria et Wraight (2001) ont démontré que l'humidité existante dans le micro- environnement de la surface de la cuticule d'insectes était suffisante pour permettre la croissance de certains isolats de *B. bassiana*. Par contre, en conditions *in vitro*, l'humidité des milieux solides semble être un facteur important qui affecte la croissance des hyphes et la consommation des nutriments par les champignons (Jenkin *et al.*, 1998). Selon cette dernière étude, la germination des conidiospores, l'expansion de l'appressorium et l'infection de la plupart des champignons entomopathogènes exigent au moins 95 % d'humidité relative (Hallsworth et Magan, 1999). Les conidies de *B. bassiana* et de *M. anisopliae* ne peuvent germer que si l'humidité relative est supérieure à 92 % (Walstad *et al.*, 1970). Par contre, d'autres études démontrent différents taux d'humidité pour la croissance d'isolats de *B. bassiana*, notamment 75 % (Barranco-Florido *et al.*, 2002), 85% (Mondal et Bhattacharya, 2004) et 90 % (Devi *et al.*, 2005).

La production des conidies semble aussi dépendre du volume d'eau ajoutée dans les milieux de culture (Devi *et al.*, 2005). Selon Jenkins *et al.* (1998), le taux d'humidité requis pour une production de masse des champignons entomopathogènes devrait se situer entre 35 et 60 %. Prakash *et al.* (2008) ont réalisé une étude sur la teneur en eau de trois céréales, le riz, l'orge et le sorgho, utilisés pour la production de *M. anisopliae*. Ainsi, les valeurs moyennes observées étaient respectivement de 22,2, 73,2 et de 75,7 %. Ils indiquaient que lorsque l'humidité était très élevée dans le substrat, cela facilitait la récolte des conidies. L'eau seule ne cause pas un grand impact sur la production des conidiospores. Cependant, la logique voudrait que les différents substrats utilisés pour la production de champignons requièrent des volumes différents d'eau et que la production optimale de conidies dépende principalement des isolats, des volumes d'eau et des substrats utilisés.

Tableau 1. Différents milieux de culture utilisés pour la production de champignons entomopathogènes.

Milieux de culture	Espèce(s)	Références
Sorgho, fève de haricot, bagasse de manioc, farine de seigle, farine de manioc, riz, bagasse de canne à sucre, résidus de torula	<i>B. bassiana</i>	Calderon <i>et al.</i> , 1995; Socol <i>et al.</i> , 1997
Blé, orge, avoine	<i>B. bassiana</i>	Jenkins <i>et al.</i> , 1998
Carcasses de crevettes séchées	<i>B. bassiana</i>	Suresh et Chandrasekaran, 1998
Son de riz	<i>B. bassiana</i>	Arcas, 1999; Goettel, 1984
Riz	<i>M. anisopliae</i>	Dorta <i>et al.</i> , 1990; Kaaya et Hassan, 2000
Grains écrasés ou entiers de maïs	<i>B. bassiana</i>	Kang <i>et al.</i> , 2005
Riz, blé, orge	<i>B. bassiana</i>	Shashi <i>et al.</i> , 1999
	<i>M. anisopliae</i>	Nelson <i>et al.</i> , 1996
	<i>B. bassiana</i>	
	<i>B. brongniartii</i>	
Mélange de sciure du bois, de cosse de riz et de riz	<i>B. bassiana</i>	Puzari <i>et al.</i> , 1990
Blé	<i>B. bassiana</i>	Sahayaraj et Namasivayam, 2008
Sorgho	<i>Vercillium lecanii</i>	Sahayaraj et Namasivayam, 2008
	<i>Paecilomyces fumosoroseus</i>	

Plusieurs substrats solides notamment les céréales entières et les déchets agro-industriels peuvent être utilisés pour la production des plusieurs espèces de champignons entomopathogènes.

4.2.3. pH

Le pH du sol est considéré comme un des facteurs majeurs qui influence la persistance et l'efficacité de la virulence des champignons entomopathogènes (Inglis *et al.*, 2001). Parmi les différents facteurs abiotiques pouvant influencer la croissance des champignons entomopathogènes, le rôle du pH et de sa conductivité ionique est le moins bien compris. Il y a des rapports contradictoires de l'effet du pH sur la survie, la distribution écologique et la virulence des champignons entomopathogènes. Rath (1992) a démontré que la distribution des isolats de *M. anisopliae* dans des niches écologiques différentes était principalement due à l'influence des averses, du pH du sol et du type du sol. Par contre, dans une autre étude, il concluait que la distribution des isolats de *M. anisopliae* n'était pas affectée par le pH du sol (Rath *et al.*, 1995). Groden et Lockwood (1991) ont étudié la fongistase, un phénomène correspondant à une inhibition biologique de la germination de certaines spores fongiques dans le sol. Ce phénomène est souvent associé à l'activité d'agents entomopathogènes comme *B. bassiana* et agirait par compétition trophique ou par antibiose. Dans le cas de *B. bassiana*, la relation significative existe entre le pH du sol et les niveaux de la fongistase qui a augmenté exponentiellement lors que le pH augmente.

Une grande variation du niveau de pH a été notée lors de la production des isolats de *B. bassiana*. Ainsi, certains auteurs indiquent que la production a été réalisée à un pH variant entre 5 et 6 (Tarocco *et al.*, 2005), entre 6 et 8,5 (Galani, 1988) et même 10 et plus (Shimazu et Sato, 1996). Dans le cas de *M. anisopliae*, la gamme de tolérance au pH se situerait entre 4 et 7,8 (Rath, 1992) ou entre 2,2 et 10,5 (Hallsworth et Magan, 1996). La culture *M. anisopliae* a été étudiée sur trois différents types de milieux solides avec des pH se situant entre 6,6 et 7,5 (Prakash *et al.*, 2008). Les résultats montraient que la production de conidies sur riz était maximale à un pH de 7,01, sur sorgho à pH 7,06 et sur l'orge à pH de 6,76. De façon générale, plusieurs isolats de *B. bassiana* montrent une préférence pour les milieux contenant le pH du légèrement acide au pH alcalin (Padmavathi *et al.*, 2003).

4.2.4. Substances nutritives

Les besoins nutritifs varient beaucoup en fonction des espèces de champignons de même que des isolats. Vega *et al.* (2003) ont mentionné que les champignons dimorphes comme *Paecilomyces fumosoroseus* peuvent seulement obtenir des concentrations optimales de blastospores avec une accumulation importante de biomasse dans des milieux riche en nutriments. Par contre, le champignon *Colletotrichum truncatum* semble requérir une faible quantité de substances nutritives essentielles pour déclencher la sporulation. Le glucose, le saccharose, la peptone et la chitine sont des éléments nutritifs essentiels à la production de masse des champignons entomopathogènes (Iskandarov *et al.*, 2006).

La germination des champignons requiert des sources de carbone comme le glucose, le saccharose, la peptone, la chitine, pour leur croissance (Iskandarov *et al.*, 2006). Ces sources peuvent être endogènement ou exogènement selon les espèces de champignons. Smith et Grula (1981) ont constaté que le glucose peut provoquer une légère augmentation de la germination des conidies de *B. bassiana*, mais seulement en présence de protéine. Par contre, St Leger *et al.* (1994) ont montré que le glucose seul peut déclencher la germination de certains isolats de *Metarhizium* sp. La proportion des conidies de *B. bassiana* qui germe en réponse au sucre était plus grande en présence d'agar que celle avec le milieu liquide (James, 2001). Le pourcentage de sucre ajouté au milieu de croissance varie beaucoup d'une étude à l'autre. Par exemple, Safavi *et al.* (2007) indiquent l'addition de 0,6 à 8 % de glucose dans le milieu de croissance. Lacey (1997) et Goettel et Inglis (1997) utilisent une concentration de 2 % de saccharose dans le milieu de croissance pour la production de conidies de leurs champignons entomopathogènes.

On sait que la cuticule d'insecte est formée en grande partie de chitine sous forme de fibres. La chitine peut jouer le rôle important dans la production de champignons entomopathogènes. Ainsi, plusieurs auteurs ont testé l'effet de concentration de chitine sur la production des spores dans le milieu liquide. Différentes concentrations ont été

essayées, dont 1 % (Safavi *et al.*, 2007; Ying et Feng, 2006) et 0,1 % (Lee *et al.*, 2005) de chitine. De plus, certains auteurs ajoutent de la peptone dans le milieu de culture comme source d'azote à des concentrations de 0,5 % (Prakash *et al.*, 2008) et 2 % (Safavi *et al.*, 2007). Finalement, de l'extrait de levure en quantité différente est souvent utilisé pour augmenter le taux de croissance de champignons entomopathogènes. Ainsi, certains auteurs proposent d'utiliser des concentrations d'extrait de levure autour de 2 % (Prakash *et al.*, 2008; Wojda *et al.*, 2009), tandis que d'autres préconisent l'emploi d'une concentration de 1 % (Prakash *et al.*, 2008; Safavi *et al.*, 2007; Ying et Feng, 2006), et ce, en fonction des milieux sélectionnés.

5. Fermentation en milieu solide

La fermentation en milieu solide est la façon la plus simple de faire la production de conidies chez les champignons entomopathogènes. Différents substrats peuvent être utilisés. Soccol *et al.* (1997) ont développé un processus de fermentation en milieu solide impliquant plusieurs substrats agro-industriels pour la production de conidies de *B. bassiana*. Normalement, les conditions de fermentation en milieu solide sont déterminées en faisant varier les paramètres conventionnels du milieu afin de stabiliser ou optimiser le rendement. Une méthode traditionnelle du pas-à-pas est couramment utilisée pour évaluer ces conditions. Dans cette optique, l'ensemble des paramètres, à l'exception de la variable ciblée, demeure constant. Des variations sont apportées à la variable testée jusqu'à ce que l'on obtienne le niveau optimal de production. Cette approche est simple. Elle peut devenir complexe et fastidieuse s'il y a plus d'un facteur en jeu (Prakash *et al.*, 2008). De plus, elle ne tient pas compte des interactions pouvant exister entre les paramètres. La production de champignons entomopathogènes à l'échelle industrielle et semi-industrielle, requiert l'emploi d'approches techniques appropriées, des milieux de culture bon marché et fortement productifs qui permettront de maintenir les caractères morphologiques et pathogéniques tout en assurant un rapport intéressant entre le coût et le rendement en terme de production (Santa *et al.*, 2005).

6. Modélisation et production

Des approches mathématiques basées sur l'utilisation de modèles ont été développées afin de déterminer les conditions optimales de production dans des systèmes ayant plusieurs facteurs. On définit le terme facteur comme toute condition contrôlable d'une expérience. Ces modèles permettent de tenir compte des interactions pouvant exister entre les différents facteurs étudiés. Le principal avantage de ces approches, c'est qu'elles permettent d'étudier plusieurs facteurs, tout en réduisant de façon significative le nombre d'expériences à réaliser, et en maintenant un niveau de fiabilité très élevé. Ces approches sont généralement appliquées dans plusieurs études de criblage et d'optimisation des bioprocédés (Gohel *et al.*, 2006 ; Park *et al.*, 2005) et la production des spores (Prakash *et al.*, 2008). Plusieurs plans expérimentaux ont été développés tels que la méthode de Taguchi (*Taguchi's Robust Design*), les plans d'expérience factorielle complète, les plans d'expérience factorielle fractionnée (*Fractional factorial design*) ou Plackett-Burmen et la modélisation de la surface de réponse (MSR) (Gohel *et al.*, 2006). Selon Gohel *et al.* (2006) la méthode de Taguchi n'inclut pas explicitement la construction de modèle permettant l'optimisation de la production. En fait, la méthode de Taguchi est peu efficace et ne tient pas compte de progrès réalisés dans l'utilisation des plans d'expériences (Han *et al.*, 1998).

D'autres approches expérimentales peuvent être utilisées pour identifier les facteurs jouant un rôle significatif lors d'expériences analytiques permettant de déterminer les conditions optimales d'un processus. Parmi les approches les plus couramment utilisées, les plans d'expérience factorielle sont certainement ceux qui fournissent le plus d'information. Les plans d'expérience factorielle sont appliqués aux expériences dans lesquelles l'ensemble des facteurs et leurs combinaisons possibles sont considérés comme traitements. Par exemple, l'utilisation de deux champignons à deux concentrations différentes est une expérience factorielle 2×2 ou 2^2 . Dans ce cas, on retrouverait quatre combinaisons possibles de chacun des deux facteurs, aux deux niveaux considérés. Dans les expériences factorielles complètes, le nombre de traitements est égal au produit du nombre de niveaux de chaque facteur, ce qui peut compromettre la

réalisation de certaines expériences. Par exemple, en présence de cinq facteurs comportant trois niveaux (expérience factorielle 3^5), le nombre de traitements serait de $3 \times 3 \times 3 \times 3 \times 3 = 243$. La réalisation d'expériences avec un nombre important de traitements peut être une source potentielle de problème, notamment aux niveaux de l'hétérogénéité des conditions de réalisation, la disponibilité des ressources financière et humaine et toute la logistique afférente.

6.1. Plan d'expériences factorielles fractionnées

Afin de pallier à la situation décrite précédemment, des dispositifs expérimentaux, comme les fractions de plan d'expérience factorielle, ont été développés (Hunter, 1985). Comme son nom l'indique, ils impliquent que seulement une fraction de plan d'expérience factorielle, et non pas l'ensemble des combinaisons possibles de facteurs et leurs niveaux correspondants, est expérimentée (Montgomery, 2005). Dans les faits, ces plans sont particulièrement utiles lorsque les expériences comportent plusieurs facteurs avec de nombreux niveaux. Ainsi, ils permettent de réduire le nombre de traitements et le nombre d'expériences devant être réalisées. En général, le nombre d'expériences est représenté par l'équation n^{k-p} d'où n signifie le nombre de niveaux de chacun des facteurs, k le nombre des facteurs et p le nombre de générateurs indépendants. Le choix du générateur p est nécessaire pour cette équation puisqu'il génère le plan d'expériences afin de trouver les meilleures interactions possibles entre les facteurs et leurs effets importants. Par exemple, en présence de six facteurs comprenant deux niveaux, le nombre de traitements serait donc de $2^{6-2} = 16$ qui correspond au quart du nombre de traitements de l'expérience factorielle complète.

Généralement, ces approches sont utilisées pour identifier ou cribler des facteurs importants. Parmi les modèles proposés, le modèle de Plackett-Burmen est certainement le plus intéressant et le plus utilisé, et correspond à un plan fraction d'expérience factorielle à deux niveaux (Gupta *et al.*, 2004, Suresh et Chandrasekaran, 1999). Ce plan expérimental a été appliqué à plusieurs études enzymatiques telles que la production de lipase par *Bacillus* sp. (Gupta *et al.*, 2004), la sélection du milieu pour la production de chitinase par *Pantoea dispersa* (Gohel *et al.*, 2006), l'étude de thermostabilité de la β -

amylase et de la pullulanase de *Clostridium thermosulfurogenes* SV2 (Reddy *et al.*, 1999), la production de α -amylase par *Aspergillus oryzae* (Bogar *et al.*, 2002), la production de nisine par *Lactococcus lactis* à partir de lactosérum (Liu *et al.*, 2003), la production de la compactine par *Penicillium citrinum* (Chakravarti et Sahai, 2002), la production de xylanase par *Aspergillus terreus* (Ghanem *et al.*, 2000) et la production de chitinase par *Alcaligenes xylosoxydans* (Vaidya *et al.*, 2003). Ce modèle permet d'explorer une étude factorielle fractionnée de 2 à 31 facteurs indépendants dont chacun de ceux-ci comprend deux niveaux : une valeur maximale (+) et une valeur minimale (-). Avec ces valeurs, il génère une matrice orthogonale comportant une combinaison de ces deux valeurs pour chacun des facteurs étudiés (tableau 2). Ainsi, chaque colonne représente un facteur indépendant (ou assigné) ou un facteur non assigné (ou factice). Tandis que chaque cellule représente un traitement. Le nombre d'expériences totales est égal à $k + 1$ d'où k est le nombre total de facteurs incluant le facteur non assigné (Montgomery, 2005). Le nombre de valeur (+) et (-) par traitement est respectivement égal à $(k + 1)/2$ et $(k - 1)/2$. Chaque colonne devrait contenir le nombre égal de valeurs (+) et (-).

6.2. Modélisation de la surface de réponse

La modélisation de la surface de réponse (MSR) est une technique mathématique et statistique puissante et efficace permettant de générer des modèles prédictifs (Montgomery, 2005). Elle peut donner des informations sur l'interaction entre des facteurs, fournir des informations nécessaires pour planifier et traiter l'optimisation en donnant des réponses multiples. L'optimisation de la production basée sur les milieux de culture est un aspect très important dans le développement des processus de la fermentation (Prakash *et al.*, 2008). Dans ce cas, la modélisation de la surface de réponse permet de faire ressortir les interactions pouvant exister entre les substances nutritives à des concentrations variées et d'établir la concentration optimale de chaque substance nutritive pour un rendement ciblé. Le *Central Composite Design* (CCD) est un des modèles prédictifs de la MSR qui est très précis. Il est largement utilisé pour optimiser les conditions de production de plusieurs produits industriels, incluant la production

enzymatique comme la compactine par *Penicillium citrinum* (Chakravarti et Sahai, 2002), la production de protéase alcaline par *Bacillus* sp. (Adinarayana et Eillaiah, 2002; Suamant *et al.*, 2002), la production de xylanase par *Aspergillus niger* Tiegh. (Park *et al.*, 2002); la production d'autres produits métabolites, notamment la physotigmine par *Streptomyces griseofuscus* (Zhang *et al.*, 1996), l'(L-)acide glutamique par *Micrococcus glutamicus* Kinoshita et *Pseudomonas reptilivora* Caldwell et Ryerson (Sunitha *et al.*, 1998), l'acide mycophenolique dans le milieu solide fermenté (Sadhukhan *et al.*, 1999), l'(L(+)) (S-) acide lactique par *Lactobacillus casei* Hansen et Lessel NRRL B-441 (Hujanen *et al.*, 2001) et l'optimisation de la biomasse de *Rhizopus arrhizus* Fisher (L'homme et Roux, 1991).

Le modèle CCD permet d'explorer l'optimisation de la production en analysant les interactions d'un à cinq facteurs indépendants dont chacun comprend cinq niveaux : un niveau factoriel avec deux valeurs [minimal (-1) et maximal (+1)]; un niveau central avec une valeur moyenne entre les deux valeurs du niveau factoriel; un niveau axial avec deux valeurs extrêmes [extrême base (- α) et extrême haute (+ α)]. Avec ces valeurs, il est possible de générer une matrice valeur de ces cinq niveaux pour chacun des facteurs étudiés (tableau 3). Ainsi, chaque cellule représente un facteur indépendant. Tandis que chaque colonne représente un traitement.

Le nombre de traitements varie en fonction du nombre des facteurs étudiés. Le nombre des niveaux axiaux (- α et + α) est égal à $2k$ d'où k est le nombre total des facteurs, tandis que celui des niveaux factoriels est égal à 2^k et les restes sont les niveaux centraux. Les niveaux centraux doivent être répétés pour augmenter la précision relativement uniforme à l'intérieur des gammes de facteurs. La rotation des contours de variances α varie en fonction du nombre de facteurs étudiés et est égale à $k^{1/4}$.

Le CCD forme une fondation solide produisant la matrice de surface de réponse en offrant le nombre d'expériences nécessaires pour adapter à une combinaison linéaire du second degré appelé un polynôme quadrique.

Tableau 2. Matrice théorique générée par le modèle Plackett-Burmen.

Expériences	Facteurs										
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈	X ₉	X ₁₀	X ₁₁
1	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-
2	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-
3	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+
4	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+
7	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+
8	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-
9	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+
10	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+
11	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-
12	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-

Le nombre des expériences est égal à $k + 1$ où k est le nombre de facteurs étudiés. Chaque facteur comprend deux valeurs dont les valeurs minimale (-) et maximale (+).

Tableau 3. Matrice théorique générée par le modèle Central Composite Design.

Facteurs	Expériences																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
X_1	0	0	-1	0	+1	+1	+1	0	0	0	- α	0	-1	0	-1	0	-1	+1	0	0
X_2	0	0	+1	0	+1	0	+1	-1	0	- α	0	+ α	-1	0	-1	0	+1	-1	0	0
X_3	0	- α	+1	0	-1	0	+1	-1	+ α	0	0	0	-1	0	+1	0	-1	+1	0	0

Chaque facteur comprend cinq niveaux dont un niveau factoriel avec deux valeurs [minimal (-1) et maximal (+1)], un niveau central (0) avec une valeur moyenne entre les valeurs minimale et maximale et un niveau axial avec deux valeurs extrêmes (- α et + α).

Problématique

La problématique des insectes ravageurs est un phénomène récurrent qui se traduit par des impacts majeurs aux plans de l'écologie, de la santé et des impacts socio-économiques. Plusieurs stratégies à risque réduit pour l'environnement sont abordées pour lutter contre ces derniers. Parmi celles-ci, l'utilisation des champignons entomopathogènes fait l'objet d'importants efforts de recherche. Ces champignons peuvent jouer un rôle important dans la régulation naturelle des populations de certains insectes nuisibles, notamment lors d'épizooties (McCoy *et al.*, 1988). En plus de provoquer une infection par contact de la cuticule des insectes, le champignon entomopathogène *B. bassiana* est de plus en plus considéré comme outil intéressant de lutte, notamment en raison de son efficacité, sa spécificité, son innocuité aux vertébrés et sa facilité de production à grande échelle. Cependant, les études portant sur la production des conidies de certains isolats de *B. bassiana* font ressortir de grandes variations dans les conditions de croissance. De plus, dans ces études, un nombre limité de facteurs pouvant influencer la production a été considéré dans des approches que l'on peut qualifier de pas-à-pas. Ces approches sont laborieuses et ne tiennent pas compte de l'interaction pouvant exister entre les variables considérées. Plusieurs études ont examiné l'effet de certains facteurs sur la croissance et l'efficacité des insecticides fongiques. C'est notamment le cas de la température et des éléments nutritifs (Iskandarov *et al.*, 2006), de l'humidité (Lazzarini *et al.*, 2006), de la lumière (Zhang *et al.*, 2009) et des substances nutritives (Gao *et al.*, 2007; Safavi *et al.*, 2007).

Dans l'optique d'une production à grande échelle de certains isolats de *B. bassiana*, l'optimisation de la production devient un élément incontournable. L'utilisation d'une approche multifactorielle devrait permet d'identifier les conditions de production qui puissent fournir de grandes quantités de conidies à partir de techniques conviviales, simples, économiques et efficaces. Cette approche multivariée prend en considération les interactions entre les variables sélectionnées afin de définir les milieux et les conditions de culture idéales pour la production des conidies, et ce, tout en maintenant les caractéristiques virulentes. Actuellement, il n'existe aucune étude de ce genre portant sur l'optimisation de la production des conidiospores de certains isolats de *B. bassiana*.

Hypothèse

Le but de cette recherche est d'identifier les conditions environnementales et nutritives permettant d'optimiser la production de conidies de *B. bassiana* et de mesurer l'impact de ces conditions de production sur leur virulence. L'hypothèse principale est la suivante :

La combinaison et la modification de certains facteurs environnementaux et nutritifs permettront d'optimiser la production des conidies de certains isolats de B. bassiana tout en maintenant leur propriété insecticide.

Afin de tester cette hypothèse, quatre objectifs principaux ont été développés :

1. Identifier le milieu de culture;
2. Sélectionner les facteurs environnementaux, soient la température, l'humidité et la photopériode, et les facteurs nutritifs ajoutés au substrat pouvant affecter la production des conidies de deux isolats de *B. bassiana*;
3. Pour chacun des facteurs environnementaux et/ou nutritifs sélectionnés, établir des valeurs permettant d'optimiser la production des isolats de *B. bassiana*;
4. Mesurer l'impact des conditions de production sur la virulence des conidies des deux isolats de *B. bassiana*.

Matériel et méthodes

1. *Beauveria bassiana*

Les isolats utilisés lors de cette étude proviennent de la banque de champignons du Laboratoire d'entomologie expérimentale de l'INRS-Institut-Armand-Frappier (Laval, Québec, Canada) qui compte plus de 400 isolats de champignons entomopathogènes. Chaque isolat de la banque est conservé à -80 °C dans du glycérol à une concentration de 70 %.

Deux isolats de *B. bassiana*, l'isolat *INRS-IP* et l'isolat *INRS-CFL*, ont été choisis pour cette recherche en raison de leur facilité de produire en grande échelle, leur innocuité aux vertébrés, leur efficacité et leur spécificité envers les insectes cibles. Il s'agit de champignons indigènes du Québec. L'isolat *INRS-IP* a été retrouvé sur un adulte du doryphore de la pomme de terre, *Leptinotarsa decemlineata* L., récolté sur l'Île-Perrot près de Montréal. Pour sa part, l'isolat *INRS-CFL* a été isolé d'un adulte du grand hylésine du pin, *Tomicus piniperda* L., sur un échantillon provenant de Cookshire dans la région de Sherbrooke.

2. Production des suspensions mères

Afin de répondre aux besoins récurrent de matériel pour les différentes expériences, une production de suspensions mères des deux isolats *INRS-CFL* et *INRS-IP* du champignon *B. bassiana* a été réalisée. En effet, afin de tenir compte des variations pouvant être associées aux productions des conidies, tant au niveau des rendements que de la virulence des conidies, toutes les expériences ont été réalisées à partir de ces solutions mères. Cette production comprend deux étapes principales, soit la production initiale sur gélose Sabouraud glucosée (10g de peptone, 40g de dextrose, 2g d'extrait de levure et 15g d'agar-agar) (Difco Laboratoires, Mannheim, Allemagne) et la production de masse par fermentation en milieu solide.

Pour chacun des deux isolats de *B. bassiana*, un tube a été retiré de la banque de champignon et placé sur la glace pendant environ 15 minutes afin que le matériel biologique puisse dégeler lentement. Sous un environnement stérile, le contenu de chaque tube a été étalé sur une boîte de Petri contenant une gélose Sabouraud glucosée afin de

Figure 3. Production des conidies du champignon entomopathogène *B. bassiana* dans différents types de supports.

A : production dans des boîtes de Petri; B : production dans des pots massons couverts par le papier filtre 0,22 μm et C : production dans des sacs polypropylènes avec le papier filtre 0,22 μm



A



B



C

permettre la croissance du champignon et la formation de conidies (figure 3A). Après sept jours d'incubation à l'obscurité et à une température de 25°C, les conidies ont été détachées en grattant délicatement la surface de la gélose à l'aide d'une lame stérile de scalpel. Les conidies ont été récupérées dans un tube de 15ml auquel un volume de 10ml d'eau distillée a été ajouté. Le tube a été soumis à une agitation vigoureuse afin d'obtenir une homogénéité de la suspension. Les suspensions de conidies ont été conservées à 4°C jusqu'à leur utilisation lors de la production des suspensions mères par fermentation sur un milieu solide.

Afin d'obtenir les suspensions mères à des volumes permettant de réaliser toutes les expériences, pour chaque répétition des expériences projetées avec chacun des isolats, une fermentation en milieu solide a été réalisée sur un substrat d'orge perlé (Clic Import Export inc., Montréal, Québec). La production a été effectuée dans des sacs spéciaux (Fungi Perfecti, Olympia, WA, USA) développés spécifiquement pour la production de champignons. Ces sacs peuvent être placés à l'autoclave et ils sont munis d'un filtre de 0,22µm permettant les échanges gazeux tout en assurant un environnement de croissance stérile (figure 3C). L'utilisation des sacs plastiques jetables est une méthode efficace et moins coûteuse pour la culture de *B. bassiana* (Mazumder *et al.*, 1995). Chaque sac contenait 500g d'orge perlé auxquels 200ml d'eau distillée étaient ajoutés. Après une stérilisation de 20 minutes à 121°C et un repos à température de la pièce durant une nuit, le substrat de fermentation a été inoculé avec un des champignons par l'ajout de 10ml d'une des suspensions de conidies récupérées des géloses Sabouraud glucosées. Les sacs ont été soumis à une brasse afin d'assurer une répartition uniforme des conidies dans l'orge. Les sacs ont par la suite été incubés pendant 14 jours dans une chambre environnementale en conditions d'obscurité complète, à 25 ± 1°C et une humidité relative de 55 ± 5%. À deux reprises au cours de la fermentation, un brassage du substrat a été réalisé afin de favoriser la formation des hyphes et des conidies (conidiogénèse). Pour chaque isolat de *B. bassiana*, deux sacs ont été préparés.

Après 14 jours d'incubation, l'extraction des conidies a été réalisée. Dans chacun des sacs de production, 400ml d'eau distillée stérile ont été ajoutés et les sacs ont été soumis à un brassage vigoureux afin de permettre le détachement des conidies. Le

mélange d'orge, d'eau et de champignon a été filtré à travers trois couches d'étamines afin de retenir les résidus, notamment les hyphes et les particules d'orge et ainsi de récupérer le filtrat contenant les conidies (figure 4). Les suspensions de conidies ainsi recouvrées ont par la suite été dénombrées en utilisant un hématimètre (Bright-Line Improved Neubauer; Hausser Scientific, Horsham, PA, USA) sous le microscope photonique. La concentration des conidies a été déterminée à l'aide de la formule suivante (Lacey, 1997)

$$C_c = x_{A1.A4} 10^4 FD$$

Où C_c correspond à la concentration de conidies exprimée en conidies par ml, $x_{A1.A4}$ représente la moyenne du nombre de conidies observées sur quatre cellules de type A de l'hématimètre (figure 5) et FD équivaut au facteur de dilution réalisé lors de la préparation de l'échantillon pour le dénombrement à l'hématimètre.

Les suspensions mères des isolats *INRS-IP* et *INRS-CFL* de *B. bassiana* ont été conservées à 4°C jusqu'à leur utilisation lors des expériences de l'étude de l'optimisation de la production des conidies.

3. Optimisation de la production

3.1. Choix du milieu de culture

La fermentation en milieu solide à base de céréales est une approche conviviale pour la production des conidies de *B. bassiana*. Sur la base des disponibilités de différents substrats de production, la première étape était de déterminer le choix d'une céréale pour la réalisation des expériences. Les céréales disponibles étaient l'orge perlée, le riz étuvé à grain longs, le maïs jaune, le blé mou régulier (Clic Import Export Inc., Montréal, Québec, Canada) et l'avoine (COOP Fédérée, Québec, Canada). L'expérience a été conçue afin de permettre de suivre la cinétique de la production des conidies et de déterminer la céréale donnant le meilleur rendement en fonction du prix.

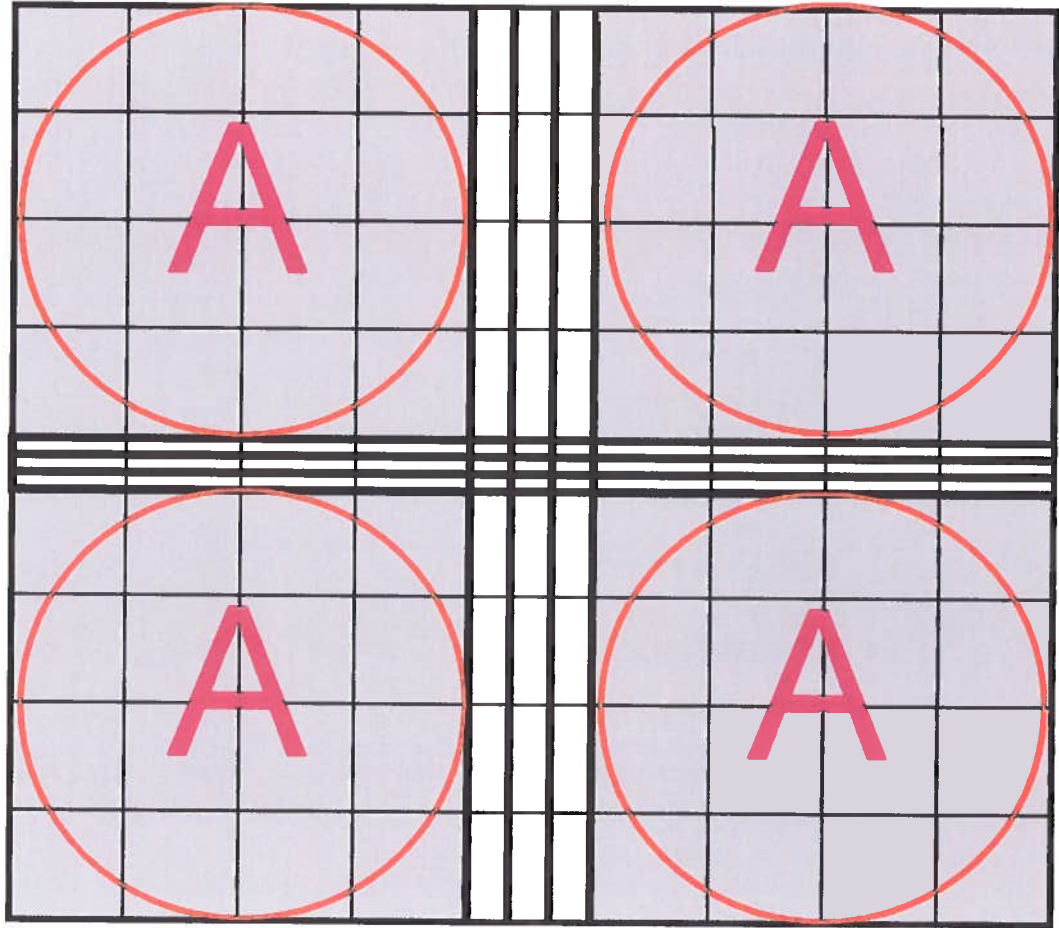
Figure 4. Filtration des conidies d'un isolat du champignon entomopathogène *B. bassiana* à travers trois couches d'étamines afin de retenir les résidus, notamment les hyphes et les particules du substrat.

Le volume du filtrat a été mesuré et la concentration des conidies par ml a été déterminée par la suite.



Figure 5. Méthode de dénombrement des conidies à partir d'un hématimètre.

Le dénombrement des conidies est effectué sous un microscope photonique. La concentration est déterminée en considérant la moyenne du nombre de conidies observées sur quatre cellules de type A d'un hématimètre.



Pour cette expérience, la fermentation des isolats de *B. bassiana* a été réalisée dans les pots Masson de 500ml (Walmart Canada, Laval) avec un couvercle munis d'un filtre de 0,22µm (Fungi Perfecti, Olympia, WA, USA) permettant les échanges gazeux dans une condition de croissance stérile (figure 3B). Chaque pot contenait 50g d'une des céréales auxquelles 20ml d'eau distillée avaient été ajoutées. Après une stérilisation de 20 minutes à 121°C et un refroidissement à température de la pièce durant une nuit, chaque substrat a été inoculé avec 10ml d'une des suspensions mères à une concentration de $1,5 \times 10^8$ conidies par ml. Les pots ont été placés dans la chambre expérimentale en conditions contrôlées d'obscurité complète, de 55 ± 5 % d'humidité et à 25 ± 1 °C. Un dispositif à bloc aléatoire avec trois répétitions a été utilisé. Pour chaque isolat, le dispositif expérimental permettait un prélèvement d'un échantillon à toutes les 48 heures durant 8 jours. Ainsi, chaque bloc comportait 20 traitements (tableau 4).

À chaque période d'échantillonnage, un pot était retiré du dispositif. Un volume de 100ml d'eau distillée stérile était ajouté aux céréales. Afin de permettre le détachement des conidies, la préparation a été brassée avant d'être filtrée à travers trois couches d'étamines afin de retenir les débris avec un ajout de 100ml d'eau distillée stérile. Le filtrat a été récupéré et la concentration de conidies a été déterminée à l'aide d'un hématimètre. La figure 6 résume les différentes étapes réalisées de la stérilisation à la détermination de la concentration et du volume récolté.

Pour chaque échantillon récolté, deux paramètres, le volume de filtrat et la concentration des conidies par ml ont été déterminés. Ces variables ont servi à déterminer le rendement de chacune des productions. Le rendement est le résultat de la multiplication de la concentration des conidies par ml et du volume de filtrat récupéré pour chaque échantillon. L'expérience ayant été répétée trois fois, pour un total de 60 expériences pour chacun des isolats de *B. bassiana*, les variables mesurées sont exprimées par leur valeur moyenne suivie de leur écart-type. Pour chaque isolat, les données recueillies ont été traitées par une analyse de variance de type ANOVA à un critère de classification suivi par le test d'homogénéité Duncan (SPSS, version 17).

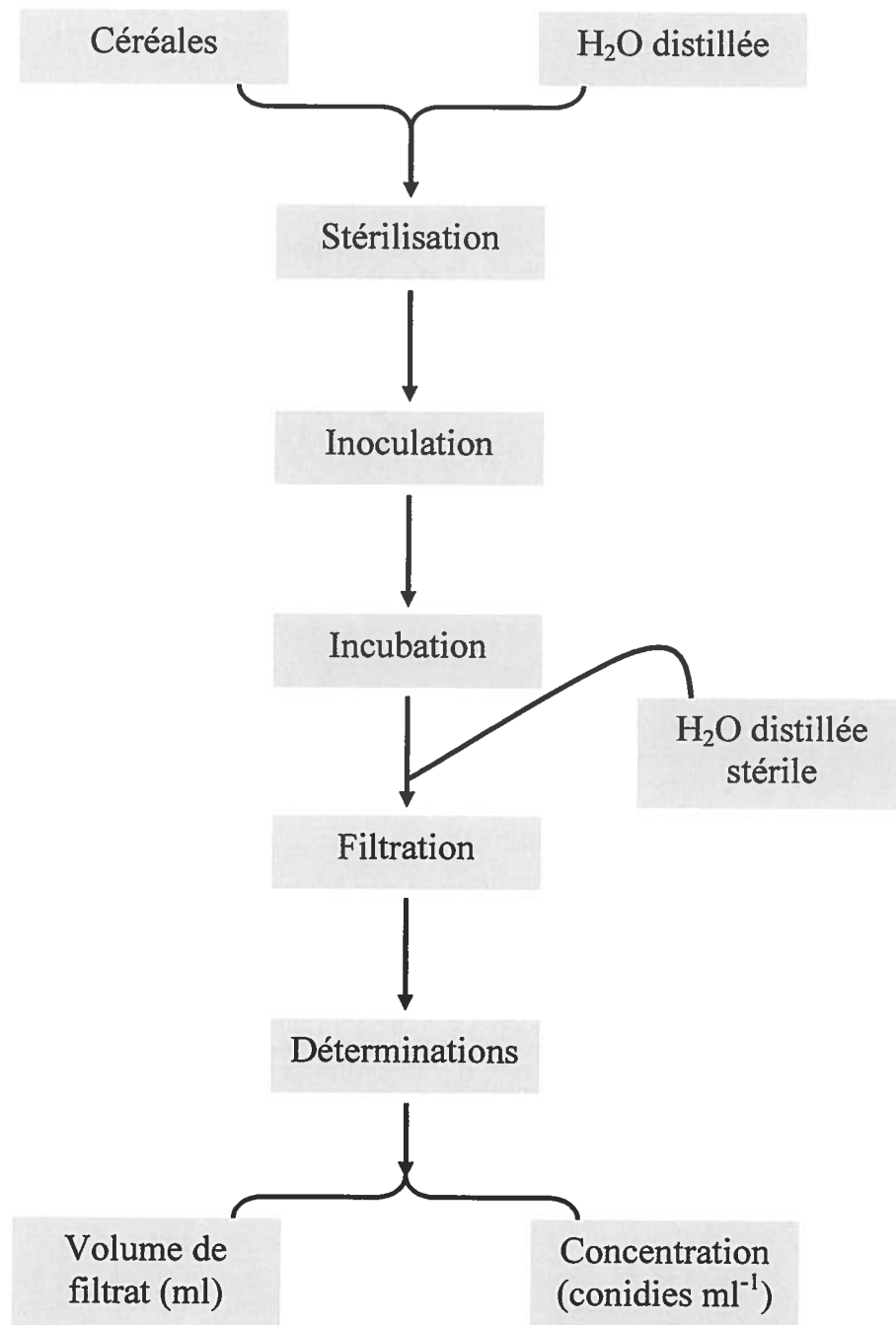
Tableau 4. Dispositif expérimental à bloc aléatoire utilisé pour l'étude des cinq céréales et de la production des isolats *INRS-IP* et *INRS-CFL* de *B. bassiana*.

J ₆ M	J ₄ A	J ₂ O	J ₂ R	J ₄ M
J ₈ O	J ₂ B	J ₈ R	J ₆ B	J ₈ B
J ₂ M	J ₆ A	J ₈ A	J ₂ A	J ₄ B
J ₄ O	J ₄ R	J ₆ O	J ₈ M	J ₆ R

Pour chaque isolat, un échantillon a été prélevé à toutes les 48 heures durant 8 jours. Les expériences ont été répétées trois fois correspondant à trois blocs expérimentaux dont chacun comportait 20 traitements. J_{2,8} : jours où un échantillon a été prélevé; A : avoine; B : blé; M : maïs; O : orge et R : riz.

Figure 6. Différentes étapes entrant dans la production des conidies de *B. bassiana*.

La production des conidies de *B. bassiana* comprend cinq étapes, notamment la stérilisation du substrat, l'inoculation de ce dernier avec une suspension fongique, l'incubation en conditions contrôlées dans une chambre environnementale, la récolte des conidies par filtration à travers trois couches d'étamine et les déterminations du volume de filtrat et l'évaluation de la concentration des conidies.



Cette approche a été utilisée afin de mettre en évidence les différences pouvant exister au niveau des concentrations de conidies par ml et des volumes de filtrat recueillis pour les cinq différentes céréales. La valeur $\alpha < 0,05$ a été choisie comme le seuil de signification. Sur la base des résultats obtenus lors de la précédente expérience, deux céréales ont été sélectionnées : l'orge perlée et le riz. Afin de valider ces résultats, une deuxième étude a été réalisée avec ces deux céréales. Lors de cette étude, la quantité de céréales et le volume d'eau distillée utilisé pour humecter les céréales ont été augmentés afin d'accroître la production et le volume de conidies. Les expériences ont été réalisées en pot Masson de 500ml. Ainsi, 100g d'orge perlé ou de riz ont été placés dans chacun des pots, auxquels 100ml d'eau distillée ont été ajoutés. Après une stérilisation de 20 minutes à 121°C et un refroidissement à température de la pièce durant une nuit, un volume de 10ml d'une des suspensions mères à une concentration de $1,5 \times 10^8$ conidies par ml a été ajouté dans chaque pot. Les contenants ont été placés dans une chambre environnementale en conditions contrôlées d'obscurité complète, à $25 \pm 1^\circ\text{C}$ et de $55 \pm 5\%$ d'humidité relative pour une durée de 14 jours. Comparativement à la première expérience, la période d'incubation a été prolongée. En effet, des expériences préliminaires ont montré que le plateau de production des conidies était atteint après 14 jours. Comme dans le cas de la première expérience, des échantillons ont été prélevés à chaque deux jours afin de suivre la production des conidies des deux isolats sur l'orge et le riz. Les expériences ont été répétées trois fois. Au total, pour les deux isolats, 42 pots ont été suivis. Pour chaque échantillon, trois paramètres ont été évalués soit la concentration des conidies par ml, le volume de filtrat récoltés et le rendement.

Les données recueillies lors de cette deuxième expérience 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 entre les concentrations des conidies, les volumes récoltés et les rendements issus de l'orge et du riz (SPSS version 17, SPSS inc.). Pour l'ensemble des analyses, le seuil de signification a été établi à une valeur $\alpha < 0,05$.

3.2. Modélisations mathématiques

Afin de déterminer les facteurs jouant un rôle dans la production des isolats *INRS-IP* et *INRS-CFL* de *B. bassiana*, deux approches matricielles ont été utilisées, le Plackett-Burmen et le Central Composite Design (CCD). Le Plackett-Burmen est un modèle d'études factorielles fractionnées permettant de cribler les facteurs étudiés en se basant sur les interactions pouvant exister entre ces derniers et leur influence sur la production des isolats *INRS-IP* et *INRS-CFL* de *B. bassiana*. Sur la base des résultats obtenus, un deuxième modèle peut, par la suite, être appliqué sur les facteurs sélectionnés. Ainsi, le Central Composite Design a été employé afin de déterminer les valeurs de ces derniers permettant d'optimiser la production des conidies.

3.2.1. Plackett- Burmen

Sur la base de la revue de la littérature, dix facteurs ont été choisis pour étudier les interactions pouvant exister entre eux et de déterminer leur effet sur la production des conidies des isolats *INRS-IP* et *INRS-CFL* de *B. bassiana*. Les dix facteurs sont la température, le niveau du pH, la présence ou l'absence de lumière, le temps de trempage, la teneur en eau et la concentration de glucose, de saccharose, de peptone, de chitine et d'extrait de levure. À l'aide du modèle Plackett-Burmen, une matrice expérimentale a été générée à l'aide du logiciel Design-Expert 7 (Stat-Ease 2005) avec les valeurs minimales et maximales pour chacun de ces dix facteurs (tableau 5). Ainsi, chaque colonne représente un facteur indépendant (ou assigné) ou un facteur non assigné (ou factice). Tandis que chaque cellule de chaque ligne correspond à une expérience à réaliser.

En se basant sur les résultats de la sélection du substrat, l'orge perlé a été utilisé pour l'ensemble des expériences d'optimisation de la production des isolats *INRS-IP* et *INRS-CFL* de *B. bassiana*. À ce stade, toutes les expériences de fermentation en milieu solide ont été réalisées à l'aide de sacs de production munis d'un filtre de 0,22 μ m et qui pouvaient être placés à l'autoclave. Dans chaque sac, 100g d'orge perlé ont été placés, auxquels des éléments nutritifs ont été ajoutés en respectant la matrice expérimentale du Plackett-Burmen. Après une stérilisation de 20 minutes à 121°C et un refroidissement à

température de la pièce durant une nuit, les sacs ont été inoculés en ajoutant 10ml d'une des suspensions mères des isolats *INRS-IP* et *INRS-CFL* de *B. bassiana* à une concentration de $1,5 \times 10^8$ conidies par ml. Après un brassage manuel permettant d'assurer une répartition uniforme de l'inoculum, les sacs ont été placés, durant 14 jours, dans une chambre environnementale dont les conditions de luminosité, de température et d'humidité correspondaient à celles générées par la matrice du modèle Plackett-Burmen. Chaque expérience a été répétée quatre fois, pour un total de 48 expériences. À deux reprises au cours de la période de fermentation, un brassage du substrat a été réalisé afin de favoriser la conidiogenèse. Après 14 jours d'incubation, 150ml d'eau distillée stérile ont été ajoutés à chacun des sacs et le contenu a été malaxé manuellement pour permettre la libération du plus grand nombre de conidies. Le contenu de chaque sac a par la suite été filtré à travers de trois couches d'étamine. Le filtrat a été récupéré et conservé à 4°C. Pour chaque traitement, deux paramètres ont été évalués, soit la moyenne de la concentration des conidies par ml et la moyenne du volume du filtrat récolté. Les résultats obtenus ont été finalement analysés par une approche multifactorielle à l'aide du logiciel Design-Expert 7.0 (Stat-Ease 2005).

3.2.2. Central Composite Design

Après avoir sélectionné les facteurs ayant des effets positifs sur la production des conidies des isolats *INRS-IP* et *INRS-CFL* de *B. bassiana*, l'étape subséquente a consisté à déterminer les valeurs optimales de chacun de ces facteurs. Pour ce faire, une analyse de la surface de réponse de type Central Composite Design (CCD) (Design-Expert 7, Stat-Ease, 2005) a donc été utilisée. Le tableau 6 présente les facteurs sélectionnés pour chacun des isolats à l'aide du modèle Plackett-Burmen et les valeurs utilisées pour générer la matrice expérimentale. Chaque facteur comprend cinq différents niveaux. Il s'agit de deux niveaux factoriels, de deux niveaux axiaux et d'un niveau moyen. Ainsi, pour chaque isolat, 20 expériences ont été réalisées, chacune ayant été répétée trois fois pour un total de 60 expériences. Les conditions de fermentation pour ces expériences étaient les mêmes que celles décrites lors des expériences de Plackett-Burmen. Les différentes étapes sont résumées à la figure 6. La production des conidies a été réalisée

Tableau 5. Matrice expérimentale donnant les conditions des expériences selon le plan factoriel fractionné de type Plackett-Burmen permettant de sélectionner les facteurs ayant des effets à la production des isolats de *B. bassiana INRS-IP* et *INRS-CFL*.

Facteurs	Expériences											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Température (°C)	30	30	20	20	20	30	30	20	30	20	20	30
pH ¹	5	8	5	8	5	8	5	8	5	8	5	8
Lumière (h)	24	0	0	24	0	0	0	0	24	24	24	24
Trempage (h)	24	24	24	24	0	0	0	24	24	0	0	0
Eau (ml)	50	150	50	50	50	50	150	150	150	150	150	50
Glucose (g)	10	10	10	0	0	10	0	0	0	10	10	0
Saccharose (g)	5	0	5	0	0	0	5	5	0	5	0	5
Peptone (g)	5	0	0	5	0	5	5	5	0	0	5	0
Chitine (g)	0	0	5	0	0	5	0	5	5	0	5	5
Extrait de levure (g)	0	5	5	5	0	0	5	0	0	0	5	5
X ²	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-

¹ pH est le pH de l'eau distillée ajoutée dans le milieu de culture. Il a été ajusté avec le bicarbonate de soude et l'acide citrique.

² X est le facteur non assigné n'ayant aucune valeur nominale.

dans des sacs de culture sur un substrat d'orge perlé dans les conditions décrite dans la matrice expérimentale (tableau 7 et 8). La fermentation s'est échelonnée sur 14 jours. À la fin des expériences, deux paramètres ont été mesurés, soit la concentration des conidies par ml et le volume total du filtrat. Les données recueillies pour chacun des traitements ont par la suite été analysées à l'aide du logiciel Design-Expert 7 (Stat-Ease, 2005) afin de déterminer les conditions optimales de production des isolats *INRS-IP* et *INRS-CFL* de *B. bassiana*.

Tableau 6. Valeurs de chacun des facteurs sélectionnés générées par Central Composite Design.

Isolats	Facteurs	-α	-1	0	+1	+α
<i>INRS-IP</i>	Température (°C)	18,26	20,00	25,50	31,00	32,74
	Extrait de levure (g)	0,71	1,50	4,00	6,50	7,29
	Peptone (g)	0,71	1,50	4,00	6,50	7,29
<i>INRS-CFL</i>	Lumière	45 min	3h30	12h30	21h15	24 h
	Extrait de levure (g)	0,71	1,50	4,00	6,50	7,29
	Chitine (g)	0,71	1,50	4,00	6,50	7,29

L'optimisation de la production des conidies des isolats *INRS-IP* et *INRS-CFL* de *B. bassiana* est basée sur les facteurs sélectionnés par le modèle Plackett-Burmen. Il y a trois facteurs ayant été sélectionnés pour l'isolat *INRS-IP* notamment la température, l'extrait de levure et la peptone et trois autres facteurs pour l'isolat *INRS-CFL* incluant la lumière, l'extrait de levure et la chitine. Selon le modèle CCD, chaque facteur comprend cinq différents niveaux dont deux niveaux factoriel (-1 et +1), un niveau moyen (0) et deux niveaux axiaux (- α et + α).

Tableau 7. Matrice expérimentale donnant les conditions des expériences selon le modèle CCD afin de déterminer les conditions optimales de production des isolats *INRS-IP* de *B. bassiana*.

Expériences	Température (°C)	Extrait de levure (g)	Peptone (g)
1	25,50	4,00	4,00
2	25,50	4,00	0,71
3	20,00	6,50	6,50
4	25,50	4,00	4,00
5	31,00	6,50	1,50
6	32,74	4,00	4,00
7	31,00	6,50	6,50
8	31,00	1,50	1,50
9	25,50	4,00	7,29
10	25,50	0,71	4,00
11	18,26	4,00	4,00
12	25,50	7,29	4,00
13	20,00	1,50	1,50
14	25,50	4,00	4,00
15	20,00	1,50	6,50
16	25,50	4,00	4,00
17	20,00	6,50	1,50
18	31,00	1,50	6,50
19	25,50	4,00	4,00
20	25,50	4,00	4,00

Tableau 8. Matrice expérimentale donnant les conditions des expériences selon le modèle CCD afin de déterminer les conditions optimales de production des isolats *INRS-CFL* de *B. bassiana*.

Expériences	Lumière	Extrait de levure (g)	Chitine (g)
1	3h30	1,50	1,50
2	21h30	1,50	6,50
3	3h30	1,50	6,50
4	12h30	4,00	4,00
5	12h30	7,29	4,00
6	12h30	4,00	0,71
7	12h30	4,00	4,00
8	21h15	6,50	6,50
9	0h45	4,00	4,00
10	12h30	0,71	4,00
11	24h00	4,00	4,00
12	21h15	6,50	1,50
13	12h30	4,00	4,00
14	12h30	4,00	4,00
15	12h30	4,00	4,00
16	21h15	1,50	1,50
17	3h30	6,50	1,50
18	12h30	4,00	4,00
19	12h30	4,00	7,29
20	3h30	6,50	6,50

4. Évaluation de la virulence des préparations fongiques

En plus des paramètres de production des isolats *INRS-IP* et *INRS-CFL* de *B. bassiana*, un des objectifs du projet de recherche était de déterminer si les conditions de production pouvaient affecter la virulence des conidies. Ainsi, des larves de la fausse teigne de la cire, *Galleria mellonella* L., un lépidoptère de la famille des *Pyralidae*, ont été soumises aux conidies issues des différentes expériences du CCD. Selon Lacey (1997), les larves de *G. mellonella* sont un bon modèle pour les épreuves biologiques, puisqu'elles seraient très susceptibles aux isolats de *B. bassiana*.

4.1. Insecte

Les larves de *G. mellonella* sont issues d'un élevage maintenu au Laboratoire d'entomologie expérimentale de l'INRS-Institut Armand-Frappier. L'élevage des larves se fait sur une nourriture artificielle à base de céréales. Elles sont élevées dans une chambre de développement dans une condition d'obscurité complète, à une température de 30°C et à 60% d'humidité. En considérant que les expériences ont été répétées trois fois, un nombre total de 1890 larves a été requis pour chaque isolat testé de *B. bassiana*.

4.2. Suspensions fongiques

Un volume de 10ml d'une concentration de 1×10^9 conidies par ml d'une des vingt suspensions de conidies issues des expériences de modélisation CCD a été placé dans un tube stérile. Pour chaque suspension, trois tubes ont été préparés et conservés à 4°C jusqu'à leur utilisation pour les épreuves biologiques.

4.3. Épreuves biologiques

Toutes les épreuves biologiques ont été réalisées avec des larves de 3^e stade. Les stades larvaires sont déterminés à l'aide de la largeur de la capsule céphalique (Sehnal, 1965). Les différentes étapes de l'épreuve biologique sont montrées à la figure 7. Pour chaque épreuve, 30 larves ont été soumises à une suspension fongique. Elles ont été immergées dans une des suspensions de conidies pendant une minute. Dans le cas des

témoins, les larves étaient soumises à un volume d'eau distillée stérile. Les larves ont été récupérées, en passant la suspension contenant les insectes à travers une passoire. Les larves ont alors été délicatement récupérées et transférées dans un godet de 29,6ml (Solo Cup, SOLO[®], USA) dans lequel 10g de nourriture artificielle avaient été ajoutés. Afin de répondre au comportement grégaire de l'insecte, cinq larves de *G. mellonella* ont été placées dans chaque godet. En effet, des expériences préliminaires ont démontré qu'en deçà de ce nombre, une mortalité importante des larves était observée.

Les godets contenant les larves ont été placés dans une chambre expérimentale à l'obscurité complète, à 25°C et à 70% d'humidité relative pendant 14 jours. Le suivi de la mortalité des larves a été fait à tous les 48 heures. Afin de déterminer si les larves mortes présentaient les signes d'une infection par *B. bassiana*, elles ont été retirées des godets puis transférées individuellement dans des boîtes de pétri contenant le papier filtre humide. Les boîtes ont été placées dans un incubateur à 25°C, afin de favoriser le développement de la muscardine. Le pourcentage de survie observé chez les larves pour chacune des expériences a été corrigé en fonction de celui noté chez les témoins à l'aide de la formule de Schneider-Orelli (Püntener, 1981). La transformation suivante a été appliquée :

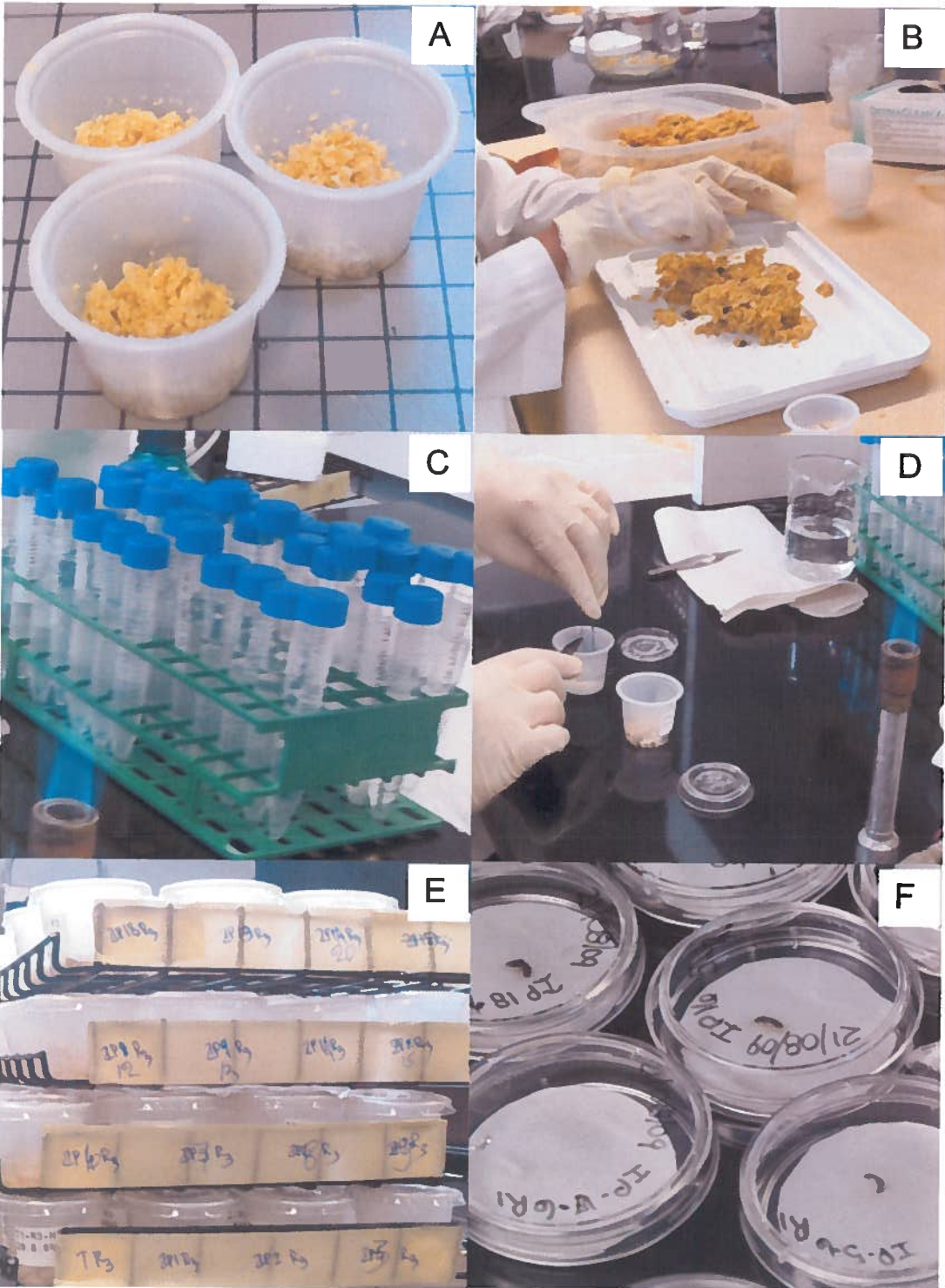
$$T.M. _c (\%) = [(T.M. \acute{e}.t. (\%) - T.M. \acute{e}.t\acute{e}m. (\%)) / (100 - T.M. \acute{e}.t\acute{e}m. (\%))] \times 100$$

Où $T.M. _c (\%)$ correspond au pourcentage de mortalité corrigé dans les échantillons traités, $T.M. \acute{e}.t. (\%)$ représente le pourcentage de mortalité dans les échantillons traités et $T.M. \acute{e}.t\acute{e}m. (\%)$ est défini comme le pourcentage mortalité observé dans le témoin.

Pour chaque isolat testé, un test de comparaison de type Kruskal-Wallis suivi par le test Khi carré a été appliqué sur l'ensemble des résultats, afin d'identifier toutes les variations significatives de la virulence des conidies pouvant être associées aux conditions de production.

Figure 7. Différentes étapes entrant dans la réalisation des épreuves biologiques permettant d'évaluer la virulence des préparations de conidies de *B. bassiana* contre les larves de *G. mellonella*.

Les différentes étapes sont : A: préparation de diète; B: sélection des larves; C et D: immersion des larves dans les suspensions de conidies; E: incubation; F: des larves mortes transférées dans des boîtes de Petri contenant le papier filtre humide.



Résultats

1. Choix du milieu de culture

1.1. Étape 1

La première étape portant sur la cinétique du rendement des isolats *INRS-IP* et *INRS-CFL* du champignon entomopathogène *B. bassiana* a été effectuée afin de sélectionner le meilleur substrat céréaliier pour leur production. Dans le cas de l'isolat *INRS-IP*, les résultats montrent qu'à partir d'une même quantité de substrat céréaliier et une même concentration de conidies inoculées, les concentrations de conidies par ml obtenues à la fin des expériences variaient considérablement d'une céréale à l'autre. Ainsi, le blé et le maïs étaient les deux substrats céréaliiers donnant les plus faibles concentrations de conidies avec, respectivement, $1,03 \times 10^9$ et $4,98 \times 10^8$ conidies par ml (tableau 9). En effet, au jour 8, aucune différence significative n'a été observée entre ces deux céréales (Duncan, $\alpha = 0,79$). L'avoine et l'orge sont les céréales donnant les concentrations de conidies par ml élevées avec des valeurs respectives de $9,68 \times 10^9$ et $9,83 \times 10^9$ conidies par ml. Cependant, l'analyse des résultats du jour 8, n'a pas permis de faire ressortir une différence significative entre ces deux céréales (Duncan, $\alpha = 0,94$).

De façon plus précise, les résultats de l'étude de la cinétique du rendement en fonction de cinq différents substrats sont présentés à la figure 8 (A). Dans un premier temps, on remarque que les périodes de latence observées avec le blé et le maïs étaient plus longues que celles des trois autres céréales. En effet, il faut attendre au 8^e jour avant d'observer une augmentation du rendement chez ces deux céréales. Dans le cas de l'avoine, le rendement obtenu ne différait pas dans le temps (Duncan, $\alpha > 0,05$). Par contre, le rendement observé avec l'orge divergeait entre les jours 4, 6 et 8 (Duncan, $\alpha < 0,05$). Finalement, les résultats obtenus avec le riz montrent une augmentation significative des rendements dans le temps. Par contre, aucune différence significative n'a été observée entre les rendements obtenus aux jours 4 et 6, ainsi qu'entre ceux des jours 6 et 8 (Duncan, $\alpha > 0,05$).

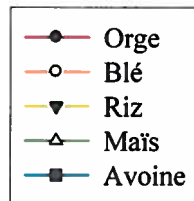
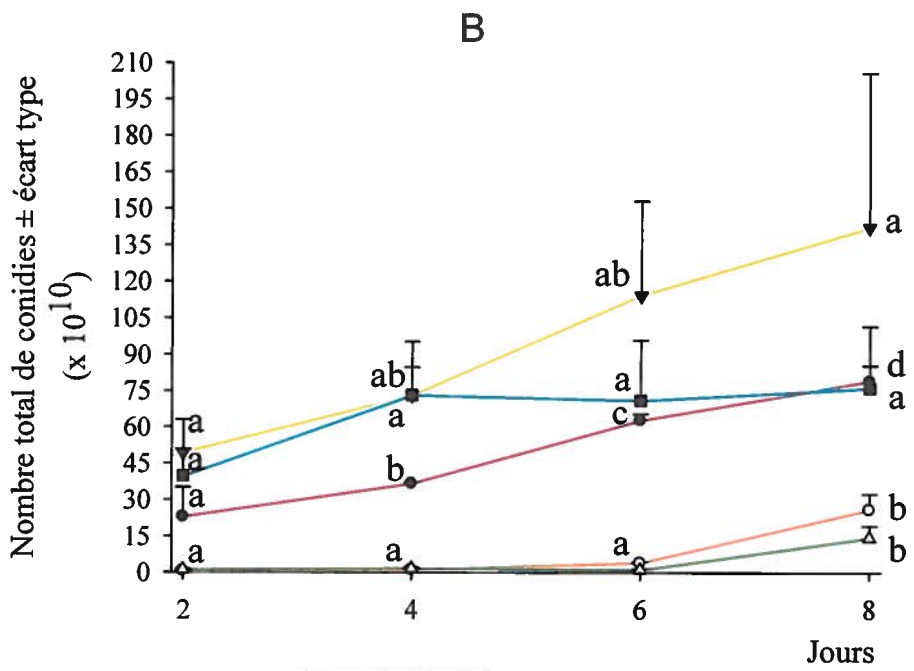
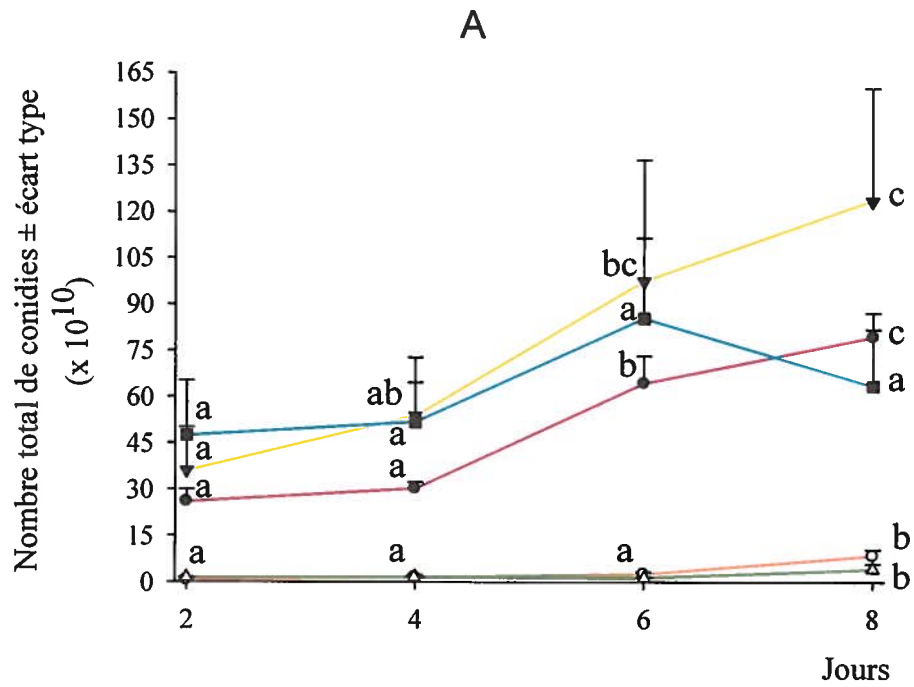
Tableau 9. Concentrations moyennes des conidies et volumes moyens obtenus lors de la production de l'isolat *INRS-IP* de *B. bassiana* huit jours suivant l'inoculation de cinq substrats céréaliers.

Céréales	Concentration \pm écart type (conidies ml⁻¹)	Volume de filtrat \pm écart type (ml)
Riz	$1,49 \times 10^{10} \pm 3,79 \times 10^9$ ^c	$82,67 \pm 4,16$ ^b
Orge	$9,83 \times 10^9 \pm 1,44 \times 10^8$ ^b	$80,67 \pm 1,53$ ^b
Avoine	$9,68 \times 10^9 \pm 4,01 \times 10^9$ ^b	$66,33 \pm 5,79$ ^a
Blé	$1,03 \times 10^9 \pm 2,53 \times 10^8$ ^a	$81,67 \pm 2,89$ ^b
Maïs	$4,98 \times 10^8 \pm 2,25 \times 10^8$ ^a	$83,67 \pm 4,04$ ^b

Pour chaque colonne, les valeurs ayant la même lettre ne diffèrent pas de façon significative (Duncan, $\alpha < 0,05$).

Figure 8. Cinétique du rendement des isolats *INRS-IP* (A) et *INRS-CFL* (B) de *B. bassiana* soumis à différents substrats céréaliers.

Pour chacun des isolats, les substrats ont été inoculés avec une concentration de $1,5 \times 10^8$ conidies par ml. Pour chacun des substrats, les valeurs ayant la même lettre ne diffèrent pas de façon significative (test Duncan, $\alpha < 0,05$).



En regard des volumes récoltés, aucune différence significative n'a été mesurée entre les différents substrats céréaliers utilisés (Duncan, $\alpha > 0,05$), à l'exception de l'avoine (tableau 9). Dans ce dernier cas, le volume moyen de filtrat récupéré était de 66,3 ml, comparativement à 82,7, 80,7 et 83,7 ml pour respectivement le riz, l'orge et le maïs.

Les résultats de l'étude de la cinétique du rendement de l'isolat *INRS-CFL* en fonction des différents substrats utilisés sont présentés à la figure 8 (B). Tout comme dans le cas de l'isolat *INRS-IP*, le blé et le maïs sont les deux céréales ayant la période latente la plus longue parmi les cinq céréales étudiées. Pour chacune de ces céréales, aucune différence significative n'a été observée entre les rendements obtenus aux jours 2, 4 et 6. Par contre, on remarque une différence significative du rendement entre les jours 6 et 8 (Duncan, $\alpha < 0,05$). Dans le cas de l'avoine, les rendements notés pour chacune des périodes d'échantillonnage ne variaient pas de façon significative. Finalement, comme dans le cas de l'isolat *INRS-IP*, l'orge et le riz sont les deux céréales avec lesquelles un rendement soutenu de la production de l'isolat *INRS-CFL* a été obtenu avec des valeurs respectives de $7,90 \times 10^{11}$ et $1,42 \times 10^{12}$ conidies. De façon détaillée, pour le riz, une différence significative du rendement a été obtenue entre les jours 2 et 8 (Duncan, $\alpha < 0,05$). En ce qui concerne l'orge, des variations significatives du rendement ont été notées entre toutes les périodes d'échantillonnages (Duncan, $\alpha < 0,05$).

Au niveau de la concentration des filtrats des différentes céréales, les résultats montrent que le blé et le maïs sont les deux substrats pour lesquels les concentrations de conidies sont les plus faibles avec, respectivement, $3,26 \times 10^9$ et $1,70 \times 10^9$ conidies par ml (tableau 10). Au jour 8, on observe aucune différence significative entre ces deux céréales (Duncan, $\alpha = 0,59$). D'autre part, aucune variation significative n'a été notée entre les concentrations d'orge et d'avoine et entre le riz et l'avoine pour la dernière période d'échantillonnage (Duncan $\alpha > 0,05$).

Finalement, au niveau du volume récolté, il y a une différence significative entre le riz et l'avoine (Duncan $\alpha > 0,05$). L'avoine est une céréale donnant le volume moyen de filtrat moins élevé, soit 73 ml, comparativement à respectivement 84,7, 79,7, 84,3 et 80,3 ml pour le riz, l'orge, le maïs et le blé.

Tableau 10. Concentrations moyennes des conidies et volumes moyens obtenus lors de production de l'isolat *INRS-CFL* de *B. bassiana* huit jours suivant l'inoculation de cinq substrats céréaliers.

Céréales	Concentration \pm écart type (conidies ml ⁻¹)	Volume de filtrat \pm écart type (ml)
Riz	$1,67 \times 10^{10} \pm 6,90 \times 10^9$ ^c	$84,67 \pm 4,04$ ^b
Avoine	$1,04 \times 10^{10} \pm 3,33 \times 10^9$ ^{bc}	$73,00 \pm 1,00$ ^a
Orge	$9,92 \times 10^9 \pm 1,44 \times 10^8$ ^b	$79,67 \pm 4,04$ ^{ab}
Blé	$3,26 \times 10^9 \pm 9,52 \times 10^8$ ^a	$80,33 \pm 3,51$ ^{ab}
Maïs	$1,70 \times 10^9 \pm 4,87 \times 10^8$ ^a	$84,33 \pm 5,51$ ^b

La colonne ayant la même lettre ne diffère pas de façon significative (Duncan, $\alpha < 0,05$).

1.2. Étape 2

Afin de sélectionner, parmi l'orge et le riz, le substrat susceptible de fournir le meilleur rendement pour la production des isolats *INRS-IP* et *INRS-CFL*, une deuxième étape a été réalisée sur une période de 14 jours. La représentation graphique des résultats obtenus avec l'isolat *INRS-IP* suggère une production des conidies plus hâtive en présence de riz qu'en présence d'orge (figure 9A). Cependant, pour chacune des périodes d'échantillonnage, les analyses statistiques montrent qu'il n'y a aucune variation significative des rendements entre les deux substrats (test de t , $\alpha > 0,05$). Dans le cas de l'isolat *INRS-CFL*, le même patron de rendement dans le temps a été observé (figure 9B), où les phases exponentielles liées à la production de l'isolat sur les deux substrats sont similaires. Aucune différence significative n'a été notée pour chacune des périodes d'échantillonnage (test t , $\alpha = 0,04$), à l'exception du jour 6 où le rendement obtenu avec le riz est un peu plus élevé que celui de l'orge.

2. Modélisation mathématique

2.1. Plackett-Burmen

Les expériences avec le modèle Plackett-Burmen avaient pour objectif d'identifier les facteurs susceptibles d'influencer la production des isolats *INRS-IP* et *INRS-CFL* de *B. bassiana*. Les résultats obtenus après 14 jours d'incubation dans les différentes conditions de cultures montrent des variations au niveau de la concentration des conidies et du volume du filtrat récolté pour les deux isolats à l'étude. En effet, pour chacun des isolats, le modèle utilisé avait une valeur hautement significative (ANOVA, $\alpha < 0,0001$). Dans le cas de l'isolat *INRS-IP*, à partir des 12 combinaisons de facteurs étudiées, la concentration maximale notée a été de $1,6 \times 10^{12}$ conidies par ml (figure 10A) et le volume maximal de filtrat récupéré a été de 129 ml (figure 10B). Selon le modèle Plackett-Burmen, sur les dix facteurs étudiés, seulement deux facteurs, la peptone et l'extrait de levure auraient des effets significatifs et positifs sur la concentration des conidies lors de la production de l'isolat *INRS-IP* (tableau 11). Par contre, au niveau des volumes extraits, la lumière et la température semblent jouer un rôle significatif sur cette variable. Cependant, on remarque une dualité avec la lumière. En effet, elle serait un

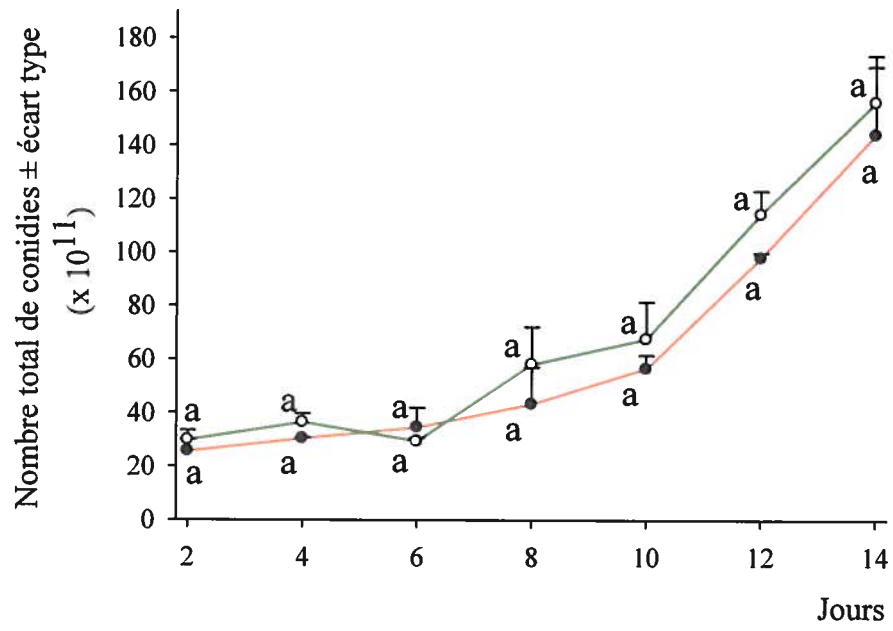
facteur inhibant la production de conidies avec 16,5% de contribution tout en favorisant la récupération de volume avec une contribution de 13,9%. En faisant la synthèse des résultats des deux paramètres, la concentration des conidies et le volume de filtrat, trois facteurs, la température, la peptone et l'extrait de levure ont été retenus pour les études subséquentes portant sur la production des conidies de l'isolat *INRS-IP* de *B. bassiana*.

Du côté d'isolat *INRS-CFL*, la concentration maximale obtenue lors de l'étude des 12 combinaisons de facteurs a été de $5,4 \times 10^{11}$ conidies par ml (figure 10A) et le volume de filtrat le plus élevé a été de 134 ml (figure 10B). Dans le cas de l'isolat *INRS-CFL*, trois facteurs viendraient influencer de façon significative la concentration de conidies par ml du filtrat récolté, soit la lumière, la chitine et l'extrait de levure (tableau 12). Par contre, contrairement à l'isolat *INRS-IP*, dans le cas de l'isolat *INRS-CFL*, la lumière contribuerait de façon significative au volume extrait avec un pourcentage de contribution de 52,51%. À l'aide du modèle Plackett-Burman, trois facteurs ont été retenus pour la poursuite des expériences avec l'isolat *INRS-CFL* de *B. bassiana*: la lumière, la chitine et l'extrait de levure.

Figure 9. Comparaison du rendement des isolats *INRS-IP* (A) et *INRS-CFL* (B) de *B. bassiana* produites sur deux substrats, l'orge et le riz.

Pour chacun des isolats, les deux substrats ont été inoculés au jour 0 avec une concentration de $1,5 \times 10^8$ conidies ml^{-1} . Les échantillons ont été pris à chaque deux jours pendant quatorze jours afin de comparer le rendement obtenu à partir de l'orge et du riz. Pour ces deux substrats, les valeurs ayant la même lettre ne diffèrent pas de façon significative (test de *t*, $\alpha < 0,05$).

A



B

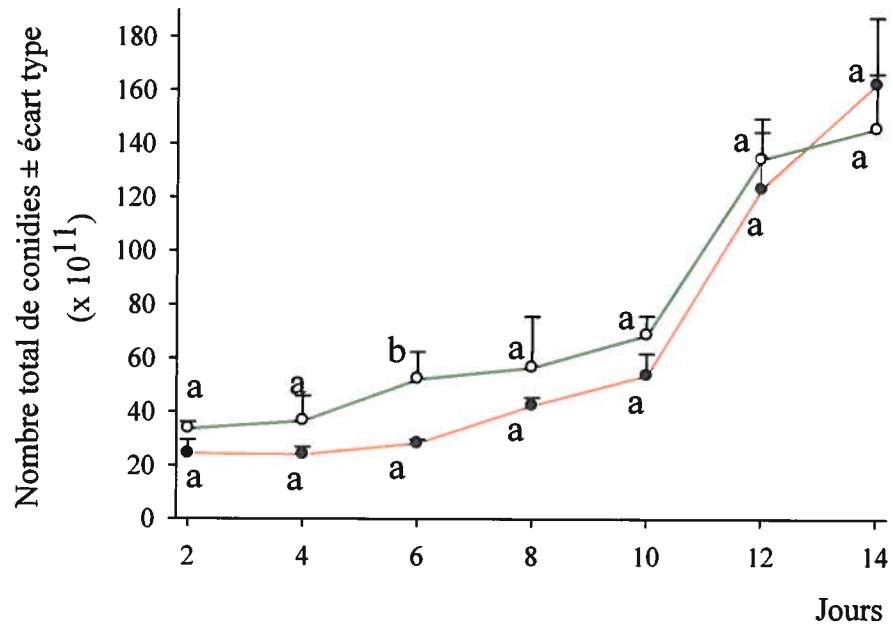
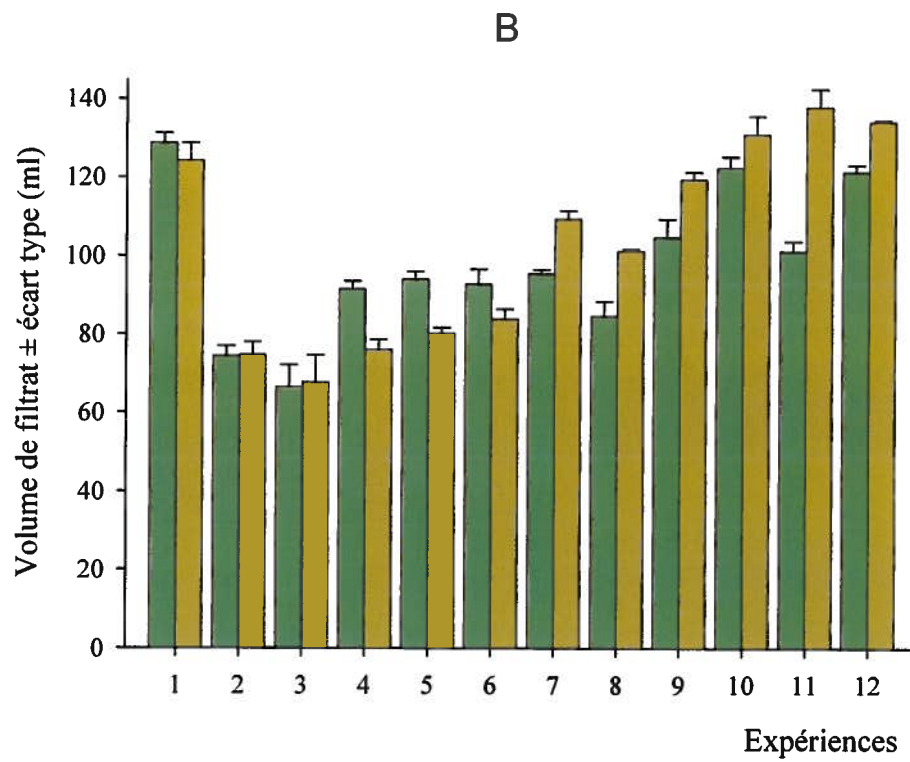
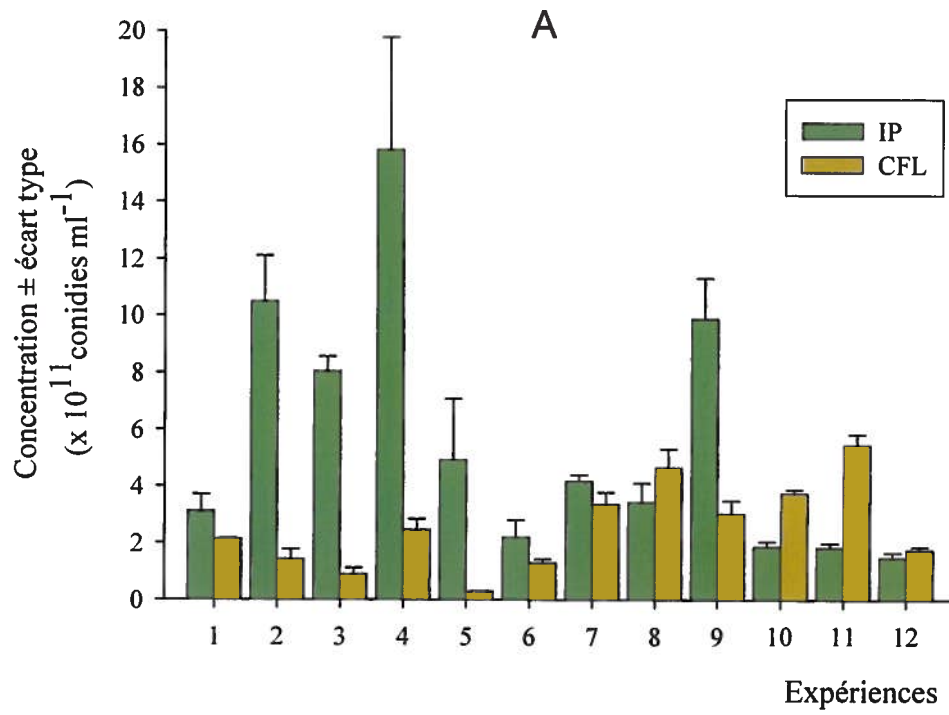


Figure 10. Variation du rendement des isolats *INRS-IP* et *INRS-CFL* en fonction des expériences générées par le modèle Plackett-Burmen, 14 jours suivant l'inoculation du substrat.

Pour chacun des isolats, l'orge a été inoculée au jour 0 avec une concentration de $1,5 \times 10^8$ conidies ml^{-1} .

A : la moyenne de la concentration de conidies ml^{-1} et B : la moyenne du volume de filtrat mesurée quatorze jours suivant l'inoculation



2.2. Central composite design

Sur la base des expériences avec le modèle Plackett-Burmen, pour chacun des isolats de *B. bassiana*, une série d'expériences a été réalisée afin de déterminer les valeurs de chacun des facteurs sélectionnés conduisant à des rendements optimaux lors de leur production. Une approche basée sur CCD a donc été déployée et les résultats sont montrés sous forme de graphiques en trois dimensions. La concentration des conidies et le volume de filtrat ayant été obtenus en fonction des facteurs utilisés sont présentés dans les figures 11 et 12 pour l'isolat *INRS-IP* et les figures 13 et 14 dans le cas d'isolat *INRS-CFL*.

Dans le cas d'isolat *INRS-IP*, sur la base des trois facteurs sélectionnés lors des expériences de Plackett-Burmen, le modèle CCD propose sept combinaisons de facteurs permettant d'obtenir des rendements intéressants tant au niveau de la concentration des conidies qu'au niveau du volume de filtrat récolté (tableau 13). Les résultats ont aussi montré que la concentration des conidies et le volume récolté étaient inversement proportionnels à la quantité de peptone. Pour 100g d'orge, la quantité de peptone permettant d'obtenir le meilleur rendement était de 1,5g. Par contre, pour l'extrait de levure des valeurs de 1,50g, 1,76g et 1,85g par 100g d'orge pouvaient donner de bons rendements. Ces valeurs varient en fonction de la température, elle-même se situant entre 24 et 28,7°C. Pour les facteurs étudiés, le modèle a estimé la concentration optimale à $9,98 \times 10^{11}$ conidies par ml pour un volume de filtrat de 114 ml. Les conditions pour obtenir ce rendement ont été évaluées pour 100g d'orge à 1,5 g de peptone, 1,5 g de levure et une incubation à 24,85°C.

Tableau 11. Pourcentage de contribution de chacun des facteurs et leur effet sur la concentration et le volume lors des expériences de modélisation Plackett-Burmen de la production de l'isolat *INRS-IP* de *B. bassiana*.

Facteurs	Contribution (%)	
	Concentration des conidies	Volume de filtrat
Lumière	-16,50	+13,90*
pH	-0,00	-0,22
Température	-4,16	+9,71*
H ₂ O	+1,00	-10,58
Chitine	+2,57	-19,64
Saccharose	+8,79	-2,27
Glucose	-5,17	-5,83
Peptone	+21,16*	-2,70
Extrait de levure	+28,24*	-6,50
Trempage	+2,95	-9,71

* Facteur ayant un effet significatif positif sur la variable mesurée.

Tableau 12. Pourcentage de contribution de chacun des facteurs et leur effet sur la concentration et le volume lors des expériences de modélisation Plackett-Burmen de la production de l'isolat *INRS-CFL* de *B. bassiana*.

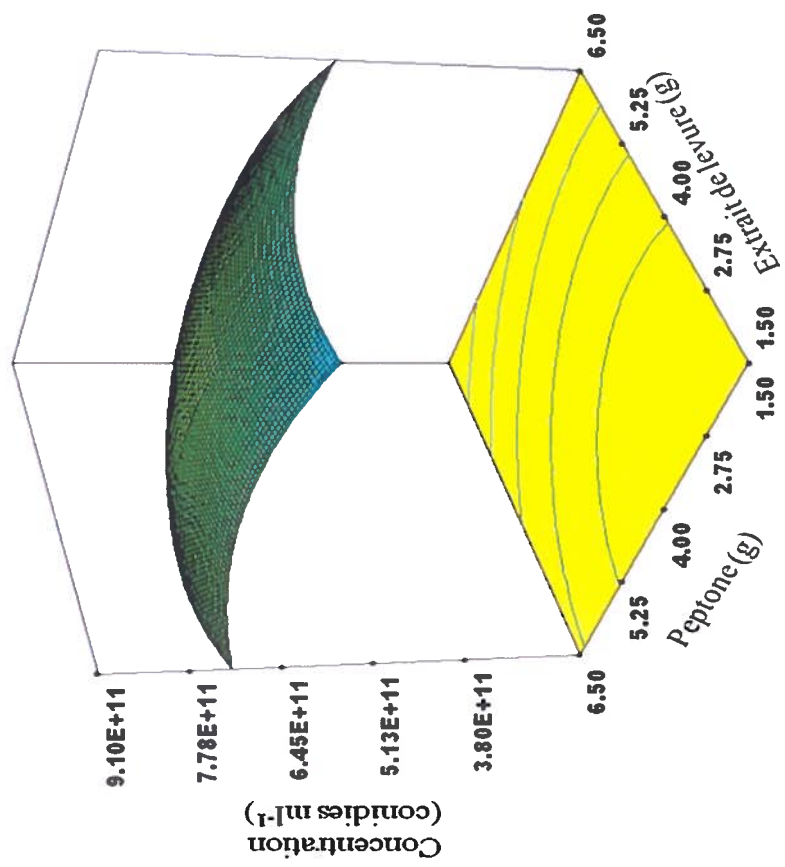
Facteurs	Contribution (%)	
	Concentration des conidies	Volume de filtrat
Lumière	+35,15*	+52,51*
pH	-1,83	+0,79
Température	-3,94	+0,59
H ₂ O	-0,09	-0,06
Chitine	+16,95*	-3,84
Saccharose	-17,41	-8,17
Glucose	+0,51	-1,70
Peptone	+0,012	-2,34
Extrait de levure	+12,17*	-0,00
Trempage	-0,35	-18,87

* Facteur ayant un effet significatif positif sur la variable mesurée.

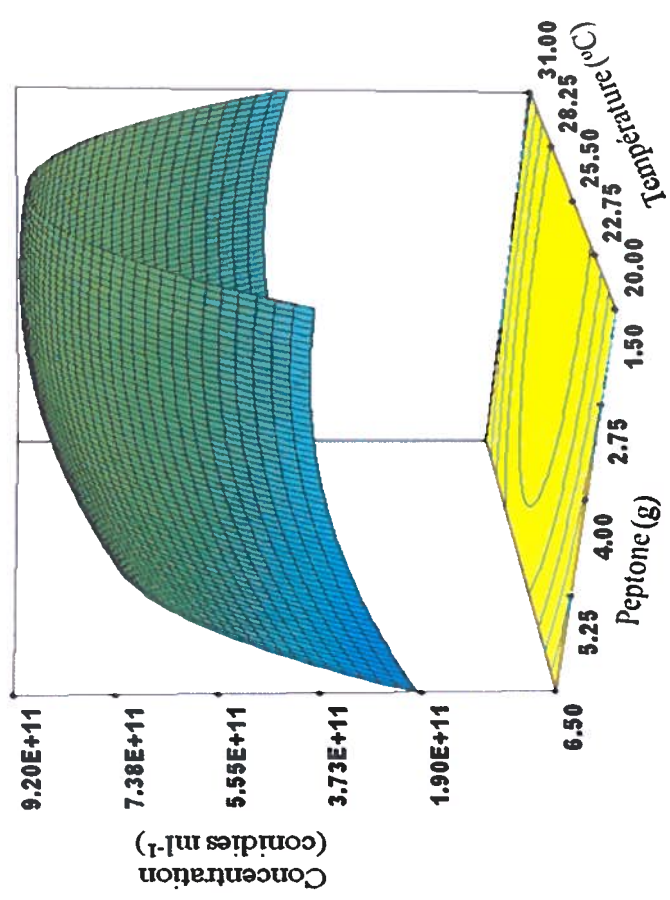
Figure 11. Effets des facteurs nutritifs, environnementaux et leurs interactions sur l'optimisation de la production des conidies de l'isolat *INRS-IP* de *B. bassiana* en utilisant le modèle CCD.

Pour cette expérience, l'orge a été inoculée avec une suspension de conidies de l'isolat *INRS-IP* à une concentration de $1,5 \times 10^8$ conidies par ml. L'échantillonnage a été réalisé 14 jours suivant l'inoculation afin de déterminer la concentration des conidies par ml de ce dernier.

A : l'effet de la peptone et de la température à 1,85g d'extrait de levure et B : de la peptone et de l'extrait de levure à 24,80°C.



A

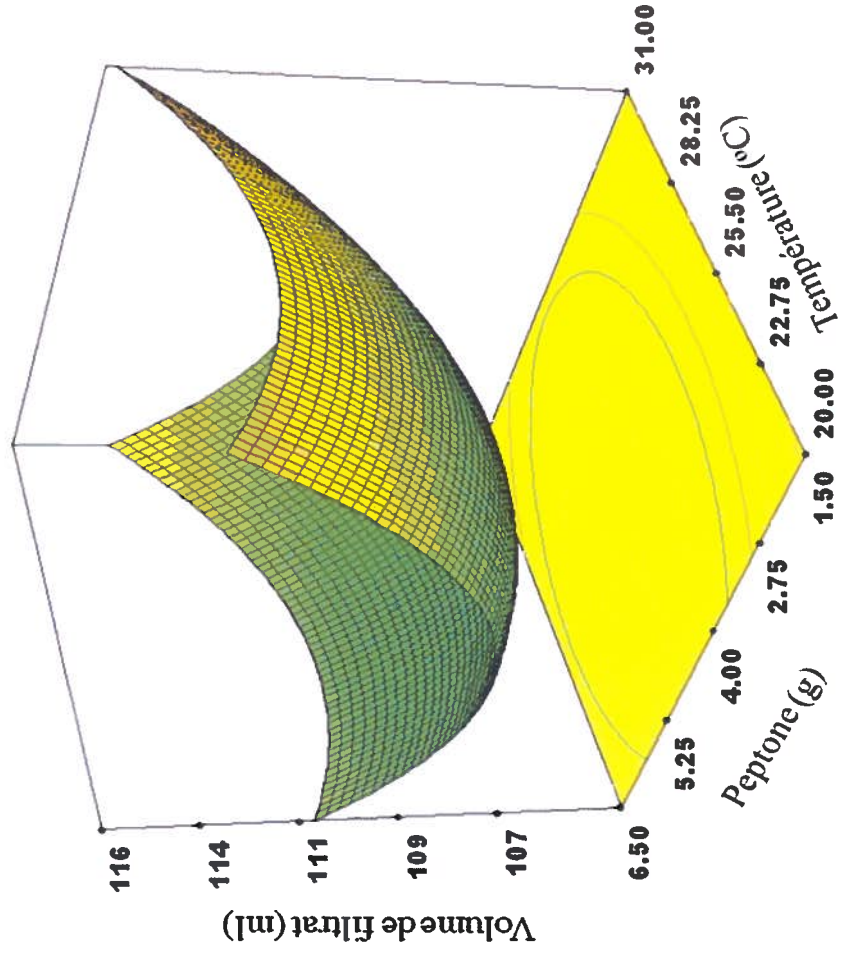


B

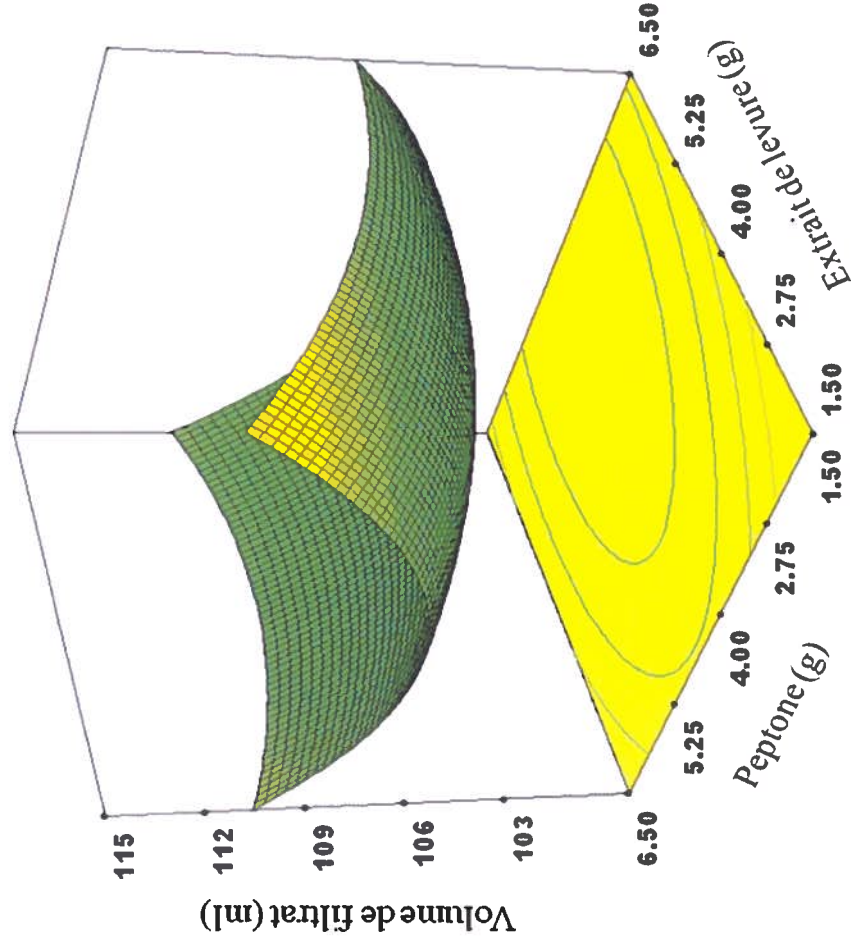
Figure 12. Effets des facteurs nutritifs et environnementaux et leurs interactions sur l'optimisation du volume de filtrat de l'isolat *INRS-IP* de *B. bassiana* en utilisant le modèle CCD.

Pour cette expérience, l'orge a été inoculée avec une suspension de conidies de l'isolat *INRS-IP* ayant une concentration de $1,5 \times 10^8$ conidies par ml. L'échantillonnage a été réalisé 14 jours suivant l'inoculation afin de déterminer le volume de filtrat de ce dernier.

A : l'effet de la peptone et de la température à 1,85g d'extrait de levure et B : de la peptone et de l'extrait de levure à 26,30°C.



A



B

Tableau 13. Combinaisons possibles des valeurs de chacun des facteurs et les rendements optimaux obtenus lors des expériences de modélisation Central Composite Design de la production de l'isolat INRS-IP de *B. bassiana*.

Température (°C)	Peptone (g)	Extrait de levure (g)	Volume de filtrat (ml)	Concentration (conidies ml ⁻¹)	Rendement (conidies totales)
25,42	1,50	1,50	114	9,03 x 10 ¹¹	1,03 x 10 ¹⁴
24,85	1,50	1,50	114	9,98 x 10 ¹¹	1,14 x 10 ¹⁴
25,29	1,50	1,76	114	9,00 x 10 ¹¹	1,03 x 10 ¹⁴
24,08	1,50	1,85	114	8,70 x 10 ¹¹	9,92 x 10 ¹³
28,73	2,35	1,50	112	7,51 x 10 ¹¹	8,41 x 10 ¹³
26,30	6,50	1,50	111	7,37 x 10 ¹¹	8,20 x 10 ¹³
24,76	6,42	1,50	110	7,29 x 10 ¹¹	8,02 x 10 ¹³

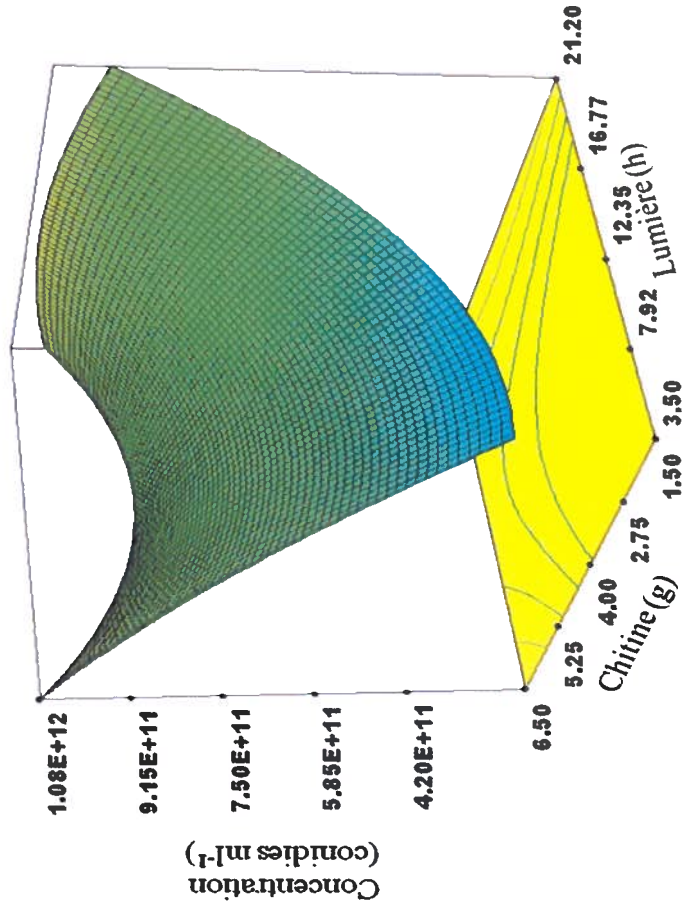
Selon les résultats obtenus après quatorze jours suivant l'inoculation, la modélisation CCD a fourni sept possibilités de combinaisons de facteurs permettant d'obtenir le rendement optimal pour l'isolat INRS-IP.

En regard de l'isolat *INRS-CFL*, les résultats du CCD suggéraient 12 combinaisons possibles pour les facteurs retenus permettant d'avoir des rendements intéressants (tableau 14). Ainsi, le volume maximal estimé a été de 112 ml à une concentration de $9,78 \times 10^{11}$ conidies par ml. D'autre part, la concentration estimée la plus importante a été de $1,03 \times 10^{12}$ conidies par ml pour un volume total de 111ml. La photopériode est un facteur affectant la concentration des conidies et le volume total extrait. Le modèle propose une photopériode de 2h40 : 21h20 (noirceur : clarté) pour l'optimisation de la production des conidies. La chitine et l'extrait de levure sont les deux autres facteurs retenus pour l'optimisation de la production de l'isolat *INRS-CFL*. Le modèle CCD a estimé que pour 100g d'orge, la quantité de chitine devait se situer entre 2,02 et 3,76g et la quantité d'extraits de levure entre 1,50g et 3,29g. Finalement, les résultats indiquent que l'abaissement de la photopériode peut être compensé par l'augmentation de la concentration de chitine et de l'extrait de levure.

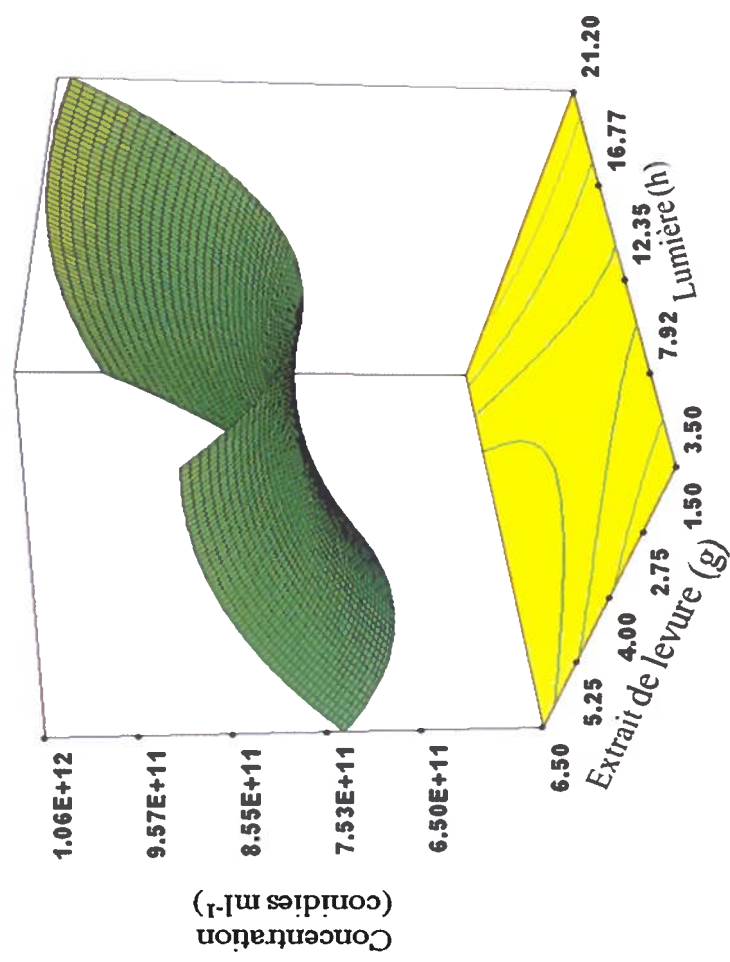
Figure 13. Effets des facteurs nutritifs et environnementaux et leurs interactions sur l'optimisation de la production de conidies de l'isolat *INRS-CFL* de *B. bassiana* en utilisant le modèle CCD.

Pour cette expérience, l'orge a été inoculée avec une suspension de conidies de l'isolat *INRS-CFL* ayant une concentration de $1,5 \times 10^8$ conidies par ml. L'échantillonnage a été réalisé 14 jours suivant l'inoculation afin de déterminer la concentration des conidies par ml de ce dernier.

A : l'effet de la chitine et de la lumière à 3,39g d'extrait de levure et B : de l'extrait de levure et de la lumière à 5,03g de chitine.



A

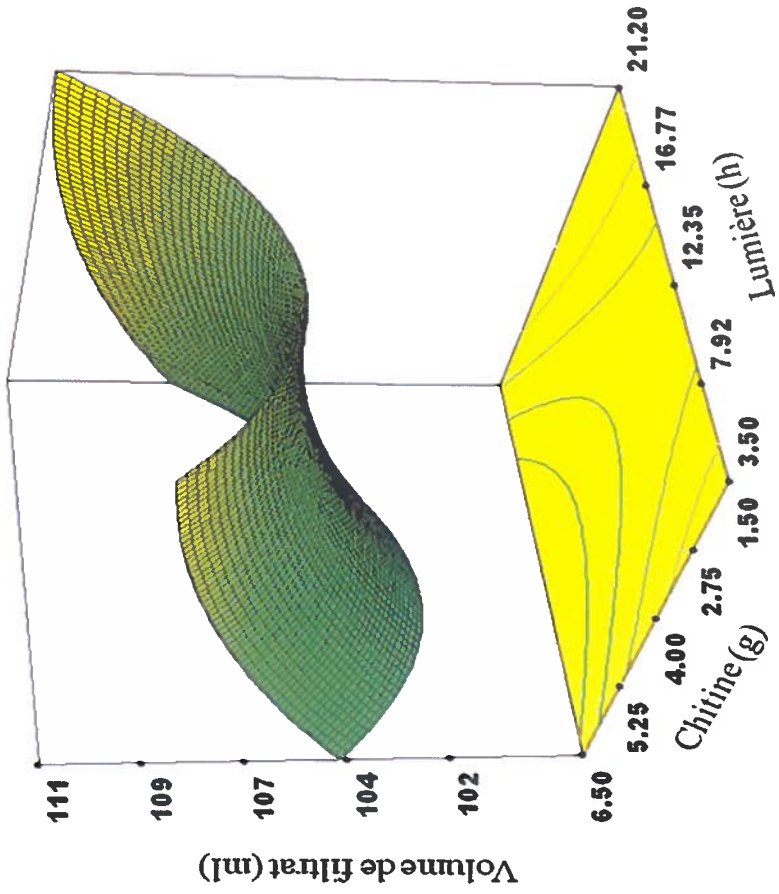


B

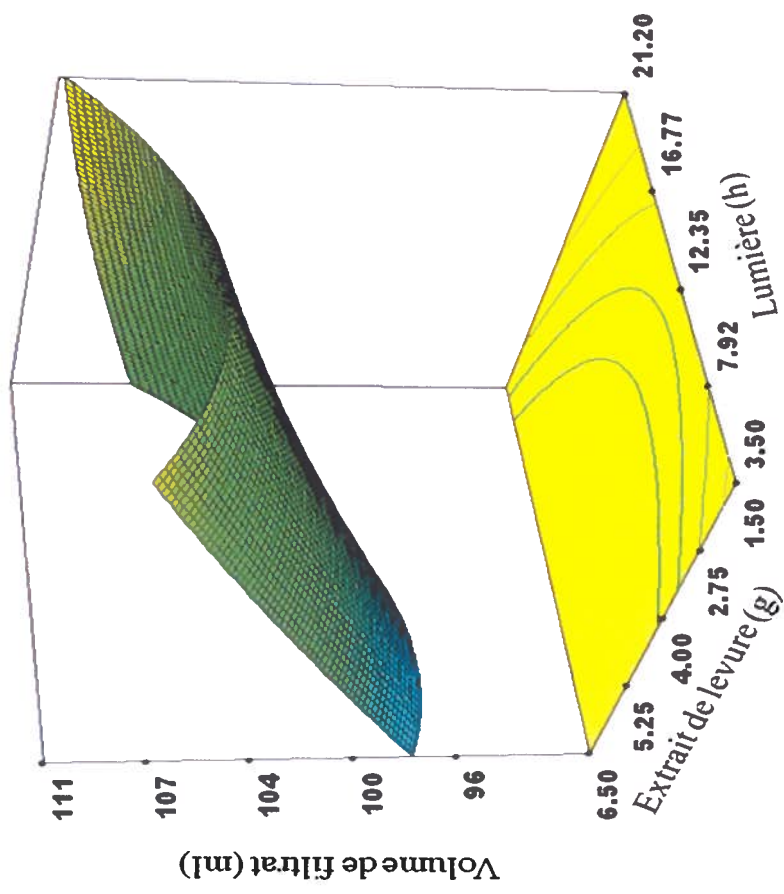
Figure 14. Effets des facteurs nutritifs et environnementaux et leurs interactions sur l'optimisation du volume de filtrat de l'isolat *INRS-CFL* en utilisant le modèle CCD.

Pour cette expérience, l'orge a été inoculée avec une suspension de conidies de l'isolat *INRS-CFL* ayant une concentration de $1,5 \times 10^8$ conidies par ml. L'échantillonnage a été réalisé 14 jours suivant l'inoculation afin de déterminer le volume de filtrat de ce dernier.

A : l'effet de la chitine et de la lumière à 2,04g d'extrait de levure et B : de l'extrait de levure et de la lumière à 3,76g de chitine.



A



B

Tableau 14. Combinaisons possibles des valeurs de chacun des facteurs et les rendements obtenus lors des expériences de modélisation Central Composite Design de la production de l'isolat *INRS-CFL* de *B. bassiana*.

Lumière	Chitine (g)	Extrait de levure (g)	Volume de filtrat (ml)	Concentration (conidies ml ⁻¹)	Rendement (conidies totales)
21h20	3,21	1,50	111	1,03 x 10 ¹²	1,14 x 10 ¹⁴
21h20	2,75	1,50	111	1,01 x 10 ¹²	1,12 x 10 ¹⁴
21h20	3,59	2,04	111	1,04 x 10 ¹²	1,15 x 10 ¹⁴
21h20	3,62	2,46	110	1,05 x 10 ¹²	1,15 x 10 ¹⁴
21h20	2,03	1,50	112	9,78 x 10 ¹¹	1,10 x 10 ¹⁴
21h20	3,76	2,82	110	1,05 x 10 ¹²	1,15 x 10 ¹⁴
21h20	2,02	2,48	111	9,99 x 10 ¹¹	1,11 x 10 ¹⁴
21h20	3,23	3,29	110	1,05 x 10 ¹²	1,15 x 10 ¹⁴
21h20	2,15	2,89	110	1,01 x 10 ¹²	1,10 x 10 ¹⁴
21h20	5,03	1,50	110	1,05 x 10 ¹²	1,15 x 10 ¹⁴
3h50	5,71	1,50	107	1,06 x 10 ¹²	1,13 x 10 ¹⁴
3h50	6,50	2,78	103	1,10 x 10 ¹²	1,13 x 10 ¹⁴

Selon les résultats obtenus après quatorze jours suivi l'inoculation, la modélisation CCD a fourni douze possibilités de combinaison des facteurs permettant d'obtenir le rendement optimal pour l'isolat *INRS-CFL*.

3. Évaluation de la virulence des préparations fongiques

Pour les isolats *INRS-IP* et *INRS-CFL* de *B. bassiana* produit lors des différentes expériences, la virulence fongique a été évaluée par l'épreuve biologique en se basant sur la mortalité des larves et l'apparition de la muscardine sur la cuticule des larves de *G. mellonella* (figure 15). Le pourcentage du taux moyen de survie (TMS) des larves dix jours suivant leur immersion dans les différentes suspensions produites des deux isolats a été estimé (figure 16). On remarque que pour chaque isolat, le TMS est très élevé pour toutes les suspensions produites lors des différentes expériences. Pour chaque isolat, aucune différence significative n'a été observée entre les données de mortalité et la présence de muscardine (test de Kruskal-Wallis).

Figure 15. Larves de *G. mellonella* recouvertes de muscardine suite à une inoculation par un des isolats de *B. bassiana* .

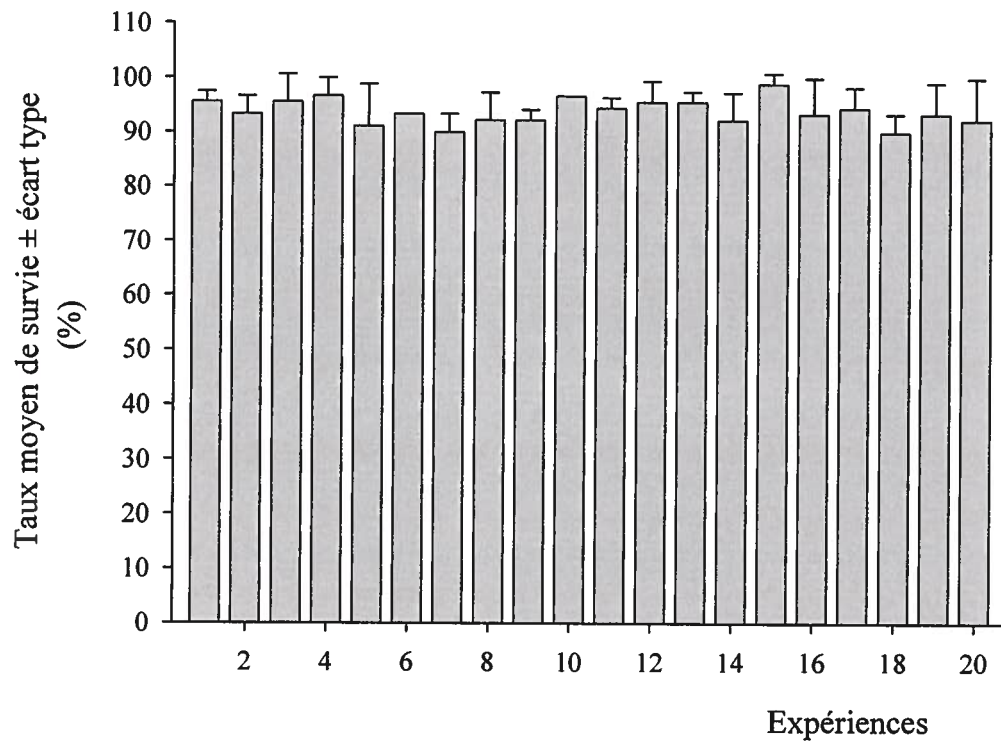
Après avoir envahi l'hémolymphe des larves, les hyphes remontent à la surface de la cuticule par les parties segmentaires des larves et envahissent la totalité de l'insecte. C'est sur la muscardine que l'on retrouve les conidies.



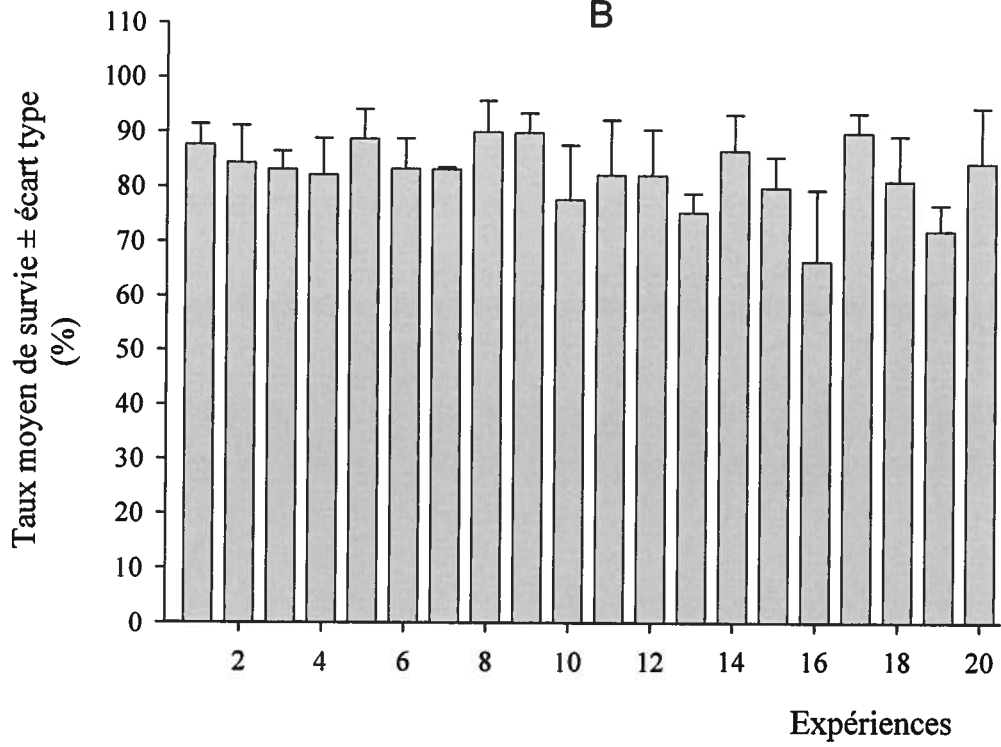
Figure 16. Pourcentage des moyennes de survie des larves de *G. mellonella* dix jours suivant l'immersion dans les différentes suspensions de conidies d'isolat *INRS-IP* (A) et d'isolat *INRS-CFL* (B) avec une concentration de 1×10^9 conidies ml^{-1} .

Pour chaque isolat, le taux moyen de survie des larves de *G. mellonella* est très élevé pour toutes les suspensions produites lors des différentes expériences. Aucune différence significative n'a été observée entre les données de mortalité et la présence de muscardine pour chaque isolat.

A



B



Discussion

Le succès du contrôle des populations d'insectes nuisibles par des microorganismes fongiques ne dépend pas seulement du type d'isolat sélectionné, de ses caractéristiques ou de sa pathogénicité, mais aussi de la capacité de produire ces agents à grande échelle. En effet, la production de masse des agents entomopathogènes à un coût le plus bas possible constitue un élément important pouvant influencer leur intégration dans les programmes de lutte contre les insectes ravageurs.

En considérant que certaines céréales sont des substrats intéressants pour la production de certains isolats de champignons entomopathogènes et que ces substrats puissent être accessibles à des prix raisonnables sont là des éléments importants qui entrent dans l'intérêt manifesté pour ces organismes en lutte biologique. Par contre, le choix du milieu céréalier semble dépendre de l'espèce de champignon, voire même de l'isolat sélectionné. Par exemple, le sorgho serait une céréale idéale pour la production de masse de *V. lecanii* et *P. farinosus* (Gopalakrishnan *et al.*, 1999; Lakshmi *et al.*, 2001; Sahayaraj et Namasivayam, 2008).

Au cours de l'étude, cinq céréales, le riz, l'orge, le blé, l'avoine et le maïs ont été utilisés comme substrat pour la production de masse des isolats *INRS-IP* et *INRS-CFL* de *B. bassiana*. Parmi ces cinq céréales, il a été démontré que le maïs et le blé sont les deux substrats donnant les plus faibles concentrations de conidies. Ces résultats viennent supporter les observations de Sahayaraj et Namasivayam (2008) qui indiquaient que le maïs était un substrat donnant de faibles concentrations de conidies chez *B. bassiana*. Par contre, l'étude montrait que la production de conidies était plus élevée avec le blé. Dans notre cas, aucune différence significative n'a été observée entre ces deux céréales.

D'un autre côté, la différence dans les concentrations de conidies obtenues avec le maïs et le blé est caractérisée par des profils cinétiques différents par rapport aux trois autres céréales. On remarque que les périodes de latence observées avec le blé et le maïs étaient plus longues que celles notées avec le riz, l'orge et l'avoine. En effet, il faut attendre huit jours avant d'observer une augmentation du rendement chez ces deux céréales. Il semble que la texture de ces deux substrats rend difficile la germination des conidies ainsi que la prolifération des hyphes.

En regard des volumes de filtrat récupérés, parmi les substrats céréaliers étudiés, l'avoine est le substrat permettant de récupérer le plus faible volume. Il semble que la texture de substrat rende difficile la récupération des liquides. En effet, l'avoine utilisée était sous forme de flocons ce qui se manifestait par une absorption plus importante des liquides. Ainsi, lors des extractions, la séquestration des liquides était beaucoup plus importante avec l'avoine qu'avec les autres substrats qui étaient sous forme de grains. C'est sur la base des résultats obtenus avec les isolats *INRS-CFL* et *INRS-IP* de *B. bassiana* au niveau de la concentration des conidies et les volumes des filtrats que le riz et l'orge ont été sélectionnés pour la poursuite des expériences.

Le riz et l'orge se sont avérés deux céréales performantes pour la production des isolats *INRS-IP* et *INRS-CFL* de *B. bassiana*. Ces deux céréales ont été aussi utilisées pour la production de masse de plusieurs espèces champignons entomopathogènes (Dorta *et al.*, 1990; Feng *et al.*, 1994; Kaaya et Hassan, 2000; Nelson *et al.*, 1996). Selon Ibrahim et Low (1993) et Sharma *et al.* (2002), le riz semble être un substrat approprié pour la production de masse de *B. bassiana*. Dans le cas de l'isolat *INRS-IP*, aucune différence significative n'a été observée entre le riz et l'orge. Des résultats similaires ont été observés avec l'isolat *INRS-CFL*, sauf pour les résultats du jour 6 où une différence de rendement a été observée entre les deux substrats. D'autre part, il serait difficile d'avancer une hypothèse pour expliquer cette variation, puisque, par la suite, il n'y a aucune différence dans les rendements obtenus aux jours 12 et 14. Malgré cela, il n'y a pas d'étude expliquant les meilleurs rendements obtenus avec ces substrats. Grimm (2001) et Yung et Feng (2006) indiquent que le riz et l'orge sont des céréales riche en amidon et en polysaccharides et pauvre en monosaccharides comme le glucose. Par contre, le rôle précis de ces particularités de même que celui des nutriments d'une céréale sur la production de champignon n'ont, à notre connaissance, jamais été étudiés.

Pour la deuxième expérience, la durée de la production des isolats *INRS-IP* et *INRS-CFL* de *B. bassiana* a été prolongée jusqu'à quatorze jours. Ce changement s'est imposé puisque, lors des expériences de la première étape, le rendement de ces deux isolats n'avait pas atteint un plateau. Dans une étude portant sur la production des conidies de *B. bassiana* sur une période de sept jours, Vega *et al.* (2003) indiquaient que

la durée de fermentation devait être doublée pour exploiter tout le potentiel permettant d'atteindre de hauts rendements dans la production du champignon. De plus, la production des conidies semble dépendre du volume d'eau ajoutée au milieu de culture (Devi *et al.*, 2005). C'est dans ce contexte que la quantité de substrat et le volume d'eau utilisé ont été augmentés lors de la deuxième expérience.

Les courbes de production des conidies des isolats *INRS-IP* et *INRS-CFL* indiquent qu'au niveau du rendement, les plateaux seraient atteints après 12 jours. Ces résultats viennent supporter l'hypothèse de Vega *et al.* (2003) sur le temps requis pour exploiter tout le potentiel de la fermentation de *B. bassiana* sur les céréales. Les résultats de cette deuxième expérience n'ont pas permis de sélectionner le riz ou l'orge comme substrat à privilégier pour la fermentation en milieu solide des deux isolats de *B. bassiana*. Ainsi, d'autres paramètres ont été considérés pour le choix du substrat de production des isolats. L'orge a été choisie comme substrat approprié pour la production des isolats *INRS-IP* et *INRS-CFL* de *B. bassiana*. Ce choix est motivé par deux raisons : d'une part, l'orge donne un bon rendement, et d'autre part, elle est une céréale locale, disponible en grande quantité, facilement accessible et, au Canada, moins coûteuse que le riz qui est une céréale importée. En 2008, lors des premières expériences, le prix des céréales a significativement augmenté dans le monde. Selon un rapport de l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO, 2008), le prix du riz en 2008 était de 782\$ (US) par tonne métrique, soit deux fois plus cher que l'année précédente. Par contre, à la même période, le prix de l'orge était environ quatre fois moins élevé que celui du riz (FPCCQ, 2008).

La modification des facteurs abiotiques, notamment les facteurs environnementaux et nutritifs, améliore le rendement de la production des conidies des isolats *INRS-IP* et *INRS-CFL* de *B. bassiana* avec, respectivement, $9,98 \times 10^{11}$ et $1,03 \times 10^{12}$ conidies par ml en utilisant le plan d'expérience factorielle fractionnée de type Plackett-Burmen et la modélisation de la surface de réponse de type CCD. Chaque isolat de *B. bassiana* semble requérir des facteurs abiotiques intrinsèques pour leur croissance (Iskandarov *et al.*, 2006; Shimazu, 2004). Les résultats obtenus avec les isolats *INRS-IP* et *INRS-CFL* supportent cette affirmation. La lumière semble avoir un effet d'inhibition

sur la production des conidies de l'isolat *INRS-IP*. Par contre, elle semble jouer un rôle important sur la production des conidies de l'isolat *INRS-CFL*. En général, lorsque la culture est réalisée en condition d'obscurité complète, les hyphes de *B. bassiana* se développent avec peu de structures reproductrices différenciées. En présence de lumière, la formation prolifique de conidiophores est plus abondante ce qui se traduit par la présence de plus de conidies (Zhang *et al.*, 2009). Donc, la lumière serait un facteur stimulant la conidiogenèse de *B. bassiana*. Nos résultats ne supportent pas cette hypothèse, puisque l'isolat *INRS-IP* de *B. bassiana* produit moins de conidies lors de l'exposition de la lumière. Les besoins intrinsèques des isolats pourraient expliquer les variations associées à l'effet de la lumière.

La production des conidies est en étroite corrélation avec la capacité de germination des conidies et de prolifération des hyphes qui requièrent essentiellement des sources de carbone (Iskandarov *et al.*, 2006). Cependant, ce ne sont pas toutes les substances carboniques qui peuvent avoir des effets intéressants sur la production des champignons entomopathogènes. Parmi toutes les substances nutritives utilisées dans les expériences, seuls la chitine, l'extrait de levure et la peptone se sont révélés avoir des effets significatifs et positifs sur la production des deux isolats de *B. bassiana* de nos champignons. La production d'enzyme chitinase par *B. bassiana* lui permet de dégrader les substrats afin de les rendre facile à absorber (Hegedus *et al.*, 1990). La chitine est une source nutritive importante pour la production des conidies de l'isolat *INRS-IP*. D'autre part, la peptone semble avoir un effet significatif sur la production de l'isolat *INRS-CFL*. James (2001) mentionnait que la présence de peptone favorisait la germination des conidies de certains isolats de *B. bassiana* et de *Paecilomyces fumosoroseus*. L'extrait de levure constitue un élément nutritif intéressant puisqu'il contribue de façon significative à l'augmentation de la production des conidies de ces deux isolats de *B. bassiana*. Par contre, Bidochka *et al.* (1987) montraient que l'extrait de levure ne contiendrait pas d'élément pouvant influencer la production de blastospores en milieu liquide. Nos résultats suggèrent que les besoins de substances nutritives, notamment l'extrait de levure, pourraient varier en fonction des isolats et des conditions de production.

En présence de plusieurs substances carboniques, le glucose s'est avéré être un composé ayant un effet d'inhibition sur la production des isolats *INRS-IP* et *INRS-CFL* de *B. bassiana*. Smith et Grula (1981) mentionnaient qu'en présence de protéine, le glucose exerçait un effet significatif sur la germination des conidies de *B. bassiana*. D'autre part, St Leger *et al.* (1994) indiquaient que le glucose seul était capable de stimuler la germination de certains isolats de *M. anisopliae*. Il serait vraisemblable que les besoins en glucose comme source de carbone et d'énergie puissent dépendre de l'origine des isolats. Par exemple, les isolats de *M. anisopliae* isolés de certains coléoptères n'utilisent pas le glucose comme substrat nutritif pour l'initiation de la germination des conidies, tandis que ceux isolés d'hémiptères et de lépidoptères assimilent facilement le glucose (James, 2001; St Leger *et al.*, 1994). Dans le cas qui nous concerne, les deux isolats étudiés ont été isolés sur des espèces de coléoptères. En effet, l'isolat *INRS-IP* a été récupéré sur un cadavre d'un doryphore de la pomme de terre (*L. decemlineata*), tandis que l'isolat *INRS-CFL* a été récolté sur un individu du grand hylésine des pins (*T. piniperda*). Les résultats viendraient supporter l'hypothèse d'un besoin moins important de glucose pour la croissance des isolats issus d'espèces de coléoptères.

Le pH ne semble pas un facteur important pouvant affecter la production des isolats *INRS-IP* et *INRS-CFL* de *B. bassiana*. De façon générale, plusieurs isolats de *B. bassiana* montrent une préférence pour des milieux légèrement acides, tandis que d'autres croissent mieux en milieux alcalins (Galani, 1988; Hallsworth et Magan, 1996; Padmavathi *et al.*, 2003; Prakash *et al.*, 2008). Cette variation implique que dans toutes les expériences d'optimisation, ce facteur devrait toujours être considéré afin de déterminer son influence sur la production des isolats de *B. bassiana*.

La température est un facteur semblant jouer un rôle important sur la production de l'isolat *INRS-IP*. Par contre, elle n'a aucun effet significatif dans le cas de l'isolat *INRS-CFL*. La température optimale de croissance des champignons entomopathogènes peut varier en fonction des besoins spécifiques et l'origine géographique de chaque isolat (Sato *et al.*, 1993; Shimazu, 2004). Ainsi, la température optimale pour la croissance de *B. bassiana* serait de $26 \pm 1^\circ\text{C}$ sur une gélose Sabouraud glucosée (Arcas *et al.*, 1999), et varierait entre 15 et 20°C lors de la croissance sur des cadavres de *R. prolixus* (Luz et

Fargues, 1998). De façon générale, les isolats de *B. bassiana* poussent à une température optimale se situant près de 25°C (Fargues *et al.*, 1992, 1997), mais varierait entre 20 et 35°C selon Iskandarov *et al.* (2006). Les isolats isolés de régions plus chaudes auraient un taux de croissance plus élevé que ceux provenant de zones plus froides (Shimazu, 2004).

Pour chacun des isolats de *B. bassiana* étudié, l'utilisation du modèle de la surface de réponse permet de connaître les concentrations de chaque substance nutritive et des différentes conditions environnementales permettant d'obtenir le rendement optimal, tant au niveau de la concentration des conidies par ml que du volume de filtrat récolté. Les résultats font ressortir plusieurs combinaisons possibles susceptibles de fournir un rendement optimal. Dans cette étude, le choix de la combinaison a aussi été basé sur une préoccupation économique. En effet, au-delà des résultats théoriques, le ratio coût et rendement a toujours été un élément considéré dans l'optimisation de la production des isolats *INRS-IP* et *INRS-CFL* de *B. bassiana*. Ainsi, le substrat permettant d'obtenir le rendement optimal avec l'isolat *INRS-IP* au coût le plus faible devrait être composé de 100g d'orge auxquels 1,50g de peptone, 1,50g d'extrait de levure, 100ml d'eau distillée, 10ml de la suspension des conidies avec une concentration de $1,5 \times 10^8$ conidies par ml seraient ajoutés. La production devrait être réalisée à une température de 24,9°C dans une condition d'obscurité complète. En revanche, les conditions optimales pour la production de l'isolat *INRS-CFL* devrait être les suivantes : 3,59g de chitine, 2,04g d'extrait de levure, 100ml d'eau distillée et 10ml de suspension de conidies à une concentration de $1,5 \times 10^8$ conidies par ml devrait être ajouté à 100g d'orge, le tout placé à 25°C avec une photopériode de 2 h 40 : 21 h 20 (noirceur : clarté).

Afin de vérifier si les différentes conditions de production pouvaient affecter la pathogénicité des préparations fongiques, une évaluation de leur virulence à l'aide d'épreuves biologiques a été réalisée. Pour chaque isolat, les résultats n'ont pas permis de mettre en évidence des différences significatives au niveau de la mortalité des insectes et la présence de muscardine chez les larves de *G. mellonella* soumises aux différentes préparations. De plus, pour chaque isolat, on note que le taux moyen de survie des larves était très élevé pour toutes les suspensions produites lors des différentes expériences. Les larves étaient en mesure de poursuivre leur développement sans qu'il soit possible

d'observer de changement tant au niveau du temps de croissance et du poids des chrysalides. Par contre, lorsque les larves soumises aux différentes préparations fongiques étaient trucidées, la présence de la muscardine était observée après 48 heures chez la majorité des individus. Cette observation semble indiquer que les conidies étaient présentes à la surface de la cuticule des larves, mais qu'elles n'étaient pas en mesure de germer et ainsi, de provoquer une infection chez ces insectes. Il semble évident que les deux isolats de *B. bassiana* utilisés lors de cette étude n'avaient pas d'effet virulent sur les larves de *G. mellonella*. Il est généralement admis que les isolats les plus virulents sont ceux isolés de l'hôte (Sabbahi *et al.*, 2008b; Pēna *et al.*, 1996). Les résultats de l'étude semblent confirmer cette règle, puisque *G. mellonella* est une espèce d'insectes de l'ordre des lépidoptères et que les isolats proviennent d'insectes appartenant à l'ordre des coléoptères. Les résultats de l'étude, comme ceux des études citées précédemment, ne supportent donc pas l'hypothèse de Devi *et al.* (2008) voulant que *B. bassiana* soit un champignon entomopathogène généraliste sans préférence d'hôte spécifique. Cette affirmation peut être vraie si l'on considère uniquement l'espèce dans son ensemble sans tenir compte de la spécificité de chaque isolat. Talaei-Hasanloui *et al.* (2007) ont noté que la germination des conidies de *B. bassiana* sur la cuticule d'insecte diffère selon les isolats et l'insecte hôte. La première barrière à l'infection d'insecte est la cuticule d'insecte qui est composée principalement de protéines (Donatti *et al.*, 2008; St Leger, 1993). Ces protéines peuvent accélérer ou inhiber la germination des conidies de champignons entomopathogènes (James *et al.*, 2003; Barnes et Moore, 1997). Les isolats *INRS-IP* et *INRS-CFL* de *B. bassiana* se sont avérés efficaces contre certaines espèces de coléoptères, notamment le charançon du pin blanc, *P. strobi* (Trudel *et al.*, 2007), l'anthonome de la fleur du fraisier, *A. signatus* et le charançon de la racine du fraisier, *O. avatus* (Sabbahi *et al.*, 2008b).

Conclusion

Le but du présent projet de recherche était d'identifier des facteurs influençant la production des isolats *INRS-IP* et *INRS-CFL* de *B. bassiana* puis de déterminer les conditions de leur utilisation afin d'optimiser leur rendement. Il s'agit d'une première étude multifactorielle sur la production des isolats de *B. bassiana*.

Parmi les différentes céréales testées, l'orge et le riz sont les deux substrats céréaliers qui donnaient le meilleur rendement lors de la production des deux isolats de *B. bassiana*. L'emploi de l'orge a été privilégié pour son efficacité et sa disponibilité au Canada à un prix nettement inférieur au riz.

L'utilisation du plan d'expérience factorielle fractionnée de type Plackett-Burmen et la modélisation de la surface de réponse de type CCD, ont permis d'identifier et de définir les conditions pour une optimisation de la production des isolats *INRS-IP* et *INRS-CFL*. Ainsi, à partir d'une liste importante de facteurs, les expériences factorielles ont permis de cibler ceux jouant un rôle dans la production de chacun des isolats. Il a été possible de constater que ces deux isolats avaient des besoins intrinsèques pour leur croissance. La température, la peptone et l'extrait de levure sont les trois facteurs importants pour la croissance de l'isolat *INRS-IP*, tandis que la lumière, la chitine et l'extrait de levure jouaient un rôle important dans la production de l'isolat *INRS-CFL*.

Les résultats issus de la modélisation CCD ont donné plusieurs combinaisons de valeurs possibles de chacun des facteurs permettant d'obtenir des rendements optimaux lors de la production des conidies des isolats *INRS-IP* et *INRS-CFL*. Ainsi, les rendements maximaux ont atteint, respectivement $1,14 \times 10^{14}$ et $1,15 \times 10^{15}$ conidies par 100g d'orge. Pour chaque isolat, une combinaison a été identifiée permettant d'obtenir des rendements soutenus aux coûts les plus faibles possible.

Finalement, un des volets de l'étude était d'évaluer l'impact des différentes conditions de production sur la virulence des conidies des deux isolats de *B. bassiana*. À la lumière des résultats obtenus, il est possible d'affirmer que les conditions de production n'affectent en rien la pathogénicité des préparations fongiques des isolats *INRS-IP* et *INRS-CFL*.

La modification de certains facteurs environnementaux et nutritifs permettant d'optimiser la production des isolats *INRS-IP* et *INRS-CFL* de *B. bassiana* est une étape essentielle pour leur intégration dans les régies de lutte contre les insectes ravageurs. En effet, l'approvisionnement constant, de qualité et des coûts relativement faibles devraient militer pour une plus grande utilisation de ces produits à risque réduit pour l'environnement. L'intérêt de l'approche développée est qu'elle pourra trouver des applications dans la production d'autres champignons entomopathogènes tels que *Verticillium*, *Metarhizium* et *Tolypocladium*.

Références

- Adamek, L., 1965. Submerge cultivation of the fungus *Metarrhizium anisopliae* (Metsch.). Folia Microbiology, vol. 10, pp. 255-267.
- Adinarayana. K., Ellaiah, P., 2002. Response surface optimization of the critical medium component for this production of alkaline protease by a newly isolated *Bacillus* sp. Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science, vol. 5, pp. 272-227.
- Akello, J., Dubois, T., Coyne, D., Kyamanywa, S., 2009. The effects of *Beauveria bassiana* dose and exposure duration on colonization and growth of tissue cultured banana *Musa* sp.) plants. Biological Control, vol. 49, pp. 6-10.
- Almeida, J.E., Alves, S.B., Perreira, R.M., 1997. Selection of *Beauveria* spp. isolates for control of the termite *Heterotermes tenuis* (Hagen, 1958). Journal of Applied Entomology, vol. 121, pp. 539-543.
- Amora, S.S.A., Bevilaqua, C.M.L., Feijo, F.M.C., Silva, M.A., Pereira, R.H.M.A., Silva, A.C., Alves, N.D., Freire, F.A.M., Oliveira, D.M., 2009. Evaluation of the fungus *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes), a potential biological control agent of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae). Biological Control, vol. 50, pp. 329-335.
- Arcas, A.J., Diaz, M.B., Lecuona, E.R., 1999. Bioinsecticidal activity of conidia and dry mycelium preparations of two isolates of *Beauveria bassiana* against the sugarcane borer *Diatraea saccharalis*. Journal of Biotechnology, vol. 67, pp. 151-158.
- Arthurs, S., Thomas, M.B., 2001. Effect of temperature and relative humidity on sporulation of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* in mycosed cadavers of *Schistocera gregaria*. Journal of Invertebrate Pathology, vol. 78, pp. 59-65.
- Bancroft, T.L., 1906. On the aetiology of dengue fever. Aust.Med.Gazette, 25: 17-18. In F.A.B. Coutinho, M.N. Burattinia, L.F. Lopeza, E. Massada, Begon, M., Harper, J.L., Townsend, C.R., 1996. Ecology: individuals, populations and communities. Ed. Blackwell Science, 1068 p.
- Barnes, S., Moore, D., 1997. The effect of fatty, organic or phenolic acids on the germination of conidia of *Metarhizium flavoviride*. Mycology Resources, vol. 10, pp. 662-666.

- Barranco-Flrido, J.E., Alatorre_Rosse, R., Gutierrez-Rojas, M., Viniegra-Gonzalez, G., Saucedo-Casteneda, G., 2002. Criteria for the selection of strains of entomopathogenic fungi *Verticillium lecanii* for solid state cultivation. Enzyme and Microbial Technology, vol. 30, pp. 910-915.
- Begon, M., Harper, J.L., Townsend, C.R., 1996. Ecology-individuals, populations and communities. Eds. Blackwell Science, 1068p.
- Bejarano, E.E, 2003. Occurrence of the Malaria Vector *Anopheles albimanus* Wiedemman (Diptera: Culicidae) in Isla Fuerte, Colombia. Neotropical Entomology, vol. 32(3), pp. 517-518.
- Bidochka, M.J., Pfeifer, T.A., Khachatourians, G.G., 1987. Development of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in liquid cultures. Mycopathologia, vol. 99, pp. 77-83.
- Bidochka, M.J., Khachatourians, G., 1992. Growth of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* on cuticular components from the migratory grasshopper, *Melanoplus sanguinipes*. Journal of Invertebrate Pathology, vol. 59, pp. 165-173.
- Bidochka, M.J., Kamp, A.M., De Croos, J.N.A., 2000. Insect pathogenic fungi: from genes to populations. In Fungal Pathology. Ed. Kronstad, J.W. pp. 171-193. The Netherlands: Kluwer Academic Press.
- Bo H., Chun-Ru L., Mei-Zhen F., 2002. Molecular Identification of the Teleomorph of *Beauveria bassiana*. Mycotaxon, vol. LXXXI, pp. 229-236.
- Bogar, B., Szakacs, G., Tengerdy, R.P., Linden, J.C., Pandey, A., 2002. Production of α -amylase with *Aspergillus oryzae* on Spent Brewing Grain by solid substrate fermentation. Applied Biochemistry and Biotechnology, vol. 10, pp. 453-462.
- Boucias, D.G., Pendland, J.C., 1984. Host recognition and specificity of entomopathogenic fungi. In Infection process in Fungi- Conference Report. Eds. Robert, D.W., Aist, J.R., pp. 185-196. Rockefeller Foundation, New York.
- Boucias, D.G., Pendland, J.C., Latge, J.P., 1991. Attachment of mycopathogens to cuticle : the initial event of mycosis on arthropod host. In The fungal spore and disease initiation in plants and animals. Eds. Cole, G.T., Hoch, H.C., pp. 101-128. Plenum, New York.
- Boucias, D.G., Pendland, J.C., Latge, J.P., 1998. Nonspecific factors involved in attachment of entomopathogenic deuteromycetes to host insect cuticle. Applied Environmental Microbiology. Vol. 54, pp. 1795-1805.
- Burgess, H.D., Croizer, G., Hubert, J., 1980. A Review of Safety Tests on *Baculoviruses*. Entomophaga, vol. 25, p. 329.

- Calderon, A., Fraga, M., Carrera, B., 1995. Production of *Beauveria bassiana* by solid-state fermentation. Reviews on Protection of Vegetables, vol. 10, p. 269-273.
- Campos, R.A., Arruda, W., Blodo, J.T., Silva, M.V., Barros, N.M., Azevedo, J.L., Schrank, A., Vainstein, M.H., 2005. *Boophilus microplus* by *Beauveria amorpha* and *Beauveria bassiana*: SEM analysis and regulation of subtilisin-like proteases and chitinases. Current Microbiology, vol. 50, pp. 257-261.
- Carlile, M.J., Watkinson, S.C., Gooday, G.W., 2001. The Fungi. San Diego : Elsevier Academic Press.
- Carruthers, R.I., Hural, K., 1990. Fungi as Naturally occurring entomopathogens, *In* New Directions in Biological Control. Eds. Baker, R.R, and Dunn, P.E. Alan R. Liss, pp. 115-138. New York.
- Chakravarti, R., Sahai, V., 2002. Optimization of compactin production in chemically defined production medium by *Penicillium citrinum* using statistical methods. Process Chemistry, vol. 38, pp. 481-486.
- Charnley, A.K., 1984. Physiological species of destructive pathogenesis in insects by fungi: A speculative review. *In* Invertebrate-Microbial Interactions. Eds. Anderson, J.M., Rayner, D.M., Walton, D.W.H., British Mycological Society Symposium 6, pp. 229-270. Cambridge University Press, London.
- Clark, T.B., Kellen, W.R., Fakuda, T., Lindegren, J.E., 1968. Field and laboratory studies on the pathogenicity of the fungus *Beauveria bassiana* to three genera of mosquitoes. Journal of Invertebrate Pathology, vol. 11, pp. 1-7.
- Cory, J.S., Hoover, K., 2006. Plant mediated effects in insect-pathogen interactions. Trends in Ecology and Evolution, vol. 21, pp. 278-286.
- Daniel, C., Wyss, E., 2009. Susceptibility of different life stage of the European cherry fruit fly, *Rhagoletis cerasi*, to entomopathogenic fungi. Journal of Applied Entomology, vol. 133, pp. 433-483.
- Devi, K.U., Padmavathi, J., Rao, C.M.U., Khan, A.A.P., Mohan, M.C., 2008. A study of host specificity in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Hypocreales, Clavicipitaceae). Biocontrol Science and Technology, vol. 8(10), pp. 975-989.
- Devi, K.U., Sridevi, V., Mohan, C.M., Padmavathi, J., 2005. Effect of high temperature and water stress on *in vitro* germination and growth in isolates of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin. Journal of Invertebrate Pathology, vol. 88, pp. 181-189.
- Donatti, A.C., Furlaneto-Maia, L., Fungaro, M.H.P., Furlaneto, M.C., 2008. Production and regulation of cuticle-degrading proteases from *Beauveria bassiana* in the

- presence of *Rhammatocerus schistocercoides* cuticule. Current Microbiology, vol. 56, pp. 256-260.
- Dorta, B., Bosch, A., Arcas, J.A., Ertola, R.J., 1990. High level of sporulation of *Metarhizium anisopliae* in a medium containing by products. Applied Microbiology and Biotechnology, vol. 33, pp. 712-715.
- Dunphy, G.B., Tibelius, K.H., 1992. Les progress biotechnologiques augmentant l'efficacité de *Bacillus thuringiensis* et *Bacillus spaericus* en tant qu'insecticide microbien. In La lutte biologique, sous la direction de Vincent, C. et Coderre, D., pp. 305-322. Chocoutimi, Québec, Canada. Gaetan Morin éditeur Itée.
- Evans, H.F., 2000. Viruses. In Field manual of techniques in invertebrate pathology. Eds. Lacey, L.A, Kaya, K.H., pp. 179-208. Kluwer Academic Publishers, Netherlands.\
- Fan, Y., Fang, W., Guo, S., Pei, X., Zhang, Y., Xiao, Y., Li, D., Jin, K., Bidochka, M.J., Pei, Y., 2007. Increased insect virulence in *Beauveria bassiana* strains overexpressing an engineered chitinase. Applied and Environmental Microbiology, vol. 73, pp. 295-302.
- Fargues, J., 1981. Spécificité des hyphomycètes entomopathogènes a résistance interspécifique des larves d'insectes. Thèse de doctorat d'état, Université de Paris VI.
- Fargues, J., Maniania, N.K., Delmas, J.C., Smith, N., 1992. Influence de la température sur la croissance *in vitro* d'hyphomycètes entomopathogènes. Agronomie, vol. 12, pp. 557-564.
- Fargues, J., Ouedradogo, A., Goettle, M.S., Lomer, C.J., 1997. Effects of temperature, humidity and inoculation method on susceptibility of *Schistocerca gregaria* to *Metarhizium flavoviride*. Journal of Biocontrol Science and Technology, vol. 7, pp. 345-356.
- Fargues, J., Vidal, C., Smits, N., Rougier, M., Boulard, T., Mermier, M., Nicot, P., Reich, P., Jeannequin, B., Ridray, G., Lagier, J., 2003. Climatic factors on entomopathogenic hyphomycetes infection of *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera: Aleyrodidae) in Mediterranean glasshouse tomato. Biological Control, vol. 28, pp. 320-331.
- Faria, M.R., Wraight, P.S., 2001. Biological control of *Bemisia* with fungi. Crop Protection, vol. 20, pp. 767-778.
- Faria, M.R., Wraight, P.S., 2007. Mycoinsecticides and Mycoascaricides : A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation type. Biocontrol, vol. 43(3), pp. 237-256.
- Fédération des producteurs de cultures commerciales du Québec (FPCCQ), 2008. Canada.

- Feng, M.G., Poprawski, T.J., Khachatourians, G.G., 1994. Production, formulation and application of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for insect control: current status. Biocontrol Science and Technology, vol. 4, pp. 3-34.
- Ferron, P., Fargues, J., Riba, G., 1993. Les champignons agents de lutte microbiologique contre les ravageurs. *In* La lutte biologique. Ed. Fraval, A. Dossier de la cellule environnement de l'INRA, vol. 5, pp. 65-93.
- Food and Agriculture Organization (FAO), 2008.
www.fao.org/economic/est/publication/rice*publications/the-fao-rice-update/en/
 (page consultée le 10 janvier 2009).
- Franz, J.M., 1971. Influence of environment and modern trends in crop management on microbial control. *In* Microbial control on insects and mites. Eds. Burgess, H.D. and Hussey, N.W., pp. 407-444. Academic Press, London.
- Fréchette, B., Cormier, D., Guertin, C., 2009. Utilisation de *Beauveria bassiana* contre le charançon de la prune, *Conotrachelus nenuphar*, en verger de pommier. Centre de recherche agroalimentaire de Mirabel (CRAM).
- Fujiwara, M., Ichinomiya, M., Motoyama, T., Horiuchi, H., Ohta, A., Takagi, M., 2000. Evidence that the *Aspergillus nidulans* class I and class II chitin synthase gens, chsC and chsA, share critical roles in hyphal wall integrity and conidiophores development. Journal of Biochemistry, vol. 127, pp. 359-366.
- Fuxa, J.R., Kunimi, Y., 1997. Microorganisms interacting with insects. *In* Manual of Environmental Microbiology, pp. 509-519. Ed. Hurst, C.J., ASM Press, Washington, DC.
- Galani, G., 1988. Cultivation of some entomopathogenic fungi in liquid media with various initial pH values. Analele-Institutului-de-Cercetari-pentru-Protecta-Plantelor, vol. 21, p. 54.
- Gao, L., Sun, M.H., Liu, X.Z., Che, Y.S., 2007. Effects of carbon concentration and carbon to nitrogen ratio on the growth and sporulation of several biocontrol fungi. Mycological Research, vol. 111, pp. 87-92.
- Ghanem, N.B., Yusef, H.H., Mahrouse, H.K., 2000. Production of *Aspergillus terreus* xylanase in solid-state cultures: application of the Plackett-Burman experimental design to evaluate nutritional requirements. Bioresources Technology, vol. 73, pp. 113-121.
- Glare, T.R., Milner, R.J., 1991. Ecology of entomopathogenic fungi. *In* Arora, D.K., Ajello, L., Mukerji, K.G, eds. Handbook of Applied Mycology, Marvel Dekker Inc, New York, vol. 2, pp. 547-612.

- Godonou, I., James, B., Atcha-Ahowe, C., Vodouhe, S., Kooyman, C., Ahanchédé, A., Korie, S., 2009. Potential of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates from Benin to control *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae). Crop Protection, vol. 28, pp. 220-224.
- Goettel, M.S., Inglis, G.D., 1997. Fungi: Hyphomycetes. In Manual of Techniques in Insect Pathology. Ed. Lacey, L.A., pp. 213-249. Academic Press, London.
- Goettel, M.S., Inglis, G.D., Wraight, S.P., 2000. Fungi. In Field manual of techniques in invertebrate pathology. Eds. Lacey, L.A., Kaya, H.K., pp. 255-282. Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
- Goettel, M.S., Roberts, D.W., 1992. Mass production, formulation and field application of Entomopathogenic Fungi. In Biological Control of Locusts and Grasshoppers. Eds. Lomer, C.J. and Prior, C., pp. 230-238. Wallingford, Oxon, UK, CAB, International.
- Goettel, T.R., 1984. A simple method for mass culturing entomopathogenic Hyphomycetes fungi. Journal of Microbiological Methods, vol. 3, pp. 15-20.
- Gohel, V., Chaudhary, T., Vyas, P., Chhatpar, H.S., 2006. Statistical screening of medium components for the production of chitinase by the marine isolate *Pantoea dispersa*. Biochemical Engineering Journal, vol. 28, pp. 50-56.
- Gopalakrishnan, C., Anusuya, D., Narayanan, K., 1999. *In vitro* production of conidia of entomopathogenic fungus *Paecilomyces farinosus*. Entomology, vol. 24, pp. 389-392.
- Greathead, D.J., Kooyman, C., Launois-Luong, M.H., Popov, G.B., 1994. Les ennemis naturels des croquets du Sahel. Collection acrodologie opérationnelle, vol. 8, pp. 1-86.
- Grimm, C., 2001. Economic feasibility of a small-scale production plant for entomopathogenic fungi in Nicaragua. Crop Protection, vol. 20, pp. 623-630.
- Groden, E., Lockwood, J.L., 1991. Effects of soil fungistasis on *Beauveria bassiana* and its relationship to disease incidence on the Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata*, in Michigan and Rhode Island. Journal of Invertebrate Pathology, vol. 57, pp. 7-16.
- Gupta, S.C., Leathers, T.D., El-Sayed, G.N., Ignoffo, C.M., 1992. Insect cuticle-degrading enzymes from the entomogenous fungus *Beauveria bassiana*. Experimental Mycology, vol. 16, pp. 132-137.
- Gupta, N., Mehra, G., Gupta, R., 2004. A glycerol-inducible thermostable lipase from *Bacillus* sp.: medium optimization by a Plackett-Burman design and by response surface methodology. Canadian Journal of Microbiology, vol. 50, pp. 361-368.

- Hafez, M., Zaki, F.N., Moursy, A., Sabbour, M., 1994. Biological effects of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* on the potato tuber moth *Phthorimaea operculella* (Seller). Journal of Islamic Academic of Sciences, vol. 7(4): pp. 211-214.
- Hajek, A.E., St Leger, R.J., 1994. Interaction between fungal pathogens and insects host. Annual Reviews of Entomology, vol. 39, pp. 293-322.
- Hallsworth, J.E., Magan, N., 1996. Culture age, temperature, and pH after the polyol and trehalose contents of fungal propagules. Applied and Environmental Microbiology, vol. 62, pp. 2435-2442.
- Hallsworth, J.E., Magan, N., 1999. Water and temperature relation of growth of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces farinosus*. Journal of Invertebrate Pathology, vol. 74, pp. 261-266.
- Han, J.J., Yang, H.T., Rhee, J.S., 1998. Optimisation of reaction variables for sucrose monoester production using lipase in solvent free system by Taguchi's method. Biotechnology Techniques, vol. 12, pp. 295-299.
- Hegedus, D.D., Bidochka, M.J., Khachatourians, G.G., 1990. *Beauveria bassiana* submerged conidia production in a defined medium containing chitin, two hexosamines or glucose. Applied Microbiology and Biotechnology, vol. 33, pp. 641-647.
- Hegedus, D.D., Bidcohka, M.J., Miranpuri, G.G., Khachatourians, G.G., 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, vol. 36, pp. 785-789.
- Hunter, 1985. Statistical design applied to produce design. Journal of Quantity Technology, vol. 17, pp. 210-221.
- Hujanen, M., Linko, S., Linko, Y.Y., Leisola, M., 2001. Optimization of media and cultivation conditions for L(+)(S)-lactic acid production by *Lactobacillus casei* NRRL B-441. Applied Microbiology and Biotechnology, vol. 56, pp. 126-130.
- Ibrahim, Y.B., Low, W., 1993. Potential of mass production and field efficacy of isolates of the Entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* on *Plutella xylostella*. Journal of Invertebrate Pathology, vol. 39, pp. 222-232.
- Ichinomiya, M., Horiuchi, H., Ohta, A., 2002a. Different functions of the classI and classII chitin synthase genes, chsC and chsA, are revealed by repression of chsB expression in *Aspergillus nidulans*. Current Genetic, vol. 42, pp. 51-58.
- Ichinomiya, M., Motoyama, T., Fujiwara, M., Horiuchi, H., Ohta, A., 2002b. Repression of chsB expression reveals the functional importance of classIV chitin synthase gene

- chsD in hyphal growth and conidiation of *Aspergillus nidulans*. Microbiology, vol. 148, pp. 1335-1347.
- Ignoffo, C.M., 1992. Environmental factors affecting persistence of entomopathogens. Florida Entomology, vol. 75, pp. 516-525.
- Inglis, D.G., Goettel, S.M., Butt, M.T., Strasser, H., 2001. Use of hyphomycetous fungi for managing insect pests. In Fungi as Biocontrol agents, Progress, Problem and Potential. Eds. Butt, T.M., Jackson, C., and Magan, N., pp. 23-69. Oxon, UK: CAB International. ISBN 0-82478435-9.
- Iskandarov, U.S., Guzalova, A.G., Davranov, K.D., 2006. Effects of nutrient medium composition and temperature on the germination of conidia and the entomopathogenic activity of the fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. Applied Biochemistry and Microbiology, vol. 42, pp. 72-76.
- James, R.R., 2001. Effects of exogenous nutrients on conidial germination and virulence against the Silverleaf Whitefly for two hyphomycetes. Journal of Invertebrate Pathology, vol. 77, pp. 99-107.
- James, R.R., Buckner, J.S., Freeman, T.P., 2003. Cuticular lipids and silverleaf whitefly stage affect conidial germination of *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus*. Journal of Invertebrate Pathology, vol. 84, pp. 67-74.
- James, R.R., Shaffer, B.T., Croft, B.A., Lighthart, B., 1995. Field evaluations of *Beauveria bassiana*: its persistence and effects on the pea aphid and non-target coccinellid in alfalfa. Journal of Biocontrol Science and Technology, vol. 5, pp. 425-437.
- Jenkins, N.E., Heviefio, G., Langewald, J., Cherry, A.J., Lomer, C.J., 1998. Development of mass production technology for aerial conidia for use as mycopesticides. Biocontrol News and information, vol. 19, pp. 21-31.
- Kamp, A.M., Bidochka M.J., 2002. Conidium production by insect pathogenic fungi on commercially available agars. Letters in Applied Microbiology, vol. 35, pp. 74-77.
- Kaaya, G.P., Hassan, S., 2000. Entomogenous fungi as promising biopesticides for ticks control. Experimental and Applied Ascarology, vol. 24, pp. 913-926.
- Kang, W.S., Lee, H.S., Yoon, C.S., Kim, S.W., 2005. Conidia production by *Beauveria bassiana* (for the biocontrol of a diamondback moth) during solid-state fermentation in a packed-bed bioreactor. Biotechnological Letters, vol. 27, pp. 135-139.
- Khetan, S.K., 2001. Microbial Pest Control. New York, Basel: Marcel Dekker, 300 p.

- Kouassi, M., Coderre, D., Todorova, S., 2003. Compatibility of Zineb, dimethoate and *Beauveria bassiana* (balsamo) Vuillemin against tarnished plant bug (Hemiptera: Miridea). Journal of Entomological Science, vol. 38, pp. 359-367.
- Kouassi, M., 2004. Utilisation d'isolats du micro-champignon entomopathogène *Beauveria bassiana* (Deuteromycete : Moniliales) pour le contrôle efficace de la punaise terne, *Lygus lineolaris* (Palisot de Beauvois) (Hémiptère : Miridae) en cultrée de laitue et de céleri. Thèse du doctorat en sciences de l'environnement, UQAM, Montréal, Canada, 209p.
- Kreutz, J., Vaupel, O., Zimmerman, G., 2004. Efficacy of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. against the spruce bark beetle, *Ips topographus* L., in the laboratory under various conditions. JEN, vol. 218(6), pp. 384-389.
- Krueger, S.R., Nechols, J.R., Ramoska, W.A., 1991. Infection of Chinch plant bug, *Blissus leucopterus* (Hemiptera: Lygaeidae) adults from *Beauveria bassiana* conidia in soil under controlled temperature and moisture conditions. Journal of Invertebrate Pathology, vol. 58, pp. 19-26.
- Lacey, L.A., 1997. Manual of techniques in insect pathology. Academic Press, London, UK, 409 p.
- Lacey, L.A., Kaya, H.K., 2000. Field manual of techniques in invertebrate pathology. Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
- Lacey, L.A., Siegel, P.J., 2000. Safety and ecotoxicology of entomopathogenic bacteria. In Entomopathogenic bacteria: From laboratory to field application. Eds. Charles, J.F., Dellécluse, A., Nielsen-LeRoux, C., pp. 253-273. Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
- Lakshmi, S.M., Alagammai, P.L., Jayaraj, K., 2001. Studies on mass culturing of the entomopathogen whitehalo fungus *Verticillium lecanii* on three grain media and its inefficacy on *Helicoverpa armigera*, In Microbials in insect pest management, pp. 23-27. Eds. Igbachimuthu, S., Sen, S., Oxford and IBH publishing Pvt Ltd, New Delhi.
- Lazzarini, G.M.J., Rocha, L.F.N., Luz, C., 2006. Impact of moisture on *in vitro* of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* and their activity on *Triatoma infestans*. Mycological Research, vol. 110, pp. 485-492.
- Lee, S.Y., Nakajima, I., Ihara, F., Kinoshita, H., Nihira, T., 2005. Cultivation of entomopathogenic fungi for the search of antibacterial compounds. Mycopathologia, vol.160, pp. 321-325.
- Leland, E.J., McGuire, M.R., 2006. Effects of different *Beauveria bassiana* isolates on fields populations of *Lygus lineolaris* in pigweed (*Amaranthus* spp.). Biological Control, vol. 39, pp. 272-281.

- L'homme, B., Roux, J.C., 1991. Utilization of experimental design for optimization of *Rhizopus arrhizus* culture. Bioresource Technology, vol. 35, pp. 301-312.
- Lipa, J.J., 1975. White muscardine (*Beauveria* sp.). In: An outline of insect pathology. Foreign Sciences Publications. Dept NCSTEI, Warsaw, Poland, pp. 139-142.
- Liu, H., Bauer, L.S., 2006. Susceptibility of *Agrilus planipennis* (Coleoptera : Buprestidae) to *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. Journal of Economic Entomology, vol. 99(4), pp. 1096-1103.
- Liu, C., Liu, Y., Liao, W., Wen, Z., Chen, S., 2003. Application of statistically based experimental designs for the optimization of niacin production from whey. Biotechnology Letters, vol. 25, pp. 877-882.
- Lomer, C.J., Bateman, R.P., Johnson, D.L., Langewald, J., Thomas, M., 2001. Biological control of locusts and grasshoppers. Annual Review of Entomology, vol. 46, pp. 667-702.
- Luz, C., Fargues, J., 1997. Temperature and moisture requirement for conidial germination of an isolate of *Beauveria bassiana*, pathogenic to *Rhodnius prolixus*. Mycopathologia, vol. 138, pp. 117-125.
- Luz, C., Fargues, J., 1998. Factors affecting conidial production of *Beauveria bassiana* from fungus-killed cadavers of *Rhodnius prolixus*. Journal of Invertebrate Pathology, vol. 72, pp. 97-103.
- MacLeod, D.M., 1954. Investigations on the genera *Beauveria* Vuillemin and *Tritirachum* Limber. Canadian Journal of Botany, vol. 32, pp. 818-890.
- Maketon, M., Orosz-Coghlan, P., Hotaga, A., 2009. Laboratory and field evaluation of *Beauveria bassiana* for controlling Mulberry whitefly *Peaius mori* Takahashi Homoptera: Aleyrodidae) in mulberry (*Morus alba* L.). Journal of Pest Science, vol. 82, pp. 251-259.
- Mazumder, D., Puzari, K.C., Hazarika, L.K., 1995. Mass production of *Beauveria bassiana* and its potentiality on rice hispa. Indian Phytopathology, vol. 48: pp. 275-278.
- McCoy, C.W., 1990. Entomopathogenous fungi as microbial pesticides. In New directions in biological control: Alternative for suppressing agricultural pests and diseases. Eds. Baker, R.R. and Dunn, P.E., pp. 139-159. New York: Alain R. Liss.
- McCoy, C.W., Samson, R.A., Boucias, D.G., 1988. Entomogenous fungi. In Handbook of natural pesticides, Vol. V: Microbial insecticides, Partie A: Entomogenous protozoa and fungi. Eds. Ignoffo, C.M., Mandava, N.B. pp. 151-234. CRC Press, Boca Raton, USA.

- Miranpuri, GS, Khachaturian, GG, 1991. Infection of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in the larvae of the mosquito *Aedes aegypti*. Entomologia experimentalis et applicata, vol. 59, pp. 19-27.
- Moino, J.A., Alves, S.B., Pereira, R.M., 1998. Efficacy of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin isolates for control of stored-grain pests. Journal of Applied Entomology, vol. 122, pp. 301-305.
- Mondal, P., Bhattacharya, A.K., 2004. Assesment of different media for mass multiplication of entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin. Proceedings of Indian Natural Science Academic, vol.74, pp. 161-169.
- Montgomery, D.C., 2005. Design and analysis of experiments, sixth ed., Jonh Wiley & Sons Inc., New Jersey, United-States.
- Nelson, T. L., Low, A., Glare, T. R., 1996. Large scale production of New Zealand strains of *Beauveria* and *Metarhizium*, Proc. 49th New Zealand Plant Protection Conference, pp. 257-261.
- Padmavathi, J., Devi, K.U., Rao, U.M., 2003. The optimum and tolerance pH range of correlated to colonial morphology in isolates of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* – a potential biopesticide. World Journal of Microbiology and Biotechnology, vol. 19, pp. 469-477.
- Park, P.K., Cho, D.H., Kim, E.Y., Chu, K.H., 2005. Optimization of carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* using statistical experimental design. World Journal of Microbiology and Biotechnology, vol. 21: pp. 429-434.
- Park, Y.S., Kang, S.W., Lee, J.S., Hong, S.I., Kim, S.W., 2002. Xylanase production in solid state fermentation by *Aspergillus niger* mutants using statistical experimental designs. Applied Microbiology and Biotechnology, vol. 58: 761-766.
- Parker, B.L., Skinner, M., Costa, S.D., Gouili, S., Rreid, W., Bouhssini, E.M., 2003. Entomopathogenic fungi of *Eurygaster integriceps* Puton (Hemiptera: Scutelleridae) collection and characterization for development. Journal of Biological Control, vol. 27, pp. 260-272.
- Pěna, J.E., Osborne, L.S., Duncan, R.E., 1996. Potential of fungi as biocontrol agents of *Polyphagotarsonemus latus* (Acari: Tarsonemidae). Entomophagia, vol. 41, pp. 27-36.
- Peng, G., Hie, 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 Genetic, vol. 55, pp. 263-271.

- Pimentel, D., 1986. Status of integrated pest management. In Pimentel, D.: Some aspects of integrated pest management. Cornell University, Ithaca, N.Y.
- Posada-Florez, F., 2008. Production of *Beauveria bassiana* fungal spores on rice to control the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei*, in Colombia. Journal of insect Science, vol. 8(41), 13 p. ISSN: 1536-2442.
- Prakash, G.V.S.B., Padmaja, V., Kiran, R.R.S., 2008. Statistical optimization of process variables for the large-scale production of *Metarhizium anisopliae* conidiospores in solid-state fermentation. Bioresource Technology, vol. 99, pp. 1530-1537.
- Prazak, R., 1991. Studies on direct infection of *Trypodendron lineatum* Oliv. With *Beauveria bassiana* Bals. Vuill. Journal of Applied Entomology, vol. 111, pp. 431-441.
- Püntener, W., 1981. Manual for field trials in plant protection second edition. Agricultural Division, Ciba-Gegy Limited.
- Puzari, K.C., Sarmah, D.K., Hazarika, L.K., 1997. Medium for mass production of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin. Journal of Biological Control, vol. 11, pp. 97-100.
- Rath, A.C., 1992. *Metarhizium anisopliae* for control of the Tasmanian pasture scarab *Adoryphorus couloni*. In The use of pathogens in scarab pest management. Eds. Jackson, A.T. and Glare, R.T. pp. 217-227. Andover: Intercept Publications ISBN 0-94670735-9.
- Rath, A.C., Worledge, D., Koen, T.B., Rowe, B.A., 1995. Long-term field efficacy of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* against the subterranean scarab, *Adoryphorus coulini*. Biocontrol Science and Technology, vol. 5, pp. 439-451.
- Reddy, P.R.M., Reddy, G., Seenayya, G., 1999. Production of thermostable β -amylase and pullulanase by *Clostridium thermosulfurogenes* SV2 in solid-state fermentation: screening of nutrients using Plackett-Burman design. Bioprocess Engineering, vol. 21, pp. 175-179.
- Roberts, D.W., Hajek, A.E., 1992. Entomopathogenic fungi as bioinsecticides. In Frontier in industrial mycology. Ed. Leatham, G.F., pp. 144-159. Chapman and Hall, New York.
- Rombach, M.C., Aguda, R.M., Shepard, B.M., Robert, D.W., 1986. Entomopathogenic fungi (Deuteromycotina) in the control of the black bug of rice (Hemiptera: Pentatomidae). Journal of Invertebrate Pathology, vol. 48, pp. 174-179.
- Rutherford T.A., Mamiya Y., Webster J.M., 1987. Distribution of pine wilt disease with respect to temperature in North American, Japan, and Europe. Canadian Journal of Forest research, vol. 17, pp. 1050-1059.

- Sabbahi, R., 2008. Utilisation du champignon entomopathogène *Beauveria bassiana* dans une stratégie de gestion phytosanitaire des principaux insectes ravageurs en fraisiers. Thèse du doctorat en biologie, INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, Canada, 162 p.
- 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, vol. 132, pp. 124-134.
- Sabbahi, R., Merzouki, A., Guertin, C., 2008b. Efficacy of *Beauveria bassiana* against the strawberry pests, *Lygus lineolaris*, *Anthonomus signatus* and *Otiiorhynchus ovatus*. Journal of Applied Entomology, vol. 132, pp. 151-160.
- Sadhukhan, A.K., Ramana Muthy, M.V, Ajaya Kumar, R., Mohan, E.V.S., Vandana, G., Bhar, C., venkateswara Rao, K., 1999. Optimization of mycophenolic acid production in solid-state fermentation using response surface methodology. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, vol. 22, pp. 33-38.
- Safavi, S.A, Shah F.A., Pakdel, A.K., Rasoulion, G.R., Bandani, A.R., Butt T.M., 2007. Effect of nutrition on growth and virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. Microbiology Letters, vol. 270, pp. 116-123.
- Sahayaraj, K., Namasivayam, S.K.R., 2008. Mass production of entomopathogenic fungi using agricultural products and by products. African Journal of Biotechnology, vol. 7(12), pp. 1907-1919.
- Santa, H.S.D., Santa, O.R.D., Brand, D., Vandenberghe, L.P.S., Soccol, C.R., 2005. Spore Production of *Beauveria bassiana* From Agro-Industrial Residues. Brazilian Archives of Biology and Technology, vol. 48, pp. 51-60.
- Sato , H. Mitsuhashi, W., Shimazu, M., 1993. Effect of temperature on mycelia growth of three muscardine fungi. Trans. 44th Meet. Kanto Branch of the Japanese Forestry Society, pp. 103-104. (in Japanese)
- Sharma, S.P., Gupta, R.B.L., Yadava, C.P.S., 2002. Selection of a suitable medium for mass multiplication of entomofungal pathogens. Indian Journal of Entomology, vol. 14(1), pp. 255-261.
- Shashi, S., Gupta, R.B.L., Yadava, C.P.R., 1999. Mass multiplication and formulation of entomopathogenic fungi and efficacy against whitegrubs. Journal of Mycology and Plant Pathology, vol. 29, pp. 299-305.
- Shimazu, M., 2004. Effects of temperature on growth of *Beauveria bassiana* F- 263, a strain highly virulence to the Japanese pine sawyer, *Monochamus alternatus*, especially tolerance to high temperature. Applied Entomology and Zoology, vol. 39, no. 2, pp. 469-475.

- Shimazu, M., Sato, H., 1996. Media for selective isolation of an entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* Deuteromycotina, Hyphomycetes. Applied Entomology and Zoology, vol. 31, pp. 291-298.
- Sivasankaran, P., Eswaramoorthy, S., David, H., 1998. Influence of temperature and relative humidity on the growth, sporulation and pathogenicity of *Beauveria bassiana*. Journal of Biological Control, vol. 12, pp. 71-75
- Smith, R.J., Grula, E.A., 1981. Nutritional requirements for conidial germination and hyphal growth of *Beauveria bassiana*. Journal of Invertebrate Pathology, vol. 37, pp. 222-230.
- Soccol, C.R., Ayala, L.A., Soccol, V.T., Krueger, N., Santos, H.R., 1997. Spore production by entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* from declassified potato by solid-state fermentation. Annual Review of Microbiology, vol. 28, pp. 34-42.
- Soares, R.P.P., Turco, S.J., 2003. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): a review. Annals of the Brazilian Academy of Sciences, vol. 75(3) : pp. 301-330.
- Starnes, R.L., Liu, C.L., Marrone, P.G., 1993. History, use and future of microbial insecticides. American Entomology, vol. 39, pp. 83-91.
- Steinkratus, D.C., Slaymaker, P.H., 1994. Effect of temperature and humidity on formation, germination and infectivity of conidia of *Neogyzites fresenii* (Zygomycetes: Neozygitaceae) from *Alphis gossypii* (Homoptera: Aphididae). Journal of Invertebrate Pathology, vol. 64, pp. 130-137.
- St Leger, R.J., 1991. Integument as a barrier to microbial infections. In The Physiology of insect epidermis. Eds. Retnakaran, A., Binnington, K., pp. 286-308. CSIRO, Australia.
- St Leger, R.J., 1993. Biology and mechanisms of insects-cuticle invasion by deuteromycete fungal pathogens. In Parasites and Pathogens of insects (vol. 2). Eds. Beckage, N.E., Thompson, S.N., Federici, B.A., pp. 211-225. Academic press Inc., New York, USA.
- St Leger, R., 1995. The role of cuticle-degrading proteases in fungal pathogenesis of insects. Canadian Journal of Botany, vol. 73(1), pp. S1119-S1125.
- St Leger, R.J., Bidochka, M.J., Roberts, D.W., 1994. Germination triggers of *Metarhizium anisopliae* conidia are related to host species. Microbiology, vol. 140, pp. 1651-1660.

- St Leger, R.J., Butt, T.M., Goettel, M.S., Staples, R.C., Roberts, D.W., 1989. Production *in vitro* of appressoria by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. Experimental Mycology, vol. 13, pp. 274-288.
- St Leger, R.J., Cooper, R.M., Charnley, A.K., 1987. Production of cuticle-degrading enzymes by the entomopathogen *Metarhizium anisopliae* during infection of cuticles from *Calliphora vomitoria* and *Manduca sexta*. Journal of Genetic Microbiology, vol. 133, pp. 1371-1382.
- St Leger, R.J., Joshi, L., Bodochka, M.J., Rizzo, N.W., Roberts, D.W., 1996. Biochemical characterization and ultrastructural localization of two extracellular trypsins produced by *Metarhizium anisopliae* in infected insect cuticles. Applied Environmental Microbiology, vol. 62, pp. 1257-1264.
- St Leger, R.J., Lacetti, L.B., Staples, R.C., Robert, D.W., 1990. Protein Kynases in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. Journal of Genetic Microbiology, vol. 136, pp. 1401-1411.
- Strasser, H., Vey, A., Butt, T., 2000. Are there any risks in using entomopathogenic fungi for pest control, in particular reference to the bioactive metabolites of *Metarhizium*, *Tolyptocladium* and *Beauveria* species? Biocontrol Science and Technology, vol. 18, pp. 717-735.
- Suamant, P., Qasim, K.B., Rani, G., 2002. Optimization of alkaline protease from *Bacillus* sp. By response surface methodology. Current Microbiology, vol. 44, pp. 286-290.
- Sunitha, I., Subba Rao, M.V., Ayyanna, C., 1998. Optimization of medium constituents and fermentation conditions for the production of L-glutamic acid by the co-immobilized whole cells of *Micrococcus glutamicus* and *Pseudomonas reptilivora*. Bioprocess Engineering, vol. 18, pp. 353-359.
- Suresh, P.V., Chandrasekaran, M., 1998. Utilization of prawn waste for chitinase production by the marine fungus *Beauveria bassiana* by solid state fermentation. World Journal of Microbiology and Biotechnology, vol. 14, pp. 655-660.
- Suresh, P.V., Chandrasekaran, M., 1999. Impact of process on chitinase production by an alkalophilic marine *Beauveria bassiana* in solid state fermentation. Process Biochemistry, vol. 34, pp. 257-267.
- Sweeney, J., Thurston, G., Lavallée, R.; Trudel, R., Desrochers, P., Cote, C., Guertin, C., Todorova, S., Kope, H.H., Alfaro, R., 2005. *Beauveria bassiana* for control of the brown spruce longhorn beetle, *Tetropium fuscum* (Fabr.) (Coleoptera: Cerambycidae). In General Technical Report NE-337. Department of Agriculture interagency research forum on gypsy moth and other invasive species 2005; 2005 January 18-21; Annapolis, MD. Ed. Gottschalk, Kurt W., Proceedings 16th U.S. Newtown Square,

- PA: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Northeastern Research Station: 82.
- Szewczyk, B., Hoyos-Carvajal, L., Paluszek, M., Skrzecz, I., Lobo de Souza, M., 2006. Baculovirus-re-emerging biopesticides. Biotechnology Advances, vol. 24, pp. 142-160.
- Talaei-hassanloui, R., Kharazi-pakdel, A., Goettel, M.S., Little, S., Mozaffari, J., 2007. Germination polarity of *Beauveria bassiana* conidia and its possible correlation with virulence. Journal of Invertebrate Pathology, vol. 94, pp. 102-107.
- Tanada, Y., Kaya, H.K. 1993. Insect Pathology. pp. 414-458. Academic Press, Inc., San Diego, CA.
- Tarocco, F., Lecuona, R., Couto, S.A., Arcas, A.J., 2005. Optimization of erythritol and glycerol accumulation in conidia of *Beauveria bassiana* by solid-state fermentation, using response surface methodology. Applied Microbiology Biotechnology, vol. 68, pp. 481-488.
- Tatchell, G.M., 1997. Microbial insecticides and IPM: current and future opportunities for the use of biopesticides. In Microbial insecticides: Novelty or Necessity? Ed. Evans, H.F., pp. 191-200. British Crop Protection Council, Farnham.
- Thompson, S.R., Brandenburg, R.L., Arends, J.J., 2006. Impact of moisture and UV degradation *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin conidial viability in turfgrass. Biological Control, vol. 39, pp. 401-407.
- Trudel, R., Lavallée, R., Guertin, C., Côté, C., Todorava, S.T., Alfaro, R., Kope, H., 2007. Potential of *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes : Moniliales) for controlling the white pine weevil, *Pissodes strobe* (Coleoptera: Curculinidae). Journal of Applied Entomology, vol. 131(2), pp. 90-97.
- Vaidya, R., Vyas, P., Chhatpar, H.S., 2003. Statistical optimization of medium components for the production of chitinase by *Alcaligenes xylosoxydans*. Enzyme and Microbial Technology, vol. 33(1), pp. 92-96.
- Van Winkelkoff, A.K., McCoy, C.W., 1984. Conidiation of *Hirsutella thompsonii* var. *synnematos* in submerged culture. Journal of Invertebrate Pathology, vol. 37, pp. 222-230.
- Vega, F.E., Jackson, M.A., Mercadier, G., Poprawski, T.J., 2003. The impact of nutrition on spore yields for various fungal entomopathogens in liquid culture. World Journal of Microbiology and Technology, vol. 19, pp. 363-368.

- Vey, A., Hoagland, R., Butt, T.M., 2001. Toxic metabolites of fungal biocontrol agents. *In Fungi as biocontrol agents*. Eds. Butt, T.M., Jackson, C.W., Magan, N., pp. 311-345. CAB International, Wallingford, UK.
- Viaud, M., Couteaudier, Y., Levis, C., Riba, G., 1996. Genome organization in *Beauveria bassiana*: Electrophoretic karyotype, gene mapping, and telomeric fingerprint. *Fungal Genetic and Biology*, vol. 20(3), pp. 75–183.
- Walstad, J.D., Anderson, R.F., Stambauch, W.J., 1970. Effect of environmental conditions on two species of muscardine fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, vol. 16, pp. 221-226.
- Wang, C.S., Li, N.C., Li, Z.Z., Wang, L., Ma, S., 1999. Grey relational assessment on control efficacies of different formulations of *Beauveria bassiana* against *Dendrolimus punctatus*. *Chinese Journal of Biological Control*, vol. 15, pp. 16–18.
- Weiser, J., Matha, V., 1998. The insecticidal activity of cyclosporines on mosquito larvae. *Journal of Invertebrate Pathology*, vol. 51, pp. 92-93.
- Wojda, I., Kowalski, P., Jakubowicz, T., 2009. Humoral immune response of *Galleria mellonella* after infection by *Beauveria bassiana* under optimal and heat-shock conditions. *Journal of Insect Physiology*, vol. 55(6), pp. 525-531.
- Wright, J.E., Chandler, L.D., 1991. Laboratory evaluation of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* against the boll weevil (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, vol. 58, pp. 448-449.
- Xu, Y., Orozco, R., Kithsiri, K., Leslie Gunatilaka, A.A., Patricia Stock, S., Molna, I., 2008. Biosynthesis of the cyclooligomer depsipeptide Beauvericin, a virulence factor of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Chemistry and Biology*, vol. 15(9), pp. 898-907.
- Ying, S.H., Feng, M.G., 2006. Medium components and culture conditions affect the thermotolerance of aerial conidial of fungal biocontrol agent *Beauveria bassiana*. *Letters of Applied Microbiology*, vol. 43, pp.331-335.
- Yun, J.S., 2003. Studies on entomopathogenic fungi isolated from dead pine Caterpillars, *Dendrolimus spectabilis*. *Korean Journal of Entomology*, vol. 33(4), pp. 247-252.
- Zhang, Y.J., Li, Z.H., Luo, Z.B., Zhang, J.Q., Fan, Y.H., Pei, Y., 2009. Light stimulates conidiation of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Biocontrol Science and Technology*, vol. 19, pp. 91-101.
- Zhang, J., Marcin, C., Shifflet, M.A., Salmon, P., Brix, T., Greasham, R., Buikland, B., Chartrain, M., 1996. Development of a defined medium fermentation process for

phytotigmine production by *Streptomyces griseofuscus*. Applied Microbiology and Biotechnology, vol. 44, pp. 568-575.