



**HAL**  
open science

# Diversité et phylogénie de quelques genres et espèces d'hyphomycètes entomopathogènes

Malalanirina Sylvia Rakotonirainy

## ► To cite this version:

Malalanirina Sylvia Rakotonirainy. Diversité et phylogénie de quelques genres et espèces d'hyphomycètes entomopathogènes. Systématique, phylogénie et taxonomie. Université Paris 13 - Orsay, 1990. Français. NNT: . tel-03139800

**HAL Id: tel-03139800**

**<https://hal.science/tel-03139800v1>**

Submitted on 12 Feb 2021

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

n° d'ordre  
ORSAY

UNIVERSITE DE PARIS SUD  
CENTRE D'ORSAY

# THESE

présentée  
pour obtenir

Le titre de Docteur en Sciences

par

**Malalanirina Sylvia RAKOTONIRAINY**

## **DIVERSITE ET PHYLOGENIE DE QUELQUES GENRES ET ESPECES D'HYPHOMYCETES ENTOMOPATHOGENES**

soutenue le 21 Décembre 1990 devant la Commission d'examen

MM DRON M. Président

BRYGOOY.

RIBA G.

Mme ROQUEBERT M.F.

M. SOLIGNAC M.

*AVANT PROPOS*

C'est avec un grand plaisir que j'exprime mes vifs remerciements et ma profonde reconnaissance à tous ceux qui m'ont encouragée et apporté leur soutien pour la réalisation de ce travail.

Mes remerciements s'adressent:

à M. RIBA G. (laboratoire de recherches en lutte biologique. La Minière) qui m'a intégré dans son équipe. Je tiens à lui exprimer ma profonde reconnaissance pour sa patience, son appui scientifique ainsi que pour sa confiance.

à M. BRYGOO Y. (laboratoire de cryptogamie. Orsay) qui m'a chaleureusement ouvert les portes de son laboratoire pour que je puisse y effectuer une grande partie de mon travail. Je lui exprime ma déférente gratitude pour son soutien permanent aussi bien moral, scientifique que financier.

à toute l'équipe de la Minière: A. AIOUN, C. CORMENIER, D. FORTINI, A. LOISEAU, P. MAURER, P. MOLLIER, C. SILVY, C. ZAHND, J. LAGNEL, A. LEREEC, M. MARCHAL, P. ROBERT, J.F. SILVAIN, pour leur fidèle amitié, leurs encouragements, leur constante bonne humeur et surtout pour l'ambiance agréablement détendue qu'ils ont su créer et préserver dans le laboratoire.

à Mlle DUTERTRE M. (laboratoire de cryptogamie. Orsay) pour sa gentillesse et sa disponibilité. Son immense aide a beaucoup facilité mon travail.

à Mme ROQUEBERT M.F. (laboratoire de cryptogamie. Muséum d'histoire naturelle de Paris) qui m'a apporté des conseils et d'excellentes critiques au cours de longues conversations fructueuses et amicales. J'ai été particulièrement sensible à la très grande disponibilité dont elle a fait preuve à mon égard.

à Mme CARIOU M.L. (laboratoire de génétique évolutive. CNRS. Gif-sur-Yvette) qui a manifesté beaucoup d'intérêt pour mon travail et qui m'a fait bénéficier de sa grande compétence en biochimie.

à M. GAUTHIER J.P.(laboratoire de génétique évolutive.Gif-sur-Yvette) qui a beaucoup donné de son temps dans le traitement des données enzymatiques. Je lui exprime mes vifs remerciements car je sais que ce ne fut pas une partie d'amusement.

à M. J.F. LAFAY (laboratoire de cryptogamie. Orsay) qui m'a initié au traitement informatique des données moléculaires et qui m'a constamment apporté son aide.

à M. SOLIGNAC M.(laboratoire de génétique évolutive.Gif-sur-Yvette) qui m'a amicalement apporté son aide et qui a bien voulu faire partie du jury.

à M. DRON M.(laboratoire de cryptogamie. Orsay) qui m'a fait l'honneur d'assumer la présidence du jury. Je lui exprime mes sincères remerciements.

à toutes les personnes du laboratoire de cryptogamie d'Orsay qui m'ont encouragé et soutenu tout au long de ce travail

# TABLE DES MATIERES

## A. INTRODUCTION GENERALE

	Pages
<b>A.I. <u>Les champignons entomopathogènes</u></b> .....	2
A.I.1. Cycle de développement.....	6
A.I.2. Classification des Hyphomycètes entomopathogènes.....	12
<b>A.II. <u>Caractéristiques et historique des différents genres</u></b>	
A.II.1. Le genre <i>Beauveria</i> Vuillemin	
a -Description morphologique.....	19
b -Historique du genre <i>Beauveria</i> .....	19
c - Biologie du genre <i>Beauveria</i> .....	20
A.II.2. Le genre <i>Microhilum</i> Yip et Rath	
a - Description morphologique.....	25
b - Historique de l'espèce <i>M. oncoperae</i> .....	25
c - Biologie de l'espèce <i>M. oncoperae</i> .....	27
A.II.3. Le genre <i>Tolypocladium</i> Gams	
a - Description morphologique.....	27
b - Historique du genre <i>Tolypocladium</i> .....	29
c - Biologie des espèces entomopathogènes de <i>Tolypocladium</i> ....	29
A.II.4. Le genre <i>Metarhizium</i> Sorokin	
a - Description morphologique.....	31
b - Historique du genre <i>Metarhizium</i> .....	33
c - Biologie du genre <i>Metarhizium</i> .....	33
A.II.5. Le genre <i>Nomuraea</i> Maublanc	
a - Description morphologique.....	37
b - Historique du genre <i>Nomuraea</i> .....	39
c - Biologie de l'espèce <i>N. rileyi</i> .....	39

A.II.6. Le genre <i>Paecilomyces</i> Bainier	
a - Description morphologique.....	4 1
b - Historique du genre <i>Paecilomyces</i> .....	4 3
c - Biologie des espèces <i>P. farinosus</i> et <i>P. fumosoroseus</i> .....	4 5
A.II.7. Le genre <i>Verticillium</i> Nees	
a - Description morphologique.....	4 5
b - Historique de l'espèce <i>V. lecanii</i> .....	4 7
c - Biologie de l'espèce <i>V. lecanii</i> .....	4 7

## B. MATERIELS ET METHODES

### **B.I. Méthodes d'analyse des ARNr et des ADNr 28S**

B.I.1. Choix des ARNr 28S.....	5 3
B.I.2. Culture des champignons.....	5 7
B.I.3. Analyse des ARNr 28S	
a - Extraction de l'ARNr.....	6 1
b - Dosage et contrôle de pureté de l'ARN.....	6 1
c - Technique de séquençage.....	6 3
d - Electrophorèse en gel de polyacrylamide.....	6 3
c - Problèmes rencontrés : la route vers le PCR.....	6 5
B.I.4. Analyse de l'ADNr	
a - Extraction de l'ADNr.....	6 7
b - Technique du PCR.....	6 7
c - Technique de séquençage de l'ADN.....	6 8

### **B.II. Méthodes d'analyse des isoenzymes**

B.II.1. Choix de la technique.....	6 8
B.II.2. Culture des champignons.....	7 1
B.II.3. Extraction des protéines.....	7 1
B.II.4. Electrophorèse en gel d'amidon	
a - Fabrication des gels.....	7 1
b - Conditions de migration.....	7 2
B.II.5. Les systèmes enzymatiques étudiés.....	7 2
B.II.6. Révélation des activités enzymatiques.....	7 3

### **B.III. Méthodes d'analyse des résultats**

B.III.1. Analyse phylogénétique des séquences d'acides nucléiques.....	73
B.III.2. Classification par l'analyse des zymogrammes.....	75

## **C. ETUDE DE LA VARIABILITE GENETIQUE : IMPLICATIONS PHYLOGENETIQUES**

### **C.I. Diversité des genres et espèces d'Hyphomycètes entomopathogènes**

C.I.1. Polymorphisme de quelques espèces de <i>Beauveria</i>	
a - Analyse des séquences d'ARNr 28S.....	78
b - Phylogénie établie par les séquences d'ARNr 28S	
b.a- Analyse par la méthode de FITCH .....	82
b.b- Analyse par parcimonie.....	84
c - Analyse enzymatique.....	84
d - Classification établie par comparaison des zymogrammes....	86
e - Etude comparative entre les différents types de classification dans le genre <i>Beauveria</i> .....	86
C.I.2. Polymorphisme du genre <i>Tolyocladium</i> .....	90
C.I.3. Polymorphisme du genre <i>Metarhizium</i>	
a - Analyse des séquences d'acides nucléiques.....	94
b - Phylogénie établie par les séquences d'ARNr 28S	
b.a-Analyse par la méthode de FITCH.....	97
b.b- Analyse par parcimonie.....	99
c - Analyse enzymatique.....	99
d - Classification établie par l'analyse enzymatique.....	101
e - Etude comparative des différentes classifications dans le genre <i>Metarhizium</i> .....	103
C.I.3. Polymorphisme de l'espèce <i>Nomuraea rileyi</i> .....	103
C.I.4. Polymorphisme de deux espèces de <i>Paecilomyces</i>	
a - Analyse des séquences d'ARNr.....	107
b - Relations phylétiques entre les deux espèces étudiées.....	107
c - Analyse enzymatique.....	111
d - Classification biochimique .....	111
e - Etude comparative entre les différentes classifications des espèces de <i>Paecilomyces</i> .....	115

C.I.5. Polymorphisme de l'espèce <i>Verticillium lecanii</i> .....	115
--	-----

**C.II. Phylogénie des genres et espèces d'Hyphomycètes entomopathogènes**

C.II.1. Classification par les comparaisons de séquences d'ARNr	
a - Analyse par la méthode de FITCH.....	119
b - Analyse par la méthode du NEIGHBOR-JOINING.....	123

C.II.2. Classification par comparaison des zymogrammes	
a - Classification par la méthode des nuées dynamiques.....	127
b - Classification par UPGMA.....	129

**C.III. Analyse comparative entre les différentes classifications** 129

**C.IV. Contribution à l'identification des espèces de position systématique incertaine**

C.IV.1. Descriptions morphologiques.....	133
--	-----

C.IV.2. Systématique des souches recharacterisées	
a - Analyse par la méthode du Neighbor-joining.....	139
b - Analyse par les isoenzymes.....	144

**D.POSITIONNEMENT DES HYPHOMYCETES ENTOMOPATHOGENES PAR RAPPORT A DES SOUCHES DONT LA FORME SEXUEE EST CONNUE.....** 145

**E. DISCUSSION ET CONCLUSIONS**

E.I. <u>Délimitation des espèces du genre <i>Metarhizium</i></u> .....	151
E.II. <u>Délimitation des espèces du genre <i>Beauveria</i></u> .....	152
E.III. <u>Délimitation des espèces du genre <i>Paecilomyces</i></u> .....	153
E.IV. <u>Avantages et limites des différentes méthodes de classification</u> .....	153

## **ANNEXE I**

**ZYMOGRAMMES DES DIFFERENTES SOUCHES..... 157**

## **ANNEXE II**

**MATRICES DE DISTANCES DE L'ANALYSE BIOCHIMIQUE, DONNEES  
ENZYMATIQUES..... 166**

## **ANNEXE III**

**PROTOCOLES, MILIEUX, SOLUTIONS ET TAMPONS..... 172**

**REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES..... 183**

## Summary

The study of the genetic variability of some genera and species of entomogenous Hyphomycetes and their phyletic relationships, has been undertaken by the comparison of the rRNA 28S sequences and the analysis of isozymes. Different methods of analysis have been used in order to constructing trees: Fitch, parsimony and Neighbor-joining for the rRNA sequences; dynamic clustering and UPGMA for isozymes.

Original results have been obtained:

- the burst of the genera *Tolypocladium* and *Paecilomyces*
- the phyletic proximity of *N. rileyi* and the genus *Metarhizium*, of *M. oncoperae* and the genus *Beauveria*
- the total separation of the genus *Tolypocladium* and *Beauveria*
- the uniformity of the species: *B. bassiana*, *B. velata*, *N. rileyi*, *V. lecanii*, *P. farinosus* and *T. cylindrosporum*
- the relative heterogeneity of the species: *M. anisopliae*, *B. brongniartii* and *P. fumosoroseus*
- the strict homology of the sequence of *B. sulfurescens* and *B. bassiana*.

Moreover, we have confirmed the divergence of the strains of *M. anisopliae* variety major and we demonstrated the originality of the strains originating from New Zealand. At least, this study allowed better understanding of the relationship between entomogenous species and phytopathogenic species.

**A. INTRODUCTION GENERALE**

Actuellement, pour combattre les ravageurs des cultures, on utilise essentiellement des produits phytosanitaires chimiques. Malgré leur indéniable efficacité, ces produits, appliqués systématiquement dans les programmes de traitement, ont appauvri à outrance une partie de la faune et de la flore auxiliaires, régulatrices naturelles des écosystèmes, favorisant ainsi le développement des nuisibles. Cette situation singulière entraîne donc une spirale de dépendance aux pesticides chimiques. Face aux grands problèmes que sont le devenir de notre alimentation et la protection de notre environnement, il est souhaitable et vital de trouver une alternative aux produits agrochimiques. En effet, il faut non seulement réduire leur utilisation, mais aussi, réintégrer les organismes auxiliaires, afin de rééquilibrer les chaînes trophiques naturelles.

Pour ce faire, la lutte biologique, définie par l'OILB (Organisation Internationale de Lutte Biologique) comme étant "l'utilisation d'organismes vivants ou de leurs produits pour empêcher ou réduire les pertes ou dommages causés par des organismes nuisibles", est, nous semble-t-il, en mesure de fournir des solutions adéquates. Parmi ses nombreux avantages, notons la grande spécificité des organismes utilisés. Malheureusement, malgré quelques succès, sa mise en pratique n'est pas réellement effective; en particulier en ce qui concerne les champignons entomopathogènes, car nous manquons encore de connaissances sur la dynamique des populations de nuisibles et de leurs antagonistes, ainsi que sur les facteurs influençant cette dynamique et sur les relations qu'entretiennent entre elles ces deux populations. Pour mieux gérer la lutte biologique, il est nécessaire de connaître les différents potentiels des organismes candidats; cette connaissance passe, entre autres, par l'analyse de leur variabilité génétique.

C'est ainsi qu'apparaît la nécessité d'une caractérisation plus fine des souches:

- d'une part pour discriminer les différents génotypes sympatriques dans une étude populationnelle de souches.

- d'autre part, pour apprécier les distances génétiques entre souches de la même espèce et entre espèces et genres différents.

En effet, fréquemment, pour identifier des isolats, les pathologistes d'insectes utilisent des critères macroscopiques, physiologiques et pathologiques. Malheureusement, ceux-ci s'avèrent parfois insuffisants et par conséquent, l'identification incertaine.

De nouvelles techniques très performantes peuvent être utilisées pour des études taxonomiques ainsi que pour la caractérisation des organismes.

Nous entreprenons ici l'analyse de la variabilité génétique de quelques Champignons entomopathogènes avec les critères suivants:

- morphologique.
- biochimique : afin d'apporter une contribution supplémentaire à la caractérisation des espèces, l'estimation de la variabilité génétique a été abordée par l'analyse du polymorphisme électrophorétique des enzymes .
- moléculaire : analyse des séquences d'ARNr 28S

A l'issue des résultats:

- nous discuterons de l'utilisation des divers caractères à des fins d'identification des souches.
- nous établirons des phylogénies fondées sur l'étude des caractères appropriés et nous les comparerons.
- nous confronterons les résultats à la classification classique.

Enfin, nous apportons ici notre contribution à la détermination de quelques souches (d'identification incertaine) isolées à partir d'insectes, par l'analyse conjuguée des séquences d'ARNr, des isoenzymes et de la morphologie. Il est aujourd'hui impératif d'asseoir les bases de nouvelles définitions de l'espèce et du genre pour les organismes dépourvus de reproduction sexuée. Nous tenterons une approche de la définition des espèces et des variétés d'entomopathogènes.

### **A.I. Les Champignons entomopathogènes**

Les liens pathologiques qu'entretiennent les Champignons avec les Insectes sont connus depuis longtemps. Bassi (1835) est le premier à avoir identifié la Muscardine qui est l'une des plus sévères maladies du Ver à soie (*Bombyx mori* Linné), provoquée par *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin. Le concept de muscardine s'est étendu par la suite à d'autres mycoses provoquées par les Hyphomycètes, présentant un symptôme post-mortem suivant lequel le cadavre de l'hôte est momifié avec ou non émission de pigments par le mycélium. Suivant la couleur de la sporée, on nomme

**Tableau 1 : Les différentes stratégies de contrôle biologique:  
quelques exemples**

Stratégie	Agent entomopathogène	Insecte	Culture
Acclimatation	<i>Entomophthora</i>	Aphides	Cultures protégées
Traitement préventif	<i>Nomuraea rileyi</i>	<i>Anticarsia gemmatilis</i>	Soja
	<i>Verticillium lecanii</i>	<i>Trialeurodes vaporariorum</i>	Cultures sous serre
Traitement curatif	<i>Beauveria bassiana</i>	<i>Ostrinia nubilalis</i>	Maïs
		<i>Mahanarva posticata</i>	Canne à sucre
	<i>Metarhizium anisopliae</i>	<i>Nilaparvata lugens</i>	Riz
	<i>Beauveria brongniartii</i>	<i>Otiorhynchus sulcatus</i>	Cultures sous serre

généralement muscardine blanche les mycoses à *Beauveria*, muscardine verte les mycoses à *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin, et muscardine rouge les mycoses à *Sorospora uvella*.

Les champignons entomopathogènes jouent un rôle important dans la régulation naturelle de populations d'insectes. Les épizooties de maladies d'insectes provoquées par des champignons sont relativement communes dans la nature et peuvent être parfois spectaculaires. C'est à partir de l'observation de ces épizooties qu'est né le concept de lutte microbiologique. Les premières tentatives de contrôle cryptogamique d'insectes ravageurs de culture sont dues à Metschnikoff (1879) qui avait découvert la muscardine verte provoquée par *Metarhizium anisopliae*, sur des larves de scarabées du blé. Il avait trouvé une méthode de multiplication et de dissémination du pathogène. En 1888, Krassilstchik donna la preuve pratique de cette lutte microbiologique, en provoquant le développement de la muscardine verte dans les populations de *Cleonus punctiventris* Germar, ravageur de la betterave. Ceci suscita l'enthousiasme de nombreux entomologistes de l'époque, car les moyens de lutte contre les ravageurs de culture étaient alors aussi limités qu'inefficaces. Depuis lors, de nombreuses études ont été entreprises tant sur les différents processus pathologiques et écologiques qui favorisent le développement des mycoses que sur les différentes modalités d'application et d'action des pathogènes.

Les nombreuses expérimentations des dernières décennies permettent de défendre trois stratégies principales d'interventions avec des champignons entomopathogènes:

- l'acclimatation d'une souche: c'est l'introduction d'une souche exotique, qui se maintiendra pendant plusieurs générations, en jugulant la population cible en dessous de son seuil de tolérance économique.

- le traitement préventif, dont l'objectif est d'anticiper une épizootie qui se serait probablement déclenchée trop tardivement dans les conditions naturelles. Il consiste en l'introduction précoce d'une quantité réduite d'inoculum qui se multiplierait suffisamment avant l'épizootie naturelle.

- le traitement curatif enfin consiste en l'apport massif d'un inoculum qui décimera brutalement la population de ravageurs, pour disparaître par la suite.

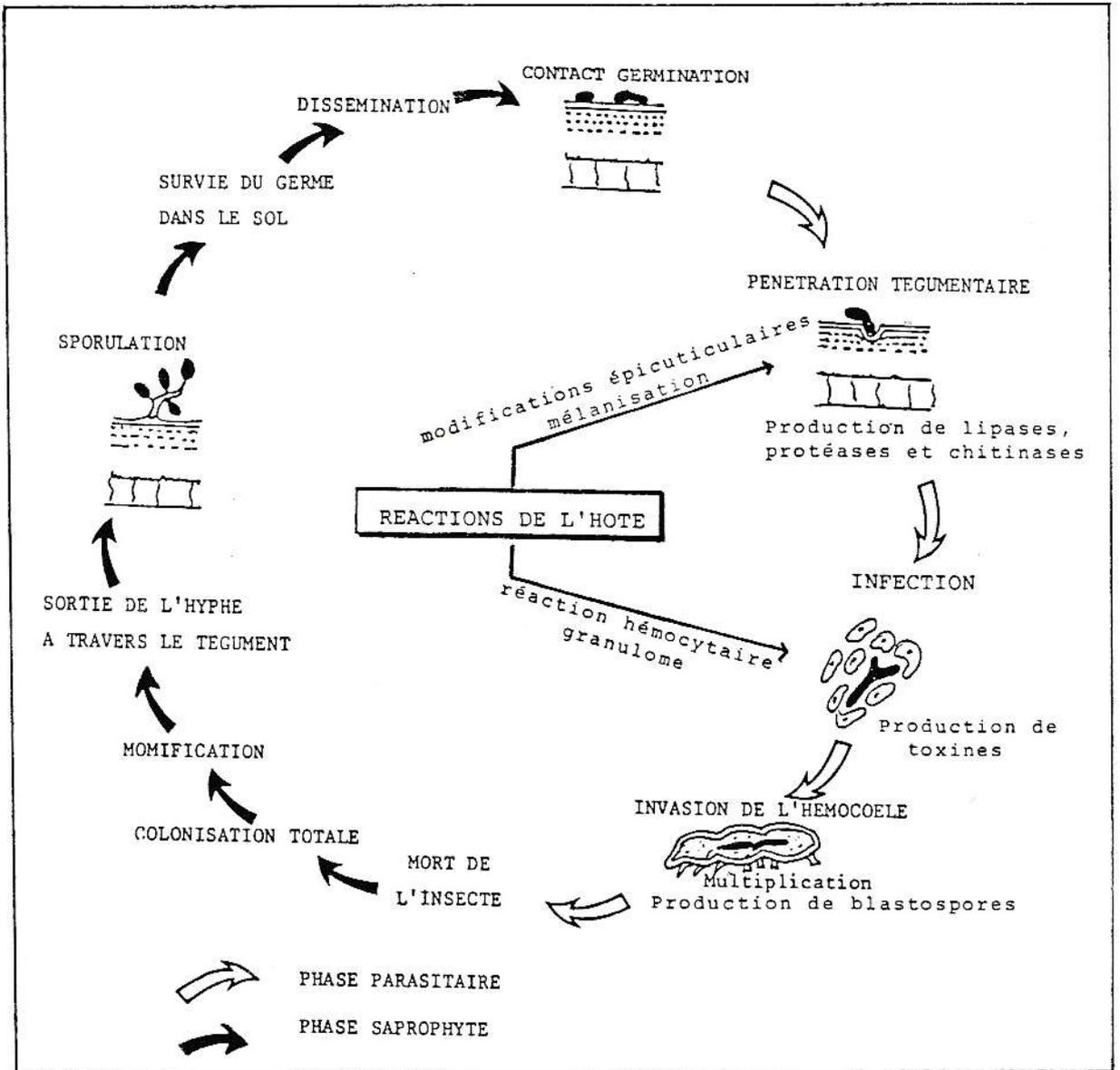


Figure 1 : Cycle de développement d'un Hyphomycète entomopathogène

Trop souvent décevants, mais parfois prometteurs, les procédés de lutte mycologique ont été suffisamment répétés dans l'espace et dans le temps, pour que l'on puisse aujourd'hui préciser les cas où l'efficacité agro-économique et la fiabilité sont suffisantes, pour envisager un développement industriel (Tableau 1).

Ces espèces entomopathogènes appartiennent à plusieurs genres dont les plus importants sont: *Beauveria*, *Paecilomyces*, *Metarhizium*, *Nomuraea*, *Isaria*, *Gibellula*, *Aspergillus*, *Verticillium*, *Acremonium*, *Sporotrichum* etc... Ces pathogènes sont trouvés sur des insectes hôtes de toutes les niches écologiques. Dans cette étude, sept genres seront considérés: *Beauveria*, *Paecilomyces*, *Verticillium*, *Nomuraea*, *Tolypocladium*, *Microhilum* et *Metarhizium*, qui sont des endoparasites nécrotrophes facultatifs. Les souches analysées sont des souches d'origines édaphique et géographique diverses. (Tableau 19).

#### A.1.1. Cycle de développement

Les endoparasites nécrotrophes peuvent pénétrer de différentes façons dans l'insecte hôte:

- par pénétration directe au travers du tégument
- à travers le tube digestif
- par les orifices naturels
- par des blessures

La pénétration par le tégument est le mode d'entrée le plus fréquemment exploité par les Hyphomycètes. Pour *Tolypocladium cylindrosporum* Gams, il a été montré qu'en plus de l'invasion tégumentaire, il peut aussi infester les larves de moustiques par l'intermédiaire du mésentéron (Soares, 1982).

Le cycle de développement (figure.1) des Hyphomycètes entomopathogènes étudiés ici comporte deux phases:

- une phase parasitaire s'effectuant en deux étapes:
  - + l'adhésion et la germination des spores sur la cuticule de l'hôte
  - + la pénétration du tégument par un tube germinatif
- une phase saprophyte qui correspond au développement du champignon dans le cadavre de l'insecte .

Tableau 2 : Les substances toxiques de faibles poids moléculaires

Genre	Espèce	Toxines
<i>Beauveria</i>	<i>B. bassiana</i>	Beauvericine Bassianolide
	<i>B. brongniartii</i> <i>B. bassiana</i>	Beauverolides H, I Isarolides A, B, C Tenelline, Bassianine Oosporéine Acide oxalique
<i>Metarhizium</i>	<i>M. anisopliae</i>	Destruxines A, B, C, D Cytochalasines C, D
<i>Nomuraea</i>	<i>N. rileyi</i>	Non identifiées
<i>Verticillium</i>	<i>V. lecanii</i>	Bassianolides
<i>Paecilomyces</i>	<i>P. fumosoroseus</i>	Beauvericine
	<i>P. fumosoroseus</i>	Acide Pyridine 2-6 Dicarboxylique
	<i>P. farinosus</i>	

NB : Un large éventail de champignons entomopathogènes produit des toxines protéiques qui sont surtout des protéases.

Le contact des spores et de l'hôte se produit d'une manière aléatoire; il dépend des conditions climatiques, de la quantité d'inoculum et de la densité de l'hôte. L'adhésion des spores est en général un phénomène passif; elle peut être facilitée dans certains cas par la présence d'une enveloppe mucilagineuse autour de la spore (cas de *Verticillium lecanii* Zimmermann Viègas). Ces mucilages de nature glycoprotéique peuvent avoir des fonctions enzymatiques impliquées certainement dans la digestion de la cuticule qui fournit les éléments nutritifs nécessaires à la germination (Nicholson, 1984).

Cette adhésion des spores peut être corrélée, mais pas toujours, à l'agressivité ou à la spécificité d'hôte. Fargues (1981) a montré qu'il y a une corrélation entre la spécificité d'hôte de *Metarhizium anisopliae* et la capacité d'attachement des spores sur la cuticule des larves de Scarabéides. De même, l'hypovirulence de certaines souches de *M. anisopliae* pathogènes de larves de moustique, peut être due à un défaut d'attachement des conidies sur les siphons larvaires (Al-Aidroos et Roberts, 1978)

Une fois la spore attachée à la cuticule, elle germe en développant un tube germinatif qui pénètre la cuticule. Cette pénétration est à la fois physique et enzymatique (Robinson, 1966; Samsinakova et al., 1971; Pékrl et Grula, 1979). La pénétration peut se faire directement comme dans le cas de *V. lecanii* (Hugues et Gillepsie, 1985) et de *B. bassiana*, ou par production d'un tube de type appressorium comme dans le cas de *M. anisopliae* (Zaccharuk 1970 a, b; Michel, 1981) .

Lors de cette phase, des modifications épicuticulaires importantes sont observées; en particulier, c'est à ce stade que les lipides épicuticulaires jouent un rôle important dans la spécificité parasitaire (Lecuona, 1989). Différentes enzymes sont excrétées par le pathogène: protéases, lipases, amylases et chitinases. Chez *B. bassiana*, la quantité de chitinases atteint son maximum avant celui des autres enzymes ; cette quantité produite est directement liée à la capacité de pénétration de la cuticule par le tube germinatif. La pathogénicité du champignon est étroitement liée aux différentes activités enzymatiques. Par exemple, la pathogénicité de *B. bassiana* pour les larves de *Leptinotarsa decemlineata* Say dépend fortement de ses activités chitinolytiques et protéolytiques (Samsinakova et al, 1977). Pour l'espèce *B. brongniartii* (Sacch.) Petch, c'est l'activité lipolytique qui joue un rôle important dans la patho-

généricité du champignon vis à vis des larves de *Melolontha melolontha* Linné: des mutants lipase-négatifs et chitinase-négatifs sont incapables d'infester *M. melolontha*.

Face à cette agression, l'hôte réagit de manière non spécifique par l'activation des phénoloxydases (Ratault et Vey, 1977). Cette réaction est assez puissante pour bloquer le processus d'infection; elle se traduit par des taches de mélanisation sur la cuticule. Ces phénoloxydases peuvent être activées par des glucides et des glycoprotéines du champignon (Unestam et Soderhall, 1977; Soderhall et Unestam, 1979; Soderhall, 1982). Si le champignon réussit à surmonter cette barrière, il pénètre dans l'hémolymphe. L'hôte réagit en formant des granulomes autour du mycélium. Le champignon va émettre des substances toxiques, les mycotoxines (tableau 2) (Kucera et Samsinakova, 1968; Hamill et al., 1969; Kucera, 1971; Frappier et al., 1978; Roberts 1981), qui affaiblissent les granulomes et vont permettre la production de blastospores et l'invasion de l'hémocoèle, provoquant rapidement la mort de l'hôte. L'importance des toxines dans la virulence du pathogène est assez difficile à évaluer dans la mesure où leur production est précédée par plusieurs activités du champignon. Il a cependant été montré que la production de beauvericine par différentes souches de *B. bassiana* est corrélée à leur virulence contre *Galleria mellonella* Linné. Quant aux destruxines, isolées des filtrats de cultures de *M. anisopliae* (Kodaira 1962; Roberts 1966; 1969; 1981), elles sont des inhibitrices de synthèse des ARN et ADN des cellules hôtes (Quiot et al. 1985). En plus de leur rôle dans la réduction de l'activité phagocytaire de l'hôte et l'inhibition de la formation des granulomes, certaines substances toxiques (telles les beauvellides, les bassionalides, les isarolides) ont un effet antibactérien durant la phase saprophytaire.

L'hémocoèle envahi, on entre dans la phase non parasitaire pendant laquelle le champignon pénètre dans les différents tissus en momifiant l'insecte. Quand les conditions environnementales sont favorables, le pathogène traverse de nouveau le tégument, cette fois-ci de l'intérieur vers l'extérieur du cadavre. Il développe des structures conidiogènes et sporule si l'humidité relative est suffisante. Si les conditions ne sont pas favorables, le champignon peut rester à l'intérieur de l'insecte où il peut survivre pendant plusieurs mois. En fonction de différents facteurs climatiques, le champignon restera dans le sol (en général sous forme de conidies) ou sera disséminé par le vent. Sa viabilité dans le sol dépend de sa résistance aux pressions des facteurs édaphiques; Cette résistance est fonction de la forme sous laquelle se trouve le germe. Les conidies de *B. bassiana* peuvent survivre plus de 400 jours dans le sol à 10°C

**Tableau 3 : Récapitulatif des différentes étapes du cycle de développement**

Action du pathogène	Réactions de l'insecte ou effet sur l'insecte
<b>Phase parasitaire</b>	
- Adhésion et germination des spores sur la cuticule	
- Pénétration	
+ reconnaissance: production de différentes enzymes	Modifications épicuticulaires
+ Infection	Activation des phénoloxydases Mélanisation Production de granulome
- Colonisation	
+ émission de substances toxiques	Affaiblissement des granulomes
+ multiplication: production de blastospores	
+ invasion de l'hémocoèle	Mort de l'insecte
<b>Phase saprophytaire</b>	
- Colonisation totale	Momification
- Sortie de l'hyphe à travers le tégument dans les conditions environnementales favorables	
- Sporulation	
- Survie dans le sol	
- Dissémination	

Tableau 4 : Liste des genres contenant des espèces entomopathogènes  
( d'après Samson et Al.1988)

Chytridiomycètes	:- Chytridiales	- <i>Coelomycidium</i>	
		- <i>Myiophagus</i>	
Oomycètes	- Blastocladales	- <i>Coelomomyces</i>	
	:- Lagenidiales	- <i>Lagenidium</i>	
Zygomycètes	:- Saprolegniales	- <i>Leptolegnia</i>	
		- <i>Couchia</i>	
		:- Entomophthorales	- <i>Conidiobolus</i>
		- <i>Entomophthora</i>	
		- <i>Erynia</i>	
Ascomycètes	:- Mucorales	- <i>Massospora</i>	
		- <i>Meristacrum</i>	
		- <i>Neozygites</i>	
		- <i>Sporodiniella</i>	
		- <i>Ascosphaera</i>	
		- <i>Atricordyceps</i>	
		- <i>Calonectria</i>	
		- <i>Cordycepioideus</i>	
		- <i>Cordyceps</i>	
		- <i>Hypocrella</i>	
		- <i>Myriangium</i>	
		- <i>Nectria</i>	
		- <i>Podonectria</i>	
		- <i>Torrubiella</i>	
		Deutéromycètes	:
- <i>Akanthomyces</i>			
- <i>Aschersonia</i>			
- <i>Aspergillus</i>			
- <i>Beauveria</i>			
- <i>Culicinomyces, Engyodontium, Funicularis, Gibellula, Hirsutella, Hymenostilbe, Metarrhizium, Nomuraea, Paecilomyces, Paraisaria Pleurodesmospora, Polycephalomyces, Pseudogibellula, Sporosporella, Sporothrix, Tetracrium, Tetranacrium, Tilachlidium, Tolypocladium, Verticillium.</i>			

(Lingg et Donaldson 1981); celles de *M. anisopliae*, 21 mois à 19°C (Fargues et Robert 1985).

Nous donnons dans le tableau 3, un récapitulatif des différentes étapes de ce cycle, ainsi que des réactions de l'hôte.

Dans ce cycle de développement, les étapes d'adhésion, de germination des spores et de pénétration tégumentaire, sont les plus critiques. Malheureusement, nous ne possédons pas encore assez de connaissances sur les différents mécanismes de reconnaissance du champignon et de défense de l'hôte. Le déterminisme génétique de la virulence et de l'agressivité des Champignons entomopathogènes est encore inconnu.

#### **A.1.2. Classification des Hyphomycètes entomopathogènes**

Les Champignons entomopathogènes se répartissent dans quelques groupes systématiques: Phycomycètes (Entomophthorales et Blastocladales), Ascomycètes (Clavicipétales) et Deutéromycètes (Hyphomycétales) (tableau 4).

Nous nous intéresserons exclusivement aux Deutéromycètes. Ce choix est justifié par l'importance agronomique de ces germes et par leur intérêt dans la lutte contre les ravageurs de culture, lutte qui est l'un des principaux axes de recherche du Laboratoire de Lutte Biologique de la Minière, d'où proviennent toutes les souches analysées.

Le groupe des Deutéromycètes rassemble les champignons pour lesquels, généralement, dans les conditions de l'observation, on ne connaît pas de fructification sexuée; soit que celle-ci est encore inconnue, soit qu'elle est réellement inexistante. Cependant certaines espèces classées originellement dans les formes imparfaites, s'avèrent posséder des formes sexuées qui sont le plus souvent des Ascomycètes, plus rarement des Basidiomycètes. La reproduction asexuée s'effectue au moyen de propagules que l'on nomme conidies, issues directement du mycélium végétatif. Celles-ci peuvent parfois être absentes (mycelium stérile). On attribue arbitrairement à ce groupe la valeur d'une classe, sous le nom de Deutéromycètes ou d'Adelomycètes qui se divise en 3 ensembles:

- les Blastomycètes : levures avec ou sans pseudomycélium
- les Hyphomycètes : champignons filamenteux
- les Coelomycètes : conidies produites dans des pycnides (Sphaeropsidales) ou dans des acervules (Mélanoconiales).

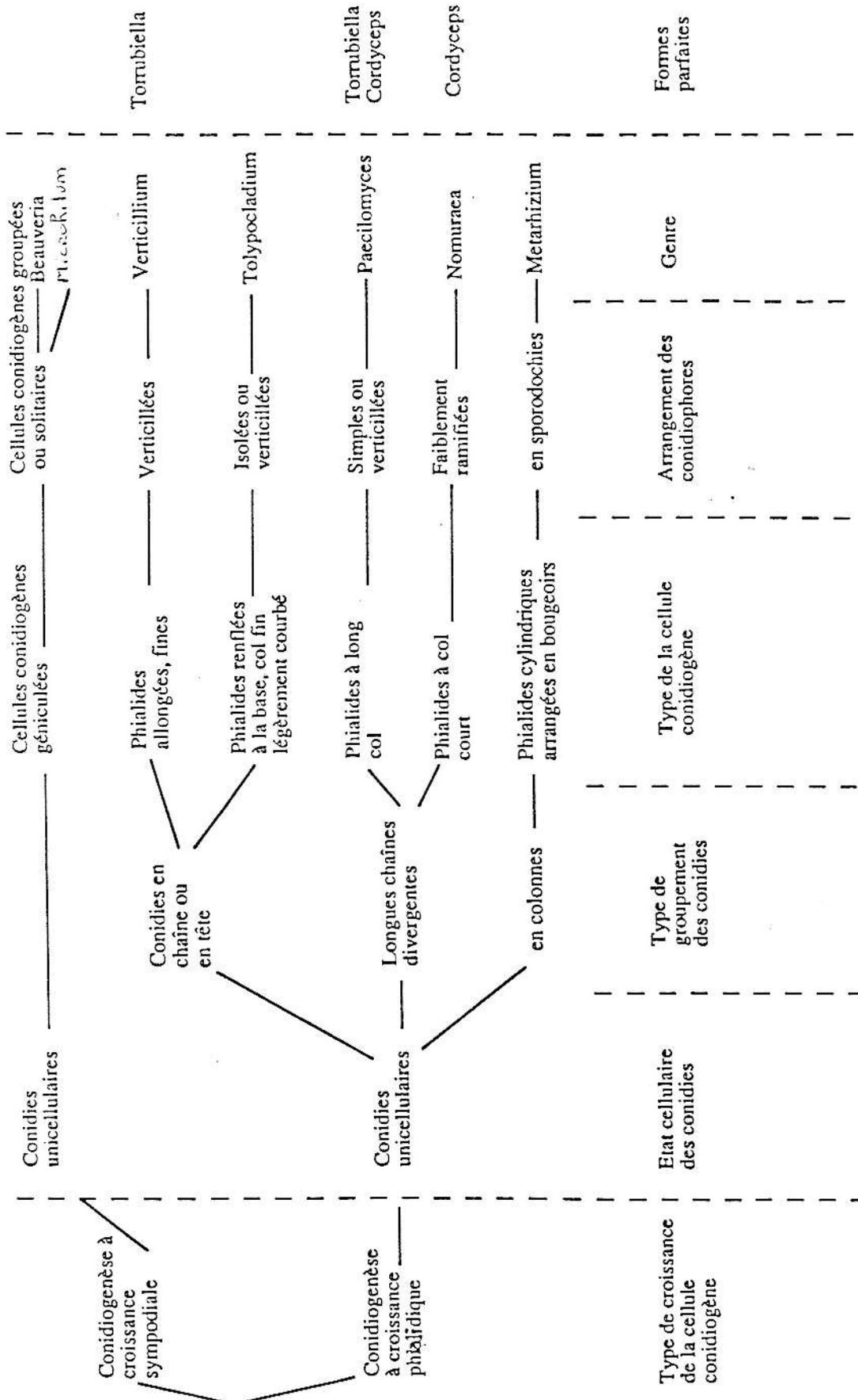
Notre étude se limitera à des genres d'Hyphomycètes; ils sont les plus fréquemment isolés d'insectes.

La notion d'espèce chez les Deutéromycètes n'a pas la même signification que dans les autres groupes où l'espèce est définie par les critères d'interfécondité. N'ayant pas de conjugaison sexuelle, ces organismes par définition n'ont pas d'identité spécifique. La notion de genre n'est pas fondée sur un concept unique ou sur un ensemble de critères uniformes. Nous tracerons brièvement l'historique des différents genres étudiés, pour souligner les difficultés inhérentes à la spéciation des Champignons imparfaits.

Les Deutéromycètes se reproduisent par les conidies. Les caractères de forme, de couleur, de dimension, de structure et d'ornementation des conidies ont longtemps servi à la discrimination des genres et espèces. Les Hyphomycètes se distinguent des autres Deutéromycètes par leurs conidiophores libres, érigés solitairement ou en groupe. Le seul système de classification des Hyphomycètes qui soit à peu près exhaustif est celui de Saccardo (1886). Ce système permet un découpage commode des groupes en fournissant une clé de détermination fondée sur des caractères simples, facilement observables, nombreux et largement diversifiés pour les différents genres et espèces. Ce système dichotomique accorde une importance primordiale à l'aspect macroscopique du champignon, à la morphologie conidiale (caractères de pigmentation, de taille, d'arrangement et de septation des conidies) et au mode de ramification et d'arrangement des conidiophores (solitaires, groupés en sporochies ou en synnema).

Les systèmes de classification plus modernes tiennent compte des différents types de conidiogenèse. Vuillemin (1910) a été le premier à émettre une conception de la systématique fondée sur l'ontogénie, c'est à dire du mode de formation des conidies qui, d'après lui, reflète mieux l'identité d'une espèce. Vuillemin travaillait sur des cultures, contrairement à Saccardo qui faisait ses observations à partir de matériel d'herbier; ce qui évidemment ne lui permettait pas de suivre l'évolution morphogénétique..

Tab. 5 : Classification des Hyphomycètes entomopathogènes étudiés



Dans la classification des Hyphomycètes, les travaux de Hughes (1953, 1958) prennent une place très importante; il propose une classification fondée sur des critères dynamiques (structure et mode de développement des conidiophores et des conidies). Plusieurs chercheurs par la suite, ont confirmé l'hypothèse de Hughes: l'ontogénèse des conidies est un caractère particulièrement stable, fixé pour chaque genre et a fortiori pour chaque espèce.

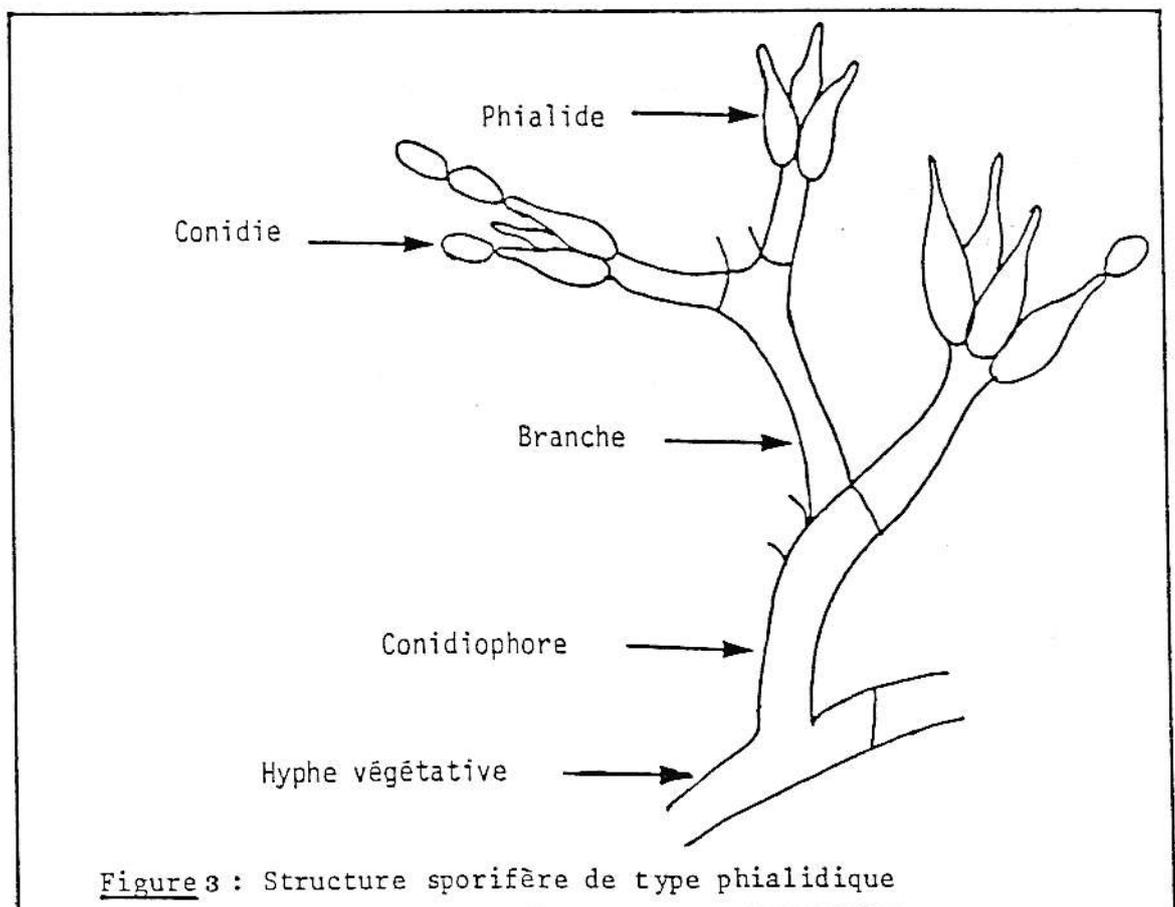
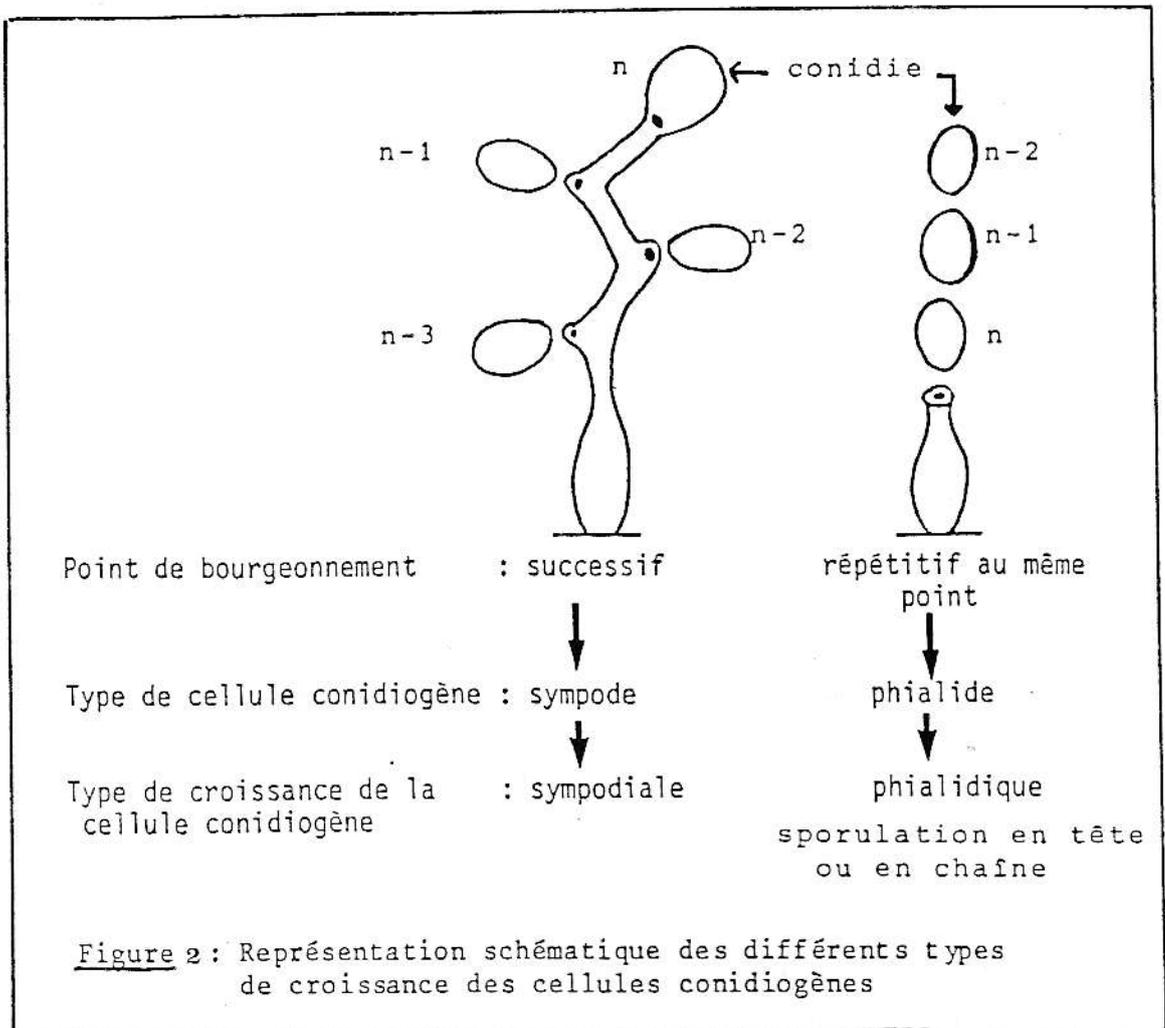
La description et la classification morpho-ontogénique des Hyphomycètes entomopathogènes proposées ici sont celles revues par Samson et al.(1988). Nous nous limiterons aux sept genres concernés par cette étude. Ces genres sont les plus fréquemment isolés d'insectes et les plus usuellement étudiés pour la production d'insecticide biologique.

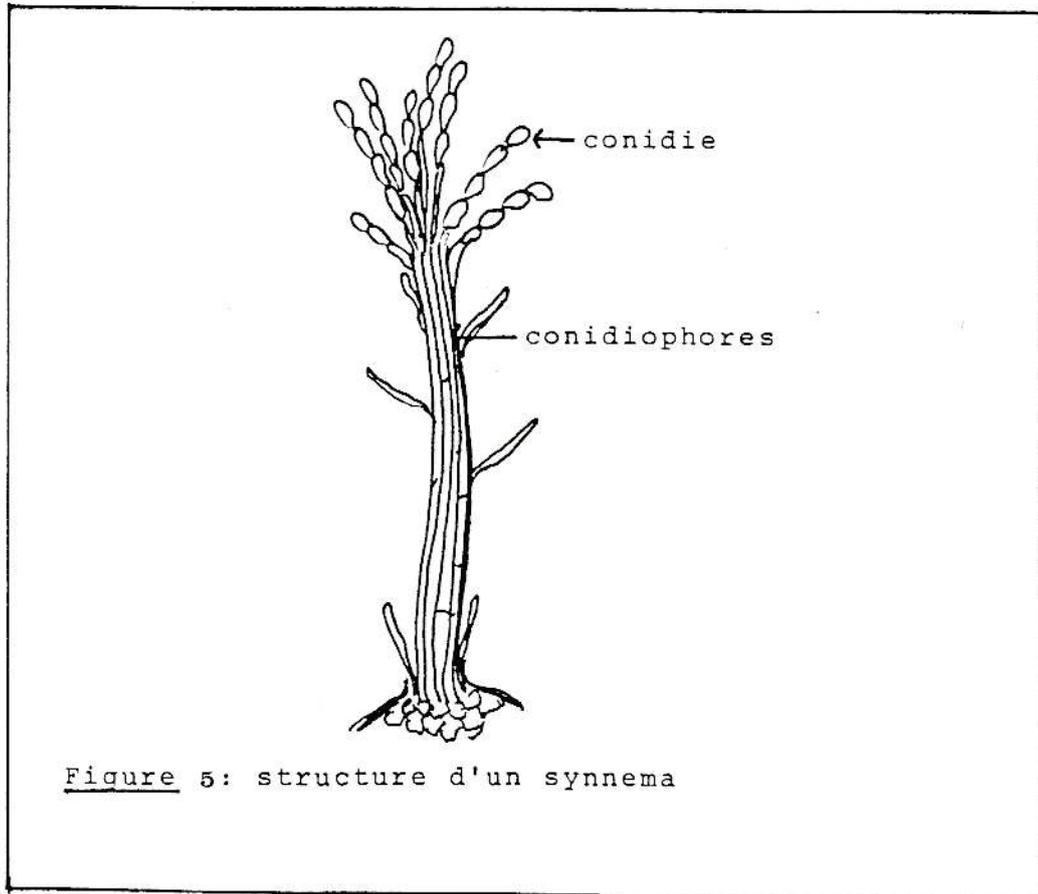
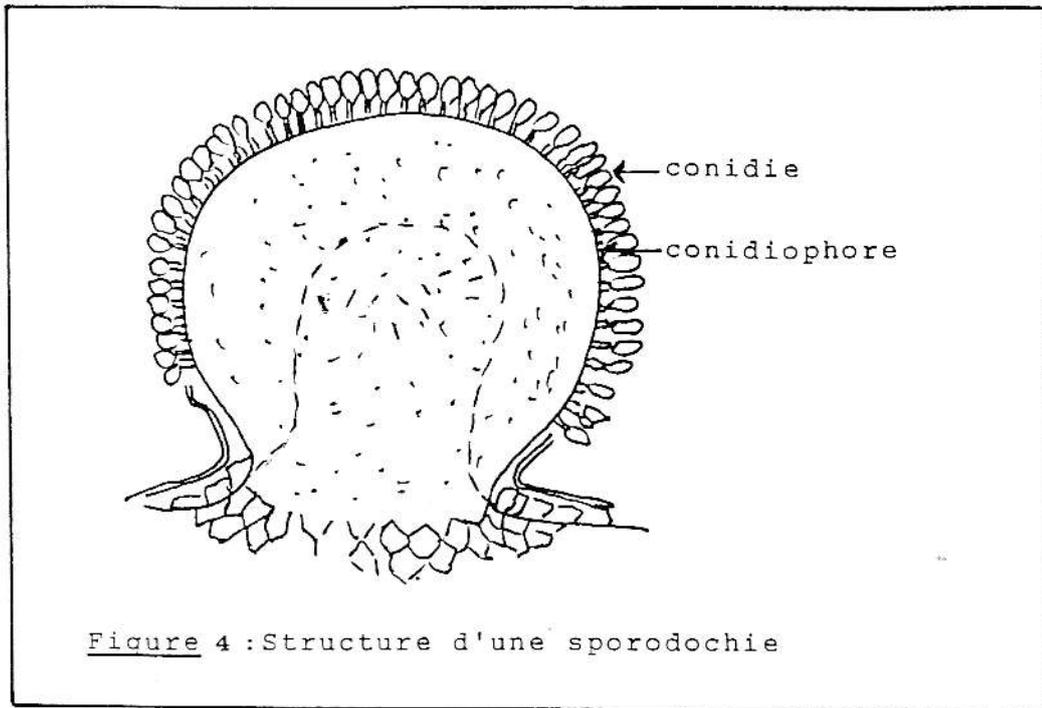
Cette classification (tableau 5) s'appuie sur des divisions dichotomiques, indépendantes de toute considération phylogénique. La base de cette classification repose sur l'ontogénie des conidies c'est à dire la conidiogénèse. Celle-ci peut être de type sympodial (par suite d'élongation de la cellule conidiogène, la conidie la plus jeune est apicale; le bourgeonnement s'effectue de manière successive) ou de type phialidique (la plus jeune conidie est celle la plus proche de la cellule conidiogène, le point de bourgeonnement est fixe)(figure 2).

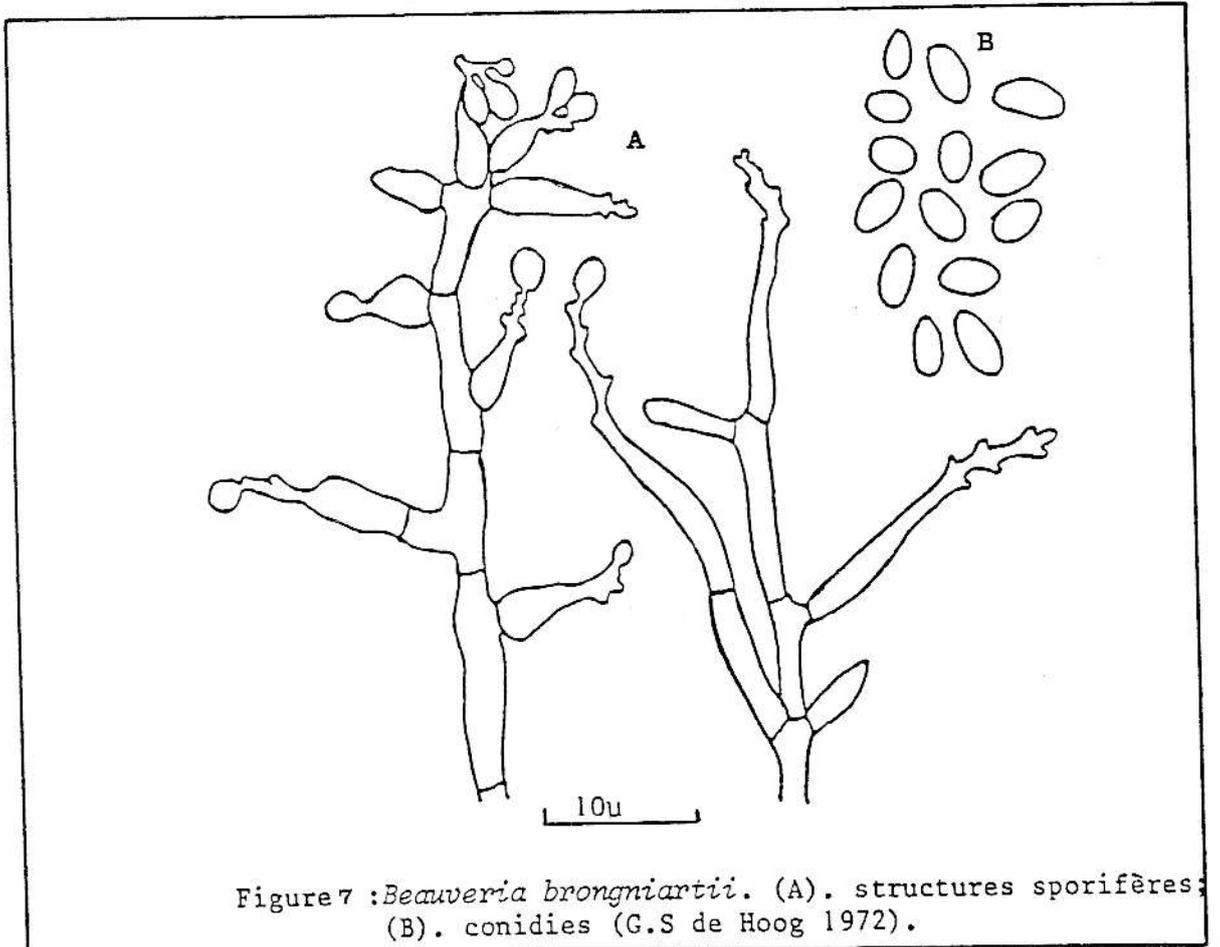
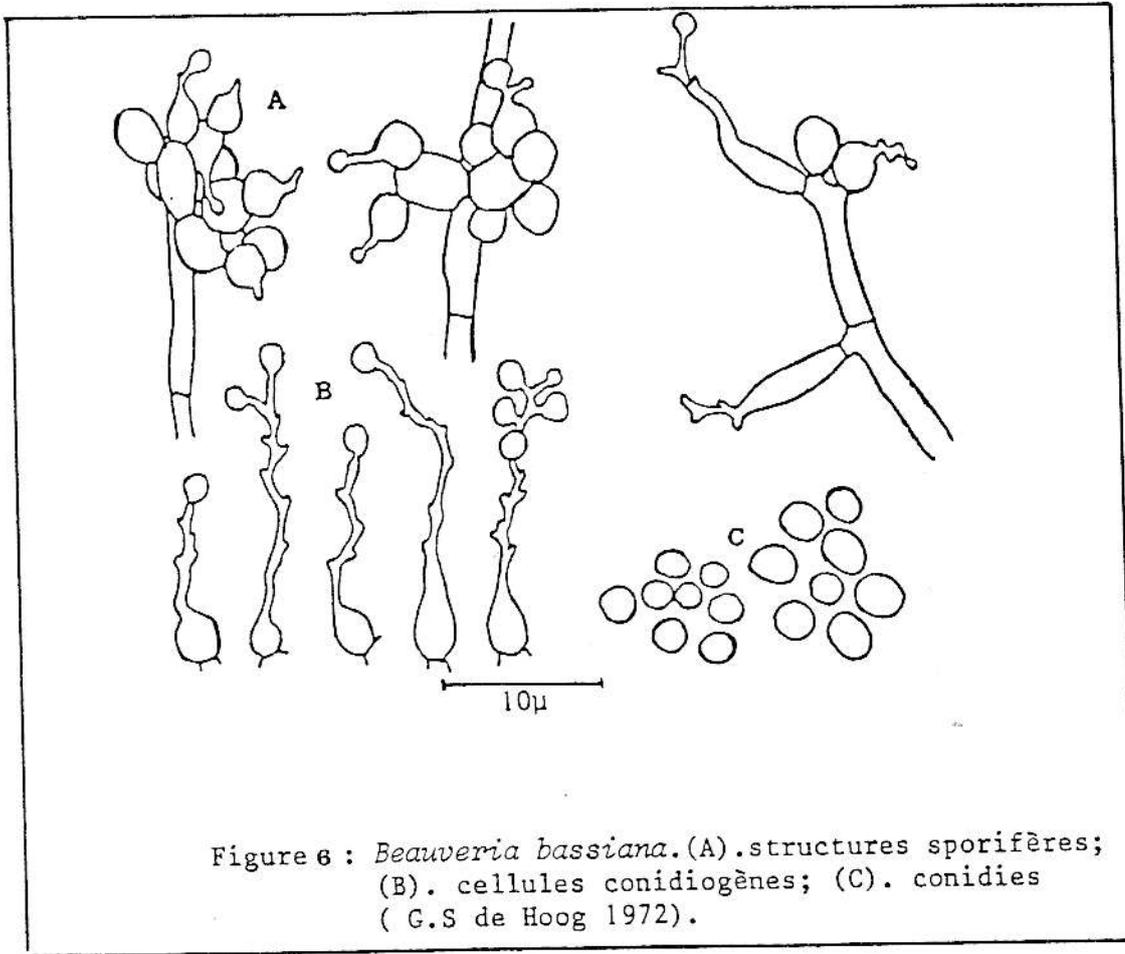
Des sept genres étudiés, *Beauveria* et *Microhilum* présentent une conidiogénèse à croissance sympodiale.

Le type phialidique est caractérisé par la présence de phialides (figure 3) qui reposent sur des conidiophores; ceux-ci peuvent être solitaires ou groupés en verticilles, en sporodochies(figure 4) ou en synnema (figure 5).

Par la suite, la forme, la taille, l'arrangement et le nombre de phialides (unique ou multiple sur le même conidiophore) sont les critères distinctifs qui caractérisent chaque genre.







## A.II. Caractéristiques et historique des différents genres

### A.II.1. Le genre *Beauveria* Vuillemin

#### a- Description morphologique

Les cellules conidiogènes forment des groupes plus ou moins denses; elles sont hyalines et à paroi lisse, à croissance sympodiale s'allongeant en rachis en zig-zag denticulé. Les conidies sont uninucléées, unicellulaires, hyalines à paroi fine et de formes globuleuse à elliptique.

Vingt six souches de *Beauveria*, réparties en 4 espèces, sont étudiées ici: *B. bassiana*, *B. brongniartii*=*B. tenella* (Delacr.)Siem., *B. velata* Samson et Evans et *B. sulfurescens*. Ces espèces sont distinguées essentiellement par la forme des conidies: rondes globuleuses pour *B. bassiana*, elliptiques pour *B. brongniartii*; *B. velata* est décrit comme ayant des conidies rondes, enrobées de gélatine (Samson et Evans,1982); *B. sulfurescens* possède des conidies globuleuses et se distingue de *B. bassiana* par l'émission de pigment jaune dans le milieu de culture et par la présence d'une endotoxine active de gros poids moléculaire (Riba comm.pers.). Les structures conidiogènes de *B. brongniartii* (figure 7) forment rarement de grands groupes comme celles de *B. bassiana* (figure 6)(les cellules conidiogènes sont arrangées en petits groupes ou plus souvent s'érigent solitairement sur l'hyphe)(tableau 6).

#### b- Historique du genre *Beauveria*

En 1912, Vuillemin crée le genre *Beauveria* en hommage à Beauverie qui, en 1911 avait remarqué les caractères particuliers des structures conidiogènes de ce groupe. La distinction anatomique faite par Vuillemin repose sur le mode de formation en zig-zag des filaments sporifères. De ce fait, le genre *Beauveria* recouvrait des champignons très différents tels que : *Botrytis*, *Sporotrichum* et *Isaria* .

En 1914, Beauverie reconnaît 4 espèces: *B. bassiana*, *B. effusa* , *B. densa* et *B.globulifera* classées selon leurs caractères cultureux et la forme de leurs spores .

Langeron (1934) y ajoute une nouvelle espèce: *B.brumpti*, qui présente plusieurs similitudes avec *Tritirachium dependens*. Cette espèce sera plus tard transférée

Tableau 6 : Quelques caractéristiques des espèces de *Beauveria* étudiées

Espèce	Forme des spores	Hôte sensible	Hôte résistant	Toxine	Divers
<i>B. bassiana</i>	Globuleuse	Pyralides, Hémiptères, Chrysomelides	Scarabeides, Noctuides, Aleurodes, Homoptères	Beauvericine, Bassianolide, Beauverolides, Isarolides, Tenelline, Oosporéine, Bassianine, Ac.oxalique.	Ubiquiste
<i>B. brongniartii</i> = <i>B. tenella</i>	Elliptique	Scarabeides, Curculionides	Noctuides, Homoptères, Pyralides, Hémiptères	Beauverolides, Isarolides, Tenelline, Bassianine, Oosporéine, Ac.oxalique,	Essentiellement inféodés aux insectes du sol
<i>B. velata</i>	Globuleuse enrobée de gélatine	?	?	Non étudié	
<i>B. sulfurescens</i>	Globuleuse	?	?	de grand poids moléculaire	Emission de pigment jaune dans le milieu

dans le genre *Tritirachium*, caractérisé par des cellules conidiogènes, également à croissance sympodiale mais sans denticules latéraux comme *Beauveria*. (Langeron, 1947)

En 1954, Mac Leod fait le point des genres *Beauveria* et *Tritirachium*. Il re-classe 32 espèces de champignons filamenteux dans les 2 genres, dont 14 deviennent des synonymies de *B. bassiana* et *B. tenella*.

En 1972, une espèce saprophyte : *B. alba*, est reconnue par de Hoog à la suite de l'observation simultanée de phialides et de sympodes, mais elle a été reclassée en 1978 dans un nouveau genre, *Engyodontium*, par le même auteur.

En 1982, deux nouvelles espèces de *Beauveria* sont décrites par Samson et Evans: *B. amorpha* et *B. velata*..

En 1986, Von Arx regroupe les *Tolypocladium* Gams avec le genre *Beauveria* en décrivant une ressemblance des structures conidiogènes et de l'aspect macroscopique des colonies. Cette classification est actuellement remise en question (Mugnai et al, 1989).

### **c- Biologie du genre *Beauveria***

Parmi les Hyphomycètes entomopathogènes, le genre *Beauveria* est le plus fréquemment isolé de cadavres d'insectes mycosés. C'est l'agent de la muscardine blanche. Il présente un intérêt agronomique important dans la mesure où quelques unes de ses espèces, en particulier *B. bassiana* et *B. brongniartii* (tableau 7), sont souvent préconisées dans la lutte biologique contre les insectes ravageurs de cultures. C'est un champignon tellurique qui possède un spectre d'hôte assez large avec une très vaste dispersion géographique, quoique *B. brongniartii* semble plus inféodé aux vers blancs. Il attaque tous les stades de développement de l'insecte.

Tableau 7 : Quelques applications expérimentales à base de *Beauveria*

Agent	Ravageur cible	Culture	Pays
<i>B. bassiana</i>	<i>Ostrinia nubilalis</i> <i>Otiornychus sulcatus</i>	Maïs Pépinières de plantes et arbustes ornementaux, Fraisiers	France, Chine France, RFA
	<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	Pommes de terre, Aubergines	USA, Pologne, URSS
	<i>Cydia pomonella</i>	Vergers, Pommiers	URSS
<i>B. brongniartii</i>	<i>Melolontha melolontha</i>	Pâturages	France, Suisse

Tableau 8 : Préparations commercialisées à base de *Beauveria*

Agent	Nom commercial	Producteur ou Importateur	Insecte ravageur cible	Culture	Pays
<i>B. bassiana</i>	BIOTROL FBB	Nutrilité	<i>Leptinotarsa decemlineata</i> <i>Cydia pomonella</i>	Pomme de terre, Vergers	USA
		Centre Sud	<i>Dendrolimus sp.</i>	Forêt	Chine

Outre les différentes enzymes et toxines déjà mentionnées, *B. bassiana* et *B. brongniartii* secrètent aussi des pigments; l'osporeine est l'antibiotique responsable de la coloration rouge des cadavres infestés. Deux autres pigments jaunes, dont on ne connaît pas encore l'activité biologique ont été identifiés: la bassianine et la tenelline (Wat et al, 1977). *Beauveria bassiana* qui parasite plusieurs espèces d'insectes est usuellement étudié pour la mise au point d'insecticide biologique. Parce qu'il est aisé de le produire en masse, *B. bassiana* est déjà utilisé avec succès en Chine et en URSS contre de nombreux ravageurs de cultures (tableau 8). Le produit BOVERINE est utilisé dans ces deux pays dans des programmes de lutte intégrée contre *Leptinotarsa decemlineata* et *Cydia pomonella* Linné. En France, il existe actuellement une formulation granulée de *B. bassiana* ; elle est éprouvée en conditions de plein champ pour la lutte contre la pyrale du maïs (*Ostrinia nubilalis* Hübner) (Riba, 1986).

*Beauveria brongniartii* est aussi un bon candidat car il joue un rôle important dans la régulation de populations d'insectes telluriques appartenant plus précisément aux familles de Scarabeides (*M. melolontha*, *Hoplochelus marginalis* Fairmaire) ou de Curculionides (*Otiorhynchus sulcatus* Fabricius). Déjà en 1893, une expérimentation de *B. brongniartii* contre les larves de *M. melolontha* avait été entreprise en France (Giard, 1893) en essayant de mettre au point des méthodes pour la production en grande masse du champignon et son application ultérieure. Plus récemment en Suisse, Keller (1986) a pu introduire la maladie dans des populations saines de *M. melolontha* et obtenir ainsi un contrôle permanent de l'Insecte.

Malgré son importance agronomique, la génétique de *Beauveria* est très mal connue. L'utilisation des méthodes génétiques est essentiellement limitée jusqu'ici à la création et à l'emploi de mutants (morphologiques, auxotrophes, résistants aux fongicides, à activité enzymatique négative...), pour étudier les propriétés physiologiques et pathologiques de ces champignons. La mise en évidence du cycle parasexuel des champignons dépourvus de reproduction sexuée, a ouvert la voie à d'innombrables perspectives d'amélioration de ces germes. Une technique de production de protoplastes a été étudiée (Kawala et al., 1984) Quant à la caractérisation des souches, l'analyse des systèmes enzymatiques polymorphes a été exploitée. Parmi les nombreux systèmes enzymatiques, les  $\alpha$ -estérases se sont révélées polymorphes pour les populations de *B. bassiana*. Il a été montré par ailleurs qu'il existe un lien entre le polymorphisme électrophorétique de *B. bassiana* et sa virulence contre la pyrale du maïs (Riba, 1985).

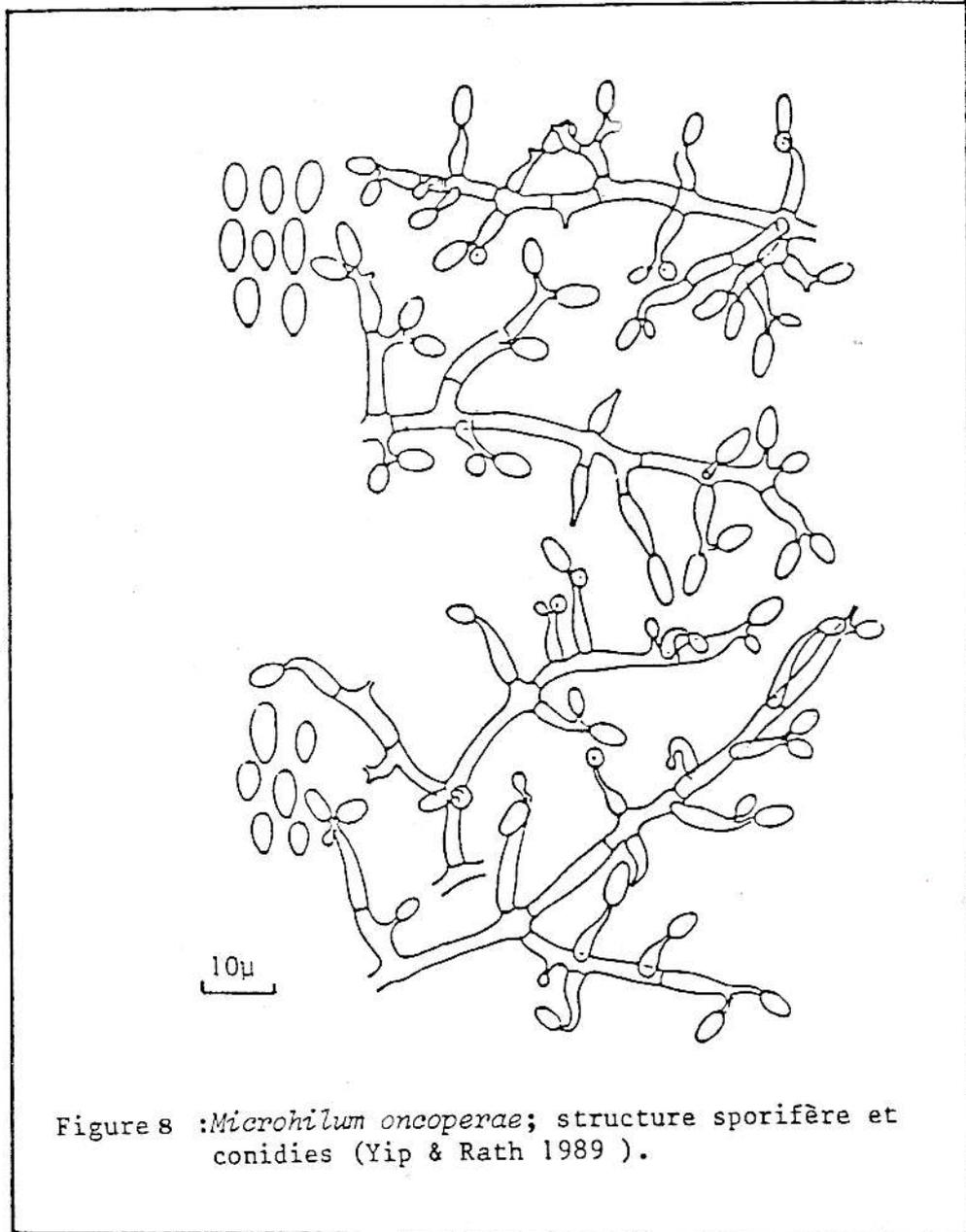


Figure 8 : *Microhilum oncoperæ*; structure sporifère et conidies (Yip & Rath 1989 ).

## A.II.2. Le genre *Microhilum* Yip et Rath

### a- Description morphologique

Les conidiophores solitaires ou en verticilles naissent directement du mycélium. Les cellules conidiogènes sont hyalines, en forme de tube avec une partie basale plus ou moins renflée. La conidiogenèse est de type sympodiale quand elle existe. Les cellules conidiogènes possèdent un nombre très limité de denticules (3 ou 4 au maximum); portées directement par l'axe principale du conidiophore, elles sont attachées en branches ou sont solitaires (figure 8).

Les conidies hyalines, unicellulaires, sont elliptiques et rugueuses, avec une extrémité tronquée par un hilum.

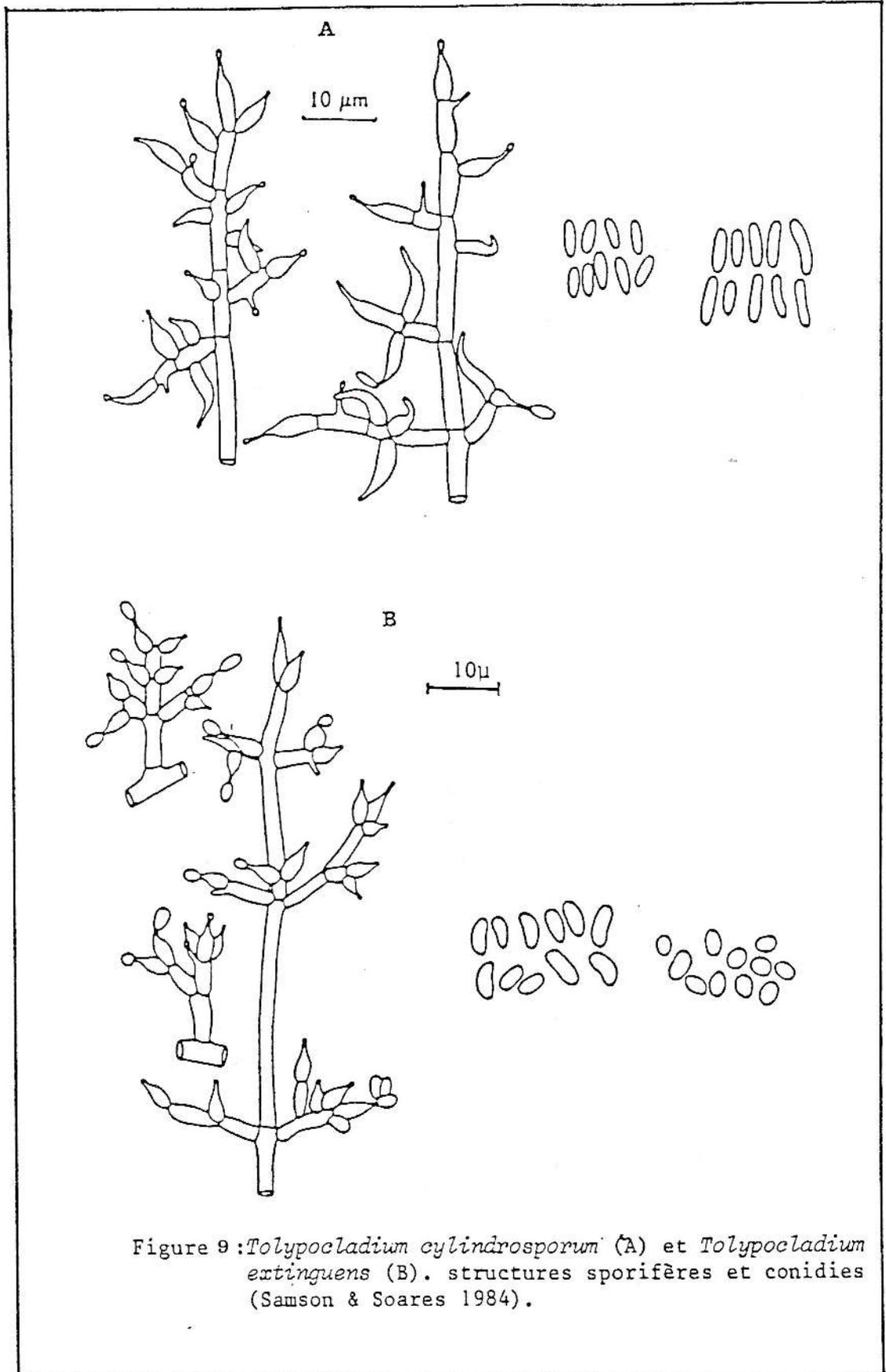
Aucune forme sexuée n'est connue.

### b- Historique de l'espèce *M.oncoperae*

En 1895, Mc Alpine et Hill rapportent la présence de *Isaria oncoptera* sur des larves de *Oncoperae intricata*, collectées en Australie. L'identification du champignon semblait douteuse puisque la description de l'hôte faite par ces 2 auteurs correspondait plutôt à celle de *O.fasiculata*.

Martyn (1960), identifie le pathogène qui cause des épizooties sur *O.intricata* comme étant un *Cephalosporum*.

En 1989, Yip et Rath, créent un nouveau genre (*Microhilum*) et une nouvelle espèce (*oncoperae*) à partir de ce pathogène identifié par Martyn. Ils distinguent *Microhilum* de *Beauveria* par son nombre limité de denticule et par la présence d'hilum sur les conidies.



### c- Biologie de l'espèce *M.oncoperae*

*Microhilum oncoperae* est un pathogène commun des larves de *O. intricata* qui sont de sérieux dévastateurs des pâturages de Tasmanie. La biologie de cet Hyphomycète est inconnue et son potentiel comme agent de contrôle biologique n'est pas encore étudié.

#### A.II.3. Le genre *Tolypocladium* Gams

##### a- Description morphologique

Les conidiophores isolés ou verticillés, portent de denses groupes de phialides. Les phialides sont en forme de flacon avec une partie basale renflée, se terminant par un col fin distinct, légèrement courbé par rapport à l'axe principal de la phialide. Les conidies sont unicellulaires, hyalines et cylindriques. Morphologiquement (tableau 9), il y a de grandes différences entre *T. cylindrosporum* Gams et *T. extinguens* Samson et Soares (Samson et Soares, 1984) .

*Tolypocladium cylindrosporum* possède des conidiophores courts, hyalins, relativement complexes, constitués de branches en verticilles portant latéralement ou à l'extrémité, des groupes de phialides. Les phialides sont de forme cylindrique à la base. Les conidies sont cylindriques avec des extrémités arrondies légèrement courbées, de taille 4-5 x 1,2-2  $\mu\text{m}$  et occasionnellement jusqu'à 8  $\mu\text{m}$  de long (figure 9a).

*Tolypocladium extinguens* possède des conidiophores de 100  $\mu\text{m}$  de long portant des branches régulièrement verticillées qui se terminent par des groupes de phialides. Ces phialides sont petites avec une partie inférieure renflée, se prolongeant par un col fin. Les conidies sont globuleuses à elliptiques, assez allongées et courbées (figure 9b) de taille 3-5,5 x 1,5-2,3  $\mu\text{m}$  .

La forme parfaite est inconnue pour ce genre.

Tableau 9 : Quelques caractéristiques des deux espèces entomopathogènes de *Tolypocladium*

	<i>T. cylindrosporium</i>	<i>T. extinguens</i>
<b>Structure des conidiophores</b>	Courts, constitués de branches en verticilles, portant latéralement ou à l'extrémité, des groupes de phialides	Longs, portant des branches régulièrement verticillées qui se terminent par des groupes de phialides
<b>Forme des phialides</b>	Cylindrique à la base	Petites avec une partie basale renflée se terminant par un col fin
<b>Forme des conidies</b>	Cylindrique avec extrémités arrondies légèrement courbées	Globuleuse à elliptique
<b>Taille des conidies</b>	4-5 x 1,2-2 $\mu\text{m}$	3-5,5 x 1,5-2,3 $\mu\text{m}$

### **b- Historique du genre *Tolypocladium***

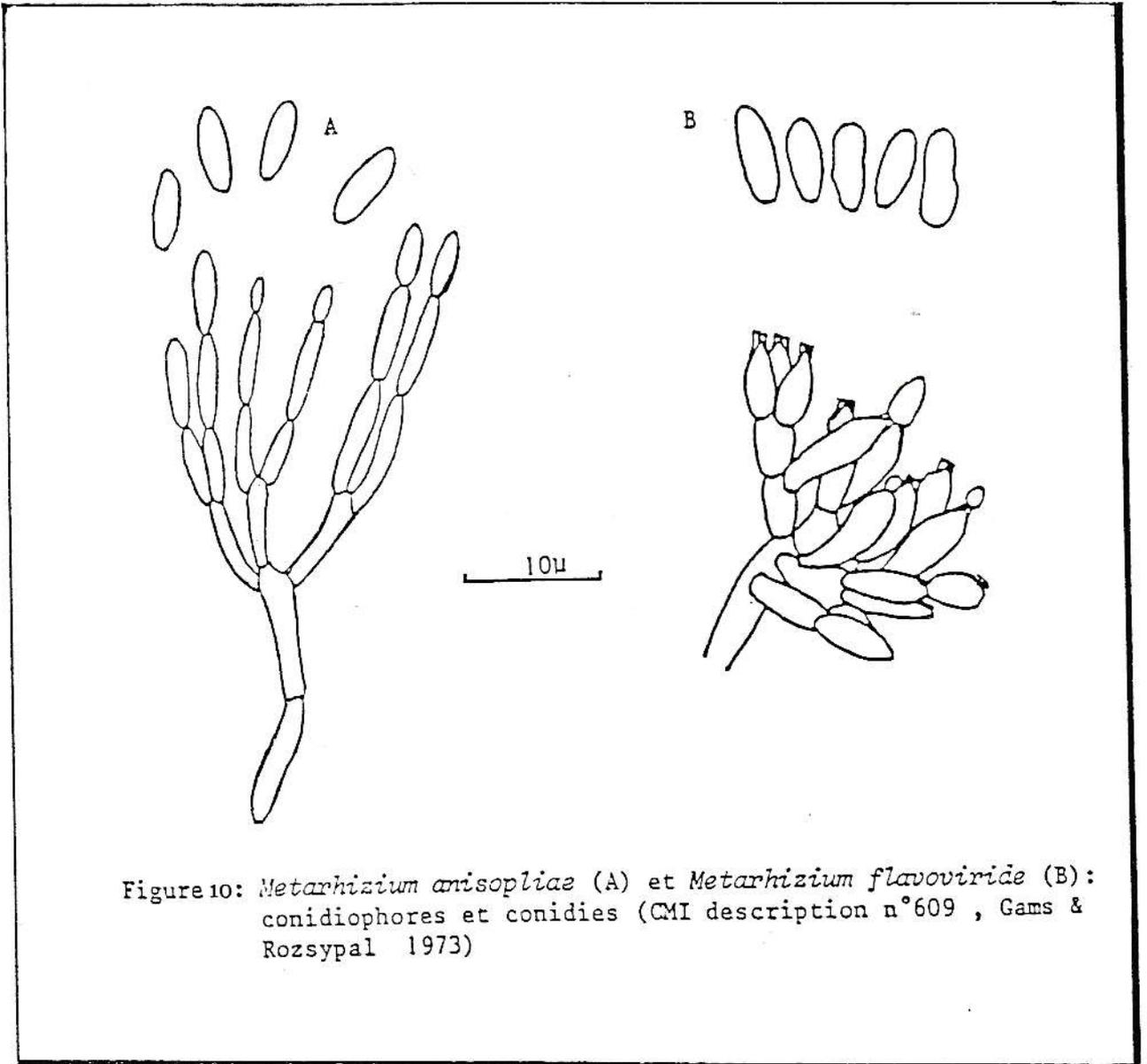
Le genre *Tolypocladium* a été créé par Gams (1971) pour un groupe d'Hyphomycètes isolés du sol avec l'espèce type *T. inflatum*. Certaines de ses espèces ressemblaient à *Beauveria*. D'ailleurs, *T. cylindrosporium* a souvent été confondu avec *B. tenella* avant d'être reconnu comme différent (Sanders, 1972; Pinnock et al, 1973; Soares, 1979). Barron (1980, 1981) décrit deux nouvelles espèces : *T. parasiticum* et *T. trigonosporum* et en 1983, Bisset révisé le genre en y incluant trois nouvelles espèces.

Les espèces décrites jusqu'à ces dernières années sont essentiellement telluriques. L'acceptation du fait que le genre *Tolypocladium* peut être entomopathogène est récente. Selon Samson et Soares (1984), ceci serait dû à ce que beaucoup d'infections provoquées par *Tolypocladium* auraient été attribuées à des espèces de *Beauveria* ou à d'autres Hyphomycètes de morphologie similaire. En effet, quoique le type de sporogénèse soit différent pour ces 2 genres, ils notent que sur de jeunes cultures, les différences entre les 2 genres ne sont pas évidentes. Deux espèces entomopathogènes sont reconnues: *T. cylindrosporium* et *T. extinguens*, décrites par Samson et Soares (1984).

Notons que *T. cylindrosporium* est très connu dans le domaine de la médecine pour sa production de cyclosporine (Jayaraman, 1988).

### **c-Biologie des espèces entomopathogènes de *Tolypocladium***

Essentiellement isolées du sol, certaines espèces sont cependant entomopathogènes. *Tolypocladium* possède une très grande spécificité d'hôte: les Diptères. *Tolypocladium cylindrosporium* est un pathogène connu des larves de moustiques (Soares et al., 1979; Soares, 1982). Il a été récemment identifié comme un facteur naturel de régulation des larves d' *Aedes* de Nouvelle-Zélande (Weisser et Pillai, 1981, Pillai, 1982); ces larves infectées produisent énormément de conidies qui se disséminent dans la nature et affectent les adultes, ce qui est certainement le plus



important mode de dispersion du pathogène. *Tolyposcladium cylindrosporum* est donc un très bon candidat comme agent de contrôle biologique.

Les expériences en laboratoire montrent que *T. cylindrosporum* produit 95% de mortalité dans les larves de moustiques telles que: *Aedes*, *Anopheles* et *Culex* (Pillai, 1982). Des méthodes de production de l'inoculum ont été développées (Who, 1984); il s'avère que l'eau saline ou saumâtre est toxique pour le champignon (Pant, 1986) .

L'analyse du polymorphisme électrophorétique d'isoenzymes a été entreprise pour quelques isolats de *T. cylindrosporum* et *T. extinguens* (Soares et al., 1985, Riba et al., 1986b); elle a pu confirmer les grandes différences observées morphologiquement entre ces 2 espèces, tout en révélant la très grande variabilité au sein de l'espèce *T. cylindrosporum*.

#### A.II.4. Le genre *Metarhizium* Sorokin

##### a-Description morphologique

Les conidiophores sont étroitement groupés en sporodochie. Les phialides de forme cylindrique, sont arrangées comme des bougeoirs. Les conidies, hyalines à légèrement colorées en vert, sont unicellulaires, ovales, avec une extrémité resserrée; elles forment de longues chaînes souvent agrégées en colonnes prismatiques.

Les 2 espèces *M. anisopliae* et *M. flavoviride* Gams et Rozsypal, sont distinguées (tableau 10) selon la forme des conidies : cylindriques avec des bouts tronqués pour *M. anisopliae* (figure 10a) et elliptiques pour *M. flavoviride*.(figure 10b) Les 2 variétés de *M. anisopliae* sont distinguées selon la taille des conidies :

- *M. anisopliae* var. major (ou type major), forme à grandes spores: 9-18  $\mu\text{m}$  de long (usuellement 10-14  $\mu\text{m}$ ) x 1,8-4,5  $\mu\text{m}$  de large

- *M. anisopliae* var. anisopliae (ou var. minor ou type minor) , forme à petites spores: 3,5-9  $\mu\text{m}$  de long (usuellement 5-8  $\mu\text{m}$ ) x 1,5-3,5  $\mu\text{m}$  .

Par la suite, nous parlerons indifféremment de type ou de variété, pour nommer ces deux variétés de *M. anisopliae*.

Tableau 10 : Quelques caractéristiques des espèces de *Metarhizium*

Espèce	Variété	Forme des spores	Taille des spores	Spectre d'hôte	Divers
<i>M. anisopliae</i>	major	Cylindrique	9-18 x 1,8-4,5 $\mu\text{m}$	Spécifique aux Dynastines	Tropical
	anisopliae	Cylindrique	3,5-9 x 3,5 $\mu\text{m}$	Melolonthines, Cercopides, Chrysomelides, Cercopides	Ubiquiste
<i>M. flavoviride</i>		Elliptique	7-9 x 4,5-5,5 $\mu\text{m}$	Curculionides	?

Aucune forme parfaite n'est connue.

### b- Historique du genre *Metarhizium*

Metschnikoff (1879) décrit *Entomophthora anisopliae* avec des spores de 4,8  $\mu\text{m}$  de long, mais il note aussi la présence de spores de tailles différentes pour la même espèce. Sorokin crée le genre *Metarhizium* en 1883 pour cet *Entomophthora anisopliae* (= *Isaria destructor* Metsch.= *Oospora destructor* (Metsch.Delacr.).

C'est Johnston en 1915 qui, le premier, met en évidence l'existence de 2 formes de conidies (longues et courtes) de *M. anisopliae*. Il décrit la forme major avec des spores de 11,9 x 3  $\mu\text{m}$  et la forme minor avec des spores de 3,5 x 2-3  $\mu\text{m}$ . Il indique que plusieurs isolats sur insectes, ou en culture pure, peuvent produire des spores de dimensions diverses, dues à des différences physiologiques.

Friederichs (1920) puis Tulloch (1976) confirment la séparation de *M. anisopliae* en 2 variétés: la variété major de la forme à grandes spores et la variété anisopliae de la forme à petites spores.

En ce qui concerne les différentes espèces composant le genre, Tulloch (1976) retient 2 espèces dans le genre: *M. anisopliae* et *M. flavoviride*. *M. brunneum* et *M. album* sont considérées comme synonymes de *M. anisopliae*. Cependant, Rombach et al.(1987) réhabilitent l'espèce *M.album* sur les bases de sa sporulation en chaîne et la coloration des colonies, différentes de celles de *M. anisopliae*. Une nouvelle variété de *M. flavoviride* var.minus est reconnue en 1986 (Rombach et al.).

### c- Biologie du genre *Metarhizium*

*Metarhizium* est un champignon très ubiquiste avec une vaste dispersion géographique, quoique, dans la majorité des cas, il soit signalé chez les insectes tropicaux,

Tableau 11: Quelques applications expérimentales à base de *Metarhizium anisopliae*

Ravageur	Culture	Pays
<i>Aphodius tasmaniae</i>	Pâturages	Australie
<i>Wiseana sp.</i>	Pâturages	Nouvelle-Zélande
<i>Mahanarva posticata</i>	Canne à sucre	Brésil

Tableau 12: Préparations commercialisées à base de *Metarhizium anisopliae*

Nom commercial	Pays	Producteur ou Importateur	Insecte ravageur cible	Culture
COMBIO	Brésil	Equilibro controle Biological LTDA	<i>Mahanarva posticata</i>	Canne à sucre
METAQUINO	Brésil	CODECAP, IAA		
BIOTROL FMA	USA	Nutrillite		

probablement à cause de ses exigences thermiques assez élevées. Il comporte des souches qui sont plus ou moins adaptées à certains genres ou à certaines espèces. Rhada, déjà en 1956 avait signalé une spécificité parasitaire de quelques souches à l'égard de certains insectes. Cette spécificité a été mise en évidence par Ferron (1972): par exemple chez *Oryctes*, on ne rencontre que le type major alors que chez le Doryphore (*L. decemlineata*) ou chez le Hanneton commun (*M. melolontha*), on trouve le type minor. Cette spécificité entomologique, confère à cet Hyphomycète un intérêt agronomique aussi important que celui de *B. bassiana* dans la lutte contre les ravageurs de cultures.

Au Nord-Est du Brésil, chaque année, plus de 200 000 hectares de culture de canne à sucre sont détruits par *Mahanarva posticata* Stål (*Cercopidae*). Dans les années 1970, il a été observé que, dans l'état de Rio, les *Cercopidae* provoquaient peu de dégâts car ils étaient enrayés par le champignon *Metarhizium*. Ces observations sont à l'origine de l'application annuelle d'une préparation de *M. anisopliae* (METAQUINO) sur les cultures de canne à sucre. Plus récemment, *M. anisopliae* regagne l'attention pour son utilisation contre les insectes telluriques : *Aphodius tasmaniae* en Australie (Coles et Pinnock, 1982), *Curculio caryae* aux USA (Gottwald et Tedders, 1983), *O. sulcatus* en Europe (Zimmermann, 1981, 1984; Zimmermann et Simons, 1986). D'autres préparations de *M. anisopliae* (BIOCONTROL, BIOMAX, COMBIO, METABIOL et METAPOL) sont homologuées au Brésil pour protéger les cultures de canne à sucre et les pâturages contre les attaques de *Cercopidae* (tableaux 11 et 12).

*Metarhizium flavoviride* est actuellement étudiée pour son éventuelle utilisation contre *O. sulcatus* (Marchal, 1977; Poprawski, Marchal et Robert, 1985). Il a été montré que la virulence de *M. anisopliae* est directement liée aux doses de conidies appliquées sur le tégument ou injectées dans l'hémocoèle.

*Metarhizium*, nous l'avons déjà mentionné, possède une spécificité parasitaire. En effet, la forme major est inféodée essentiellement aux Scarabéides. Ces observations ont suscité l'analyse de la variabilité génétique de *M. anisopliae*, qui a été entreprise par l'étude du polymorphisme électrophorétique de quelques systèmes isoenzymatiques (Riba et al. 1987, 1986 a). Des relations entre les profils électrophorétiques et les variétés morphologiques ont pu être distinguées. Trois sous-populations de *M. anisopliae* ont été mises en évidence :

- l'ensemble des souches de *M. anisopliae* var. major

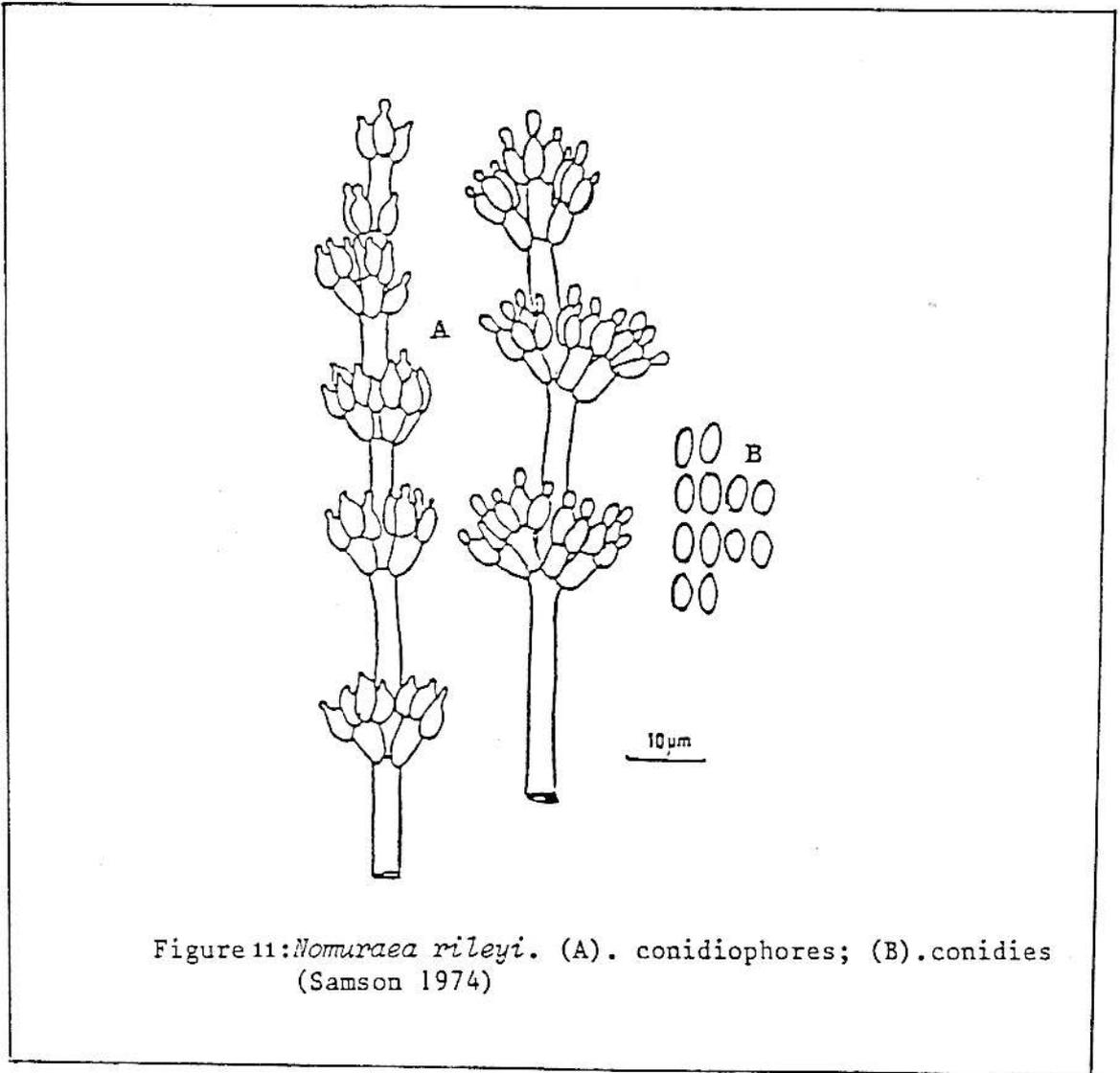


Figure 11: *Nomuraea rileyi*. (A). conidiophores; (B). conidies  
(Samson 1974)

- l'ensemble des souches minor qui se subdivise en 2 :
  - + les souches en provenance de Brésil, qui seraient le résultat d'une pression de sélection exercée par l'insecte hôte, étant donné que ces souches ont toutes été isolées de *Cercopidae*
  - + et les autres

Concernant les études génétiques liées à *M. anisopliae*, des transformations de souches en benomyl résistant (ces champignons sont souvent utilisés en association avec des insecticides chimiques), utilisant les gènes benA3 de *Aspergillus nidulans*, ont été récemment obtenues (Goettel et al., 1989).

Dans le but de l'éventuelle création de nouvelles souches pour la lutte biologique, le cycle parasexuel de *M. anisopliae* a été étudié (Tinkine et Noviello, 1971, Messias et Azevedo, 1980) en utilisant des mutants auxotrophes. Des diploïdes prototrophes hétérozygotes ont été obtenus. Ils pourront être utilisés en lutte biologique car il s'avère qu'ils sont très stables et probablement plus virulents que les souches haploïdes si on se réfère à la quantité de substances produites. Par accouplement forcé de mutants de couleur et d'auxotrophies complémentaires, des diploïdes ont été obtenus. Leur analyse génétique suggère l'existence de deux voies métaboliques dans la biosynthèse des pigments. La compréhension des relations épistatiques des marqueurs de couleur et l'attribution des mutations aux groupes de liaison, permettent l'analyse génétique des ségrégeants de la recombinaison mitotique; elles prouvent l'utilité de ce genre d'analyse pour mieux comprendre les relations hôte-pathogène. Des hybrides intervariétés ont été obtenus (Riba et al., 198 ).

#### **A.II.5. Le genre *Nomuraea* Maublanc**

##### **a- Description morphologique**

Les structures sporifères sont simples ou agrégées en synnema, constituées de conidiophores faiblement verticillés, portant de denses groupes de phialides. Les phialides sont renflées dans leur partie basale et se prolongent par un col très court. Les conidies sont unicellulaires, de couleur verte à pourpre, disposées en chaînes divergentes. Le genre est constitué de 2 espèces entomopathogènes *N. rileyi* (Farlow)

Tableau 13 : Quelques caractéristiques des espèces de *Nomuraea*

Espèce	Taille des phialides	Taille des conidie	Forme des conidies	Couleur des colonies
<i>N. rileyi</i>	4,7-6,5 x 2,3-3 $\mu\text{m}$	3,5-4,5 x 2-3,1 $\mu\text{m}$	Elliptique	Vert-olive
<i>N. atypicola</i>	3,5-5 x 2-2,5 $\mu\text{m}$	4-6 x 1,2-1,5 $\mu\text{m}$	Cylindrique légèrement courbée	Pourpre foncée

Samson (figure 11) et *N. atypicola* (Yasuda) Samson. Ces 2 espèces se distinguent l'une de l'autre (tableau 13) par la taille des phialides, la taille des conidies et la forme des conidies: elliptiques pour *N. rileyi* et cylindriques légèrement courbées pour *N. atypicola*.

La forme parfaite serait dans les *Cordyceps* pour *N. atypicola* mais celle de *N. rileyi* est inconnue.

### **b- Historique du genre *Nomuraea***

Le genre *Nomuraea* a été créé en 1903 par Maublanc avec l'unique espèce *N. prasina*, isolée d'une larve de *Pionea forficalis*. En 1919, Sawada transfère cette espèce dans le genre *Spicaria*, sur la base de sa sporulation en chaîne.

En 1936, Charles identifie *Spicaria prasina* comme synonyme de *Botrytis rileyi* (= *Beauveria rileyi*) décrit en 1883 par Farlow.

Hughes en 1951, puis Brown et Smith en 1957, proposent de transférer la majorité des espèces de *Spicaria* dans le genre *Paecilomyces*, à l'exception de *S. rileyi* qu'ils placent à côté des *Penicillium* (section *Divaricata*) à cause de la couleur verte des colonies et de la forme de ses phialides, rappelant celles des *Penicillium*. Kish et al. (1974) puis Samson (1974) réhabilite le genre *Nomuraea* en le différenciant des *Penicillium*, par l'arrangement des structures sporifères et par le fait que les espèces de *Nomuraea* sont entomopathogènes.

### **c- biologie du genre *Nomuraea***

*Nomuraea rileyi* semble essentiellement inféodé aux Noctuides des zones tropicales et subtropicales. Cette espèce est responsable de vastes épizooties naturelles dans des populations de Noctuelles, sur cultures de Soja au Brésil et en Floride (Ignoffo et al., 1976). Ces épizooties entraînent la destruction des populations hôtes sensibles mais elles se produisent trop tard pour empêcher un désastre économique (Kish et Allen, 1978; Fuxa, 1984). Par ailleurs, *N. rileyi* n'est pas virulent contre les insectes auxiliaires. C'est donc un bon candidat pour la lutte biologique, malheu-

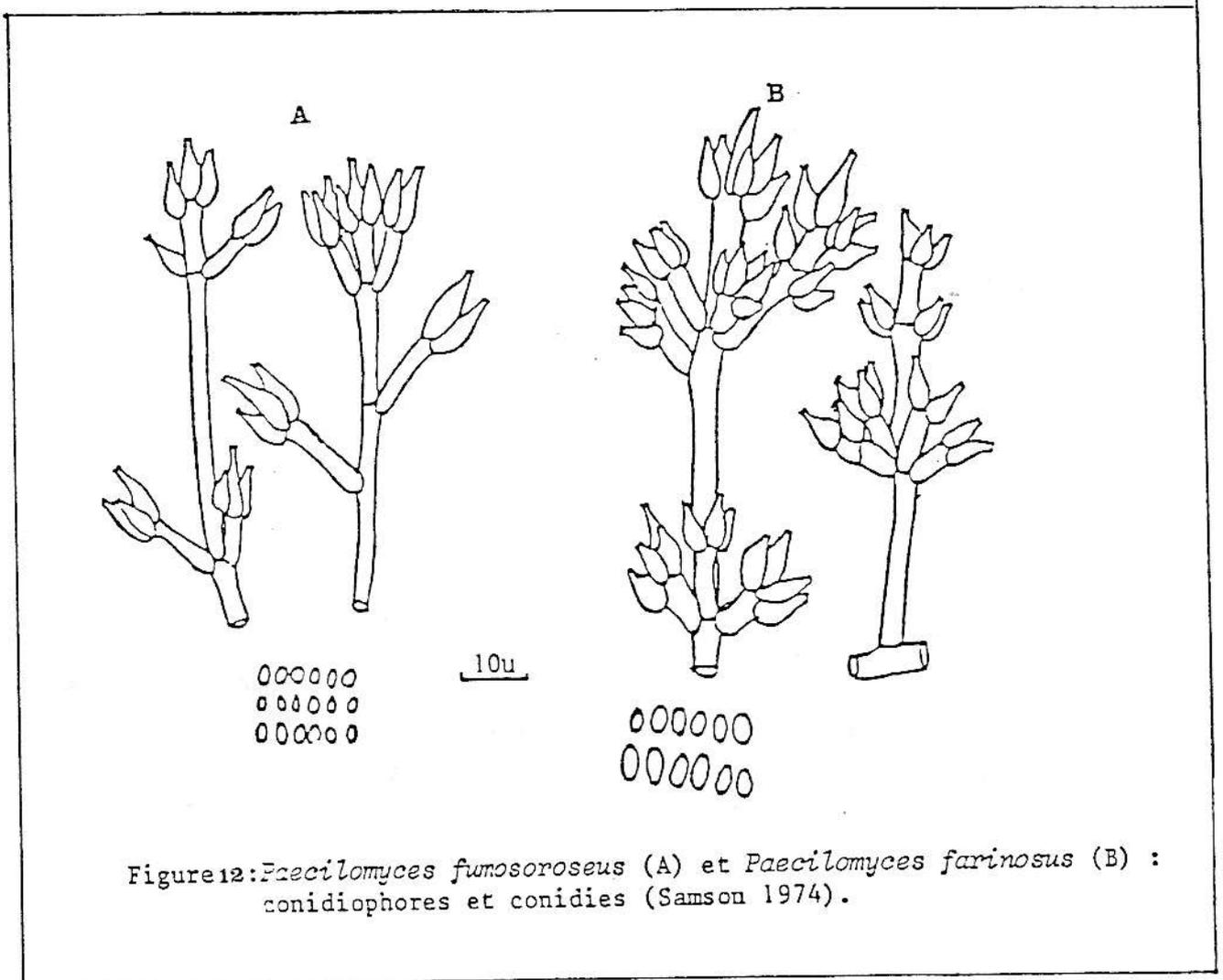


Figure 12: *Paecilomyces fumosoroseus* (A) et *Paecilomyces farinosus* (B) :  
conidiophores et conidies (Samson 1974).

reusement il est très difficile à cultiver car il pousse très lentement sur milieu synthétique. Un programme de prédiction de l'incidence de l'infection de *N.rileyi* sur *Anticarsia gemmatilis* Hübner sur les cultures de Soja, a été réalisé en 1976 (Kish et Allen, 1976). Les résultats ont été prometteurs car ils ont montré une forte corrélation entre ce qui s'observe sur le terrain (Johnson et al., 1976) et ce qui a été prédit. De nombreux travaux ont été par la suite entrepris dans la lutte contre les ravageurs de cultures de Soja (Ferron 1978). Mais selon Ignoffo (1981, 1982) il y a différents facteurs qui empêchent l'utilisation pratique de *N. rileyi* : il attaque trop lentement pour prévenir un désastre; il requiert de l'eau pour germer, croître et sporuler; son spectre de température va de 15 à 30 °C et il faut des doses massives de spores contre les larves pour qu'il soit efficace. Il offre cependant de nombreux avantages qui font de lui un éventuel insecticide biologique intéressant : il possède un large spectre d'activité vis à vis des larves de nombreuses Noctuelles; il est localisé dans différents agrosystèmes mais malheureusement, il est très difficile à produire

#### A.II.6. Le genre *Paecilomyces* Bainier

##### a- Description morphologique

*Paecilomyces* est caractérisé par un thalle blanc, rose, brun-jaune à brun-verdâtre mais jamais vert, ce qui le distingue des *Penicillium*. Les structures sporifères sont simples ou agrégées en synnema, constituées de conidiophores ramifiés, portant des phialides de forme caractéristique : cylindriques ou renflées dans leur partie inférieure et se prolongeant par un long col étroit bien distinct. Les conidies sont unicellulaires, hyalines à légèrement pigmentées, disposées en très longues chaînes basipétales, divergentes ou enchevêtrées.

Le genre *Paecilomyces* est divisé en deux sections (Samson, 1974).

- la section *Paecilomyces* qui rassemble des espèces mésophiles et thermophiles dont des formes sexuées sont connues pour la plupart d'entre elles. Les espèces phytopathogènes appartiennent à cette section.

- la section *Isarioïdae* réunit 31 espèces mésophiles dont on ne connaît pas de forme parfaite. Les espèces entomopathogènes connues appartiennent à cette section. Les descriptions et la classification morpho-ontogéniques des espèces de *Paecilomyces* reposent essentiellement sur des caractères morphologiques en culture pure.

Tableau 1.4 : Quelques caractéristiques des deux espèces de *Paecilomyces* étudiées

Espèce	Taille des phialides	Forme des conidies	Couleur des colonies	Hôtes sensibles	Hôtes résistants	Divers
<i>P. fumosoroseus</i>	5,7-8 x 1,2 µm	Cylindrique à Fusiforme	Rosâtre	Chrysalides de Pyralides et Noctuides	Chenilles de Pyralides	Ubiquiste
<i>P. farinosus</i>	5-15 x 1,2-2,5 µm	Elliptique à Fusiforme	Blanche	Larves de Lépidoptères telluriques		Tempéré à Subtropical

Dans la section *Paecilomyces*, trois genres d'Ascomycètes avec un stade asexué *Paecilomyces* sont connus :

- *Byssochlamys* : toutes les espèces possèdent un stade imparfait correspondant à *Paecilomyces*
- *Talaromyces* : très proche de *Byssochlamys* . On trouve des stades imparfaits dans *Penicillium* ou *Paecilomyces*
- *Thermoascus* : stade imparfait dans les genres *Paecilomyces* ou *Polypaecilum*.

En ce qui concerne les *Paecilomyces* de la section *Isarioidea* de Samson, le stade parfait est absent en culture pure. Mais sur insecte, plusieurs espèces peuvent être associées à des *Torrubiella* ou *Cordyceps* .

Parmi les nombreuses espèces entomopathogènes de *Paecilomyces*, deux sont étudiées ici : *P. farinosus* (Holm) Brown et Smith et *P. fumosoroseus* (Wize) Brown et Smith. Ces 2 espèces se distinguent (tableau 14) entre elles par la taille des phialides (5-15 x 1,2-2,5 µm pour *P. farinosus* et 5,7-8 x 1-2 µm pour *P. fumosoroseus* ), la forme des conidies (elliptique à fusiforme pour *P. farinosus* et cylindrique à fusiforme pour *P. fumosoroseus* ) et la couleur des colonies (blanches pour *P. farinosus* et rosâtres pour *P. fumosoroseus* ) (figure 12).

#### b- Historique du genre *Paecilomyces*

C'est en 1907 que le genre *Paecilomyces* est introduit par Bainier qui le décrit comme relativement proche de *Penicillium*, mais se distingue de celui-ci par l'absence de colonies de couleur verte et par une courte phialide cylindrique, se prolongeant par un col long et fin. Différentes espèces antérieurement décrites comme *Spicaria* ou *Isaria* ont été transférées dans ce genre à la suite des observations de similitudes des structures conidiogènes.

Vingt trois espèces de *Paecilomyces* sont reconnues par Brown et Smith en 1957. En 1967, Onions et Barron élargissent le concept générique de *Paecilomyces* en y plaçant 10 espèces monophialidiques dont 9 seront transférées dans le genre *Acremonium* par Gams; elles seront encore par la suite transférées dans le genre *Sagrahamala* par Subramanian.

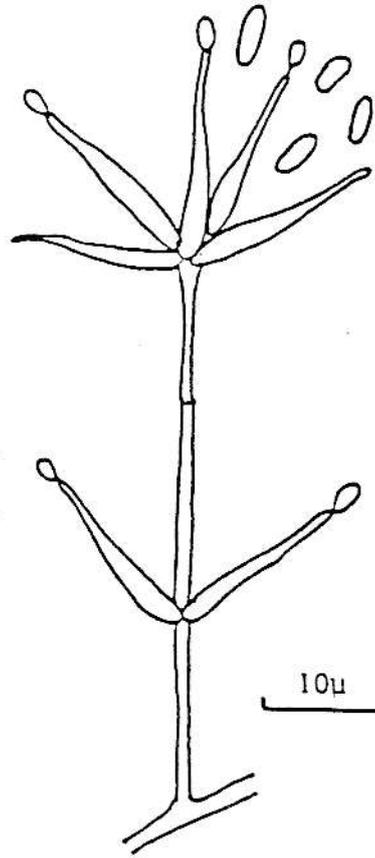


Figure 13: *Verticillium lecanii* .conidiophore et conidies

En 1974 , Samson fait la mise au point du genre et répartit les différentes espèces en 2 sections : *Paecilomyces* et *Isarioïdae*.

### c - Biologie des espèces *P.farinosus* et *P.fumosoroseus*

Les espèces étudiées ici sont essentiellement pathogènes d'Insectes telluriques.

*Paecilomyces fumosoroseus* et *P. farinosus* sont les espèces les plus connues et les plus préconisées en lutte biologique. Elles possèdent un spectre d'hôte assez large: Lépidoptères, Diptères, Homoptères, Coléoptères, Hyménoptères, Termites et plusieurs autres insectes, mais tendent à être spécifiques d'un seul hôte (Knitowa et al., 1977).

*Paecilomyces farinosus* est très commun dans les pays à climat tempéré ou subtropical . Il possède un très haut potentiel comme agent de contrôle biologique car il peut être efficace contre différents insectes: *L. decemlineata* (Samsinakova et Kalalova, 1978), *Scolytis scolytis* (Doberski, 1981), larves de *Spodoptera exigua* (Agudelo et Falcon, 1983), plusieurs espèces de Lépidoptères (Mohanana et Varma, 1988) etc..

La gamme d'hôtes de *P. fumosoroseus* est mal connue mais on sait qu'elle est assez large et que le champignon a une très vaste distribution géographique. Par l'emploi de mutants diauxotrophes, le cycle parasexuel a été mis en évidence, l'hybridation par fusion protoplasmique a été éprouvée et a permis de créer des hybrides portant des marqueurs de résistance aux fongicides; ceux-ci se sont révélés aussi pathogènes que la souche sauvage initiale (Riba, 1978) .

Par ailleurs des diploïdes et des recombinants mitotiques ont pu être obtenus à partir de mutants auxotrophes (Riba et Ravelojaona, 1984).

#### A.II.7. Le genre *Verticillium* Nees

##### a- Description morphologique

Le genre *Verticillium* est caractérisé par des conidiophores dressés, hyalins ou noirs, avec plusieurs étages de verticilles de phialides divergentes, étroites et hyalines. Les conidies sont hyalines, unicellulaires, rarement en chaînes. Beaucoup

Tableau 15 : Les préparations commercialisées à base de *Verticillium lecanii*

Nom commercial	Pays	Producteur ou Importateur	Insecte ravageur cible	Culture
VERTALEC	Angleterre	Tate & Lyle	Aphides	Cultures protégées
MYCOTAL	Suisse	Bridet	Aleyrodides	
MYCOTAL	Angleterre	Tate & Lyle	Aleyrodides	
THRIPTAL	Suisse	Bridet	Thrips	
VERTICILLIN	URSS		Aleyrodides	

d'espèces sont saprophytes ou phytopathogènes; une dizaine sont entomopathogènes dont *V. lecanii* (Zimm.) Viègas.(figure 13)

*V. lecanii* est caractérisé par un thalle à croissance lente, floconneux, blanc à jaune pâle. Les phialides sont isolées ou en verticilles, très allongées, légèrement renflées dans la partie inférieure. Les conidiophores ne sont pas distinctement différents de l'hyphe végétative.

Les conidies sont unicellulaires, hyalines, à paroi fine, cylindriques à ellip-tiques, formant des glomérules à l'extrémité de la phialide .

Les formes parfaites des *Verticillium* se répartissent dans les genres *Nectria* , *Cordyceps* et *Torrubiella*. Pour *V. lecanii* , aucune forme parfaite n'est connue.

#### **b- Historique de l'espèce *Verticillium lecanii***

Cette espèce a été décrite en 1939 par Zimmermann. Dans une monographie du genre *Cephalosporum* , Gams (1971) crée une section : *Verticillium* section *Prostrata* , contenant des espèces entomopathogènes et dont *V.lecanii* fait partie. Balazy (1973) propose de mettre les souches à conidiophores verticillés dans le sous-genre *Proverticillium* et de retenir les souches à conidiophores uniques dans le genre *Cephalosporum*. Hall (1981) ne retiendra par la suite que la classification de Gams .

#### **c- Biologie du genre *Verticillium***

*Verticillium lecanii* possède un large spectre d'hôte et parasite tous les stades de développement d'insectes de tous les groupes. Il produit des épizooties naturelles spectaculaires sur les pucerons et les aleurodes, dans les régions tropicales et sub-tropicales. Dans les régions tempérées, il n' a jamais été impliqué dans des épizooties mais il est souvent isolé à partir d'insectes de serres (Samsinakova et Kalalova, 1975; Easwaramorhy et Jayaraj, 1978; Kanagratam et al.,1982, Hall et Papierok,, 1982). Il a aussi été signalé sur les nématodes comme ceux de la betterave sucrière.et il peut.

Tableau 16: Récapitulatif des spectres d'hôtes

Espèce	Hôte généralement très sensible	Hôte généralement peu sensible	Divers
<i>B. bassiana</i>	Pyralidae Chrysomelidae Hémiptères	Scarabeidae Noctuidae Aleurodes Homoptères	Ubiquiste
<i>B. brongniartii</i>	Scarabeidae Curculionidae	Noctuidae Homoptères Pyralidae Hémiptères Homoptères	Ubiquiste
<i>P. fumosoroseus</i>	Chrysalides de Pyralidae et de Noctuidae	Chenilles de Pyralidae	Ubiquiste
<i>P. farinosus</i>	Larves telluriques de Lépidoptères		Ubiquiste
<i>N. rileyi</i>	Noctuidae	Pyralidae Scarabeidae Homoptères	Tropical
<i>T. cylindrosporum</i>	Diptères		Ubiquiste
<i>M. anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	Melolonthinae Chrysomelidae Pyralidae Cercopidae		Ubiquiste
<i>M. anisopliae</i> var. <i>major</i>	Dynastidae		Tropical

parfois hyperparasiter des champignons phytopathogènes (Kotthoff, 1937; Leming, 1976; Hall 1980) .

Petch (1925) fut le premier à préconiser l'emploi de *V. lecanii* en lutte biologique. Mais l'appréciation des potentialités du champignon dans le contrôle des insectes ravageurs de culture remonte à 1958 aux Seychelles, où il fut introduit dans des populations d'insectes divers; ceci donna de bons résultats. *V. lecanii* s'est révélé efficace dans les cultures de chrysanthèmes contre les aphidides *Brachycandus helichrysi* et *Myzna persicae*, et dans les cultures de concombres pour contrôler les populations d'*Aphis gossypii* et de *Trialeurodes vaporariorum* (Hall et Burges, 1979 , Hall, 1981; Kanagratam et al., 1982) .

*Verticillium lecanii* a été le premier champignon commercialisé en Europe. Trois préparations (tableau 15) à base de 3 souches distinctes ont été exploitées : VERTALEC homologué en Grande-Bretagne en 1981 contre les Homoptères aphididés, MYCOTAL contre les Homoptères aleyroididés et THRIPTAL pour réguler les Thrips et l'acarien *Tetranychus urticae*. Ces formulations contiennent des substances nutritives qui induisent la germination et limitent la croissance saprophytique à la surface. Cependant, l'utilisation de *V. lecanii* dans les champs ne donne pas entière satisfaction à cause des conditions d'humidité et de température non favorables. Dans les zones tropicales ou subtropicales, une plus grande potentialité existe car l'humidité y est très élevée pendant de longues périodes. Ces préparations ont été depuis retirées du marché. Notons qu'en URSS, *V. lecanii* est commercialisé sous le nom de VERTICILLIN (Filatov, 1981) .

L'isolement de protoplastes a été développé (Jackson, 1984). Grâce à des mutants auxotrophes, des croisements par anastomoses hyphales et par des fusions de protoplastes ont été obtenus avec succès (Jackson et Heale, 1987), bien que les diploïdes se soient montrés en majorité instables. Cette instabilité peut être contournée car il a été montré qu'elle est influencée par le choix des marqueurs d'auxotrophie (Mc Geary et Hastie, 1981).

Pour conclure, nous présentons les tableaux récapitulatifs:

- des spectres d'hôtes des espèces étudiées (tableau 16)

Tableau 17 : Liste récapitulative des préparations commercialisées

Agent	Nom commercial	Pays	Producteur ou Importateur	Insecte ravageur cible	Culture
<i>B. bassiana</i>	BIOTROL FBB	USA	Nutrillite	<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	Pommes de terre
				<i>Cydia pomonella</i>	Vergers
				<i>Dendrolimus sp.</i>	Forêt
<i>M. anisopliae</i>	COMBIO	Brésil	Equilibro controle		
				<i>Mahanarva posticata</i>	Canne à sucre
	METAQUINO	Brésil	CODECAP, IAA		
	BIOTROL FMA	USA	Nutrillite		
<i>V. lecanii</i>	VERTALEC	Angleterre	Tate & Lyle	Aphides	
	MYCOTAL	Suisse	Bridet	Aleyrodides	
	MYCOTAL	Angleterre	Tate & Lyle	Aleyrodides	Cultures protégées
	THRIPTAL	Suisse	Bridet	Thrips	
	VERTICILLIN	URSS		Aleyrodides	

Tableau 18: Liste de quelques applications expérimentales, parcelles, à base d'hyphomycètes entomopathogènes

Agent	Ravageur	Culture	Pays
<i>B. bassiana</i>	<i>Ostrinia nubilalis</i>	Mais	France, Italie
	<i>Otiocorynus sulcatus</i>	Pépinières de plantes et arbustes ornementaux, Fraisiers	France, RFA
	<i>Sitona sp.</i>	Protéagineux	France
	<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	Pommes de terre, Aubergines	France, Pologne, URSS, USA
	<i>Cydia pomonella</i>	Vergers, Pommiers	URSS, France
<i>B. brongniartii</i>	<i>Melolontha melolontha</i>	Pâturages	France, Suisse
<i>M. anisopliae</i>	<i>Hoplochelus marginalis</i>	Canne à sucre	La Réunion
	<i>Aphodius tasmaniae</i>	Pâturages	Australie
	<i>Wiseana sp.</i>	Pâturages	Nouvelle-Zélande
<i>P. fumosoroseus</i>	<i>Spodoptera frugiperda</i>	Mais	Antilles
<i>P. farinosus</i>	<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	Pommes de terre	Pologne
<i>N. rileyi</i>	Noctuides	Soja, Coton, Pâturages	USA, France

- des produits commercialisés à base d'hyphomycètes entomopathogènes(tableau 17)
- et enfin de quelques exemples d'applications expérimentales.(tableau 18).

**B. *MATERIELS ET METHODES***

## **B.I. Méthodes d'analyse des ARNr 28S et ADNr 28S**

Pour une caractérisation plus rigoureuse des souches et une meilleure évaluation des liens phylétiques entre les organismes, il est important de multiplier les caractères considérés. Des méthodes et techniques modernes d'analyses ont été utilisées. L'identification de chaque souche peut ainsi être définie par différents critères autres que les critères morphologique, physiologique ou pathologique.

Parmi les méthodes biochimiques, celles qui étudient les acides nucléiques (hybridation ADN-ADN ou ADN-ARN, comparaison de séquences, analyses du polymorphisme des fragments de restriction...) sont à l'heure actuelle les plus usitées. Elles sont fiables et permettent une certaine évaluation quantitative des relations phylétiques, ce que ne permettent pas les études phénotypiques.

### **B.I.1. Choix des ARNr 28S**

Les structures secondaires et tertiaires des ARN ribosomiques (ARNr) (décrites à partir d'analyses de séquences nucléotidiques) se sont remarquablement bien conservées au cours de l'évolution des espèces (Woese, 1980; Gerbi, 1985), bien que de grandes variations en taille aient été observées. Ces variations sont plus importantes pour la grande sous-unité de l'ARNr que pour la petite (Michot et Bachellerie, 1987; Qu, 1986). Les molécules d'ARNr jouent un rôle essentiel dans la structure et fonction des particules ribosomiques; ce sont des éléments indispensables de la synthèse protéique. Il apparaît évident qu'il y a une forte corrélation entre cette fonction et le haut degré de conservation structurale de ces molécules. La comparaison de séquences procaryotiques et eucaryotiques de la grande sous-unité de l'ARNr et l'étude des modèles de structures secondaires (qui en résultent), révèlent que toutes les molécules portent un grand coeur structural fortement conservé, interrompu à des sites particuliers et spécifiques par des domaines divergents qui ont subi de larges variations de taille durant l'évolution des eucaryotes. Cette conservation d'un coeur structural, fermement homologue durant l'évolution, suggère que cette caractéristique commune participe à des fonctions de base portées par les ribosomes de procaryotes et d'eucaryotes (Michot et al., 1984).

Le haut degré de conservation structurale de l'ARNr explique son implication directe dans la fonction ribosomique et laisse supposer que le ribosome primitif était une molécule d'ARN (Brimacombe et Stiege, 1985).

Les protéines ribosomiques (1/3 de la composition du ribosome) se seraient associées plus tard aux ARNr, pour augmenter l'efficacité du ribosome. Leur rôle, ainsi que leur interaction avec les ARN ne sont pas encore bien élucidés. Il est certain que ces protéines jouent un rôle important dans le maintien de la compacité du ribosome et certaines d'entre elles possèdent des activités enzymatiques; d'autres pourraient avoir un rôle de régulation dans la traduction de plusieurs autres protéines ribosomiques (Nomura et al., 1984).

La fonction du ribosome induit des changements conformationnels spécifiques. Dans le processus de biosynthèse des protéines, c'est certainement durant la traduction que se situe le stade le plus important où la molécule doit changer de conformation (Glotz et Brimacombe, 1980).

La taille et les proportions d'ARN et de protéines des ribosomes d'eucaryotes ou de procaryotes, cytoplasmiques ou mitochondriaux, présentent des variations assez appréciables; cependant leurs fonctions dans la synthèse protéique sont équivalentes et universelles. Rappelons ici ces 3 fonctions principales :

- une fonction dans la sélection et la reconnaissance des différents ligands: ARNt, ARNm
- une fonction mécanique dans la fixation de l'ARNm permettant la lecture de celui-ci
- une fonction catalytique grâce à ses quelques protéines possédant des activités enzymatiques.

Toutes ces fonctions sont inscrites dans la structure de la particule qui, elle-même, dépend des ARNr et de l'agencement des différentes protéines ribosomiques. La structure et la fonction universellement conservées du ribosome font des ARNr de bons indicateurs moléculaires (Qu, 1986) pour l'étude de l'histoire évolutive du monde vivant.

Ce haut degré de conservation se traduit aussi au niveau des séquences nucléotidiques : dans diverses régions bien précises de la molécule, elles évoluent beaucoup moins vite que la plupart des autres molécules (Takeshi & al. 1983). Il est probable que des contraintes fonctionnelles ont rendu ces séquences indispensables, car elles possèdent un contenu informationnel très important.

De ce fait, les séquences nucléotidiques des ARNr constituent donc un matériel de choix pour l'analyse phylogénétique entre les différents organismes (noyaux et organites des Eucaryotes ou des Procaryotes) et permettent d'établir des estimations de la divergence génétique.

Les ARNr 5S ont été les premiers à être utilisés comme indicateur phylogénétique, à cause de leur petite taille qui facilite la détermination des séquences (Hori & Osawa, 1987). Cependant, du fait de cette petite taille et du fait que ces molécules sont très fortement conservées (le nombre de positions nucléotidiques variables étant ainsi trop restreint), elles ne permettent pas d'obtenir des mesures exactes quand il s'agit de relations très étroites ou très éloignées, contrairement aux molécules plus grandes: 16-18S, 23-28S (Mc Carroll et al., 1983).

Pour cette raison, la comparaison de séquences partielles d'ARNr 28S est l'un des critères que nous avons choisis dans notre contribution à l'étude de la variabilité génétique des Hyphomycètes entomopathogènes.

Il a été montré que certaines séquences de ces molécules sont fortement conservées au cours de l'évolution des espèces alors qu'à côté de ces séquences conservées, se trouve un ensemble de domaines structuralement plus diversifiés. Ces domaines sont constitués d'une suite de séquences conservées, variables et hypervariables. Cette étude porte uniquement sur deux domaines (D1 et D2) à variation rapide, situés près de la région 5' terminale de l'ARNr 28S (figure 14).

Notre choix s'est porté sur ces 2 domaines car D2 est l'un des domaines les plus variables de l'ARNr 28S qui va nous permettre de mieux apprécier les divergences au

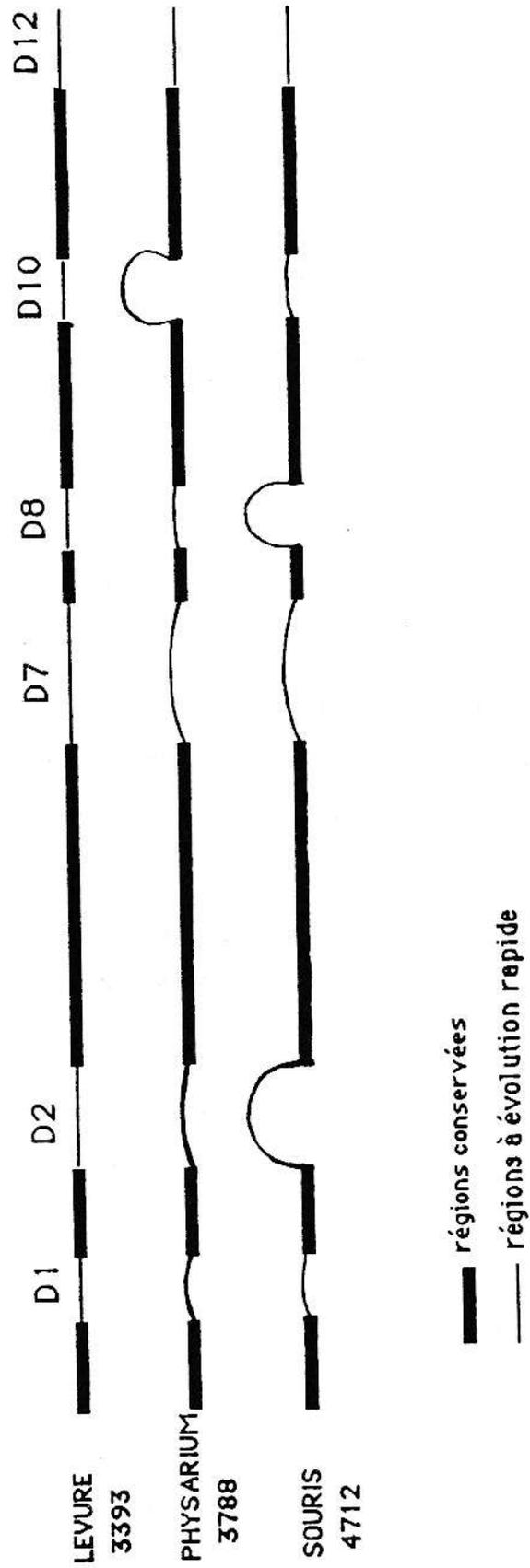


Figure 14: Comparaison schématique des séquences d'ARNr 28S eucaryotiques. Les molécules ont été alignées par référence à l'ARN de Levure, qui est le plus court. ( d'après Qu 1986 )

sein d'une même espèce ou entre des espèces proches. Les relations phylétiques entre taxons un peu plus éloignés sont estimées par l'analyse du domaine D1, qui est un domaine relativement plus conservé. Sur l'ensemble des deux domaines, 476 nucléotides ont été séquencés. Il a été défini que pour établir les relations phylétiques entre différents organismes par la comparaison de leurs séquences, il n'est pas nécessaire que la séquence de la molécule soit entièrement déterminée (Lane et al., 1985). Ce qui est impératif, c'est que le nombre de nucléotides comparés ait une signification statistique et que les séquences puissent être alignées.

### B.1.2. Culture des champignons

Les différentes souches étudiées proviennent de la mycothèque de la Station de Recherches de Lutte Biologique de la Minière. INRA. Guyancourt (liste des souches tableau 19).

La majorité des souches analysées pousse facilement sur un milieu semi-synthétique complet (MC) dont la composition est précisée dans le tableau 1. (Annexe III). Les souches de *Nomuraea* poussent sur un milieu un peu différent (tableau 2, Annexe III).

A partir de chaque tube de collection (milieu gélosé, conservé à 4°C à l'obscurité) provenant de la mycothèque, une préculture monospore est effectuée en boîte de Pétri sur milieu gélosé. Après 7 jours de culture à 26°C (20°C pour Ma23 et Ma76), le mycélium est récupéré par grattage superficiel du milieu puis broyé dans 100 ml d'eau distillée. On ensemence 1 ml de ce broyat dans une fiole de Roux contenant 150 ml de milieu liquide. Après quelques jours de croissance en condition statique, on obtient un tapis mycélien à la surface du milieu. Le mycélium est recueilli par filtration sur toile à bluter, puis lavé 3 fois dans l'eau distillée. On essore légèrement le mycélium dans la toile et on ôte l'excès d'eau avec du papier absorbant. Le mycélium est recueilli dans une boîte de Pétri, congelé et lyophilisé. Ce lyophilisat est gardé à -20°C jusqu'à son utilisation.

Tableau 19 : Liste des 116 souches étudiées

Nom de l'espèce	Isolat	Année d'isolement	Hôte d'origine	Origine géographique
<i>Beauveria bassiana</i>				
	Bb28	1971	<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	France (Nord)
	Bb70	1973	<i>Lasiocampidae</i>	Madagascar
	Bb73	1974	?	URSS
	Bb103	1975	<i>Tingidae gargaphia</i>	Colombie
	Bb147	1978	<i>Ostrinia nubilalis</i>	France (Nord)
	Bb169	1981	<i>Sitona discoïdeus</i>	France (Lusignan)
	Bb182	1982	<i>Sitona discoïdeus</i>	France ( Sud)
	Bb216	1983	<i>Sitona discoïdeus</i>	Maroc
	Bb377	1986	<i>Ostrinia nubilalis</i>	France (Alsace)
<i>Beauveria sulfurescens</i>	Bs	1981	ATCC 7159	
<i>Beauveria brongniartii</i>				
	Bt1	1961	<i>Melolontha melolontha</i>	France (Sarthe)
	Bt4	1962	<i>Melolontha melolontha</i>	Pologne
	Bt6	1964	<i>Melolontha melolontha</i>	France (Sarthe)
	Bt9	1965	<i>Melolontha melolontha</i>	France (Orne)
	Bt22	1968	<i>Melolontha melolontha</i>	France(Marolles)
	Bt33	1972	<i>Oryctes rhinoceros</i>	France
	Bt44	1972	<i>Melolontha melolonth</i>	Suisse
	Bt46	1972	<i>Melolontha melolontha</i>	Suisse
	Bt47	1973	<i>Melolontha melolontha</i>	France(Vésoul)
	Bt51	1974	<i>Meolontha melolontha</i>	France(Doubs)
	Bt53	1974	<i>Ixodes ricinus</i>	Tchécoslovaquie
	Bt72	1976	<i>Holotrichia serrata</i>	Inde
	Bt80	1978	<i>Mimela costata</i>	Japon
	Bt81	1979	<i>Pissodes nitizus</i>	Japon
	Bt82	1980	<i>Ips typographus</i>	Pologne
	Bt85	1982	<i>Melolontha melolontha</i>	Suisse
	Bt86	1983	<i>Melolontha melolontha</i>	Suisse
	Bt89	1983	<i>Melolontha melolontha</i>	Suisse
	Bt90	1983	<i>Melolontha melolontha</i>	Suisse
	Bt93	1986	<i>Melolontha melolontha</i>	France(Cantal)
	Bt100	1988	<i>Melolontha melolontha</i>	Italie
	Bt101	1988	<i>Melolontha melolontha</i>	Italie
<i>Beauveria velata</i>				
	Bv442	1981	<i>Lepidoptera sp.</i>	Equateur
	Bv352	1981	<i>Lepidoptera sp.</i>	Equateur
<i>Metarhizium anisopliae</i>				
	Ma2	1963	<i>Oryctes nasicornis</i>	Afrique
	Ma5	1964	<i>Strataegus aloeus</i>	?
	Ma14	1964	<i>Phyllopertha horticola</i>	France
	Ma15	1964	<i>Oryctes rhinoceros</i>	Afrique
	Ma17	1965	<i>Schistocerca gregaria</i>	Afrique
	Ma23	1966	<i>Oxycanus sp.</i>	Nouvelle-Zélande

Ma29	1967	<i>Oryctes rhinoceros</i>	France(La Minière)
Ma32	1967	<i>Cetonia aurata</i>	France
Ma44	1970	<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	France (La Minière)
Ma51	1971	<i>Oryctes rhinoceros</i>	France (La Minière)
Ma66	1972	<i>Oryctes nasicornis</i>	France (Poitiers)
Ma69	1973	<i>Oryctes sp.</i>	Afrique
Ma73	1972	<i>Oryctes rhinoceros</i>	Inde
Ma76	1973	<i>Oxycanus sp.</i>	Nouvelle Zélande
Ma91	1974	<i>Elateridae</i>	France (Rennes)
Ma94	1974	<i>Elateridae</i>	France (Doubs)
Ma95	1975	<i>Oryctes nasicornis</i>	France
Ma97	1975	<i>Melolontha melolontha</i>	France (Vésoul)
Ma104	1976	Sauterelle	Guadeloupe
Ma110	1978	<i>Sitona sp.</i>	France(Montpellier)
Ma139	1980	<i>Ostrinia nubilalis</i>	France (Levesville)
Ma146	1981	<i>Mahanarva posticata</i>	Brésil
Ma151	1981	<i>Zulia entreriana</i>	Brésil
Ma152	1981	<i>Zulia entreriana</i>	Brésil
Ma162	1982	<i>Mahanarva posticata</i>	Brésil
Ma167	1982	<i>Mahanarva posticata</i>	Brésil
Ma170	1982	<i>Mahanarva posticata</i>	Brésil
Ma175	1982	<i>Pachnaeus litus</i>	Cuba
Ma177	1982	<i>Sitona discoideus</i>	France(Montpellier)
Ma178	1982	<i>Otiorhynchus sulcatus</i>	France(Plougastel)
Ma180	1980	<i>Hoplochelus sp.</i>	La Réunion
Ma181	1983	<i>Hoplochelus marignalis</i>	La Réunion
Ma197	1986	<i>Diaprepes abbreviatus</i>	Guadeloupe
Ma199	1986	<i>Diaprepes abbreviatus</i>	Guadeloupe
Ma202	1986	<i>Adoretus sp.</i>	La Réunion
Ma229	1987	<i>Diaprepes abbreviatus</i>	Indonésie
Ma243	1986	<i>Diaprepes abbreviatus</i>	Martinique
Ma250	1987	<i>Diaprepes abbreviatus</i>	Guadeloupe
Ma252	1988	<i>Diaprepes abbreviatus</i>	Guadeloupe
Ma253	1988	<i>Diaprepes abbreviatus</i>	Guadeloupe
Ma254	1988	<i>Diaprepes abbreviatus</i>	Guadeloupe
<i>Metarhizium flavoviride</i>			
Mf88	1974	<i>Otiorhynchus sulcatus</i>	France
<i>Nomuraea rileyi</i>			
Nr5	?	<i>Anticarcia gemmatalis</i>	Floride
Nr7	1979	<i>Bombyx mori</i>	Japon
Nr9	1980	<i>Anticarcia gemmatalis</i>	Brésil
Nr11	1982	<i>Anticarcia gemmatalis</i>	USA
Nr12	1983	<i>Anticarcia gemmatalis</i>	USA
<i>Paecilomyces farinosus</i>			
Pf6	1970	<i>Thaumetopoea pityocampa</i>	France (La Minière)
Pf13	1973	<i>Pristiphora abietina</i>	France
Pf33	1977	<i>Hylobius sp.</i>	France(Orléans)
Pf36	1979	<i>Dendrolimus superus</i>	Japon
<i>Paecilomyces fumosoroseus</i>			
Pfr6	1972	<i>Cirphis unipuncta</i>	France(Montfavet)
Pfr25	1975	<i>Melolontha melolontha</i>	France(Vésoul)
Pfr35	1976	<i>Mamestra brassicae</i>	France(Marcoussis)
Pfr40	1977	<i>Ostrinia nubilalis</i>	France
Pfr47	1980	<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	Pologne
Pfr54	1984	<i>Diaprepes abbreviatus</i>	Guadeloupe
Pfr59	1985	<i>Diaprepes abbreviatus</i>	Martinique
<i>Tolypocladium cylindrosporum</i>			

	TC8	1965	Fougère	Angleterre
	TC10	1967	Sol	Tchécoslovaquie
	TC7	?	<i>Aedes australis</i>	Nouvelle-Zélande
	TC9	?	Sol	Hollande
	TC1	1971	<i>Aedes sierrensis</i>	Californie
<i>Tolypocladium extinguens</i>	TC16	1977	<i>Arachnocampa luminosa</i>	Nouvelle-Zélande
<i>Microhilum oncoperae</i>	B95	1987	<i>Adoryphorus couloni</i>	Australie
<i>Verticillium lecanii</i>	VF	1976	Cochenille	France
	VV	1981	Aleurode	?
	Vlec	1982	Aleurode	France
	MYC	1984	<i>Trialeurodes vaporariorum</i>	Angleterre
	V2V	1986	Acarien	France
<i>Penicillium citrinum</i>	Pcit	1980	Moustique	Indes

## Liste des souches recharacterisées

Ancien nom	Isolat	Année d'isolement	Hôte d'origine	Origine géographique	Nouveau nom
<i>Paecilomyces fumosoroseus</i>	Pfr38	1976	<i>Scotia segetum</i>	France	forme intermédiaire entre <i>P.fumosoroseus</i> et <i>P.farinosus</i>
	Pfr52	1984	<i>Calliphora</i>	France	<i>Paecilomyces javanicus</i>
	Pfr63	1987	<i>Diaprepes sp.</i>	Guadeloupe	<i>Paecilomyces lilacinus</i> ou <i>P.marquandii</i>
<i>Paecilomyces lilacinus</i>		1980	<i>Meloïdogyne incognita</i>	Pérou	<i>P.lilacinus</i> ou <i>P.marquandii</i>
<i>Paecilomyces tenuipes</i>	Pt	1987	Larves de lépidoptère		<i>Beauveria sp.</i>
<i>Paecilomyces canadensis</i>	Pc	1979	<i>Lymantria</i>	Japon	<i>Beauveria brongniartii</i>
<i>Beauveria brongniartii</i>	B41	1973	<i>Adalia notata</i>	France	<i>Verticillium lecanii</i>
	B73	1973	<i>Sibine apicalis</i>	USA	<i>Paecilomyces sp.</i>
	B96	1988	<i>Hoplochelus marginalis</i>	Madagascar	<i>Microhilum oncoperae</i>
<i>Verticillium lecanii</i>	VC26	1987	<i>Formicidae</i>	Cuba	<i>Acremonium strictum</i>

### B.I.3. Analyse des ARNr 28S

#### a- Extraction de l'ARNr (Annexe III)

Environ 120 mg de mycélium lyophilisé sont broyés dans l'azote liquide puis répartis dans deux tubes Eppendorf de 2,2 ml et mélangés énergiquement avec 900  $\mu$ l de tampon d'extraction (Annexe III) et 900  $\mu$ l d'une solution phénol-chloroforme (vol1:1) (Annexe III) L'utilisation de ces 2 solvants organiques permet une déprotéinisation plus efficace ; le chloroforme facilite en même temps la séparation de la phase aqueuse et de la phase organique. Avant utilisation, le phénol est saturé avec du Tris-HCL pH 7,4. Cette solution contient aussi de l'hydroxyquinoléine (qui est un antioxydant, un faible chélateur des ions métal et un inhibiteur partiel de RNase) et de l'alcool isoamylique (qui réduit l'émoussement lors de l'extraction). On centrifuge le mélange 15 mn à 10 000 tpm à 2°C. La phase aqueuse est récupérée. L'extraction au phénol-chloroforme est répétée deux fois. Après ce cycle de purification et d'extraction, suit une série de lavages et de précipitations. On rajoute 70  $\mu$ l de NaCl 3M puis 1400  $\mu$ l d'éthanol froid à la phase aqueuse. On laisse précipiter 2h à -20°C. Après centrifugation, le culot est séché sous vide puis resuspendu dans 400  $\mu$ l de Tris(10mM) pH7,4.

La purification des ARN se poursuit par une série de précipitations au LiCl(3M), éliminant ainsi l'ADN double brin. Après centrifugation, le culot est de nouveau resuspendu dans 250  $\mu$ l de Tris (10mM) pH 7,4.

#### b- Dosage et contrôle de pureté de l'ARN

Les 2 suspensions de chaque souche (250  $\mu$ l) sont regroupées dans un seul tube, puis analysées au spectrophotomètre selon un spectre d'absorption de 200 à 320  $\mu$ m. La concentration d'ARN est déduite à partir du pic de la DO 260.

L'ARN est utilisé à une concentration de 4  $\mu$ g/ $\mu$ l. La pureté de l'ARN est ensuite contrôlée par un mini-gel d'agarose en présence de BET (l'efficacité du séquençage requiert une population de molécules entières, homogènes et sans protéines).



### **c-Technique de séquençage**

Le séquençage des ARNr se fait selon une technique simple et rapide (Qu et al., 1988). Cette technique repose sur la synthèse d'ADNc par la transcriptase inverse.

L'élongation est initiée par des oligonucléotides de synthèse, complémentaires de la région phylogénétiquement conservée en aval des domaines (amorces P1, P3, (Guadet et al., 1989) (Annexe III).

Ces amorces sont préalablement marquées en 5' avec  $\gamma$ P32(ATP) et la polynucléotide kinase (Annexe III).

L'allongement de la chaîne s'effectue en présence de nucléotides triphosphates froids (dN) (Annexe III). Le principe de la méthode (figure 15) est fondé sur l'activité inhibitrice de l'élongation des didésoxynucléotides triphosphates (ddN). Ces ddN n'ont pas de groupe 3'hydroxyl. L'élongation est arrêtée chaque fois qu'un ddN est incorporé. Chaque tube de séquence contient un type de ddN (ddA, ddT, ddG ou ddC) et le type de dN analogue (dA, dT, dG ou dC). On obtient ainsi des fragments de différentes longueurs ayant la même extrémité 5'. Les fragments d'ADN sont séparés par électrophorèse en gel de polyacrylamide à 6% ou à 8% (Annexe III) sur plaque de 40 cm.

Les gels sont séchés avant autoradiographie. La lecture se fait après 2 à 3 jours d'exposition sur film Amersham.

### **d- Electrophorèse en gel de polyacrylamide**

La migration électrophorétique se fait dans des conditions dénaturantes dans un tampon Tris-Borate pH 8,3 (Annexe). Le gel contient de l'urée à une concentration suffisante pour assurer un maximum de dénaturation de l'ARN. Le pouvoir dénaturant du gel est aussi rehaussé par sa température élevée résultant de la haute tension utilisée (1800 volts). Ceci permet d'obtenir le maximum d'échauffement, de minimiser la diffusion des fragments et de réduire le temps de la migration. Dans ces conditions, les régions à structure secondaire devraient être effectivement dénaturées.

Deux concentrations de polyacrylamide sont utilisées: 6% et 8%. Le pourcentage d'acrylamide et de bis acrylamide détermine la classe de taille des fragments que l'on veut séparer. Un haut pourcentage (8%) pour un court temps de migration (2h)



permet d'obtenir les séquences près de l'extrémité marquée. Quand on diminue le pourcentage (6%) et quand on augmente le temps de migration (7h), les fragments plus longs sont résolus et la séquence déterminée est plus longue.

#### **e- Problèmes rencontrés: la route vers le PCR**

Le rapport de concentration habituel entre ddN et dN est de 5, avec pour chaque tube, une concentration de 40  $\mu\text{M}$  de dN et 200  $\mu\text{M}$  de ddN. Ceci permet de synthétiser facilement près de 300 nucléotides. Malheureusement dans le domaine D2, pour certaines de nos souches, il a été impossible d'aller au delà de 150 nucléotides.

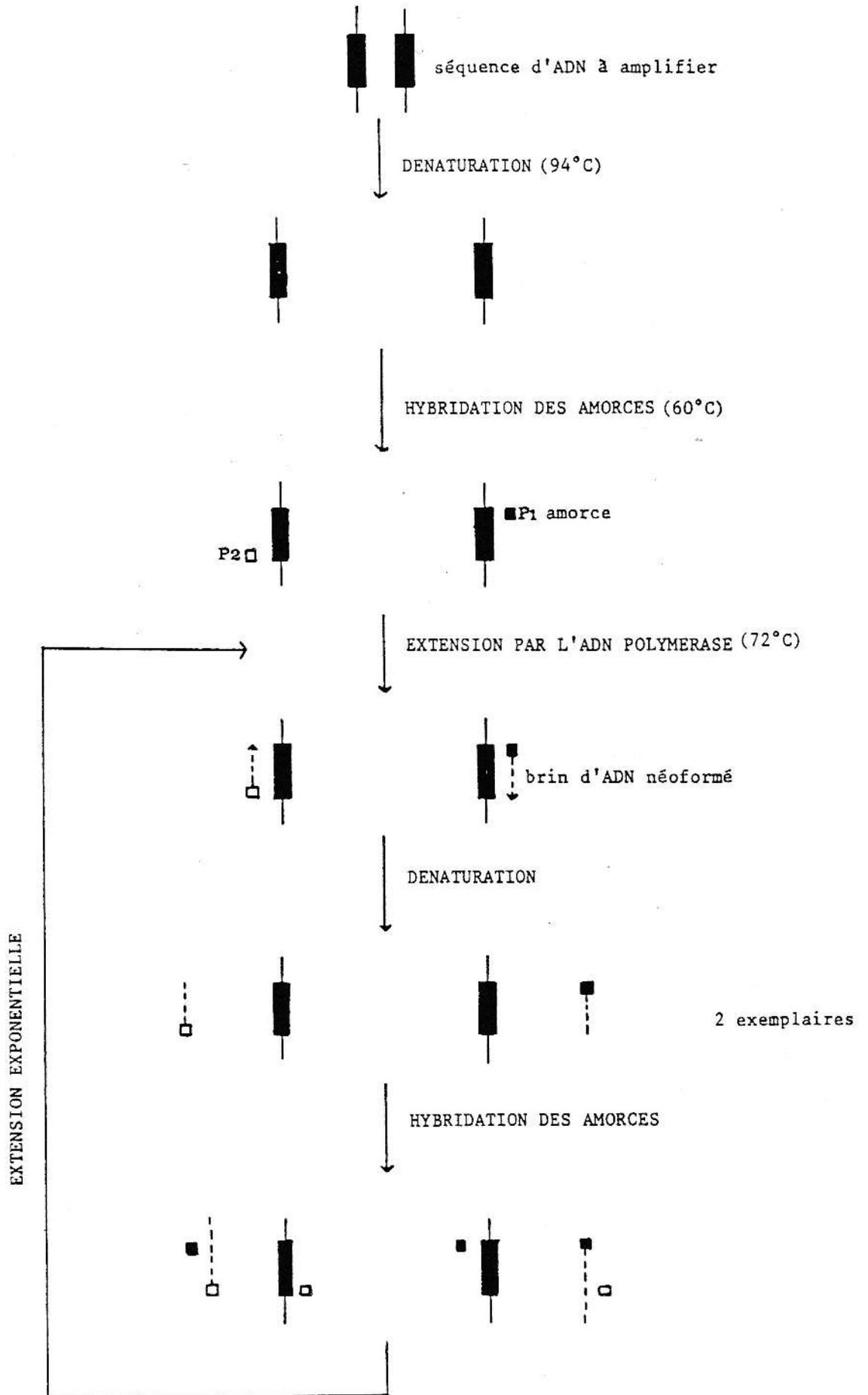
- Au départ, nous avons pensé que cette interruption de l'élongation était due à un mauvais rapport entre ddN et dN. Différents rapports ddN/dN ( $r=1, 2, 4$ ) ont donc été testés, avec une concentration invariable de dN et égale à 40  $\mu\text{M}$ . Ceci ne nous a pas permis de dépasser les 150 nucléotides.

- La modification du rapport par des changements de concentrations de dN n'est pas non plus efficace.

- Au vu de ces résultats, nous avons tenté de réaliser l'élongation à différentes températures (30, 35 et 45°C) pendant 30 mn. Aucune différence n'a été observée pour les 3 conditions. Par ailleurs, le temps d'élongation (20 mn à 1 h) n'a aucun effet sur la longueur de la séquence, à partir de 30-35 mn. Pour des temps inférieurs, les séquences sont plus courtes.

Après cette bande d'arrêt, on a parfois encore quelques nucléotides mais tout se passe comme si on arrivait à l'extrémité de l'ARN. Pour vérifier si l'ARN n'a pas été coupé lors de la conservation, les extraits ont été repassés sur minigel d'agarose. Les profils obtenus semblent normaux, cependant cette technique n'est pas assez résolutive pour distinguer des fragments trop courts. Il pourrait être aussi probable que cet arrêt d'élongation dans le domaine D2 soit dû à une conformation secondaire particulière de l'ARN au niveau de laquelle la chaîne n'est plus normalement accessible à la transcriptase. Pour contourner ce problème, nous avons séquencé le segment d'ADN codant pour cette région de l'ARNr 28S (figure 20), en passant par une étape d'amplification enzymatique(PCR).

Figure 21: Technique de base du PCR



#### **B.I.4. Analyse de l'ADNr**

##### **a- Extraction de l'ADNr (Annexe III)**

L'extraction et la purification de l'ADN génomique s'effectuent suivant un protocole de mini-extraction simple et rapide. Le mycélium lyophilisé, obtenu dans les mêmes conditions que pour l'extraction des ARNr, est broyé, placé dans un tube Eppendorf, et mélangé avec 1 ml de tampon d'extraction (EDTA 50 mM, SDS 0,2% pH8,5). Le mélange est incubé à 70°C, puis centrifugé. On ajoute de l'acétate de Potassium 5M au surnageant; on laisse précipiter 30 mn dans la glace avant de centrifuger. Le surnageant est prélevé. L'extraction proprement dite est réalisée à l'aide d'une solution de phénol-chloroforme-alcool isoamylique(48-48-4) saturée avec du Tris pH7,5. Cette opération est effectuée 3 fois. Les protéines restantes sont enlevées par l'addition de 800 µl de chloroforme-alcool isoamylique(48-4). L'ADN contenu dans la phase aqueuse est ensuite concentré par une précipitation à l'éthanol (1 ml), suivi d'une centrifugation. Le culot est lavé à l'alcool 70 %, puis séché sous vide et resuspendu dans 100 µl de tampon Tris EDTA.

Un traitement à la RNase (10mg/ml) à 37°C pendant 30 mn dégrade les ARN qui restent. La pureté de l'ADN est contrôlée sur un mini-gel d'agarose en présence de BET.

##### **b- Technique du PCR**

La technique du PCR permet d'amplifier un segment d'ADN entre 2 régions de séquence connue. Elle a été conçue et développée à la Cetus Corporation par Mullis (1987). La technique est basée sur le fonctionnement cyclique d'une ADN polymérase. Deux oligonucléotides de synthèse sont utilisés comme amorce pour une série de réactions synthétiques catalysées par la polymérase. Ces amorces sont complémentaires des séquences qui sont à l'opposé de l'ADN modèle. Elles sont présentes en large excès par rapport à la quantité d'ADN pour favoriser la formation du complexe amorce-ADN, par rapport à la réassociation des 2 brins d'ADN quand la température baisse après l'étape de dénaturation. Cependant la concentration de ces amorces ne doit pas être trop élevée pour éviter toute hybridation non spécifique.

Un cycle d'amplification comprend 3 étapes (figure 21):

- la dénaturation de l'ADN (94°C)
- l'hybridation des amorces (60°C)
- l'extension de l'amorce par la Taq polymérase (72°)

La Taq polymérase a été isolée d'une archéobactérie (*Thermus aquaticus*) et peut résister à de très hautes températures (100°C). Chaque cycle d'amplification double la quantité du produit d'ADN désiré

Des niveaux d'amplification de  $10^5$  peuvent être atteints au bout de 25 cycles.

Dans un premier temps, la région concernée est amplifiée sous forme d'ADN double brin. Deux couples d'amorce sont employés: PN7 ou PN9 est utilisé en association avec PN2 ou PN4 .

Dans un second temps, l'ADN est amplifié de façon asymétrique sous forme d'ADN simple brin avec PN9; le produit d'ADN ainsi obtenu servira de matrice pour le séquençage. Les produits de l'amplification sont visualisés sur un mini-gel d'agarose en présence de BET. Avant d'être séquençé, l'ADN est purifié par un passage sur une colonne de sephadex.

### **c- Technique de séquençage de l'ADN**

Le séquençage de l'ADNr est entrepris par la méthode de didésoxynucléotides terminateurs de chaîne (Sanger, 1977). L'élongation de la chaîne est catalysée par la T7 DNA polymérase. Le protocole utilisé, livré avec le kit de séquençage est celui proposé par Pharmacia . Les fragments d'ADN sont marqués au S35. Ce choix est justifié d'une part, par une meilleure résolution autoradiographique du S35 par rapport au P32, d'autre part, par une durée de vie plus longue des produits marqués et par une utilisation plus simple. L'initiation de l'élongation se fait avec l'amorce P3 (= PN4).

## **B.II. Méthodes d'analyse des isoenzymes**

### **B.II.1. Choix de la technique**

Les isoenzymes sont des enzymes utilisant *in vitro* le même substrat mais qui possèdent des propriétés électrophorétiques différentes.

Les techniques électrophorétiques qui permettent d'étudier les isoenzymes ont été élaborées depuis longtemps. C'est en 1955 que Smithies a introduit les techniques d'électrophorèse en gel d'amidon, donnant l'espoir, à plus ou moins longue échéance, d'identifier différents groupes taxonomiques par une simple électrophorèse. Ces techniques ne nécessitent pas de purification du matériel et peuvent se faire directement à partir d'un extrait brut. En électrophorèse conventionnelle, les deux supports les plus utilisés sont l'amidon et le polyacrylamide.

L'électrophorèse en gel d'acrylamide a un pouvoir de séparation plus grand que l'électrophorèse en gel d'amidon. Ces 2 techniques séparent les molécules essentiellement par la charge mais aussi par la taille suivant un effet de tamis. Malheureusement, les profils obtenus par gel de polyacrylamide sont parfois trop complexes et donc difficiles à interpréter. Ces techniques restent cependant les meilleures pour la typologie des souches. L'électrophorèse en gel d'amidon donne des patterns électrophorétiques simples donc plus faciles à utiliser dans une étude comparative à des fins taxonomiques et même phylogénétiques.

Notre contribution à l'étude de la variabilité génétique de ces organismes a porté sur des souches choisies à partir de chaque branche de l'arbre phylétique établi par l'analyse des séquences d'ARNr. Cette étude s'est faite à l'aide de la séparation électrophorétique en gel d'amidon et porte sur une dizaine de systèmes enzymatiques. Cette technique présente l'avantage de donner des profils électrophorétiques simples, faciles à interpréter génétiquement; elle permet en outre, pour un individu, pour un gel, de révéler simultanément 4 à 5 systèmes enzymatiques.

Au sein de chaque espèce, nous verrons s'il est possible de reconnaître des profils typiques et nous essayerons, à partir de la comparaison des différents zymogrammes, d'établir les liens phylétiques entre les espèces et les genres étudiés.

Nous rechercherons des congruences entre la classification issue de cette analyse biochimique et la classification établie par les séquences d'ARNr: la première est établie par l'analyse du produit de plusieurs gènes dans un même organisme; la seconde se situe au niveau d'un seul gène.

Tableau : Liste des souches concernées par l'analyse enzymatique

Espèce	Isolat	Hôte d'origine	Groupe d'ARNr
<i>B. bassiana</i>	Bb28	<i>L. decemlineata</i>	BA
	Bb147	<i>O. nubilalis</i>	BA
	Bb216	<i>S. discoideus</i>	BA
<i>B. brongniartii</i>	Bt22	<i>M. melolontha</i>	BC2
	Bt33	<i>O. rhinoceros</i>	BC2
	Bt72	<i>H. serrata</i>	BC4
	Bt82	<i>Ips typographus</i>	BC1
	Bt85	<i>M. melolontha</i>	BC2
	Bt93	<i>M. melolontha</i>	BC3
<i>B. velata</i>	Bv352	Larves de Lépidoptères	BB
<i>B. sulfureus</i>	Bs	ATCC 7159	BA
<i>M. anisopliae</i>	Ma5	<i>S. aloeus</i>	M4
	Ma15	<i>O. rhinoceros</i>	M2
	Ma23	<i>Oxycanus sp.</i>	M3
	Ma29	<i>O. rhinoceros</i>	M2
	Ma38	<i>O. monoceros</i>	M2
	Ma51	<i>O. rhinoceros</i>	M2
	Ma66	<i>Oryctes sp.</i>	M2
	Ma73	<i>O. rhinoceros</i>	M2
	Ma76	<i>Oxycanus sp.</i>	M7
	Ma91	Taupin	M1
	Ma95	<i>O. nasicornis</i>	M2
	Ma97	<i>M. melolontha</i>	M1
	Ma104	Sauterelle	M5
	Ma139	<i>O. nubilalis</i>	M1
	Ma152	<i>Z. entreriana</i>	M6
	Ma175	<i>P. ritus</i>	M1
	Ma180	<i>Hoplochelus sp.</i>	M6
	Ma181	<i>H. marginalis</i>	M1
Ma253	<i>D. abbreviatus</i>	M6	
<i>M. flavoviride</i>	Mf	<i>O. sulcatus</i>	M8
<i>V. lecanii</i>	Myc	<i>T. vaporariorum</i>	V1
	Vlec	Aleurode	V1
	VF	Cochenille	V2
<i>T. cylindrosporum</i>	TC1	<i>A. sierrensis</i>	TA
	TC10	Sol	TA
<i>M. oncoperae</i>	B95	<i>A. couloni</i>	
<i>N. rileyi</i>	Nr9	<i>A. gemmatilis</i>	
<i>P. fumosoroseus</i>	Pfr35	<i>M. brassicae</i>	PFRB1
	Pfr40	<i>O. nubilalis</i>	PFRB2
	Pfr47	<i>L. decemlineata</i>	PFRB3
	Pfr54	<i>D. abbreviatus</i>	PFRB2
<i>P. farinosus</i>	PF6	<i>T. pityocampa</i>	PA
	PI36	<i>D. superius</i>	PA

## **B.II.2 .Culture des champignons**

Nous avons analysé 44 souches dont nous donnons la liste dans le tableau 16.

Les conidiospores sont obtenues après 15 jours de culture des souches sur milieu MC gélosé à 25°C (20°C pour Ma23 et Ma76) et à l'obscurité. Les spores sont récoltées par grattage superficiel du milieu, puis mises en suspension dans de petits flacons contenant de petites billes de verre et 10 ml d'eau distillée. Elles sont ensuite dispersées par agitation. Cette suspension est ensemencée dans 50 ml de milieu liquide Adamek (tableau 5 Annexe III) répartie, en Erlenmeyers de 150 ml. Le mycélium est récolté au bout de 7 jours de culture profonde agitée (100 tpm), à 25°C.

## **B.II.3. Extraction des protéines**

Le mycélium formé sur milieu Adamek subit 3 séries de lavage à l'eau stérile par centrifugation à 900 tpm pendant 15min. Le mycélium est ensuite rincé dans une solution tamponnée (Tris  $10^{-2}$  M-EDTA  $5.10^{-3}$  M pH 8,2 ) puis séché par un papier absorbant, pesé et finalement broyé dans de l'azote liquide. Le broyat est repris dans le même tampon à raison de 0,1 ml pour 1 g de mycélium séché. Cette suspension subit une centrifugation réfrigérée à 15 000 tpm pendant 1h. Le surnageant contenant les extraits protéiques est recueilli puis reparti dans des tubes Eppendorfs. Ces extraits sont conservés à -80°C jusqu'au moment de leur utilisation.

## **B.II.4 .Electrophorèse en gel d'amidon**

### **a-Fabrication des gels**

Les gels sont réalisés avec de la fécule de pomme de terre hydrolysée (Sigma).

Les gels sont préparés en mélangeant dans un Erlenmeyer de 2 litres, 38 g d'amidon et 300 ml de tampon Tris-Acétate-EDTA (Annexe) dont 200 ml ont été préalablement chauffés. Ce mélange est mis en ébullition en agitant constamment l'Erlenmeyer. Dès qu'il commence à être visqueux, on compte 1 mn de cuisson. Le mélange devient fluide et transparent. Après dégazage à la trompe à eau, l'amidon est

coulé dans un moule de plexiglas. En refroidissant, le gel devient opaque. Préparé la veille, il est gardé en chambre froide (5°C) jusqu'à son utilisation.

### **b- Conditions de migration**

Treize échantillons peuvent être analysés sur le même gel. On prend toujours une souche de référence que l'on dépose 3 fois sur le gel. Dans chaque tube d'extrait décongelé, on trempe un papier Whatman (0,50x1cm) que l'on dépose verticalement dans une fente réalisée dans le gel. A chaque extrémité et au centre du gel, on dépose un papier imbibé de bleu de bromophénol pour visualiser la migration du front électrophorétique. Un film de polyéthylène posé sur le gel empêche l'évaporation et un sac de glace pilée empêche la dénaturation des enzymes et la distorsion dans les profils.

Les électrophorèses sont réalisées en chambre froide. Pour toutes nos analyses et pour la préparation et la migration des gels, nous avons utilisé le même tampon (Tris 9,19 g-Acide citrique 1,05 g-EDTA 250 mg). Les migrations sont effectuées à 200 volts pendant 4h.

#### **B.II.5. Les systèmes enzymatiques étudiés**

Dix systèmes appartenant aux classes d'enzymes suivantes, ont été étudiés:

- oxydoréductases : Malate déshydrogénase (MDH), Xanthine déshydrogénase (XDH), Phosphogluconate déshydrogénase (PGD), Glycérophosphate déshydrogénase (GPDH), Glucose-6 phosphate déshydrogénase (G6PDH), Lactate déshydrogénase (LDH), Alcool déshydrogénase (ADH).

- hydrolase :  $\alpha$  - estérases

- transférases: Glutamate oxaloacétate transaminase (GOT), Phosphoglucomutase (PGM) .

D'autres systèmes ont été testés: certains comme GDH (Glutamate déshydrogénase) et SDH ( Sorbitol déshydrogénase) présentent les mêmes profils que GPDH;

d'autres comme SU (Succinate déshydrogénase), IDH (Isocitrate déshydrogénase) n'ont pu être révélés par les méthodes de coloration à notre disposition.

#### **B.II.6. Révélation des activités enzymatiques**

Après 4h de migration électrophorétique, on procède à la révélation des diverses isoenzymes. A l'aide d'un fil d'acier, on coupe des tranches d'environ 2 mm d'épaisseur dans le gel. Chaque tranche permet de révéler une enzyme. On arrive ainsi à révéler simultanément 4 à 5 systèmes par gel. Chaque tranche est placée dans 100 ml de solution de révélation (tableau 4, Annexe III), placée à 37°C à l'abri de la lumière, pendant 20 mn à 2h suivant les systèmes. Les réactions sont arrêtées avec un mélange fixateur (alcool, H<sub>2</sub>O et acide acétique).

### **B.III .Méthodes d'analyse des résultats**

#### **B.III.1. Analyse phylogénétique des séquences d'acides nucléiques**

A partir des données moléculaires, on peut définir les distances génétiques qui séparent différentes souches. Les séquences lues sont entrées dans l'ordinateur et alignées "à l'oeil", en se référant à celle de *Fusarium oxysporum* (Guadet et al., 1989) Celle-ci est prise comme séquence de référence car elle s'avère suffisamment homologue aux séquences d'entomopathogènes. Malgré cette homologie, cependant, cette séquence a été introduite dans les calculs de distances car elle s'est avérée suffisamment éloignée des autres pour constituer un "outgroup" permettant de déterminer un pied pour les dendrogrammes Ensuite, on a construit des arbres phylogénétiques à partir de ces données. Trois types de méthodes ont été utilisées:

- une méthode de parcimonie : programme DNAPENNY du "package" Phylip de J. Felsenstein (Hendy et Penny, 1982). Cette méthode examine tous les sites variables pour un ensemble de séquences alignées, et construit un arbre (ou des arbres) où les séquences sont placées de telle manière que le nombre total de substitutions, site par site, soit minimum dans l'ensemble de l'arbre. Malheureusement le traitement par cette méthode est très limité puisque dès que le nombre de sites

différents est trop élevé, le traitement peut durer de nombreux jours (par exemple pour 40 sites différents entre 11 séquences, au bout de 3 jours, on n'obtient pas encore de réponse). Cette méthode ne sera donc appliquée ici que pour traiter des séquences assez proches (à l'intérieur d'un genre), prises par groupes d'effectif réduit.

- deux méthodes basées sur les distances entre souches. La distance entre deux souches est estimée soit par le nombre total des sites qui diffèrent entre elles, soit par l'indice Knuc de Kimura (1980) qui pondère différemment les transitions et les transversions. Ces valeurs sont calculées par l'ordinateur (programme Homolog sur HP 1000) qui fournit une matrice de toutes les distances entre souches d'un ensemble donné, prises deux à deux. Cette matrice est traitée ensuite par deux programmes différents:

+ le programme FITCH du package Phylip, qui applique la méthode de Fitch et Margoliash (1967) et donne un arbre optimisant les longueurs de branches.

+ le programme du NEIGHBOR-JOINING (Saitou et Nei, 1987), qui calcule un arbre similaire à celui de FITCH à partir des mêmes données, mais utilise un algorithme plus rapide. Cette méthode présente l'avantage de pouvoir traiter un très grand nombre de séquences en un temps très court (1 mn au lieu de 54 h pour 25 séquences à traiter).

Pour les analyses intra-genres, les séquences sont traitées avec le programme FITCH et le programme DNAPENNY. Quant aux analyses inter-genres, le traitement se pratique avec le programme FITCH conjugué avec celui du NEIGHBOR-JOINING. Sur l'ensemble des deux domaines, 476 nucléotides ont été séquencés, 95 groupes de séquences ont été établis à partir de 116 souches au départ.

Dans les figures d'arbres, la longueur des branches horizontales reflète directement la distance (issue de la matrice) entre les différents groupes. Les branches verticales servent de repères et leur longueur n'est pas à prendre en compte.

### B.III.2. Classification par l'analyse des zymogrammes

Dans cette partie, notre propos n'est pas d'établir le déterminisme génétique des systèmes enzymatiques dans les différentes populations étudiées, mais d'analyser leur variabilité génétique afin de dresser des arbres phylétiques. En effet les champignons que nous étudions ici sont des organismes haploïdes et les profils obtenus sont trop complexes, donc difficiles à interpréter génétiquement .

Les bandes observées sont notées en terme de présence ou d'absence. L'identification des bandes se fait par observation visuelle, leur intensité et leur épaisseur sont prises en compte chaque fois qu'elles apparaissent différentes. Néanmoins une grande épaisseur peut être le résultat d'une superposition de plusieurs bandes (que nous ne pouvons séparer). Notons enfin, que par rapport à une souche donnée, nous n'avons retenu que les patterns électrophorétiques reproductibles.

Nous avons appliqué trois méthodes d'analyse:

- une analyse factorielle des correspondances
- une analyse par les nuées dynamiques (Diday, 1971).
- une analyse en UPGMA (unweighted pair-group method with arithmetic mean = méthode des moyennes) (Sneath et Sokal, 1973) appliquée aux distances euclidiennes calculées à partir des coordonnées de l'AFC.

Ces analyses ont été effectuées en collaboration avec M. Gauthier J.P du laboratoire de génétique évolutive du CNRS de Gif-sur-Yvette.

Pour l'ensemble des souches considérées, nous avons obtenus 145 bandes différentes (tableau 1, Annexe II). L'analyse en AFC s'est avérée très peu discriminante (11% de l'inertie totale sur le premier axe, ce qui est très faible) (figure 17). En fait cette grande variabilité est due à la présence de plusieurs caractères à phénotypes uniques, détectés pour une seule souche. Nous avons donc épuré le fichier en enlevant tous les phénotypes uniques, qui ne contribuent qu'à la discrimination mais non pas à la phylogénie. Les dendrogrammes que nous présentons sont issus de l'analyse des 104 bandes restantes .



gramme obtenu par les nuées dynamiques représente la moyenne des résultats de toutes les partitions essayées (jusqu'à 20).

La méthode d'UPGMA est fondée sur une matrice de distance (tableau 2 Annexe II). La quantité de divergence entre les différents groupes est estimée par la moyenne des distances. Ces distances ont été calculées à partir des coordonnées en AFC et correspondent à des distances euclidiennes.

Sur tous les dendrogrammes que nous présentons, la distance sur l'axe des ordonnées est arbitraire.

**C. ETUDE DE LA VARIABILITE GENETIQUE:  
IMPLICATIONS PHYLOGENETIQUES**

## **C.I. Diversité des genres et espèces d'Hyphomycètes entomopathogènes**

La caractérisation des Hyphomycètes entomopathogènes repose essentiellement sur des critères morphologiques et de développement plus ou moins influencés par les conditions du milieu. Quoique ces critères soient de bons outils d'identification des souches, ils ne permettent pas toujours d'établir une classification phylogénique satisfaisante. Grâce à l'analyse comparative des séquences de l'ARNr 28S et celle des systèmes enzymatiques, nous pouvons mesurer la quantité de divergence séparant les différents taxons et établir leur phylogénie. Par l'analyse des systèmes enzymatiques, nous apportons aussi un critère supplémentaire à la caractérisation des souches. Nous terminons par une analyse comparée des différentes classifications.

### **C.I.1. Polymorphisme de quelques espèces de *Beauveria***

#### **a. Analyse des séquences d'ARNr 28S**

Les séquences nucléotidiques des domaines D1 et D2 sont représentées figure 18, alignées comparativement à la séquence de *B. bassiana*.

De 4 groupes au départ, correspondant à 4 espèces de *Beauveria*, séparées selon des critères morphologiques: *B. bassiana*, *B. velata*, *B. brongniartii* et *B. sulfurescens*, les 34 souches analysées ont été séparées en 6 groupes de séquences (tableau 22) dont 4 sont des groupes formés par des souches de *B. brongniartii*.

L'alignement des séquences indique qu'elles sont toutes très proches les unes des autres; on note très peu de variations entre les groupes (tableau 23). Sur l'ensemble des 2 domaines, le nombre de différences entre les groupes varie de 2 à 18 nucléotides sur 476 séquencés. Les différences observées sont toutes des substitutions de nucléotides. Elles sont essentiellement concentrées dans le domaine D2. Ces substitutions ne sont pas uniformément distribuées ; certaines positions sont plus sujettes à variation.

*Beauveria bassiana* forme une espèce remarquablement homogène; les 9 souches étudiées, d'origines parasitaire et géographique diverses, ont des séquences stricte-

Domaine D1

		5'	10	20	30	40	50	60	70	80
1	<i>B. bassiana</i>	ACUUAAGCA	AAUCAAUAG	CGGAGGAAA	GAACCAACA	GGAAUUGCC	CAGUAACCC	GAGUGAAGC	GCACAGCC	AAAUUGAAA
2	Dt 93	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
3	<i>B. brongniartii</i> 1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
4	<i>B. brongniartii</i> 2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
5	Dt 72	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
6	<i>B. velata</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

		90	100	110	120	130	140	150	160	170	180	
1		UCUGGCCU	UCAGGGCCC	ACUUCGUAU	UUGUAGAGGA	UGUUUUUGCC	GAAGGUGCCU	UCCCGAAGUU	CCUGGAAGC	GCAGCCACA	GAGCCGAGA	CCCCCUA
2		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
3		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
4		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
5		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
6		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	

		200	210	220	230
1		UGGUCGGAO	CAAGCCAGCC	UCDUGUAAAG	CUCUUCGAC
2		-----	-----	-----	-----
3		-----	-----	-----	-----
4		-----	-----	-----	-----
5		-----	-----	-----	-----
6		-----	-----	-----	-----

## Domaine D2

		5'	10	20	30	40	50	60	70	80
1	<i>B. bassiana</i>	UACGUGAAU	UCUUCAAAGC	GAAGCCCCUA	UGACCAGACU	UGGGCCCGU	UAAUCACCAO	GGCUUUCUC	CCUCUGCACU	UUGCCCOGGU
2	Dt 93	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
3	<i>B. brongniartii</i> 1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
4	<i>B. brongniartii</i> 2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
5	Dt 72	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
6	<i>B. velata</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

		90	100	110	120	130	140	150	160	170	180	190
1		ACGAGGCCA	CAUCAGUUA	CCCCGGGCA	UAAAGGCCUC	GGAAUUGUCO	GCUCCCUUCO	GGGAGUGUUA	UAGCCCCUCG	CCGUAUUGCC	CCUGCCCGG	ACUGAGGUAC
2		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
3		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
4		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
5		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
6		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

		200	210	220	230
1		CCGCAUUGU	CCAAGGAUC	UGGGUAAUG	GUCACAGCC
2		-----	-----	-----	-----
3		-----	-----	-----	-----
4		-----	-----	-----	-----
5		-----	-----	-----	-----
6		-----	-----	-----	-----

Figure 18: Alignement des séquences des groupes de *Beauveria*. Les positions des nucléotides sont numérotées à partir de l'extrémité 5' du domaine concerné.

(-) : nucléotide identique

(O) : délétion

Tableau 22 : Liste des groupes de séquences du genre *Beauveria*

Isolat	Année d'isolement	Hôte d'origine	Origine géographique
<u>GROUPE A</u> Souches de <i>B. bassiana</i>			
Bb28	1971	<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	France (Nord)
Bb70	1973	<i>Lasiocampidae</i>	Madagascar
Bb73	1974	?	URSS
Bb103	1975	<i>Tingidae gargaphia</i>	Colombie
Bb147	1978	<i>Ostrinia nubilalis</i>	France (Nord)
Bb169	1981	<i>Sitona discoïdeus</i>	France (Lusignan)
Bb182	1982	<i>Sitona discoïdeus</i>	France (Sud)
Bb216	1983	<i>Sitona discoïdeus</i>	Maroc
Bb377	1983	<i>Ostrinia nubilalis</i>	France (Alsace)
<i>B. sulfurescens</i>			
Bs	1981	ATCC 7159	
<u>GROUPE B</u> Souches de <i>B. velata</i>			
Bv442	1981	Larves de lépidoptère	Equateur
Bv352	1981	Larves de lépidoptère	Equateur
<u>GROUPE C</u> Souches de <i>B. brongniartii</i>			
<u>Groupe 1</u>			
Bt53	1974	<i>Ixodes ricinus</i>	Tchécoslovaquie
Bt80	1978	<i>Mimela costata</i>	Japon
Bt81	1979	<i>Pissodes nitizus</i>	Japon
Bt82	1980	<i>Ips typographus</i>	Pologne
<u>Groupe 2</u>			
Bt1	1961	<i>Melolontha melolontha</i>	France (Sarthe)
Bt4	1962	<i>Melolontha melolontha</i>	Pologne
Bt6	1964	<i>Melolontha melolontha</i>	France (Sarthe)
Bt9	1965	<i>Melolontha melolontha</i>	France (Orne)
Bt22	1968	<i>Melolontha melolontha</i>	France (Marolles)
Bt44	1972	<i>Melolontha melolontha</i>	Suisse
Bt46	1972	<i>Melolontha melolontha</i>	Suisse
Bt47	1973	<i>Melolontha melolontha</i>	France (Vésoul)
Bt51	1974	<i>Melolontha melolontha</i>	France (Doubs)
Bt85	1982	<i>Melolontha melolontha</i>	Suisse
Bt86	1983	<i>Melolontha melolontha</i>	Suisse
Bt89	1983	<i>Melolontha melolontha</i>	Suisse
Bt90	1983	<i>Melolontha melolontha</i>	Suisse
Bt100	1988	<i>Melolontha melolontha</i>	Italie
Bt101	1988	<i>Melolontha melolontha</i>	Italie
Bt33	1972	<i>Oryctes rhinoceros</i>	France
<u>Groupe 3</u>			
Bt 93	1986	<i>Melolontha melolontha</i>	France (Cantal)
<u>Groupe 4</u>			
Bt72	1976	<i>Holotrichia serrata</i>	Inde

	Bb	Bt93	1	2	Bt72	Bv	Fo
Bb		9	15	13	18	18	51
Bt93	0,038		8	8	11	12	46
1	0,065	0,034		2	7	12	49
2	0,056	0,034	0,008		7	14	51
Bt72	0,078	0,047	0,029	0,029		8	50
Bv	0,051	0,052	0,052	0,060	0,078		49
Fo	0,235	0,210	0,226	0,236	0,230	0,226	

Tableau23: Matrice de distances des souches de Beauveria; distances exprimées par l'indice Knuc (en bas) et par le nombre brut de différences de nucléotides, sur l'ensemble des deux domaines (476 nucléotides).

Bb : B. bassiana; Fo : F. oxysporum; 1 et 2: groupes de B. brongniartii; Bt : souche de B. brongniartii.

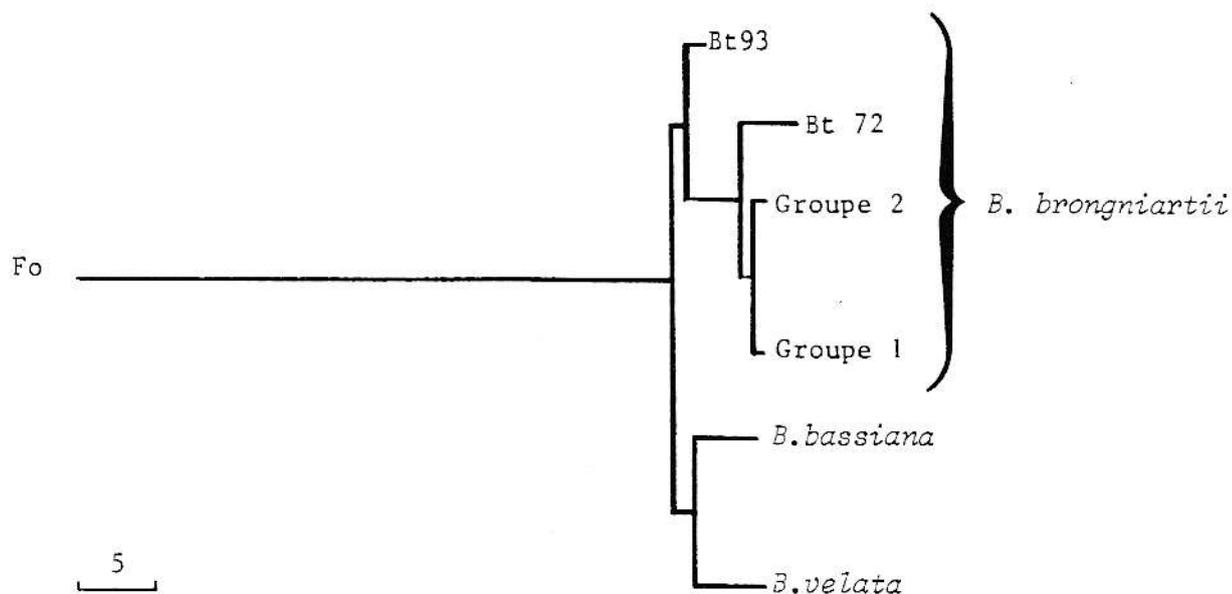


Figure19: Relations phylétiques entre les groupes de Beauveria.  
Arbre calculé par le programme FITCH, à partir de la matrice Tabl.23  
Echelle : 5 nucléotides

ment identiques. D'autre part, bien que présentant des particularités biologiques, l'espèce *B. sulfurescens* (une souche) possède une séquence d'ARNr strictement identique à celle de *B. bassiana*.

Les 2 souches de *B. velata* présentent exactement la même séquence. Sur le domaine D1, elles ont une séquence identique à celle d'un des groupes de *B. brongniartii*.

Contrairement à *B. bassiana*, *B. brongniartii* (= *B. tenella*) est assez hétérogène. Sur 22 souches de *B. brongniartii*, apparaissent 4 groupes de séquences. Le groupe 1 est composé de quatre souches issues de différents genres d'insectes et sont d'origines géographiques variées. Le groupe 2 est composé de souches isolées de *M. melolontha* de diverses régions. Notons la présence de la souche Bt33, qui est à l'origine, une souche isolée de *M. melolontha* (Bt6) mais réactivée sur *Oryctes rhinoceros*. Le groupe 3 est composé de la souche Bt93, qui est aussi isolée de *M. melolontha*.

Le nombre de différences entre les groupes de *B. brongniartii* est du même ordre de grandeur que celui entre les autres espèces de *Beauveria*. Au vu de cette observation, nous discuterons de la valeur et de la signification à donner à chaque variation.

## b. Phylogénie établie par les séquences d'ARNr 28S

Pour mieux apprécier les relations phylétiques entre les différents groupes, des dendrogrammes sont construits suivant la méthode des matrices de distances de Fitch (figure 19) et par la méthode de parcimonie (figure 20).

### b.a- Analyse par la méthode de FITCH

*Beauveria brongniartii* apparaît comme une espèce relativement hétérogène. *Beauveria bassiana* est par contre très homogène et n'est pas plus éloigné de *B. brongniartii* que certaines souches de cette espèce ne le sont les unes des autres. Nous avons vu que les différences entre les souches de *B. brongniartii* et de *B. bassiana* sont aussi peu nombreuses que celles qui existent entre les souches de *B. brongniartii*.

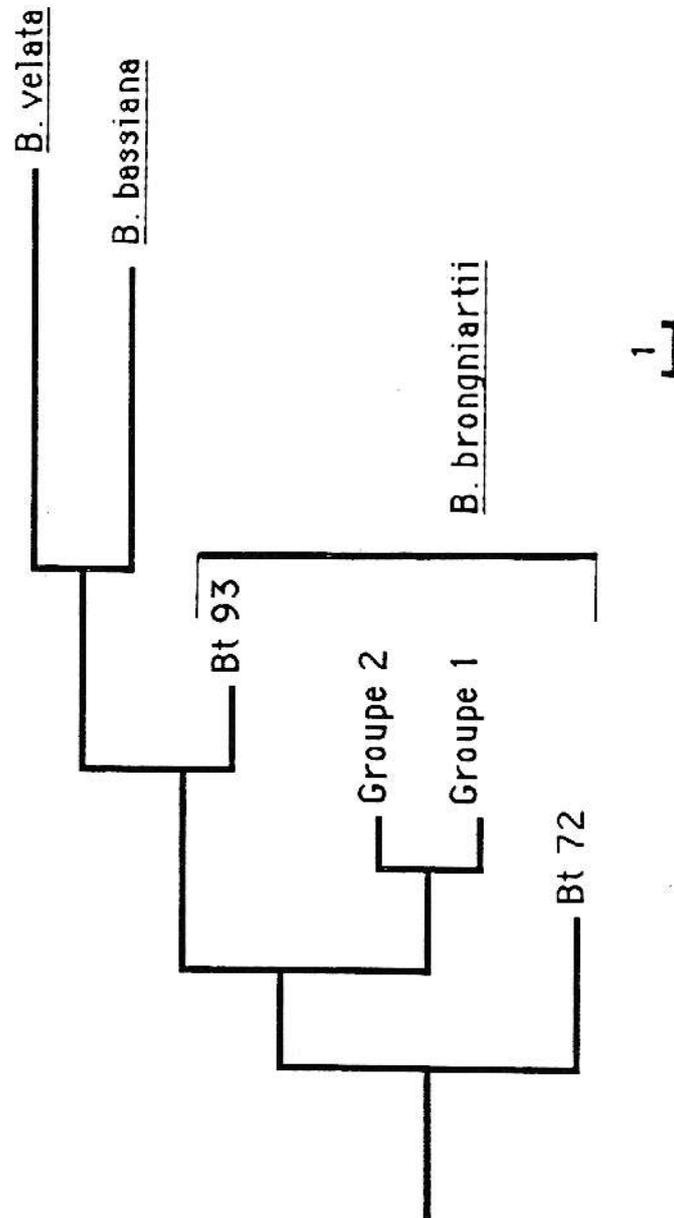


Figure 20. Relations phylétiques entre les souches de Beauveria. Arbre obtenu par la méthode de parcimonie. 24 sites différents sur 476 nucléotides ont été considérés.

Echelle : 1 nucléotide

*Beauveria bassiana* n'est pas sur une branche particulièrement distincte par rapport à l'ensemble des groupes de *B. brongniartii*. Si on accorde la même valeur entre chaque branche menant à chaque groupe de *B. brongniartii* et entre les branches menant à *B. bassiana* ou à *B. velata*, la valeur de la classification des groupes en espèces suivant les critères morphologiques serait alors à discuter par rapport à la classification moléculaire.

### **b.b- Analyse par parcimonie**

Elle donne exactement la même topologie d'arbre (figure 20) que la méthode de Fitch. La longueur des branches est plus éclatée et permet de mieux séparer les différents groupes.

### **c. Analyse enzymatique**

Onze souches de *Beauveria*, dont 3 de *B. bassiana*, 1 de *B. velata*, 6 de *B. brongniartii* et 1 de *B. sulfurescens* sont considérées dans cette analyse. (tableau 16). Parmi les 10 systèmes étudiés, les  $\alpha$ -estérases s'avèrent être les plus polymorphes (figure 1 Annexe I et tableau 24).

Pour les cinq systèmes PGD, G6PDH, GPDH, ADH et MDH, les trois souches de *B. bassiana* (Bb28, Bb147 et Bb216) se retrouvent dans le même groupe électrophorétique. Pour GOT et LDH, seules Bb147 et Bb216 se trouvent ensemble. En ce qui concerne les autres systèmes, ces 3 souches présentent des zymogrammes différents. Notons que pour ADH et GPDH, aucune bande n'a été révélée pour ces 3 souches de *B. bassiana*. Cette absence de bande est à prendre avec précaution car elle peut être due, soit effectivement à un allèle nul, soit à des problèmes d'ordre techniques (dénaturation des protéines, mauvaise coloration...) que nous n'avons pu lever.

Quant à la souche *B. velata*, pour 6 systèmes:  $\alpha$ -estérases, GOT, XDH, ADH, LDH et PGD, elle présente des zymogrammes distincts des autres espèces avec parfois des électromorphes en commun avec d'autres souches. *Beauveria velata* présente le même

Genre ou Espèce	Type	Nombre de profils	Nombre d'électromorphes	Nombre d'électromorphes/profils
11 souches <i>Beauveria</i>	estérases	8	18	2 à 5
	GOT	3	3	1 à 2
	MDH	2	3	1 à 3
	XDH	8	5	1 à 2
	ADH	5	3	0 à 2
	PGM	5	5	1 à 2
	GPDH	5	4	0 à 1
	LDH	6	9	1 à 3
	G6PDH	4	4	1
	PGD	6	7	1 à 2

Tableau 24: Nombre de profils enzymatiques et d'électromorphes observés chez *Beauveria*.

profil que les souches de *B. bassiana* pour le système MDH, que Bb216 pour le système PGM, et Bt82 pour le système GPDH.

*Beauveria sulfurescens* a un phénotype particulier pour les systèmes estérases, ADH, XDH, PGM, LDH et PGD; pour les autres systèmes, il se retrouve associé à d'autres souches.

#### d - Classification établie par comparaison des zymogrammes

Les relations phylétiques sont ici issues d'une analyse par les nuées dynamiques (figure 21).

Quatre ensembles peuvent être dégagés :

- l'ensemble des souches de *B. bassiana*
- l'ensemble des souches de *B. brongniartii*
- la souche de *B. sulfurescens*
- la souche de *B. velata*.

Il existe une certaine variabilité au sein des ensembles *B. bassiana* et *B. brongniartii* malgré la relative homogénéité de ces 2 ensembles. A l'intérieur de ces ensembles, les groupes n'ont aucune corrélation ni avec l'origine géographique ni avec l'insecte hôte.

On ne retrouve pas exactement le même regroupement que par les séquences de ARNr. On met en évidence des différences masquées par les séquences: par exemple celles qui existent entre la souche *B. sulfurescens* et *B. bassiana* ou entre la souche Bt33 et le groupe 2 de *B. brongniartii*. D'autre part, on rassemble des groupes qui avaient été séparés: par exemple la souche Bt93 du groupe 2.

#### e. Etude comparative entre les différents types de classification dans le genre *Beauveria*

Les classifications biochimiques possèdent beaucoup de congruences (tableau 25) avec la classification moléculaire dont la fiabilité dans l'établissement des relations phylétiques n'est plus à démontrer.

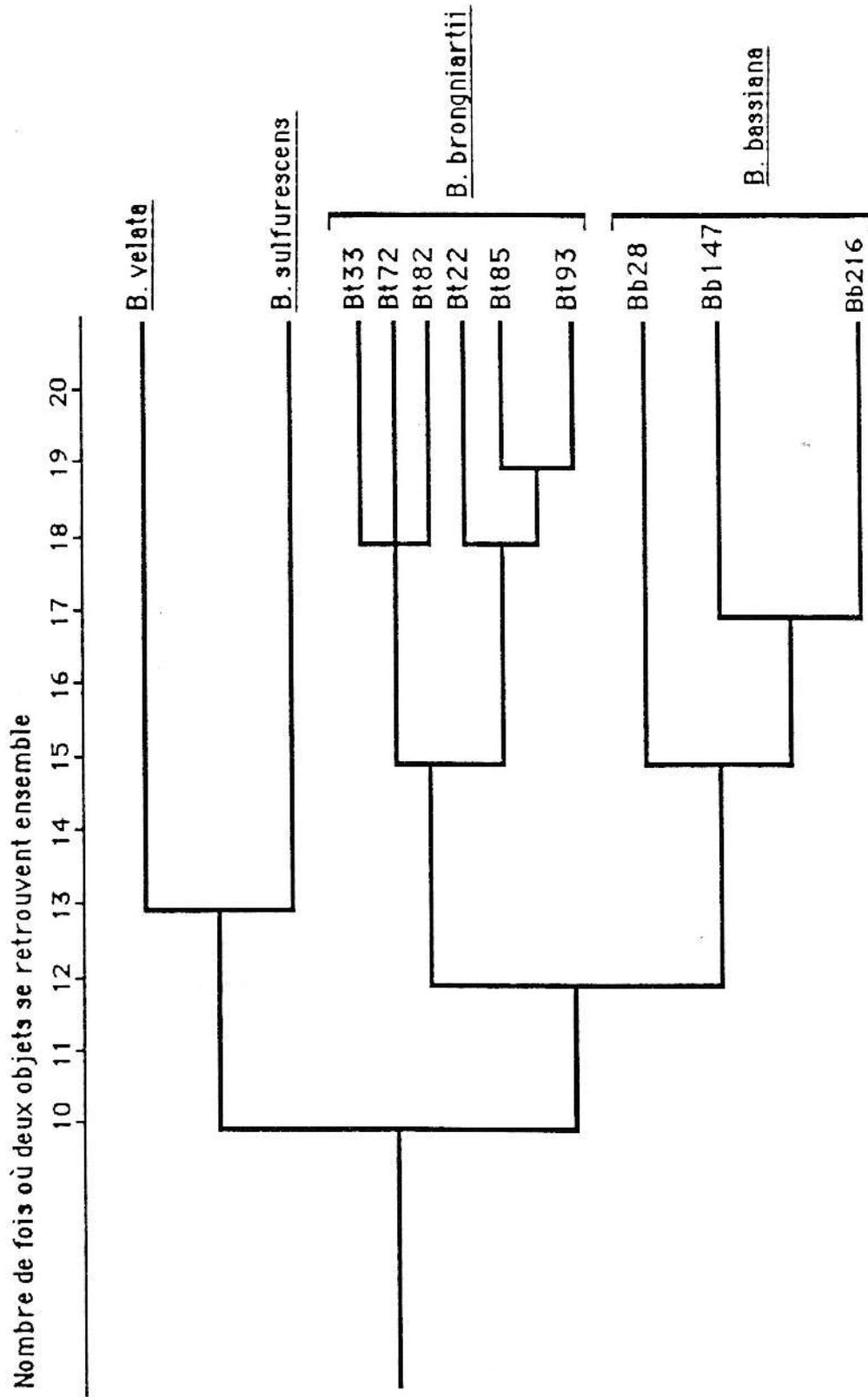
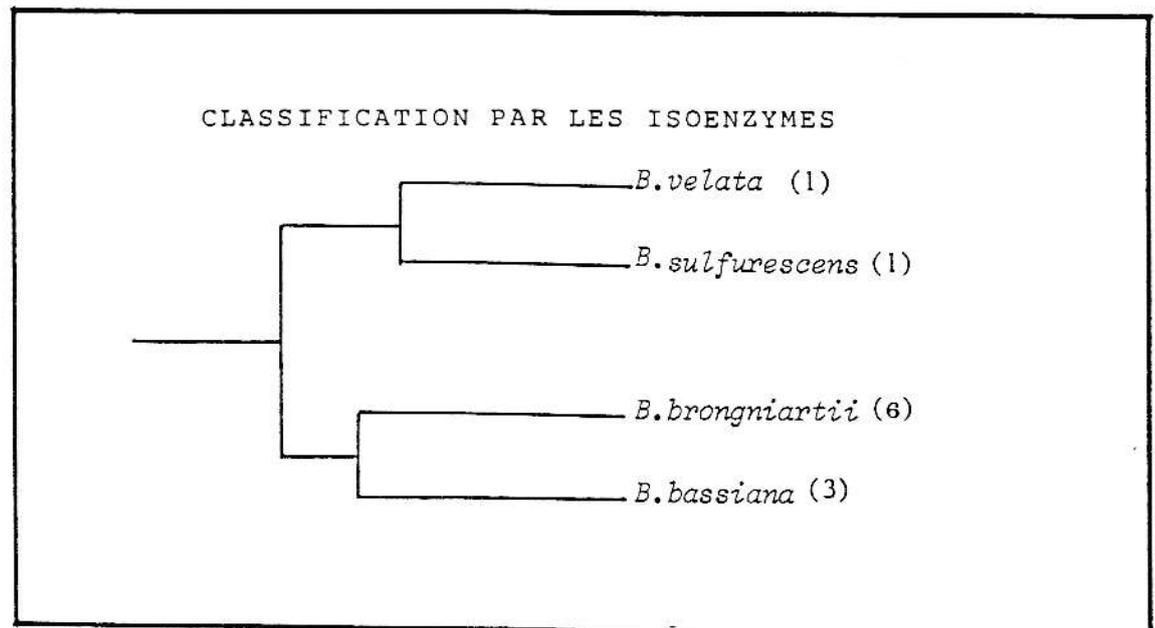
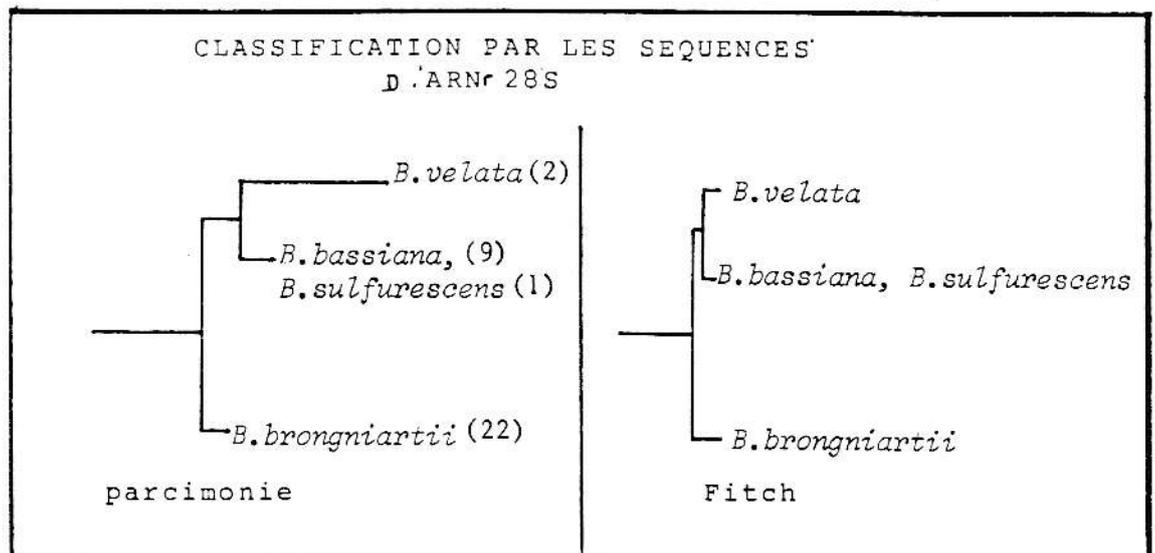
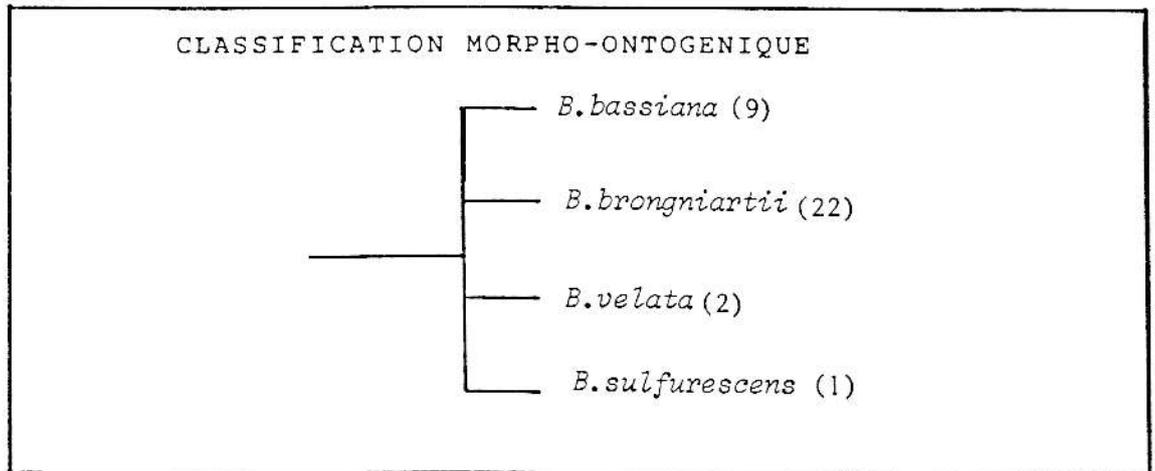


Figure 2: Relations biochimiques entre les souches de Beauveria ; Dendrogramme construit par la méthode des nuées dynamiques.

Tableau 25: Comparaison entre les différentes classifications des espèces de Beauveria étudiées.



( ): Nombre de souches étudiées

Domaine D1

1	B. bassiana	5'	ACUUAAGCA	10	AUUCAMUAG	20	GGGAGGAAA	30	GAAAGCAACA	40	GGCAUUGCCC	50	CAGUACGGC	60	GAGUGAAGC	70	GAACACGCUA	80	AAAUUGAAA				
2	T. cylindrosporum								U--UA														
3	T. extingvens																						
1	B. bassiana	90	UCUGGUCUOO	100	UCACGGCCCG	110	ACUUGUAAU	120	UUGUAGAGGA	130	UGCAAAAGGC	140	GAUGGUGCCU	150	UOCCGAAGUU	160	CCCUGGAAGC	170	GGACGGCACA	180	GAGGGUGACA	190	CCCCCGUAOO
2	T. cylindrosporum																						
3	T. extingvens																						
1	B. bassiana	200	UGGUCOAGAO	210	CAOCCGAGCC	220	UCOUGUAAAG	230	CUCGUUGGAC														
2	T. cylindrosporum																						
3	T. extingvens																						

Domaine D2

1	B. bassiana	5'	ACGUGAAAU	10	UGUUGAAAU	20	GAAGCGCCUA	30	UGAGCAGACU	40	UGGGCCCGCU	50	UAAUCACCAO	60	OOCCUUCUOC	70	GUUGUGCAGU	80	UUGCCOOGGU				
2	T. cylindrosporum																						
3	T. extingvens																						
1	B. bassiana	100	ACOAGGCCAG	110	CAUCAGUUA	120	GGCGGGGGA	130	UAAAGCCUUC	140	GGGAAUGUGO	150	GCUCCCOUCO	160	GGGAGUGUUA	170	UAGCCCGCUG	180	UUGUAAUAGCC	190	UCUGGGCCGG	200	ACUGAGGUAC
2	T. cylindrosporum																						
3	T. extingvens																						
1	B. bassiana	210	GGGCAUOOO	220	GCAAGGAUGC	230	UGGGUAAUUG	240	GUCAUCAGCG														
2	T. cylindrosporum																						
3	T. extingvens																						

Figure 22: Séquences nucléotidiques de T. cylindrosporum et T. extingvens, alignées par rapport à la séquence de B. bassiana  
 (-) : nucléotide identique  
 (O) : délétion

*Beauveria bassiana* est un groupe très homogène malgré l'existence d'un polymorphisme enzymatique. Cette homogénéité se retrouve au niveau morphologique. Par les séquences d'acides nucléiques, nous n'avons pas pu séparer *B. sulfurescens* du groupe de *B. bassiana*. L'analyse enzymatique sépare totalement ces 2 espèces. Si on se réfère à la forme des conidies, qui est le critère de différenciation des espèces de *Beauveria*, *B. sulfurescens* possède des conidies globuleuses, de taille inférieure à celles de *B. bassiana*. Cette souche est reconnaissable en culture pure par l'excrétion d'un pigment jaune qui diffuse dans le milieu. Une hypothèse est de considérer que *B. sulfurescens* pourrait être un mutant de *B. bassiana*, bloqué dans une chaîne de biosynthèse des pigments comme dans le cas de certains mutants chez *Fusarium*. Or, si on considère les propriétés pathogéniques de *B. sulfurescens*, celui-ci ne présente aucune affinité avec *B. bassiana* (il diffère de *B. bassiana* tant par son aptitude à la pénétration tégumentaire que par son activité toxémique).

Quant à l'ensemble des souches de *B. brongniartii*, par le critère moléculaire et le critère biochimique, elle apparaît respectivement hétérogène et variable. Cependant, cette hétérogénéité est assez faible dans la mesure où tous les groupes apparaissent phylogénétiquement très proches. Du point de vue morphologique, toutes les souches de tous les groupes sont identiques à la description du type. Par contre l'espèce *B. velata*, morphologiquement différente de *B. brongniarti* par la forme de ses conidies, s'intègre parfaitement dans l'ensemble des souches de *B. brongniartii* si on considère les critères moléculaires.

Nous reviendrons par la suite sur la valeur des différents types de classification: morphologique, biochimique, moléculaire, pathogénique et physiologique.

### C.I.2. Polymorphisme du genre *Tolyposcladium*

Toutes les souches de *T. cylindrosporium* ont des séquences strictement identiques. C'est une espèce très homogène. Par contre, entre les espèces de *Tolyposcladium*, il y a 30 différences sur l'ensemble des deux domaines. Les séquences nucléotidiques sont représentées figure 23, alignées avec celle de *B. bassiana*. Le genre est phylétiquement très éclaté. Les 2 espèces étudiées sont très éloignées l'une de l'autre; la distance qui les sépare est aussi importante que la distance entre *T. cylindrosporium* et *B. bassiana*.

Genre ou Espèce	Type	Nombre de profils	Nombre d'électromorphes	Nombre d'électromorphes/profils
<i>Tolypocladium cylindrosporium</i>  2 souches	estérases	1	2	2
	GOT	2	3	1 à 2
	MDH	1	2	2
	XDH	1	1	1
	ADH	1	1	1
	PGM	1	2	2
	GPDH	2	2	1
	G6PDH	1	1	1
	LDH	2	2	1
	PGD	2	2	1

Tableau 26: Nombre de profils enzymatiques et d'électromorphes observés chez *T. cylindrosporium*.

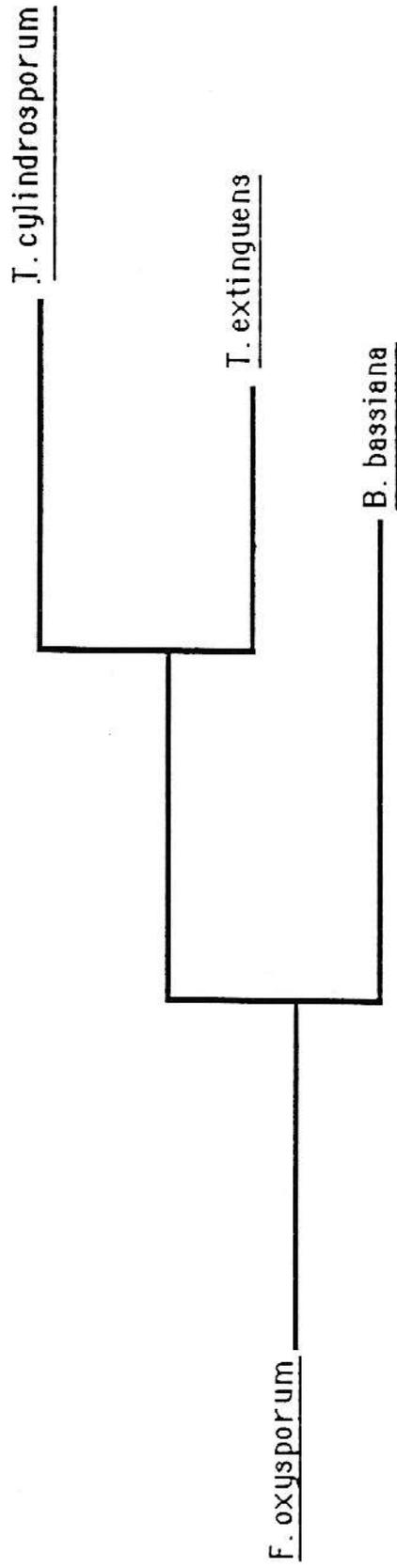


Figure 23x Relation entre les deux espèces de Tolypocladium. Arbre obtenu par la méthode de parcimonie. 91 sites différents sur 476 nucléotides ont été considérés.

Echelle : 5 nucléotides

Domaine D1

		10	20	30	40	50	60	70	80	
1	B.bassiana 5'	ACUUUAGCA	AUUCAAUAG	CCGACCAAA	GAUCCAACA	GGGAUUGCC	CAGUAAGCC	GAGUGAAGC	CCAACAGCC	AAUUUCAA
2	M.anisopliae 1	-----	-----	-----	-----	-----	U-----	-----	-----	-----
3	M.anisopliae 2	-----	-----	-----	-----	-----	U-----	-----	-----	-----
4	M.anisopliae 3	-----	-----	-----	-----	-----	U-----	-----	-----	-----
5	M.anisopliae 4	-----	-----	-----	-----	-----	U-----	-----	-----	-----
6	M.anisopliae 5	-----	-----	-----	-----	-----	U-----	-----	-----	-----
7	M.anisopliae 6	-----	-----	-----	-----	-----	U-----	-----	-----	-----
8	M.anisopliae 7	-----	-----	-----	-----	-----	U-----	-----	-----	-----
9	M.flavoviride	-----	-----	-----	-----	-----	U-----	-----	-----	-----

	90	100	110	120	130	140	150	160	170	180	190
1	UCUGGCUCC	UCAGGGCCG	ACUUUGUAA	UUGUAGAGCA	UGUUUUUGG	GAAGGUGCC	UCCCGAAGU	CCUUGCAAG	CGAGCCACA	GAGGUGACA	CCCCCUAAG
2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
3	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
4	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
5	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
6	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
7	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
8	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
9	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	200	210	220	230
1	UGGUUUGCA	CAAGCGAGC	UCUUUAAAG	CUUUUCCAC
2	-----	-----	-----	-----
3	-----	-----	-----	-----
4	-----	-----	-----	-----
5	-----	-----	-----	-----
6	-----	-----	-----	-----
7	-----	-----	-----	-----
8	-----	-----	-----	-----
9	-----	-----	-----	-----

Domaine D2

		10	20	30	40	50	60	70	80	
1	B.bassiana 5'	ACCUGAAAU	UCUUUAAAG	GAAGCGCCA	UGACCAGACU	UGGCGCCGU	UAUACACCA	UCCUUUCUC	CCUUGCCACU	UUCCCGGGU
2	M.anisopliae 1	-----	-----	A-U	-----	-----	G-U	CCG-CCG	CUG-----	-----
3	M.anisopliae 2	-----	-----	-U-O	-----	C-UU	G-U-O	GGG-CC	-----	-----
4	M.anisopliae 3	-----	-----	CC-U	-----	C-C	G-U-U	GGG-CC	C-A	-----
5	M.anisopliae 4	-----	-----	-U-O	-----	C-UU	-----	GGG-CC	-U	-----
6	M.anisopliae 5	-----	-----	A-U	-----	C-C	UO	CCG-CCG	CUG	-----
7	M.anisopliae 6	-----	-----	A-U	-----	C	G-UO	CCG-CCG	CUG	-----
8	M.anisopliae 7	-----	-----	CC-U	-----	C	G-U	CCG-CC	CUG	CC-C
9	M.flavoviride	-----	-----	U	-----	C	G-U	CCG-CC	CUG	C-U

	90	100	110	120	130	140	150	160	170	180	190
1	ACUAGCCAG	CAUCAGUUA	CCCCCCCCA	UAAAGGCUU	GGAAUGUGU	CCUCCCUUC	CCGAGUGUA	UAGCCCGUG	CCUAAAGCC	CCUCCCCCA	ACUAGCCAG
2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
3	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
4	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
5	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
6	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
7	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
8	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
9	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	200	210	220	230
1	CCUCCAUUU	CCUAGGAGC	UGCCCUAAG	CUCAUCAGC
2	-----	-----	-----	-----
3	-----	-----	-----	-----
4	-----	-----	-----	-----
5	-----	-----	-----	-----
6	-----	-----	-----	-----
7	-----	-----	-----	-----
8	-----	-----	-----	-----
9	-----	-----	-----	-----

Figure 24: Alignement des séquences nucléotidiques des groupes de Metarhizium.  
 (-) : nucléotide identique  
 (O) : délétion

De ce fait, cet éclatement nous fait admettre que ces 2 espèces si éloignées l'une de l'autre, n'appartiennent certainement pas au même genre. Nous confirmons les observations de Samson et Soares, 1984.

Dans cette étude, seules deux souches de *T. cylindrosporum* ont été analysées par les isoenzymes (TC1 et TC10)(tableau 26). Elles présentent des profils distincts uniquement pour cinq systèmes : GOT, estérase, LDH, GPDH et PGD (figure 4, Annexe I).

### C.I.3. Polymorphisme du genre *Metarhizium*

#### a. Analyse des séquences d'acides nucléiques

Les séquences nucléotidiques des domaines D1 et D2 des 42 souches étudiées sont représentées figure 24, après alignement sur la séquence de *B. bassiana*. Sur le domaine D1, toutes les séquences des souches de *M. anisopliae* sont strictement identiques. Sur l'ensemble des 2 domaines, on peut répartir les 42 souches en 8 groupes (tableau 27). Notons que pour la souche Ma32, nous n'avons pas pu extraire les ARN pour des raisons qui nous sont inconnues.

Toutes les souches du groupe 2, isolées de coléoptères, sont de type major. Les souches en provenance du Brésil (isolées d'un homoptère, de la famille des *Cercopidae*) se retrouvent toutes dans le groupe 6. On note dans ce groupe, la présence de 4 souches (Ma178, Ma180, Ma253 et Ma252) isolées de coléoptères et d'origines géographiques diverses.

Un mélange de souches est rassemblé dans le groupe 1, essentiellement de type minor. Ces souches sont isolées de différents hôtes et sont aussi de provenances géographiques diverses.

A l'intérieur de *M. anisopliae*, le nombre de nucléotides différents (tableau 28) observés, varie de 2 à 28. Les groupes 1, 5, 6, sont très proches les uns des autres puisqu'il n'y a que 2 à 5 différences entre eux. Il en est de même pour les groupes 4 et 2 (6 nucléotides). Ils constituent deux super-groupes séparés l'un de l'autre par une vingtaine de nucléotides. On retrouve un nombre de différences du même ordre, entre le groupe 3 (ou le groupe 7) et les autres groupes. A l'intérieur du genre *Metarhizium*

Tableau : Liste des groupes de séquences de *Metarhizium*

Isolat	Hôte d'origine	Origine géographique
<u>Groupe 1</u>		
Ma17	<i>Schistocerca gregaria</i>	Afrique
Ma91	<i>Elateridae</i>	France (Rennes)
Ma94	<i>Elateridae</i>	France (Doubs)
Ma97	<i>Melolontha melolontha</i>	France (Vésoul)
Ma139	<i>Ostrinia nubilalis</i>	France (Levesville)
Ma175	<i>Pachnaeus litus</i>	Cuba
Ma181	<i>Hoplochelus marginalis</i>	La Réunion
Ma197	<i>Diaprepes abbreviatus</i>	Guadeloupe
Ma199	<i>Diaprepes abbreviatus</i>	Guadeloupe
Ma202	<i>Adoretus sp.</i>	La Réunion
Ma229	<i>Oryctes rhinoceros</i>	Indonésie
Ma243	<i>Diaprepes abbreviatus</i>	Martinique
Ma254	<i>Diaprepes abbreviatus</i>	Guadeloupe
<u>Groupe 2</u>		
Ma2	<i>Oryctes nasicornis</i>	Afrique
Ma14	<i>Phyllopertha horticola</i>	France
Ma15	<i>Oryctes rhinoceros</i>	Afrique
Ma29	<i>Oryctes rhinoceros</i>	France ( La Minière)
Ma38	<i>Oryctes monoceros</i>	Afrique
Ma44	<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	France (La Minière)
Ma51	<i>Oryctes rhinoceros</i>	France (La Minière)
Ma66	<i>Oryctes nasicornis</i>	France (Poitiers)
Ma69	<i>Oryctes sp.</i>	Afrique
Ma73	<i>Oryctes rhinoceros</i>	Inde
Ma95	<i>Oryctes nasicornis</i>	France
Ma110	<i>Sitona</i>	France (Montpellier)
Ma177	<i>Sitona discoideus</i>	France (Montpellier)
Ma250	<i>Diaprepes abbreviatus</i>	Guadeloupe
<u>Groupe 3</u>		
Ma23	<i>Oxycanus sp.</i>	Nouvelle-Zélande
<u>Groupe 4</u>		
Ma5	<i>Strataegus aloeus</i>	?
<u>Groupe 5</u>		
Ma104	Sauterelle	Guadeloupe
<u>Groupe 6</u>		
Ma146	<i>Mahanarva posticata</i>	Brésil
Ma151	<i>Zulia entreriana</i>	Brésil
Ma152	<i>Zulia entreriana</i>	Brésil
Ma165	<i>Mahanarva posticata</i>	Brésil
Ma167	<i>Mahanarva posticata</i>	Brésil
Ma170	<i>Mahanarva posticata</i>	Brésil
Ma178	<i>Otiorhynchus sulcatus</i>	France
Ma180	<i>Hoplochelus sp.</i>	La Réunion
Ma252	<i>Diaprepes abbreviatus</i>	Guadeloupe
Ma253	<i>Diaprepes abbreviatus</i>	Guadeloupe
<u>Groupe 7</u>		
Ma76	<i>Oxycanus sp.</i>	Nouvelle-Zélande
<i>M. flavoviride</i>		
Mf88	<i>Otiorhynchus sulcatus</i>	France

	Bb	1	2	3	4	5	6	7	Mf	Fo
Bb		46	43	43	44	47	46	44	41	51
1	0,212		21	26	21	5	2	21	26	54
2	0,196	0,094		22	6	21	21	30	26	44
3	0,196	0,118	0,099		28	27	24	13	24	39
4	0,202	0,094	0,026	0,128		19	21	30	26	48
5	0,217	0,021	0,094	0,123	0,084		5	20	25	52
6	0,212	0,008	0,094	0,108	0,094	0,021		19	26	54
7	0,201	0,094	0,138	0,057	0,138	0,089	0,085		18	47
Mf	0,187	0,117	0,116	0,107	0,116	0,112	0,117	0,079		45
Fo	0,235	0,253	0,199	0,175	0,221	0,242	0,253	0,215	0,205	

Tableau28: Matrice de distances des souches de Metarhizium; distances exprimées par l'indice Knuc (en bas) et par le nombre de différences brut de nucléotides, sur l'ensemble des deux domaines (476 nucléotides).  
 Bb : B. bassiana ; 1 à 7 : groupes de séquences de M. anisopliae ;  
 Mf : M. flavoviride; Fo : F. oxysporum

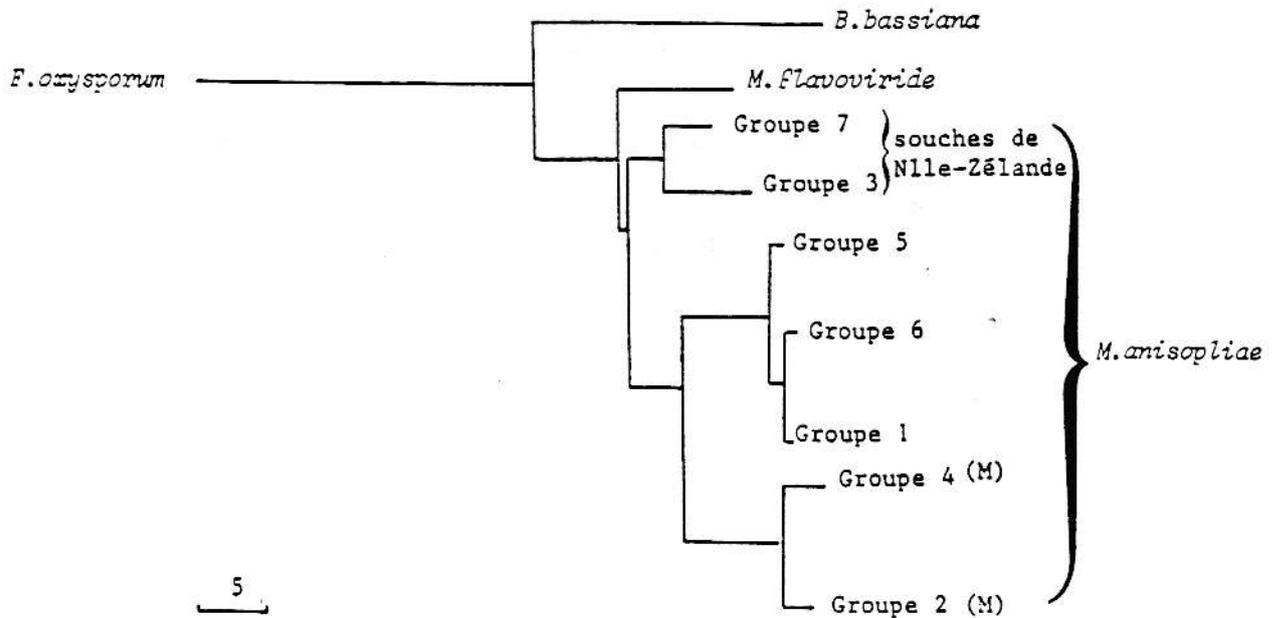


Figure25: Relations phylétiques entre les groupes de Metarhizium. Arbre obtenu par le programme FITCH, à partir de la matrice de distances Tabl.  
 Echelle : 5 nucléotides  
 (M) : souches de variété major

donc, on peut constater que le nombre de nucléotides différents entre chaque groupe de souches de *M. anisopliae* est égal à celui entre les 2 espèces, puisqu'il y a une vingtaine de nucléotides différents entre les deux espèces *M. flavoviride* et *M. anisopliae*.

## b. Phylogénie établie par les séquences d'ARNr 28S

### b.a - Analyse par la méthode de FITCH

Le dendrogramme (figure 25) révèle l'apparente homogénéité du genre et met en évidence 3 ensembles importants :

- un ensemble formé par les groupes 7 (Ma76) et 3 (Ma23)
- un autre composé de toutes les autres souches de *M. anisopliae*
- et enfin la souche de *M. flavoviride*.

La séparation entre les 2 espèces est très claire.

Les souches Ma76 et Ma23 sont étroitement liées et apparaissent comme des souches "aberrantes" de *M. anisopliae*. Elles sont sur des branches complètement à part; en plus la distance entre cet ensemble et les autres souches est, nous l'avons vu, aussi grande que celle qui sépare les 2 espèces. Ces 2 souches proviennent de Nouvelle-Zélande et sont isolées à partir d'une espèce d'*Oxycanus*.

Au sein des groupes de *M. anisopliae*, on constate une certaine uniformité. Cependant, on peut distinguer 2 sous-ensembles :

- les groupes 2 et 4 qui sont très liés; le groupe 2 est composé de l'ensemble des souches de type major et le groupe 4 correspond à la souche Ma5 qui est aussi de type major.
- les groupes 1, 5 et 6 rassemblent les souches de variété anisopliae. Le groupe 6 est composé en majorité de souches en provenance du Brésil.

Cet arbre phylétique permet de bien séparer les souches de *Metarhizium* qui se distinguent soit par leur morphologie (l'espèce *M. flavoviride*, les souches de type major) soit par leur biologie (Ma23, Ma76(optimum thermique à 20°C) et les souches du Brésil).

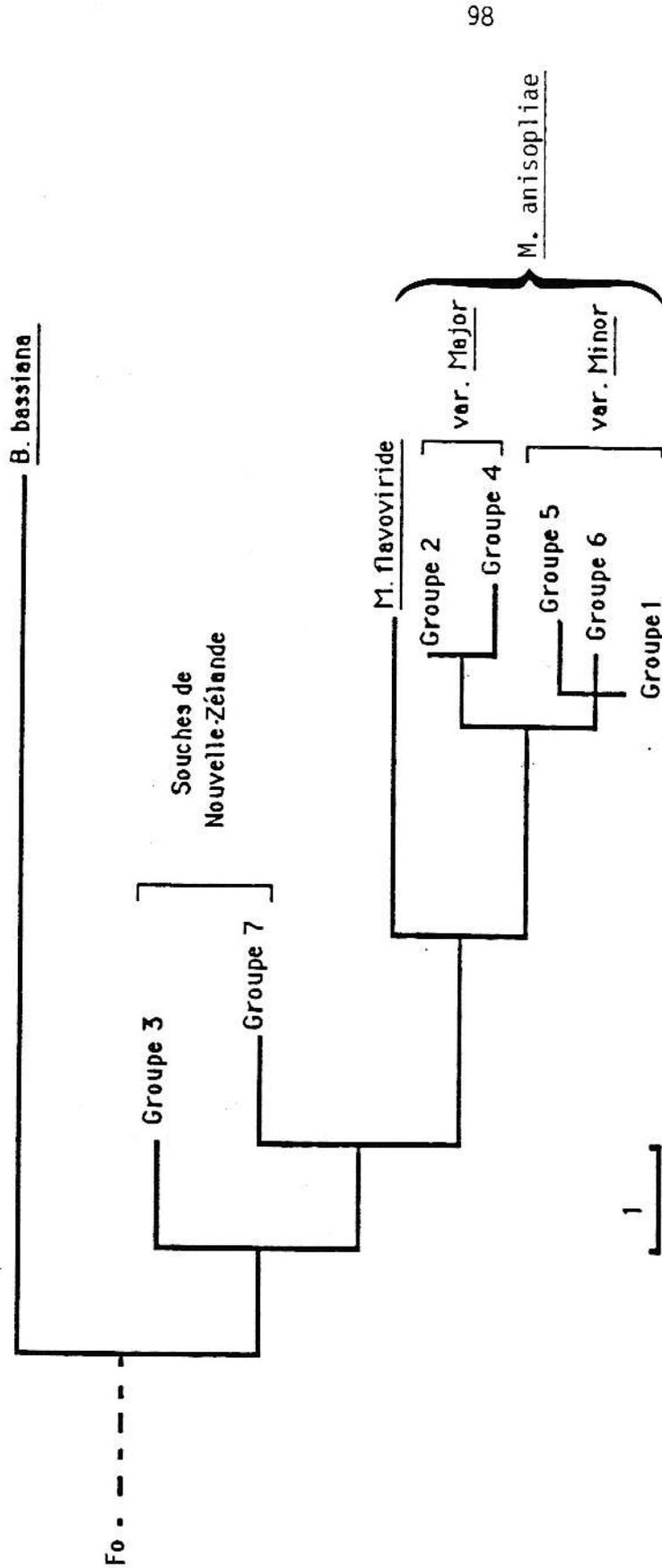


Figure 2. Relations phylétiques entre les groupes de Metarhizium. Arbre obtenu par la méthode de parcimonie. 46 sites sur 476 nucléotides sont considérés.  
 Echelle : 1 nucléotide Fo : F. oxysporum Groupe 1 à 7 : M. anisopliae

### b.b - Analyse par parcimonie

La représentation (figure 26) confirme tout à fait les regroupements établis par la méthode de Fitch. Elle souligne la séparation des deux variétés ainsi que la particularité des souches de Nouvelle-Zélande. Il semble qu'il y ait eu une dérive de ces deux souches de *M. anisopliae* avant même que la séparation des deux espèces ne se soit faite. Sur l'ensemble des deux domaines, 46 sites différents ont été considérés.

### c. Analyse enzymatique

Vingt troissouches de *Metarhizium* dont une de *M. flavoviride* sont considérées (tableau 16).

Les systèmes les plus polymorphes sont  $\alpha$ -estérases et LDH puisque l'on peut en dénombrer respectivement 15 et 11 phénotypes différents. Au niveau de chaque phénotype, on compte de 2 à 6 isoenzymes pour  $\alpha$ -estérases et de 1 à 3 pour LDH (figure 2 Annexe I et tableau 29).

Pour uniquement quatre systèmes ( $\alpha$ -estérases, MDH, PGM et LDH), les zymogrammes de l'espèce *M. flavoviride* sont entièrement distincts de ceux des souches de *M. anisopliae*. Pour les autres systèmes, *M. flavoviride* ne présente aucun profil particulier et se retrouve associée avec d'autres souches de *M. anisopliae*. Quels que soient les systèmes, les souches de type major ont souvent les mêmes profils, sauf Ma5 qui se distingue soit par un profil particulier ( $\alpha$ -estérases, ADH, GPDH et LDH) soit qu'elle se retrouve avec les souches de type minor. *M. anisopliae* var. major (type major) est donc un groupe très homogène contrairement à la variété anisopliae (type minor) qui présente une assez grande variabilité.

Pour le système ADH, aucune bande n'a été détectée pour la souche Ma91 (var. anisopliae) qui se comporte aussi de façon particulière dans les autres systèmes.

Les systèmes étudiés ici sont tous plus ou moins polymorphes, cependant  $\alpha$ -estérases et LDH permettent de mieux discriminer les souches. Pour ces deux systèmes et essentiellement pour les estérases, chaque souche peut être caractérisée par un

Genre ou Espèce	Type	Nombre de profils	Nombre d'électromorphes	Nombre d'électromorphes/profils
<i>Metarhizium</i>	estérases	15	21	3 à 6
	GOT	7	3	1 à 2
	MDH	5	4	1 à 3
	XDH	5	4	1 à 2
	ADH	6	6	1 à 3
	PGM	6	6	1 à 3
	GPDH	5	9	1 à 3
	G6PDH	3	5	1 à 2
	LDH	11	11	1 à 3
	PGD	4	3	1 à 2
20 souches				

Tableau 29: Nombre de profils enzymatiques et d'électromorphes observés chez *Metarhizium*

profil donné. Malheureusement, ceci n'est vrai que pour les souches de type minor (var. anisopliae). En effet, aucun de ces systèmes, même le plus polymorphe, ne peut être retenu pour la caractérisation individuelle des souches de type major.

#### d. Classification par les analyses enzymatiques

Cinq groupes de *Metarhizium* ressortent de cette classification (figure 27):

- le groupe des souches originaires de Nouvelle-Zélande
- le groupe des souches de *M. anisopliae* var. major
- le groupe des souches de *M. anisopliae* var. anisopliae (minor)
- la souche *M. flavoviride*
- enfin la souche Ma91

Malgré l'uniformité de *M. anisopliae* var. anisopliae, une des souches: Ma139, s'en distingue en s'insérant dans le groupe des souches var. major. D'après le screening fait sur différentes souches de *Metarhizium*, Ma139 a été choisie pour son activité toxémique importante qui la distingue des autres souches de son groupe morphologique .

Quant à Ma91, qui se retrouve assez distante des autres souches de *M. anisopliae*, aucun critère biologique ne la distingue des autres; cependant, l'absence d'activité pour le système ADH semble avoir été le caractère discriminant de cette souche. Comme dans le cas des souches de *B. bassiana*, cette absence de bande est à considérer avec précaution.

Ma5 est une souche de var. major. Nous l'avons vu, selon les systèmes, elle se distingue très clairement des autres var. major (soit par des phénotypes particuliers, soit en s'insérant parmi les souches de var. minor). Elle se retrouve pourtant dans cette classification, liée aux souches de son groupe morphologique. Une observation minutieuse des bandes issues des systèmes où elle présente un profil particulier ( $\alpha$ -estérases, ADH, GPDH et LDH) laisse penser que sa position est justifiée par les électromorphes qu'elle possède en commun avec les autres souches de var. major. Estérase est le seul système où Ma5 possède des électromorphes en commun avec les souches de var. major (3 électromorphes). Ces trois électromorphes sont vraisemblablement très importants car l'observation du profil estérasique de Ma139 (qui s'insère dans le groupe des var. major) fait ressortir ces trois mêmes électromorphes.

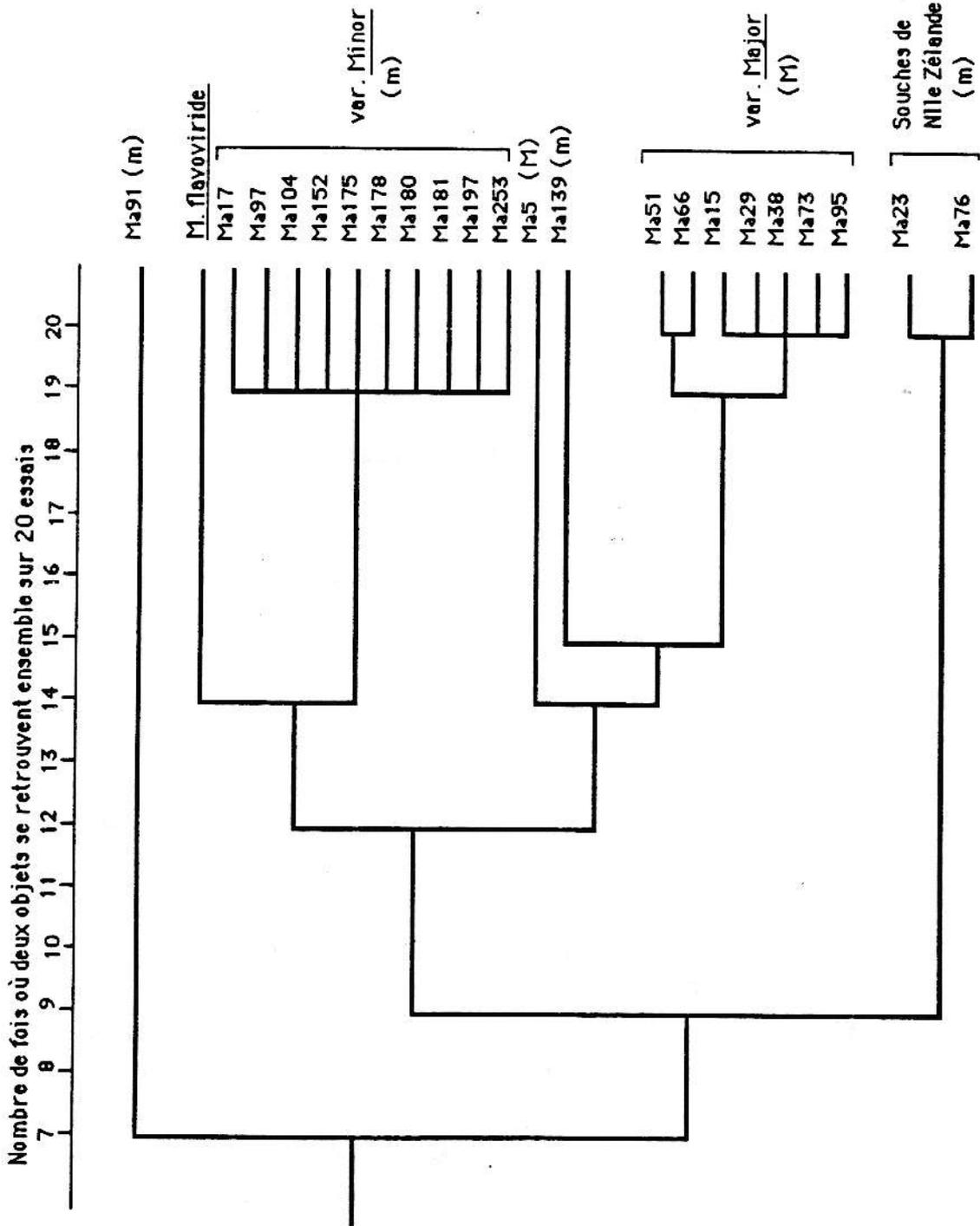


Figure 2: Relations entre les souches de Metarhizium, établies par l'analyse enzymatique. Arbre obtenu par la méthode des nuées dynamiques.

### e. Etude comparative des différentes classifications dans le genre *Metarhizium*

Malgré l'existence d'une variabilité enzymatique, *Metarhizium* est un groupe phylogénétiquement homogène. Par les critères moléculaire et biochimique, nous confirmons:

- la nette séparation des 2 espèces de *Metarhizium*
- la particularité des souches en provenance de Nouvelle-Zélande
- A l'intérieur de *M. anisopliae*, la divergence des souches de var. major et l'existence d'une sous population de souches en provenance du Brésil.

Ces 2 critères donnent des résultats (tableau 30):

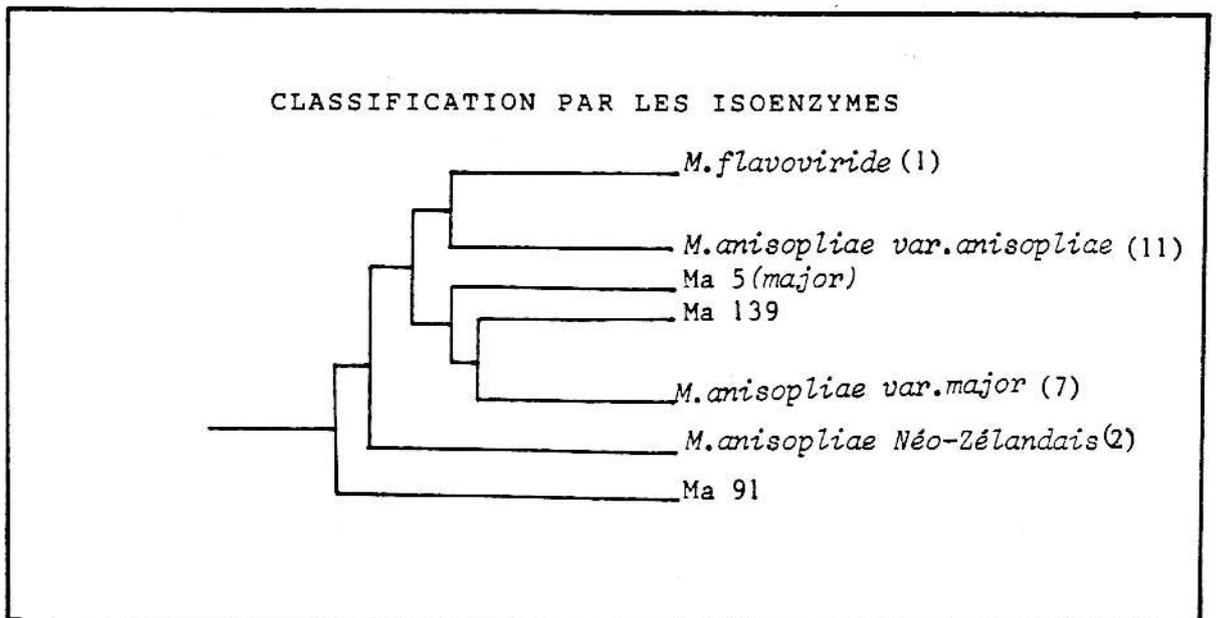
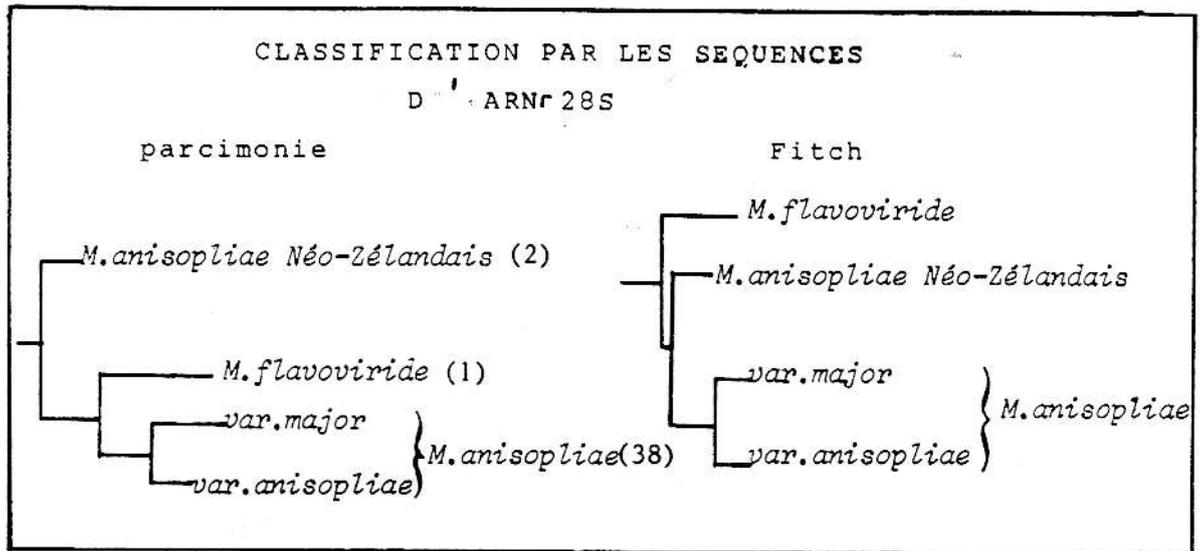
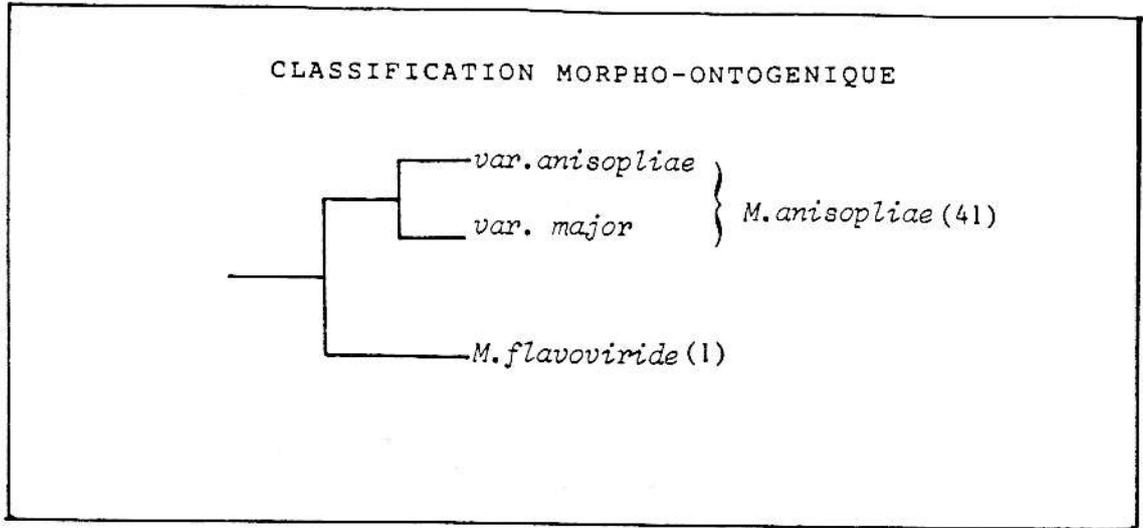
- concordants
- parfois complémentaires entre eux (car la classification biochimique a permis en plus de mettre en évidence des différences supplémentaires).
- confirmant la classification morpho-ontogénique.

En effet, à l'intérieur de *M. anisopliae*, on a pu distinguer des groupes de souches qui par leur morphologie ou leur biologie diffèrent des autres souches. Au sein de cette espèce, il existe une certaine variabilité morphologique (Tulloch, 1976) et parasitaire (Fargues, 1981). L'analyse du polymorphisme isoélectrophorétique des isoenzymes (Riba, 1978) avait permis de définir des "sous-populations" plus ou moins liées à l'insecte d'origine. Notre étude conforte tout à fait ces résultats. Par les comparaisons d'acides nucléiques et par l'analyse de systèmes enzymatiques, nous séparons les souches de var. major des souches de var. minor, nous mettons en évidence la divergence entre les souches en provenance de la Nouvelle-Zélande (Ma23 et Ma76) et les autres souches de *M. anisopliae*. Ces 2 souches Néo-Zélandaises sont physiologiquement différentes des autres souches par le fait que leur optimum de température de croissance est de 20-23°C (28°C pour les autres).

### C.I. 3. Polymorphisme de l'espèce *Nomuraea rileyi*

Les séquences nucléotidiques de *N. rileyi* sont représentées figure 28, après alignement avec la séquence de *B. bassiana*. Les 5 souches étudiées, d'origines édaphiques et géographiques différentes, ont des séquences strictement identiques sur l'ensemble

Tableau 30: Comparaison entre les différentes classifications des groupes de Metarhizium



( ) : Nombre de souches étudiées.

## Domaine D1

B. bassiana 5' ACUUAAGCA 10 AAUCAAAUAG 20 CGGAGGAAAA 30 GAAACCAACA 40 GGAUUGCCC  
 N. rileyi -----

50 CAGUAACGGC 60 GAGUGAAGCG 70 GCAACAGCUA 80 AAAUUUGAAA 90 UCUGGCUCOO 100 UCAGGGCCCC  
 -----C-----O-----

110 ACUUOGUAAU 120 UUGUAGAGGA 130 UGCAAAAGGC 140 GAOGGUGCCU 150 UOCCGAOGUU 160 CCCUGGAACG  
 ---C-----C-----

170 GGACGCCACA 180 GAGGGUGAGA 190 GCCCCGUAOO 200 UGGUCOGGAAO 210 CAOCCGAGCC 220 UCUGUAAAG  
 -----U-----C-----U-----UG-----

230 CUCCUUCGAC  
 -----

## Domaine D2

B. bassiana 5' ACGUGAAAU 10 UGUUGAAAGG 20 GAAGCGCCUA 30 UGACCAGACU 40 UGGGCCCGGU  
 N. rileyi -----

50 UAAUCACCAO 60 OOCOUUCUOC 70 GCUGUGCACU 80 UUGCCUUGGU 90 ACOAGGCCAG 100 CAUCAGUUCA  
 ---A-----A-----C-----UG

110 GCGCGGGGGA 120 UAAAGGCUUC 130 GGGAAUGUGO 140 GCUCCCOUCO 150 GGGAGUGUUA 160 UAGCCCGCUG  
 C-C-----U-----AU---

170 COGUA AUGCC 180 OCUGCGCCGG 190 ACUGAGGUAC 200 GCGOCAUOOU 210 GCAAGGAUGC 220 UGGCGUAAUG  
 --AC--A--G-G--U--C--

230 GUCAUCAGCG  
 -----

Figure 28: Séquence nucléotidique de *N. rileyi* alignée par rapport à celle de *B. bassiana*. les positions des nucléotides sont numérotées à partir de l'extrémité 5' du domaine concerné.

(-) : nucléotide identique  
 (O) : délétion

Genre ou Espèce	Type	Nombre de profils	Nombre d'électromorphes	Nombre d'électromorphes/profils
<i>Nomuraea rileyi</i>	estérases GOT MDH XDH ADH PGM GPDH G6PDH LDH PGD	1	2	2
		1	2	2
		1	2	2
		1	2	2
		1	2	2
		1	1	1
		1	1	1
		1	1	1
		1	2	2
		1	1	2

Tableau 31: Nombre de profils enzymatiques et d'électromorphes observés chez *N. rileyi*.

des deux domaines. *N. rileyi* est donc un groupe très homogène de par sa séquence d'ARN 28S.

Pour l'analyse enzymatique (tableau 31), une seule souche (Nr9) a été considérée. Aucun système ne se montre polymorphe pour cette souche (figure 4 Annexe I), même  $\alpha$ -estérase qui est pourtant très polymorphe pour les autres genres et espèces étudiés. On dénombre deux électromorphes pour chacun des systèmes suivants :  $\alpha$ -estérases, GOT, MDH, XDH, ADH, LDH, PGD et un pour PGM, GPDH et G6PDH.

#### **C.I.4. Polymorphisme de deux espèces de *Paecilomyces***

##### **a. Analyse des séquences d'ARNr**

Sur 11 souches étudiées appartenant à 2 espèces de *Paecilomyces*, nous avons pu établir 4 groupes (tableau 32) de séquences nucléotidiques sur l'ensemble des deux domaines. Ces séquences sont représentées figure 29, alignées comparativement à la séquence de *B. bassiana*.

Les 2 espèces décrites morphologiquement sont bien séparées par les séquences. Sur l'ensemble des deux domaines, les 4 souches de *P. farinosus* ont strictement la même séquence: c'est donc un groupe très homogène par ce critère moléculaire. Ce qui n'est pas le cas de *P. fumosoroseus*, pour laquelle 3 groupes ont pu être constitués.

Entre les deux espèces, il y a une trentaine de différences. Il y a autant de différences entre ces 2 espèces qu'entre chacune d'elles et *B. bassiana*. A l'intérieur de *P. fumosoroseus*, les différences sont de 3 à 11 nucléotides entre les groupes (tableau 33)

##### **b. Relations phylétiques entre les différents groupes de *Paecilomyces***

Les relations phylétiques (établies par la méthode de Fitch) entre les différents groupes de *Paecilomyces* sont représentées figure 30. Les 3 groupes de *P. fumosoroseus* sont étroitement liés. On constate que les 2 espèces de *Paecilomyces* paraissent phylétiquement éloignées l'une de l'autre. C'est donc un genre relativement éclaté. Morphologiquement, la différenciation entre ces 2 espèces est indéniable. Cependant, la divergence génétique entre elles nous paraît trop importante pour des espèces du même

Domaine D1

	5'	10	20	30	40	50	60	70	80
1	<i>B. bassiana</i>	ACUUAAGCA	AUUCAAUAAAG	GGAGGAAAA	GAACCAACA	GGGAUUGCCC	CAGUACGGC	CACUGAAGCC	CCAACAGCCUC
2	<i>P. fumosoroseus</i> 1	-----	-----	-----	-----	0	-----	-----	-----
3	<i>P. fumosoroseus</i> 2	-----	-----	-----	-----	0	-----	-----	-----
4	<i>P. fumosoroseus</i> 3	-----	-----	-----	-----	0	-----	-----	-----
5	<i>P. farinosus</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	90	100	110	120	130	140	150	160	170	180	190
1	UCUGGCUCCO	UCAGGGCCC	ACUUCGUAAU	UUCUACAGCA	UGCUUUUGCC	CAAGGUCUCU	UCCCGAGCUU	CCCGUGAAGC	GAACCCACA	CAGCGUGACA	CCCCCUA00
2	-----	C-O--U	-----	-----	CG	-----	-----	-----	-----	-----	C
3	-----	C-U--U	-----	-----	CG	-----	-----	-----	-----	-----	C
4	-----	C-O	-----	-----	CG	-----	-----	-----	-----	-----	C
5	-----	O-O	-----	-----	CG	-----	-----	-----	-----	-----	C

	200	210	220	230
1	UGGUCGGCAO	CA0CCGAGCC	UC0UGUAAAG	CUCCUUGGAC
2	-----	CG	-----	-----
3	-----	CG	-----	-----
4	-----	CG	-----	-----
5	-----	-----	-----	-----

Domaine D2

	5'	10	20	30	40	50	60	70	80
1	<i>B. bassiana</i>	ACCGUAAA	UCUUCAAAGG	GAAGCCCUA	UGACCGAGACU	UGCCCGCCGU	UAAUACACCAO	00CONUUCO	CCUGUCACU
2	<i>P. fumosoroseus</i> 1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
3	<i>P. fumosoroseus</i> 2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
4	<i>P. fumosoroseus</i> 3	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
5	<i>P. farinosus</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	90	100	110	120	130	140	150	160	170	180	190
1	AC0AGCCAG	CAUCAGUICA	GGCCGGCGA	UAAAGGUUC	GGAAUUCUGO	CCUCC0U0CO	GGAGUCUUA	UAGCCCGCUG	CGUUAUCC	CCUCCCGCG	ACUACAGUAC
2	-----	UG	-----	A	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
3	-----	UG	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
4	-----	UG	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
5	-----	UG	-----	A	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	200	210	220	230
1	CGCGAU00U	GCAAGCAUC	UGCCCUAUG	CUCAUCAGCC
2	-----	C-O	-----	-----
3	-----	C-O	-----	-----
4	-----	C-O	-----	-----
5	-----	C-O	-----	-----

Figure 20: Alignement des séquences nucléotidiques des groupes de Paecilomyces par rapport à celle de *B. bassiana*.  
 (-) : nucléotide identique  
 (O) : délétion

Tableau : Liste des groupes de séquences du genre *Paecilomyces*

Isolat	Année d'isolement	Hôte d'origine	Origine géographique
<b><u>GROUPE A</u> <i>Paecilomyces farinosus</i></b>			
Pf6	1970	<i>Thaumetopoea pityocampa</i>	France (La Minière)
Pf13	1973	<i>Pristiphora abietina</i>	France
Pf33	1977	<i>Hylobius sp.</i>	France (Orléans)
Pf36	1977	<i>Dendrolimus supereus</i>	Japon
<b><u>GROUPE B</u> <i>Paecilomyces fumosoroseus</i></b>			
<b><u>Groupe 1</u></b>			
Pfr25	1975	<i>Melolontha melolontha</i>	France (Montfavet)
Pfr35	1976	<i>Mamestra brassicae</i>	France (Marcoussis)
<b><u>Groupe 2</u></b>			
Pfr6	1972	<i>Cirphis unipuncta</i>	France (Montfavet)
Pfr40	1977	<i>Ostrinia nubilalis</i>	France
Pfr54	1984	<i>Diaprepes abbreviatus</i>	Guadeloupe
Pfr59	1984	<i>Diaprepes abbreviatus</i>	Martinique
<b><u>Groupe 3</u></b>			
Pfr47	1980	<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	Pologne

	Bb	1	2	3	Pf	Fo
Bb		34	33	34	20	49
1	0,173		3	11	28	56
2	0,165	0,014		8	29	54
3	0,173	0,054	0,040		32	54
Pf	0,102	0,139	0,144	0,162		44
Fo	0,257	0,294	0,292	0,281	0,229	

Tableau33: Matrice de distances des souches de Paecilomyces; distances exprimées par l'indice Knuc (en bas) et par le nombre de différences brut de nucléotides, sur l'ensemble des deux domaines (438 nucléotides).

Bb : B. bassiana ; Fo : F. oxysporum; Pf : P. farinosus  
 1 à 3 : groupes de séquences de P. fumosoroseus

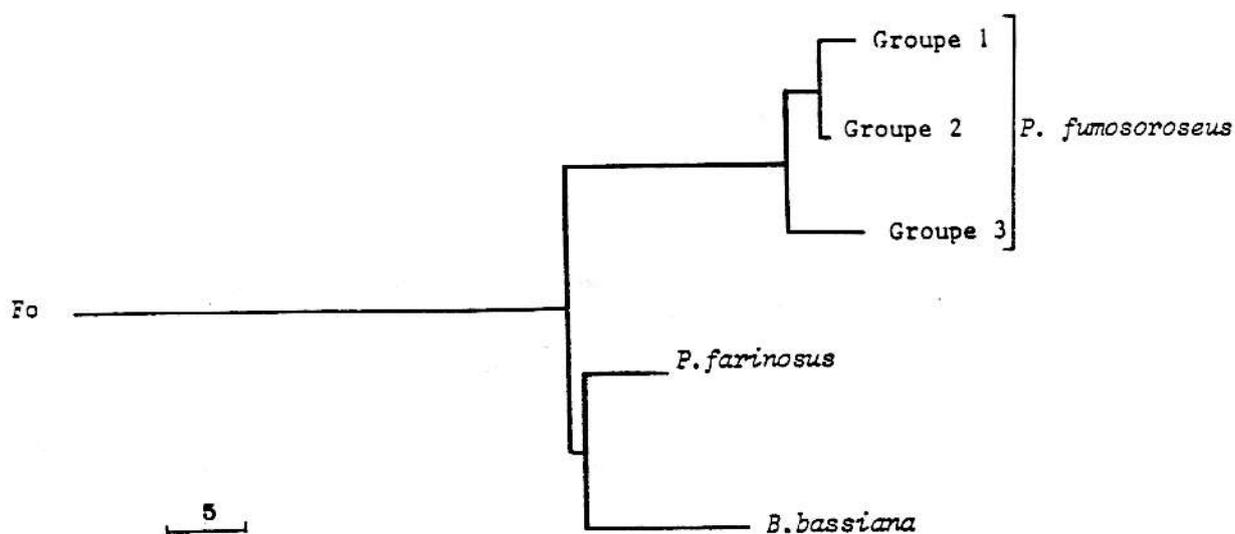


Figure30: Relations phylétiques entre les groupes de Paecilomyces.  
 Arbre obtenu par le programme FITCH, à partir de la matrice de distances Tabl.

Echelle : 5 nucléotides

genre. On retrouve un peu ici, une situation analogue au cas des souches de *B. bron-gniartii*. A partir des exemples des souches et espèces de *Paecilomyces* et de *Beauveria*, comparativement à ce qui se passe dans le genre *Metarhizium*, nous essaierons de discuter la notion d'espèce et de variété en nous basant sur les 3 critères que nous avons à notre disposition.

### c. Analyse enzymatique

Six souches de *Paecilomyces* sont considérées (tableau 16). Pour chacun des systèmes, les nombres d'électromorphes et de profils sont dans le tableau 34. Les zymogrammes sont représentés dans la figure 5 Annexe I.

Seules les estérases apparaissent polymorphes. Pour tous les systèmes, sauf pour PGM et GOT, les 3 souches de *P. fumosoroseus* (Pfr35, Pfr47 et Pfr54) ont toujours le même profil enzymatique. Pour ADH, aucune bande n'est détectée pour ces 3 souches. Les 2 souches de *P. farinosus* sont bien différenciées. Il n'y a que pour les systèmes PGD et G6PDH qu'elles présentent le même profil. Pour tous les autres systèmes, elles ont des profils particuliers et n'ont aucun électromorphe en commun. Le système  $\alpha$ - estérase est très discriminant pour ces souches de *P. farinosus*.

### d. Classification biochimique

Le dendrogramme issu de l'analyse enzymatique (figure 31) montre une certaine variabilité au sein des deux espèces de *Paecilomyces*. Les 2 souches de *P. farinosus*, non séparées par les ARNr, sont très éloignées l'une de l'autre. Nous avons vu qu'elles n'avaient aucun électromorphe en commun. Estérase est le système le plus discriminant pour ces souches. La souche Pf6 s'intègre dans l'ensemble des souches de *P. fumosoroseus* dans cette analyse. Les souches de *P. fumosoroseus* forment, par contre, un ensemble relativement homogène.

Genre ou Espèce	Type	Nombre de profils	Nombre d'électromorphes	Nombre d'électromorphes/profils
<i>Paecilomyces</i>	estérases GOT MDH XDH ADH PGM GPDH G6PDH LDH PGD	4	9	3 à 5
		3	3	1
		4	5	1 à 2
		4	4	1
		2	1	0 à 1
		4	4	1
		3	4	1 à 2
		2	2	1
		4	4	1
		2	2	1

Tableau 34: Nombre de profils enzymatiques et d'électromorphes observés chez *Paecilomyces*.

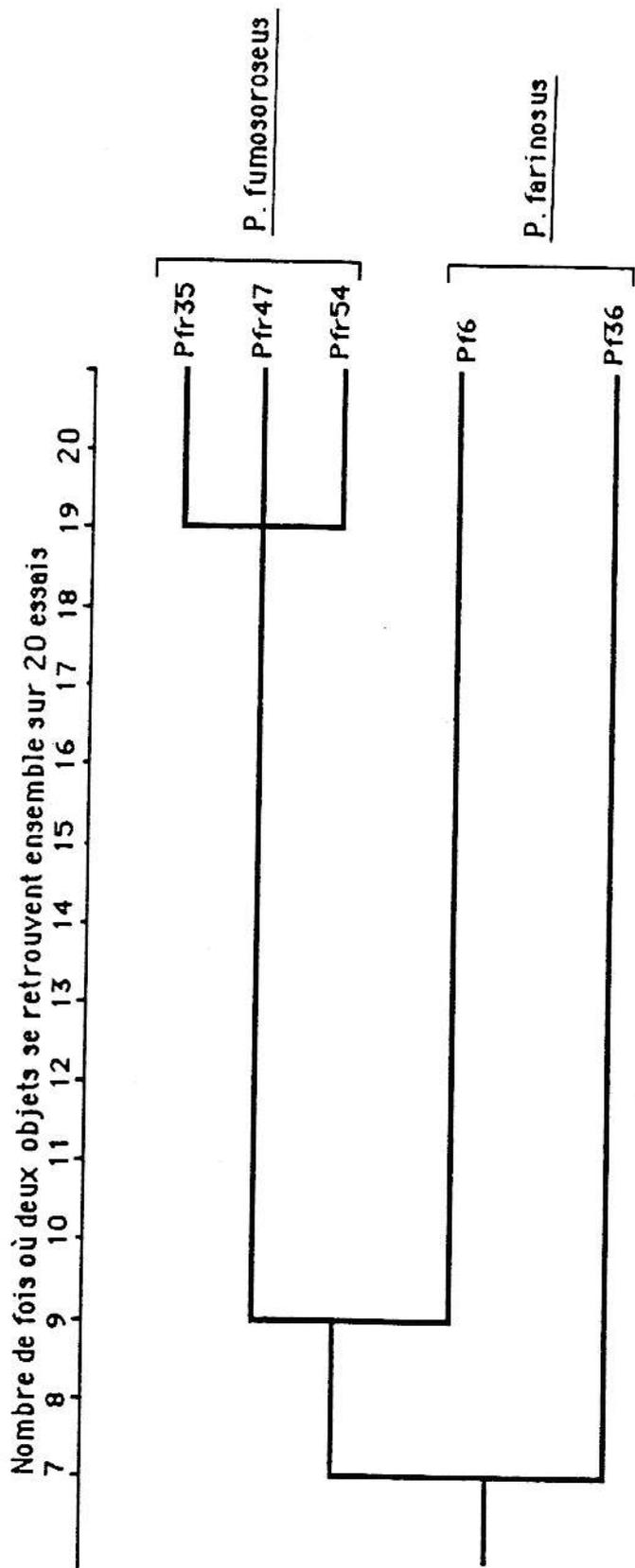
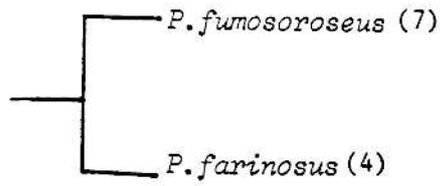


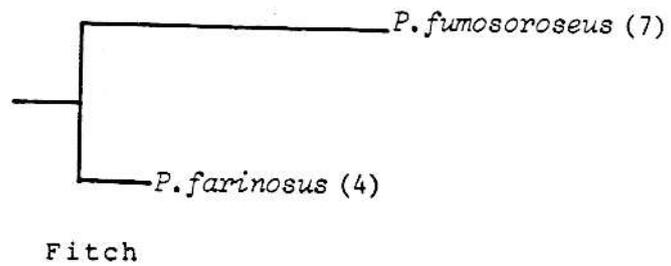
Figure 3: Relations entre les souches de Paecilomyces ; Dendrogramme obtenu par la méthode des nuées dynamiques.

Tableau 85 : Comparaison entre les différentes classifications des deux espèces de Paecilomyces étudiées

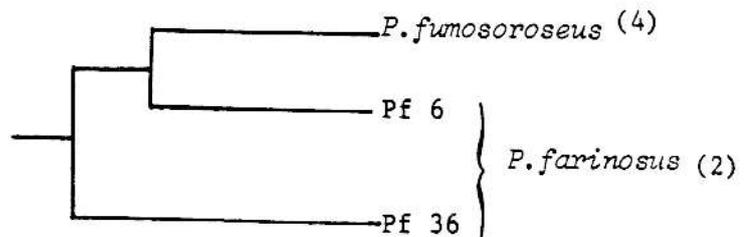
CLASSIFICATION MORPHO-ONTOGENIQUE



CLASSIFICATION PAR LES SEQUENCES  
D' ARN<sub>r</sub> 28S



CLASSIFICATION PAR LES ISOENZYMES



( ) : Nombre de souches étudiées.

### e. Etude comparative entre les différentes classifications des espèces de *Paecilomyces*

Dans l'ensemble, les classifications moléculaire et enzymatique (tableau 35) se confortent tout à fait. Par ces deux critères : les deux espèces sont vraiment très distantes. Cependant, les 2 souches de *P. farinosus* qui avaient des séquences identiques, se retrouvent complètement séparées dans la classification enzymatique. Ces 2 souches sont morphologiquement indifférenciables. Cet exemple souligne l'intérêt de l'analyse de la variabilité génétique par des molécules hautement variables dans le typage des souches. Les molécules conservées telles que les ARNr sont insuffisantes pour cela, malgré leur efficacité dans l'établissement des relations phylogénétiques entre les souches.

#### C.I.5. Polymorphisme de l'espèce *Verticillium lecanii*

Les cinq souches de *V. lecanii* ont pu être réparties en deux groupes de séquences (tableau 36). Les séquences nucléotidiques sont représentées figure 32, après alignement avec la séquence de *B. bassiana*.

Sur l'ensemble des deux domaines, les 2 groupes diffèrent par trois nucléotides.

Pour l'analyse enzymatique, trois souches sont étudiées (Myc, Vlecor et VF). Le groupe *V. lecanii* apparaît très homogène (figure 3 Annexe I et tableau 37).

La souche VF qui se distingue des autres souches par sa séquence, se distingue aussi par la forme des conidies (elliptique avec une extrémité reserrée au lieu de cylindrique pour les autres). Au niveau des isoenzymes, cette souche ne s'éloigne pas des autres; elle présente beaucoup d'électromorphes en commun avec les deux autres souches.

### C.II. Phylogénie des genres et des espèces d'Hyphomycètes entomopathogènes

L'analyse que nous entreprenons ici concerne les 7 genres réunis, dont on va tenter d'estimer les relations et distances phylétiques.

Domaine D1

1	B. bassiana	5'	ACUUAACCA	10	AUCAAUAG	20	UGAGGAAA	30	GAAACCAACA	40	GGCAUUGCC	50	CAGUAACGCC	60	GAGUACACCG	70	GCAACAGCUA	80	AAAUUUGAAA		
2	V. lecanii 1		-----		-----		-----		-----		-----		-----		-----		-----		-----		
3	V. lecanii 2		-----		-----		-----		-----		-----		-----		-----		-----		-----		
1	B. bassiana	100	UCUGGUCUOO	110	ACUUUGUAAU	120	UUGUAGAGGA	130	UGCAAAGCC	140	CAUGGUGCCU	150	UOCCGAAGUU	160	CCUGGAAGG	170	GGACCCACA	180	GAGGGUGAGA	190	GGCCCCUAOO
2	V. lecanii 1		-----		-----		-----		-----		-----		-----		-----		-----		-----		-----
3	V. lecanii 2		-----		-----		-----		-----		-----		-----		-----		-----		-----		-----
1	B. bassiana	200	UGGGCGCAO	210	CAOCCGAGCC	220	UCUGOAAAG	230	COCCOCCGAC												
2	V. lecanii 1		-----		-----		-----		-----												
3	V. lecanii 2		-----		-----		-----		-----												

Domaine D2

1	B. bassiana	5'	ACGUGAAAU	10	UGUUGAAAGG	20	GAAGCGCCUA	30	UGACCACACU	40	UGGGCGCGGU	50	UAAUCACCAO	60	UOCUUUCUOC	70	CCCGCGCACU	80	UUGCCOOGGU		
2	V. lecanii 1		-----		-----		-----		-----		-----		-----		-----		-----		-----		
3	V. lecanii 2		-----		-----		-----		-----		-----		-----		-----		-----		-----		
1	B. bassiana	100	ACGAGCCAG	110	CAUCAGUUA	120	CGCGCGGGA	130	UAAAGCCUUC	140	CGAAAGUUO	150	GCUCCCOUO	160	GGAGUGUUA	170	UAGCGCGCUG	180	CCGUAUAGCC	190	UCUGCCCGG
2	V. lecanii 1		-----		-----		-----		-----		-----		-----		-----		-----		-----		-----
3	V. lecanii 2		-----		-----		-----		-----		-----		-----		-----		-----		-----		-----
1	B. bassiana	200	GGGCAUOOO	210	GCAAGGAUGC	220	UGGCGUAAUG	230	CUCAUCAGCG												
2	V. lecanii 1		-----		-----		-----		-----												
3	V. lecanii 2		-----		-----		-----		-----												

Figure 32: Séquences nucléotidiques des groupes de V. lecanii, alignées par rapport à la séquence de B. bassiana.  
 (-) : nucléotide identique  
 (O) : délétion

Tableau 36: Liste des groupes de séquences de *V. lecanii*

Isolat	Année d'isolement	Hôte d'origine	Origine géographique
<u>GROUPE 1</u>			
WV	1981	Aleurode	?
Vlec	1982	Aleurode	France
MYC	1984	<i>Trialeurodes vaporariorum</i>	Angleterre
V2V	1986	Acarien	France
<u>GROUPE 2</u>			
VF	1976	Cochenille	France

Genre ou Espèce	Type	Nombre de profils	Nombre d'électromorphes	Nombre d'électromorphes/profils
<i>Verticillium lecanii</i>	estérases GOT MDH XDH ADH PGM GPDH G6PDH LDH PGD	3	8	3 à 5
		2	1	0 à 1
		2	2	1
		2	1	0 à 1
		1	0	0
		2	2	1
		2	2	1
		1	1	1
		2	2	1
		1	1	1

Tableau 37: Nombre de profils enzymatiques et d'électromorphes observés chez *V. lecanii*.

### C.II.1. Classification par les comparaisons de séquences d'ARNr

#### a - Analyse par la méthode de FITCH

Les séquences nucléotidiques des différents genres et espèces analysés sont sur les figures 33 et 34. Elles constituent au total 25 groupes. La taille des domaines D1 et D2 est la même pour tous les genres, les séquences observées ont suffisamment de similitude pour permettre leur alignement et leur comparaison.

Les variations les plus fréquemment observées sont des substitutions de nucléotides mais il existe aussi quelques rares délétions (ou insertions). Le nombre de nucléotides différents entre 2 séquences varie de 3 à 40. Ces substitutions sont essentiellement ponctuelles (dispersées). L'examen des séquences montre l'existence de régions très variables. Cependant, tout au long des séquences, des variations éparses existent aussi en dehors de ces régions. A l'intérieur des régions très variables, les sites modifiés sont essentiellement les mêmes pour toutes les souches d'un même genre et ils subissent souvent le même type de changement exprimant ainsi une sorte de "signature" caractéristique du genre. De ce fait, à l'intérieur d'un genre, chaque séquence de souche est plutôt caractérisée par les variations se situant à l'extérieur de ces régions "signatures" très variables.

Les distances obtenues (tableau 38), relativement faibles, suggèrent une certaine proximité phylétique entre les genres étudiés. Notons que les distances entre *Fusarium oxysporum* et nos souches apparaissent relativement faibles, sachant que *F. oxysporum* a été choisie comme espèce extérieure. Les distances entre *F. oxysporum* et les souches entomopathogènes sont du même ordre de grandeur que les distances entre *M. anisopliae* et les autres genres (ex:  $K_{nuc} = 0,259$  entre *M. anisopliae* groupe 1 et *P. fumosoroseus* groupe 1) ou encore entre *T. cylindrosporium* et le reste (entre *B. bassiana* et *T. cylindrosporium* :  $K_{nuc} = 0,239$ , entre *B. bassiana* et *F. oxysporum* :  $K_{nuc} = 0,222$  ).

L'analyse phylétique a été entreprise en utilisant l'indice  $K_{nuc}$  comme mesure de distances.

Domaine D1

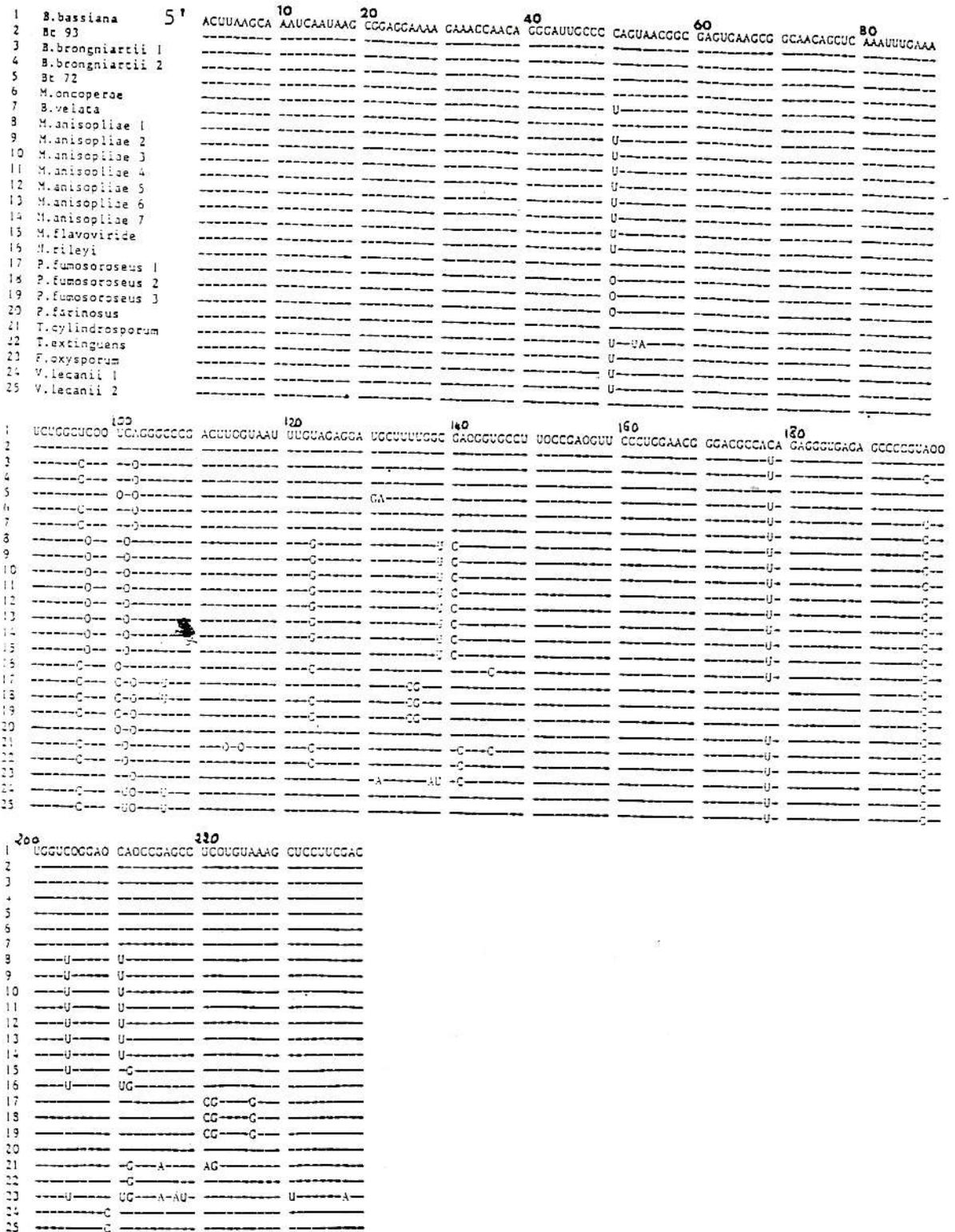


Figure 33: Alignement des 25 groupes de séquences de souches entomopathogènes.  
 (-) : nucléotide identique à celui de B.bassiana  
 (O) : délétion

Domaine D2

	5'	10	20	30	40	50	60	70	80	
1	B. bassiana	ACCUCAAAU	UCUUGAAAGG	GAAGCCCA	UGACCAGACU	UGCCGCCCGU	UAAUCACCAU	CGCCUUCUCG	CCUCUCCACU	UUGCCCGCGU
2	Bt 93						U	GCC		
3	B. brongniartii 1					O-C-O	U	G-C		C
4	B. brongniartii 2					O-C-O	U	G-C		C
5	Bt 72					O-C-O	U	G-C		C
6	M. oncopetæ									
7	B. velata						U			
8	M. anisopliae 1		C	A-U		C	G	UO	GCC	CCG
9	M. anisopliae 2			OU-O		C-UU	C	U-U	GGCC	C
10	M. anisopliae 3			CC-U		C-C	G	U-U	GGCC	CC
11	M. anisopliae 4			OU-O		C-UU	U	GGCC	C	U
12	M. anisopliae 5			A-U		C-C		UO	GCC	CCG
13	M. anisopliae 6			A-U		C-C	G	UO	GCC	CCG
14	M. anisopliae 7			CC-U		C	G	U	GCC	CCG
15	M. flavoviride			U		C	G	U	GCC	CCG
16	N. rileyi								A	
17	P. fumosoroseus 1			C		C	C-A-U	CC-C	CC	C-A
18	P. fumosoroseus 2			C		C	C-A-U	CC-C	CC	C-A
19	P. fumosoroseus 3					A-A-UU	C-A-U	CC-C	CC	C-A
20	P. farinosus					C	C	U	CC	C
21	T. cylindrosporum			A-U-G		C	G	U	G	CUG
22	T. extinguens					O	CO	CC-A-U	U	GAGU-CU
23	F. oxysporum			UU		UU	U-U	GGCC	C	A
24	V. lecanii 1					C	G	U		
25	V. lecanii 2					C	G	U	O	CC

	90	100	110	120	130	140	150	160	170	180	190
1	ACDAGCCAC	CAUCAGUCCA	GGCCCGCCGA	UAAAGCCUUC	GGCAUUGUCU	GCUCGCCUCU	GGCAGUCUUA	UAGCCCGCUC	CGUAAUCCG	CCUCCCGCCG	ACUAGGUAC
2		G		A					A		
3		G		A					A		
4		G		A					A		
5		G	CC	A					A		
6		G		A	U				A		
7		G	U	C					A		
8	U		CUC		U			AU	A	U-G	G-U
9	C		CUC		U			AU	A	U-U-G	C-U
10	C		C-U		U			AU	AC	A	C-U
11	C		CUCU		U			AU	A	U-U-G	G-U
12	U		CUC		U			AU	U	A	U-G
13	U		CUC		U			AU	C	A	U-G
14	C		C-U		U			AU	AC	A	U-G
15	C-C		C-C		U		A	AU	A	U-U-G	U
16	C		C-C		U			AU	AC	A	U-G
17				A		C		O-C	C	A	
18						C		O-C	C	A	
19						C			C	A	
20				A	U			AU	A		
21	O		C	A	C			U	AC	A	CC
22					C-U		U-CU	U	A	U-C	C
23	C		C-C		CC		U-U-G		A-C	U	A
24				A	U			AU	U	A	C-CC
25				C	U			A-C	U-CC	A	

	200	210	220	230
1	CCDCAUDDU	CCAAGCAUC	UGCCGUAAUG	GUCUACGCC
2				
3				
4				
5				
6		U-C	A	
7		AC-O		
8		U-UA		U
9		U-UA		U
10		C		U
11		UAUA		U
12		U-UA		U
13		U-UA		U
14		C		
15		CA		
16		C		
17		C-O		
18		C-O		
19		C-O		
20		C-O		
21	O	O-C-O		O-CC-C-U
22		C-O		
23		C		A
24				
25		C-O		

Figure 34: Alignement des 25 groupes de séquences de souches entomopathogènes  
 (-) : nucléotide identique à celui de B. bassiana  
 (O) : délétion

	Bt93	1	2	Bt72	Mo	Bv	Ma1	Ma2	Ma3	Ma4	Ma5	Ma6	Ma7	Mf	Nr	Pfr1	Pfr2	Pfr3	Pf	Tc	Te	Fo	V11	V12
Bbassiana	.033	.046	.037	.066	.073	.069	.169	.178	.160	.195	.178	.152	.156	.148	.132	.120	.100	.085	.239	.152	.222	.222	.095	.126
Bt 93		.013	.013	.032	.054	.058	.164	.173	.139	.191	.173	.131	.134	.127	.104	.109	.089	.050	.235	.131	.209	.209	.060	.098
Bbrong. 1		.008	.036	.041	.045	.168	.177	.143	.195	.177	.177	.135	.139	.122	.091	.095	.076	.045	.230	.127	.204	.204	.047	.085
Bbrong. 2		.036	.050	.053	.177	.186	.152	.204	.186	.144	.148	.131	.091	.095	.076	.054	.239	.135	.214	.056	.094			
Bt 72		.078	.073	.182	.191	.165	.200	.191	.191	.157	.192	.135	.125	.129	.109	.065	.271	.165	.208	.084	.123			
M.oncoperae		.056	.156	.164	.156	.182	.164	.164	.147	.151	.143	.115	.119	.099	.058	.235	.130	.236	.065	.089				
B.velata		.178	.187	.152	.187	.187	.143	.156	.139	.107	.103	.084	.060	.221	.136	.222	.093	.085						
M.anisopliae 1		.007	.076	.022	.007	.007	.085	.082	.119	.249	.232	.219	.151	.245	.219	.222	.156	.200						
M.anisopliae 2		.085	.015	.015	.015	.093	.073	.128	.259	.241	.228	.160	.255	.228	.231	.165	.209							
M.anisopliae 3		.101	.085	.068	.007	.073	.058	.197	.180	.167	.119	.200	.164	.187	.132	.148								
M.anisopliae 4		.029	.029	.110	.089	.144	.277	.258	.246	.177	.274	.248	.250	.182	.227									
M.anisopliae 5		.015	.093	.089	.128	.249	.241	.228	.160	.240	.228	.213	.148	.191										
M.anisopliae 6		.076	.089	.111	.240	.223	.210	.160	.236	.209	.231	.165	.200											
M.anisopliae 7		.065	.050	.188	.172	.159	.111	.209	.156	.178	.124	.140												
M.flavoviride		.088	.209	.197	.183	.115	.245	.164	.182	.127	.160													
N.rileyi		.174	.154	.141	.098	.191	.147	.176	.124	.140														
P.fumosoroseus 1		.019	.037	.095	.236	.161	.279	.111	.119															
P.fumosoroseus 2		.019	.100	.214	.141	.275	.124	.124																
P.fumosoroseus 3		.088	.200	.129	.252	.120	.112																	
P.farinosus		.230	.110	.213	.048	.071																		
T.cylindrosporium		.232	.336	.254	.254																			
T.extinguens		.250	.131	.122																				
F.oxysporum		.214	.214																					
V.lecanti 1		.052																						
V.lecanti 2																								

Tableau 38: Matrice de distances de 25 séquences de souches entomopathogènes. Distances exprimées par l'indice Knuc.  
Bt93 et Bt72 sont des souches de *B.brongniartii*.

Le dendrogramme (figure 35) indique :

- une cassure fondamentale entre l'ensemble des genres *Nomuraea* et *Metarhizium* d'une part et l'ensemble des autres genres étudiés d'autre part. La distance entre *N. rileyi* et *M. anisopliae* n'apparaît pas plus grande qu'entre *M. anisopliae* et *M. flavoviride*.
- Dans le genre *Paecilomyces*, les 2 espèces étudiées (qui sont les espèces les plus communément rencontrées) sont assez distantes l'une de l'autre (Knuc= 0,100). La distance entre ces deux espèces est du même ordre que celle observée entre *B. bassiana* et *P. farinosus* (Knuc=0,085).
- Toujours dans le genre *Paecilomyces*, l'espèce *P. farinosus* apparaît très proche de *V. lecanii* (Knuc= 0,048).
- Les 2 espèces de *Tolypocladium* semblent ne pas appartenir au même genre (Knuc= 0,232). Quant à l'appartenance de *Tolypocladium* (et en particulier de *T. cylindrosporum* (Von Arx 1986)) au genre *Beauveria*, nos résultats l'infirmement complètement. Les 2 genres sont aussi distants entre-eux (Knuc=0,239) que *B. bassiana* est éloignée de *F. oxysporum* (Knuc= 0,222).
- Contrairement à *Paecilomyces* et *Tolypocladium*, les genres *Beauveria* et *Metarhizium* sont relativement homogènes malgré une certaine variabilité intraspécifique.
- on note enfin la parfaite intégration de l'espèce *M. oncoperae* au sein de l'ensemble des *Beauveria*.

#### b - Analyse par la méthode du NEIGHBOR-JOINING

Ce programme nous permet de traiter un grand nombre de séquences en un temps très court. Le dendrogramme est construit à partir de la matrice de distances (tableau 38). Cette classification est identique à celle établie par la méthode de FITCH. Deux grands ensembles peuvent être définis (figure 36):

- l'ensemble composé des genres *Nomuraea* et *Metarhizium*
- l'ensemble des autres genres.

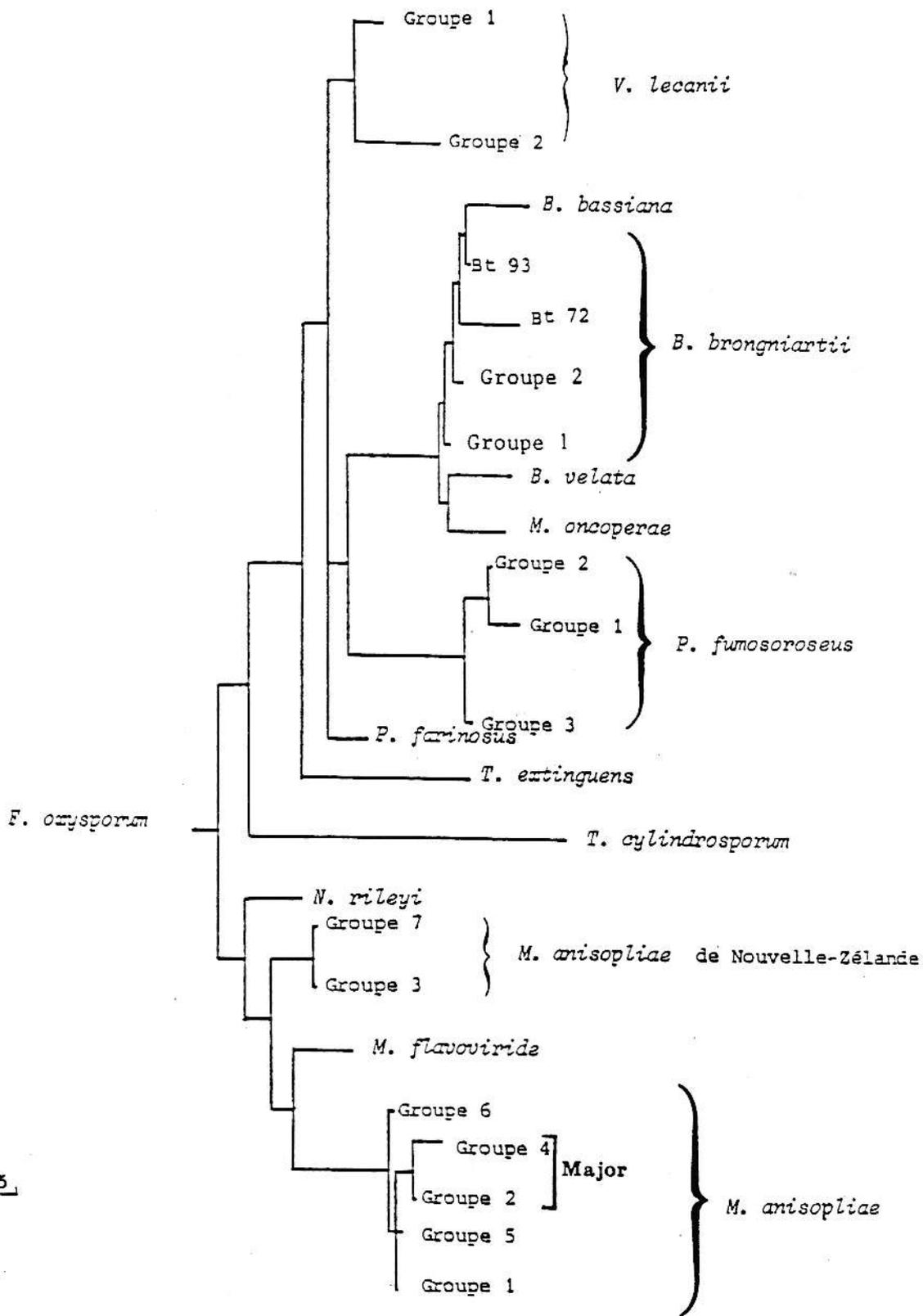


Figure 35: Relations phylétiques entre les 25 groupes de séquences des souches entomopathogènes. Arbre obtenu par la méthode de FITCH. Les groupes sont numérotés à l'intérieur de chaque espèce.  
Echelle: 5 nucléotides

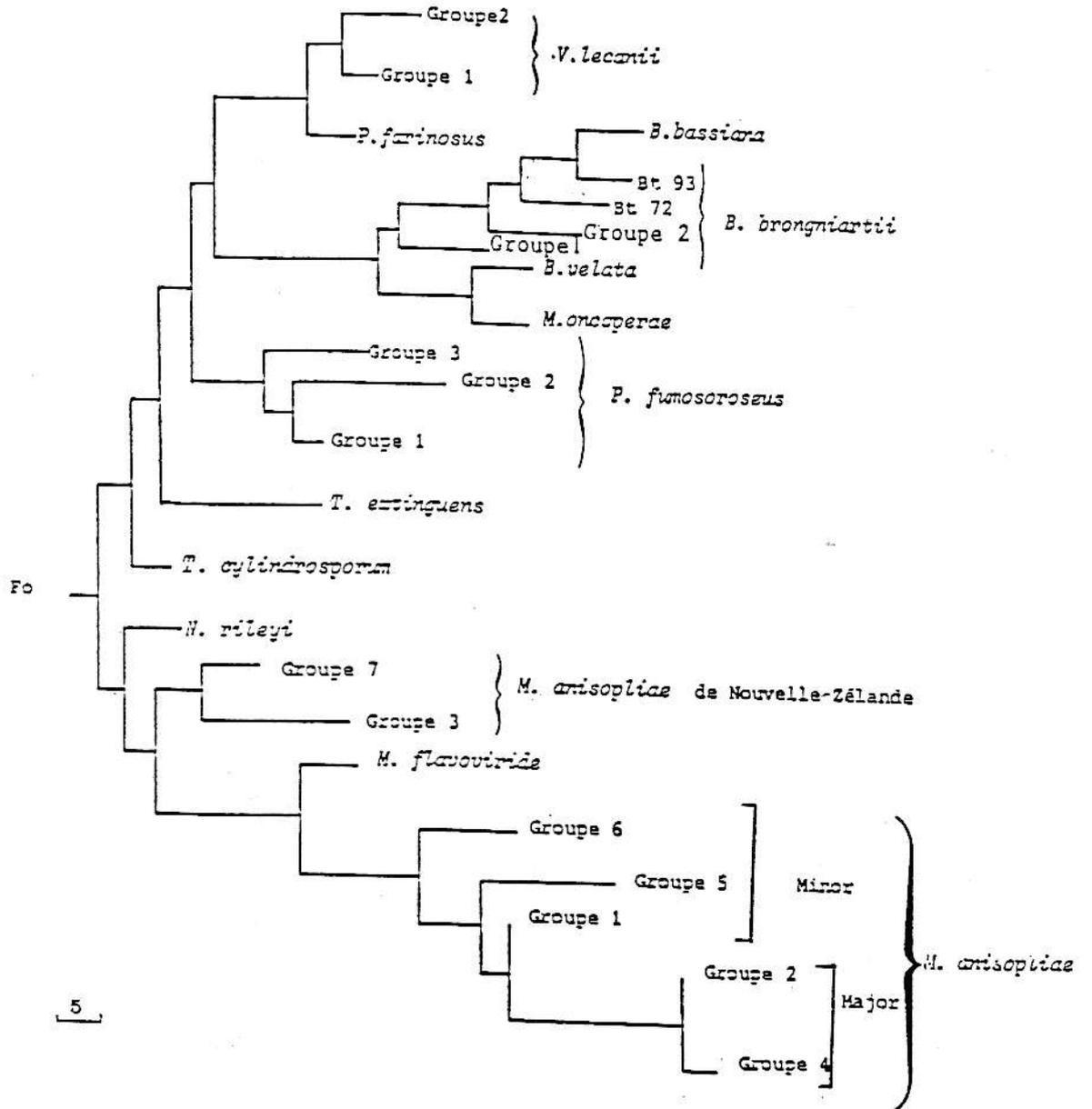


Figure 37: Relations phylétiques entre les 25 groupes de séquences des souches entomopathogènes. Arbre obtenu par la méthode du NEIGHBOR-JOINING. Fo : *F. oxysporum*. Les groupes sont numérotés à l'intérieur de chaque espèce. Echelle : 5 nucléotides.

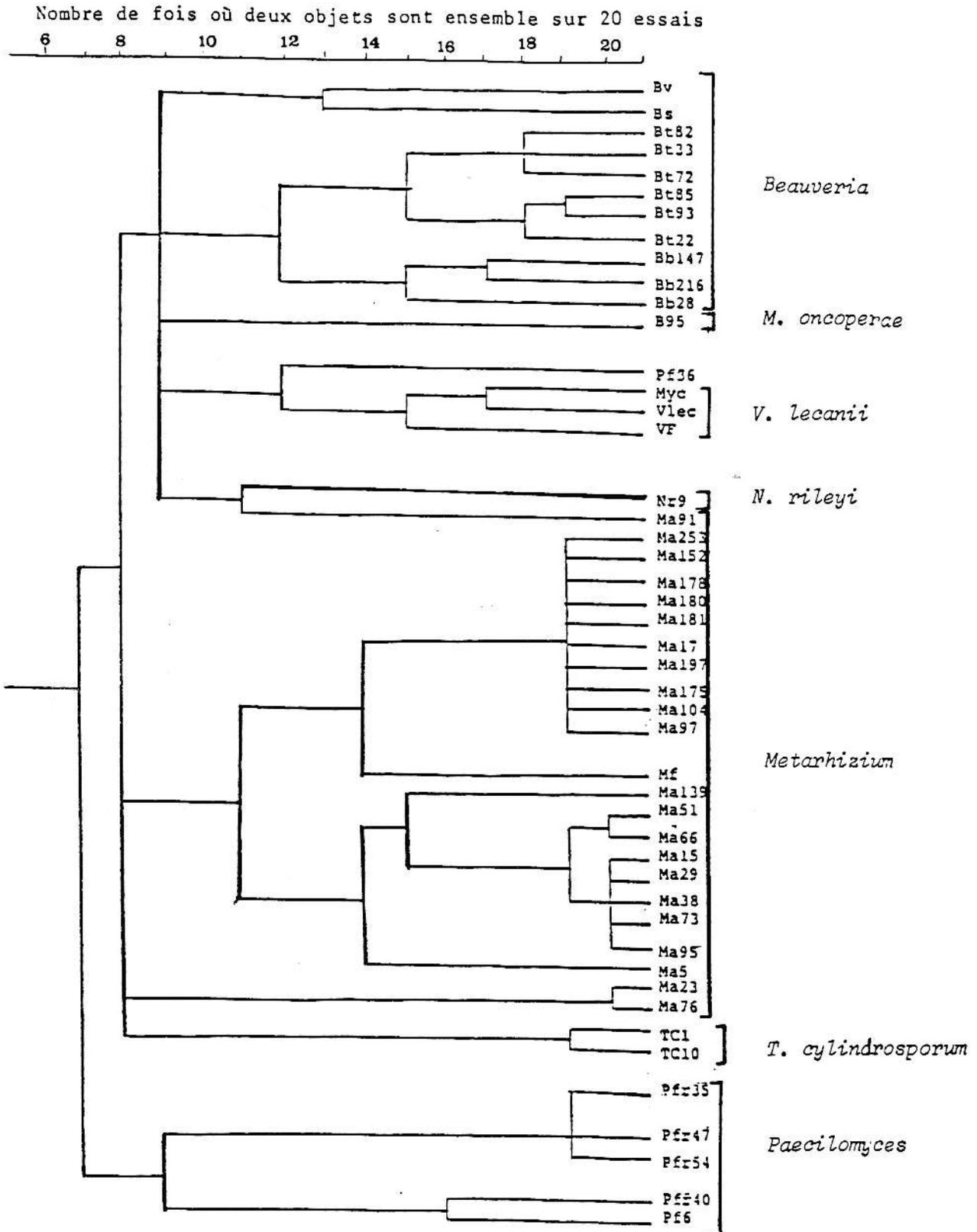


Figure 37: Relations biochimiques entre les souches entomopathogènes. Dendrogramme obtenu par la méthode des nuées dynamiques.

Dans les genres *Metarhizium* et *Beauveria*, cette méthode permet de mieux discriminer les différents groupes. Les longueurs des branches obtenues par la méthode de FITCH sont trop faibles pour bien apprécier les relations phylétiques entre ces groupes. Par la méthode du Neighbor-joining, on met en évidence plus nettement, au sein de *M. anisopliae* l'existence de la sous-population de souches en provenance du Brésil (groupe 6). Par ailleurs, on confirme la divergence des souches en provenance de Nouvelle-Zélande.

## C.II.2. Classification par comparaison des zymogrammes

### a - Classification par la méthode des nuées dynamiques

5 grands ensembles sont mis en évidence (figure 37):

- l'ensemble des souches de *Metarhizium*
- les souches de *Beauveria*
- les souches de *V. lecanii*
- les souches de *T. cylindrosporum*
- les souches de *P. fumosoroseus*.

Cette classification présente beaucoup de congruences avec la classification moléculaire. Elle confirme:

- la relative homogénéité des genres *Metarhizium* et *Beauveria* et de l'espèce *P. fumosoroseus*.
- l'éclatement du genre *Paecilomyces*
- la séparation des genres *Tolypocladium* et *Beauveria*
- à l'intérieur du genre *Metarhizium*, elle fait ressortir l'originalité des souches en provenance de Nouvelle-Zélande ainsi que la particularité des souches de *M. anisopliae* var. major.

Malgré ces convergences, on note quelques différences, à savoir:

- l'éclatement de l'espèce *P. farinosus*
- la séparation de *B. sulfurescens* avec les souches de *B. basiana*
- la nette distinction des genres *Microhilum* et *Beauveria*

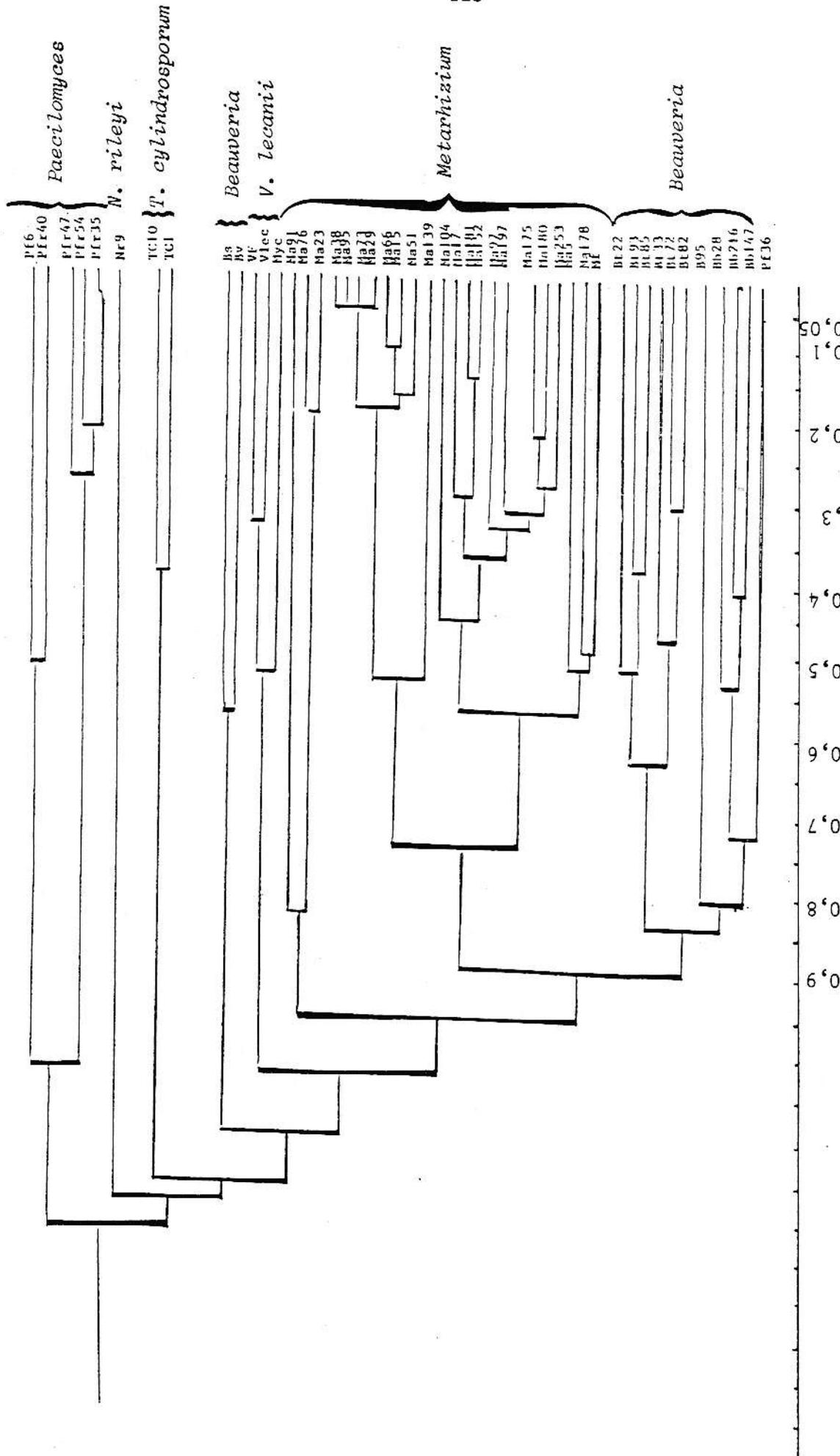


Figure 38: Relations phylétiques entre les différentes souches d'Hyphomycètes entomopathogènes. Arbre obtenu par la méthode d'UPGMA appliquée à des distances euclidiennes calculées à partir des coordonnées en AFC.

- la proximité des genres *Nomuraea* et *Metarhizium* n'est pas bien soulignée, alors qu' on note l'étroite relation entre la souche de *N. rileyi* et la souche Ma91 de *M. anisopliae*.

#### b - Classification par UPGMA

A partir des mêmes données que les nuées dynamiques, une analyse en UPGMA appliquée aux distances euclidiennes est entreprise (figure 38).

Dans l'ensemble, cette classification présente beaucoup de similitudes avec les 3 premières.

Cependant on note une différence fondamentale: *Metarhizium* est totalement séparé de *N. rileyi*. Les espèces *B. velata* et *B. sulfurescens* sont très éloignées de l'ensemble des souches du genre *Beauveria* contrairement aux précédentes classifications. Les 2 souches de *P. farinosus* sont très distantes l'une de l'autre comme dans la classification par les nuées dynamiques. La souche de *M. oncoperae* s'intègre parfaitement parmi les souches de *Beauveria*.

Cette classification met en évidence trois grands ensembles :

- l'ensemble des *Beauveria*
- L'ensemble des *Metarhizium*
- et le reste.

#### C.III. Analyse comparative entre les différentes classifications

Les classifications moléculaire et biochimique donnent dans l'ensemble des résultats assez concordants. La classification par les nuées dynamiques permet de bien répartir les genres sans établir les liens entre eux. Au niveau de la séparation des genres, la valeur du pas n'est pas assez significatif pour faire une interprétation phylétique à ce niveau. Par ces différentes classifications, nous avons pu d'une part, rassembler certaines espèces qui avaient été séparées telles que *B. bassiana* et *B. sulfurescens* ; d'autre part, nous avons différencié des souches qui avaient été regroupées dans une même espèce (ex: *B. brongniartii* et *P. fumosoroseus*).

On observe une forte relation entre *Nomuraea* et *Metarhizium*, ce qui est à la fois nouveau et surprenant, car nous l'avons vu, morphologiquement, la séparation

Tableau 39 : Liste des souches recaractérisées

Isolat	Année	Hôte d'origine	Origine géographique	Nom
PI	1980	<i>Meloidogyne incognita</i>	Pérou	<i>Paecilomyces lilacinus</i> ou <i>Paecilomyces marquandii</i> ?
PIr63	1987	<i>Diaprepes</i> sp.	Guadeloupe	<i>Paecilomyces marquandii</i> ou <i>Paecilomyces lilacinus</i> ?
PIr52	1984	<i>Calliphora</i>	France	<i>Paecilomyces javanicus</i>
PIr38	1976	<i>Scotia segetum</i>	France	Forme intermédiaire entre <i>P.fumosoroseus</i> et <i>P.farinosus</i>
VC26	1987	<i>Formicidae</i>	Cuba	<i>Acremonium strictum</i>
Pt	1987	Larves de lépidoptère		<i>Beauveria</i> sp.
Pc	1979	<i>Lymantria</i>	Japon	<i>Beauveria brongniartii</i>
B73	1973	<i>Sibine apicalis</i>	USA	<i>Paecilomyces</i> sp.
B41	1973	<i>Adalia notata</i>	France	<i>Verticillium</i> sp.
B96	1988	<i>Hoplochelus marginalis</i>	Madagascar	<i>Microhilum oncoperae</i>

entre les deux genres est tout à fait nette et rien n'a laissé prévoir cette relation. Morphologiquement, *N. rileyi* est plus proche de *Paecilomyces*; la distinction entre les deux genres est récente (Samson, 1974). On aurait pu s'attendre donc, à voir *N. rileyi* phylétiquement plus proche de *Paecilomyces* ou même de *Beauveria* (*N. rileyi* a été identifiée comme *B. rileyi* (Farlow) Grosswald, 1939).

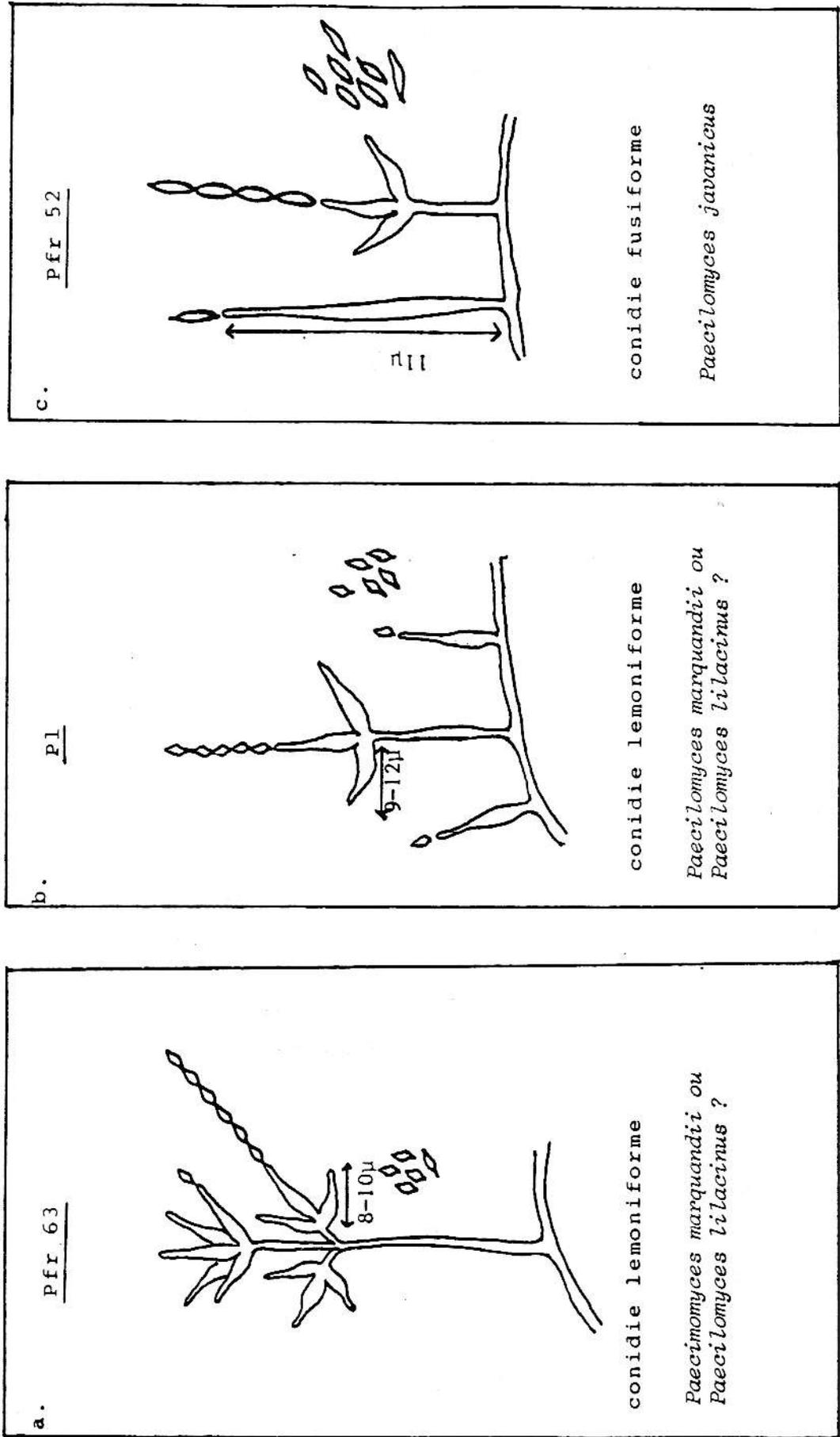
Les deux espèces de *Paecilomyces* étudiées apparaissent très éloignées l'une de l'autre. Dans le genre *Paecilomyces* comme dans le genre *Beauveria*, la différenciation entre les espèces est généralement basée sur la forme et la couleur des conidies. Ces deux espèces de *Paecilomyces* sont essentiellement distinguées par la couleur de leur sporée ainsi que par la forme de leurs conidies. Aussi, une similitude morphologique peut éventuellement masquer une diversité génétique et inversement. En effet, dans les cas de *Nomuraea-Metarhizium* et *P. farinosus -Verticillium*, l'étroite relation phylétique au niveau des ARNr ne se retrouve pas au niveau morphologique. Il en est de même pour les genres *Microhilum* et *Beauveria*; la souche de *Microhilum* étudiée s'intègre parfaitement dans l'ensemble des *Beauveria*, malgré une différenciation morphologique bien marquée entre eux.

En général, à l'intérieur des genres, la répartition des espèces suivant les critères moléculaire et biochimique, est tout à fait en accord avec la classification morpho-ontogénique. Par contre, entre les genres, les classifications que nous avons établies ne vérifient ni ne confirment la classification classique (cf Classification morphologique). Ceci souligne la différence de finalité entre ces classifications.

#### **C.IV. Contribution à l'identification des espèces de position systématique incertaine**

Lors de l'isolement d'un champignon à partir d'un insecte donné, une caractérisation microscopique détaillée n'est pas toujours effectuée. L'identification de ces germes est parfois uniquement basée sur l'aspect macroscopique (symptôme, couleur) et la forme des spores. Ces critères sont parfois insuffisants et peuvent conduire à des confusions. Nous avons eu en notre possession, quelques souches d'identification douteuse. Les séquences d'ARNr et l'analyse des systèmes enzymatiques, ont permis de les distinguer des souches types de l'espèce à laquelle elles avaient été assignées. Leur

Figure 39 : Les souches recharacterisées



caractérisation morphologique a été réalisée par une observation microscopique des structures sporifères.

Les souches sont cultivées sur milieu Malt-agar en boîte de Pétri, à 25°C et à l'obscurité. Les observations sont effectuées après 15 jours de culture. La liste des souches est donné dans le tableau 39.

#### C.IV.1. Descriptions morphologiques

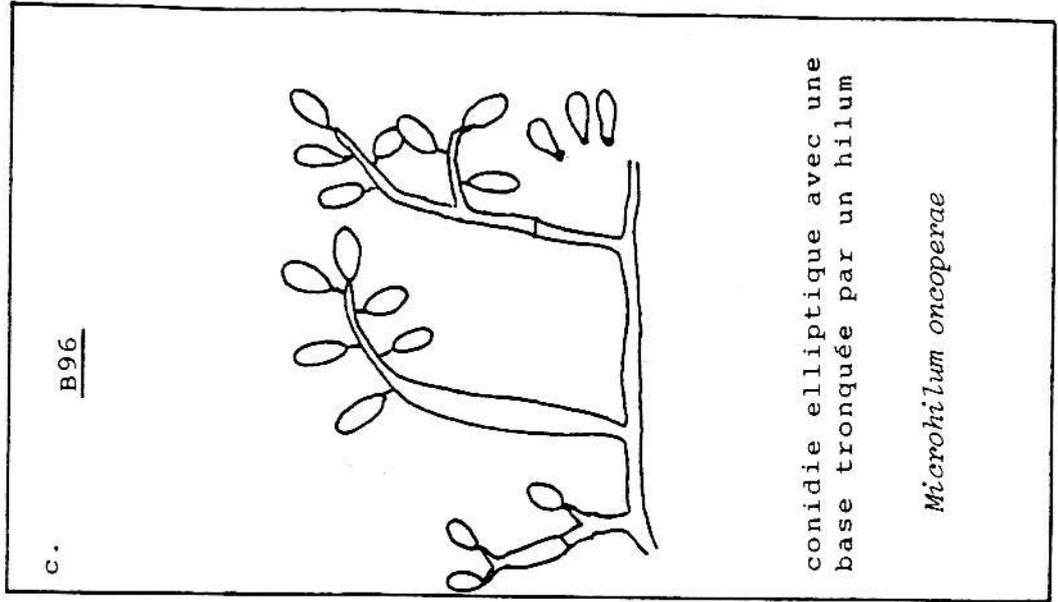
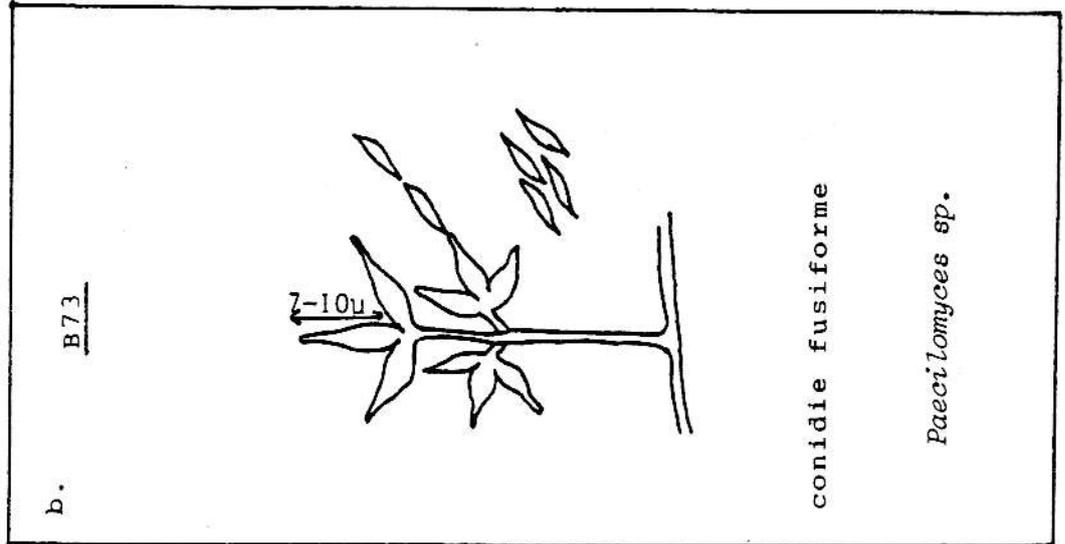
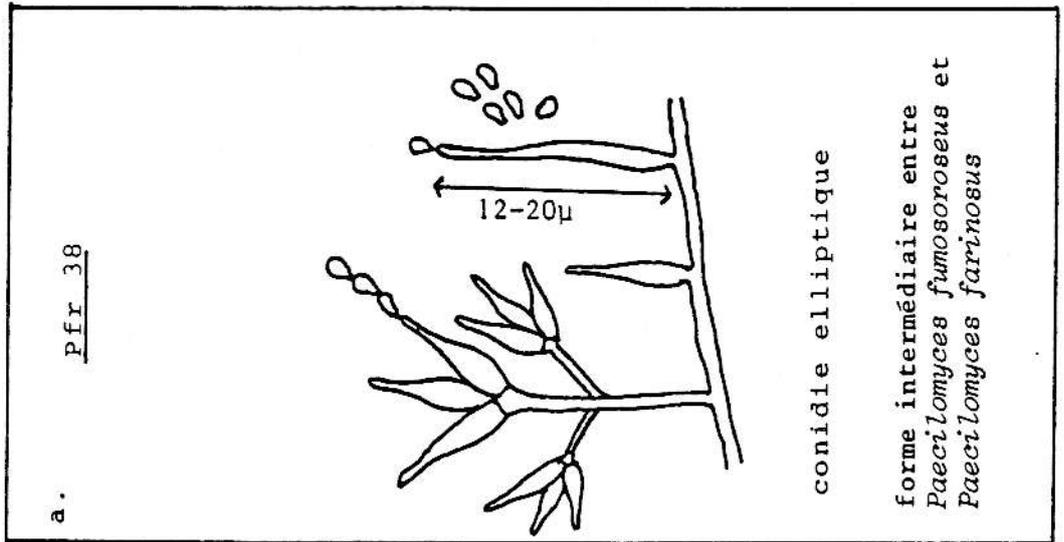
Pfr 63 : Colonie cotonneuse, de couleur violacée avec un revers rougeâtre. Les conidiophores en pinceaux, sont très peu différenciés et non pigmentés. Les phialides (en groupe de 6), de 8-10  $\mu\text{m}$  de long, possèdent une partie basale très peu renflée se prolongeant par un col bien distinct, long et fin. Les conidies sont lemoniforme de 3 x 2  $\mu\text{m}$  (figure 39a). Cette souche a été distinguée dès le départ des autres souches de *P. fumosoroseus* (groupe où elle avait été assignée), par le fait qu'elle ait été isolée d'un coléoptère, qui n'est pas un hôte connu de cette espèce.

Cette souche est très proche de *Paecilomyces marquandii* par les conidiophores très peu différenciés et non pigmentés, mais d'un autre coté, elle est plus proche de *P. lilacinus* par la couleur des colonies et celle du revers. Nous n'avons pu trancher entre ces 2 espèces.

Pl : Colonie duveteuse blanche avec un revers incolore; la colonie devient légèrement violacée avec le temps. Absence de conidiophore dans les conditions de l'observation. Les phialides sont majoritairement solitaires ou en groupe de 2 à 5, de 9-12  $\mu\text{m}$  de long sur 2  $\mu\text{m}$  de large. Elles sont constituées d'une partie basale renflée se prolongeant par un col long et fin. Les conidies sont lemoniformes de 2,5-3 x 1,5-2  $\mu\text{m}$  (figure 39b).

Cette souche est très proche de *Paecilomyces marquandii* sauf pour son revers incolore qui est rougeâtre chez *P. marquandii*. Par ce caractère, elle se rapprocherait de *P. lilacinus*. Mais le fait de n'avoir pu observer de conidiophores ne nous permet pas de trancher entre ces 2 espèces.

Figure 40: Les souches recharacterisées



Les 2 espèces *P. lilacinus* et *P. marquandii* sont souvent confondues entre elles. Jusqu'à ce jour, cependant aucune souche de *P. marquandii* n'a été recensée comme entomopathogène.

Pfr 52 : Colonie duveteuse gris rose. Deux types de phialides sont observées:

- 1) très allongées et très fines, en majorité solitaires.
- 2) plus typiques de *Paecilomyces* avec une partie basale renflée et un col bien distinct, en groupe de 2 à 3. Aucun verticille n'a été observé. Dans les deux cas, les conidies sont fusiformes de 4-7 x 1-1,5  $\mu\text{m}$  ; elles sporulent en longues chaînes très solides (figure 39c).

Pfr52 est une souche de *Paecilomyces javanicus* (suivant la description de Samson, 1974).

Pfr 38 : Colonie duveteuse blanche. On note la présence de deux types de phialides:

- 1) des phialides portées par des pinceaux de conidiophores, renflées dans leur partie basale qui se prolonge par un col distinct, long et fin.
- 2) des phialides solitaires ou en groupes de 4, très longues (12-20  $\mu\text{m}$ ) et effilées.

Les conidies sont elliptiques, avec une extrémité basale resserrée de 2-3,5 x 1,5  $\mu\text{m}$ . Elles sporulent en chaînes très courtes (figure 40a).

Cette souche est proche de *Paecilomyces farinosus* par la forme et la taille des spores ainsi que la couleur de la colonie, mais est différente par la taille et la forme des phialides qui se rapprocheraient un peu plus de celles de *P. fumosoroseus*. Cette souche serait une forme intermédiaire entre les 2 espèces.

B73 : Colonie duveteuse blanche au départ, devient grise et poudreuse avec le temps. Les conidiophores en pinceau, portent des groupes de 3 à 4 phialides. Les phialides sont assez trapues (7-10 x 2  $\mu\text{m}$ ), avec une partie basale renflée se prolongeant par un col long et fin. Ces phialides sont groupées de manière assez serrée. Les conidies sont fusiformes (4-6 x 1,5-2  $\mu\text{m}$ ), hyalines et sporulent en chaîne (figure 40b).

Cette souche appartient au genre *Paecilomyces*. Elle est très proche de *P. javanicus* par la forme des spores mais est différente par la forme des phialides.

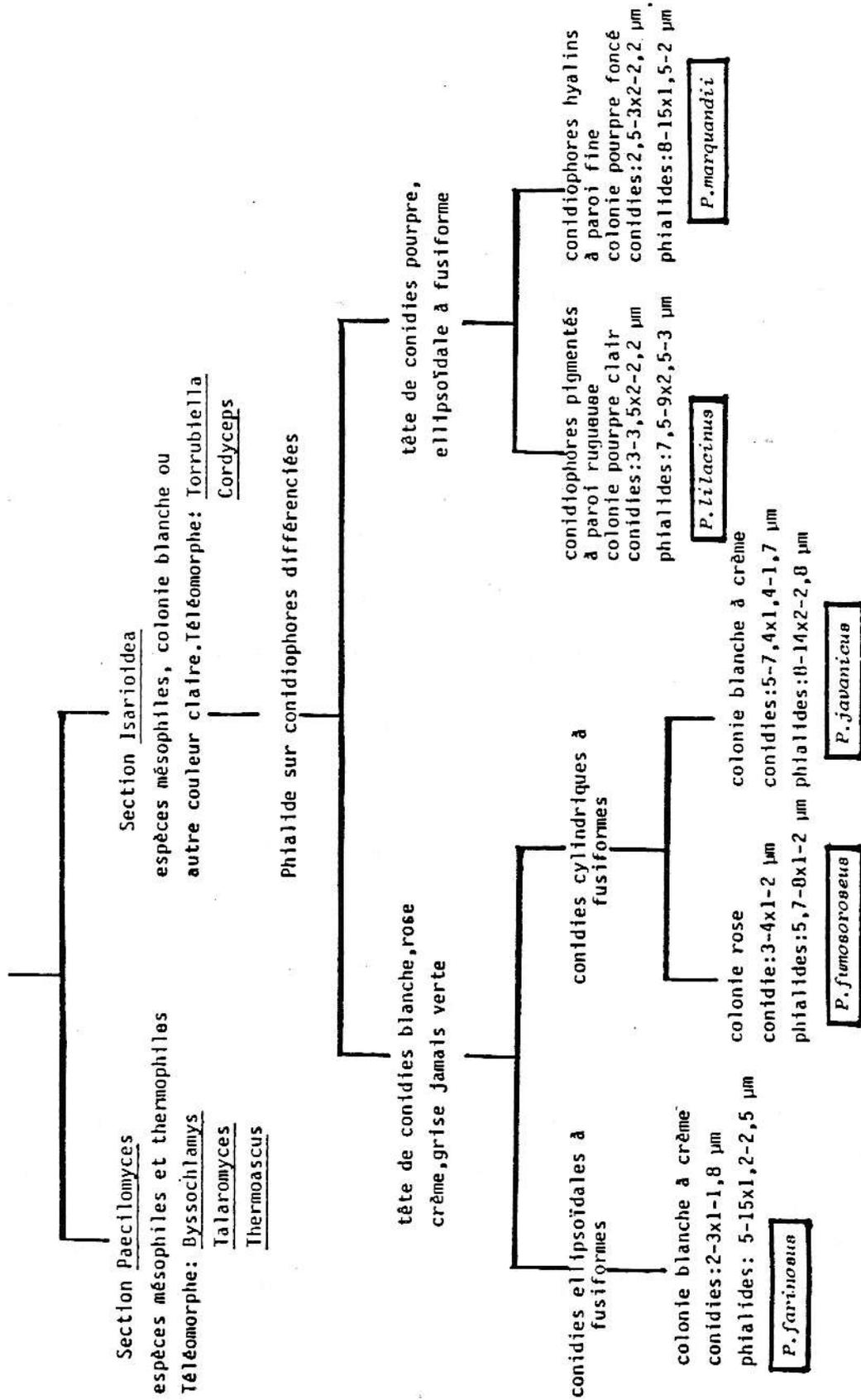
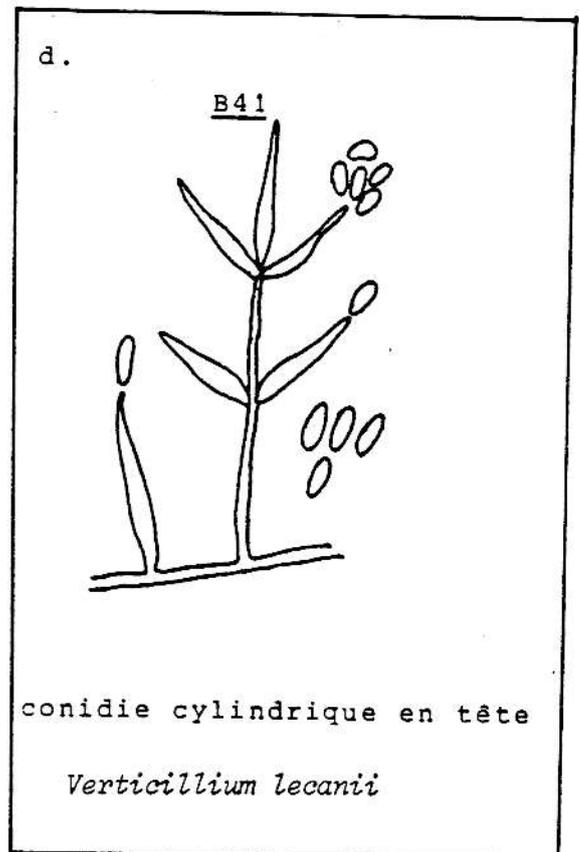
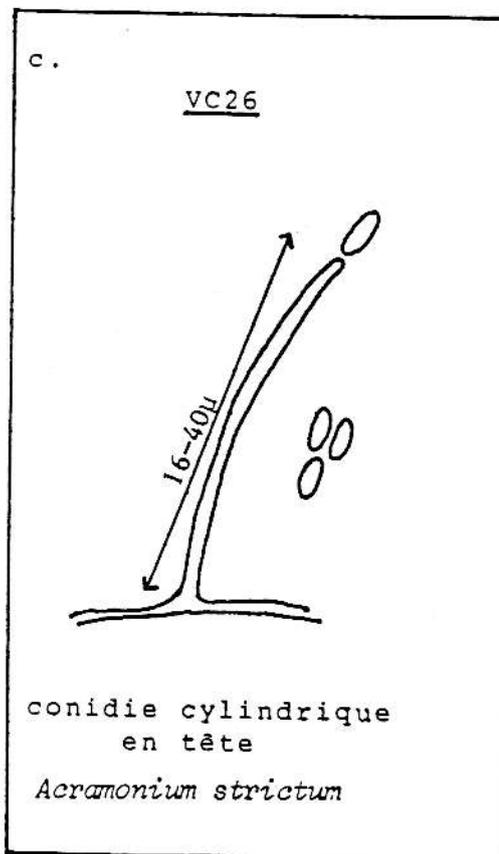
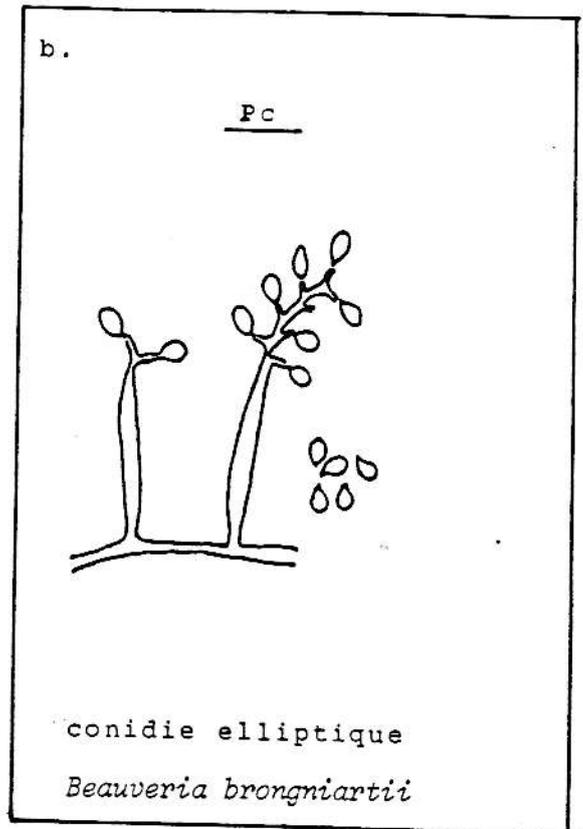
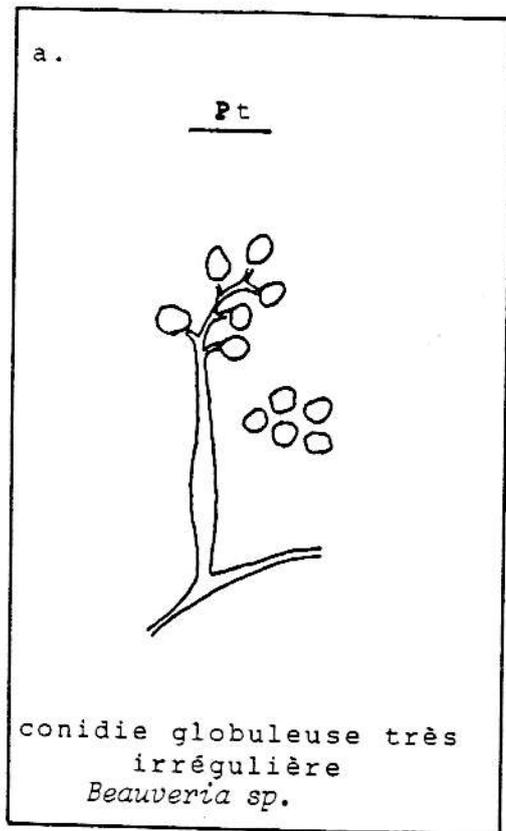


Figure 42: Classification morpho-ontogénique de quelques espèces de Paecilomyces

Figure 41: Les souches recharacterisées



Pour référence, nous donnons dans le figure 42, la description des types de souches de *Paecilomyces* qui nous intéressent (selon les descriptions de Samson 1974).

**B96** : Colonie duveteuse blanche. Les cellules conidiogènes sont attachées à l'extrémité de branches latérales ou naissent directement de l'hyphe végétative. Ces cellules sont à croissance sympodiale. On n'observe pas de rachis en zig-zag. Les denticules sont en nombre très limité. Les spores sont elliptiques (3-5,5 x 1-1,5  $\mu\text{m}$ ), hyalines, unicellulaires, avec un apex arrondi et une base tronquée par un hilum (figure 40c).

Cette souche possède les mêmes caractéristiques que la souche B95 qui appartient à l'espèce *Microhilum oncoperae* (suivant description de Yip et Rath, 1989).

**Pt** : Colonie duveteuse blanche. Les cellules conidiogènes, solitaires, sont longues et fines, avec une partie basale renflée. Elles sont à croissance sympodiale, ne possède pas de rachis bien géniculé. Les conidies hyalines sont de forme globuleuse et irrégulière (figure 41a).

Cette souche appartient sans nul doute au genre *Beauveria*; elle est très proche de *B. bassiana* par la forme des spores mais se rapproche de *B. brongniartii* par l'aspect général des cellules conidiogènes.

**Pc** : Colonie duveteuse blanche avec un revers incolore. Les cellules conidiogènes sont assez trapues ou longues et fines, solitaires ou groupées de manière éparse. Elles possèdent une croissance sympodiale et un rachis géniculé bien marqué. Les conidies hyalines, sont elliptiques avec une partie basale pincée (2-4 x 1,5  $\mu\text{m}$ ) (figure 41b).

Pc est une souche de *Beauveria brongniartii* (suivant la description de de Hoog).

**B41** : Colonie duveteuse blanche. Les phialides en majorité solitaires, sont très fines et allongées (9-30  $\mu\text{m}$  de long). Elles sont parfois en verticille. Les conidies sont hyalines, unicellulaires, de forme cylindrique et en tête (figure 41c).

B41 est une souche de *Verticillium lecanii* (suivant la description de Gams).

**VC26** : Colonie très humide de couleur orange. Les phialides, solitaires, naissent directement de l'hyphe végétative. Elles sont très longues (16-40  $\mu\text{m}$ ) et d'aspect fragile. Les conidies, cylindriques (3-5,5 x 0,8-1,2  $\mu\text{m}$ ), hyalines et unicellulaires (figure 41d), sporulent en tête

VC26 est une souche d'*Acremonium strictum* (suivant description de Gams)

#### C.IV.2. Systématique des souches recharacterisées

La figure 43 représente les séquences nucléotidiques des souches que nous venons de caractériser. Leur positionnement systématique par rapport aux genres et espèces étudiés, a été estimé par la méthode du NEIGHBOR-JOINING (figure 44) pour les séquences d'acides nucléiques et par l'analyse issue des nuées dynamiques et l'UPGMA pour les systèmes enzymatiques (figures 45 et 46). Les deux méthodes donnent des résultats concordants. Dans cette analyse, nous employons uniquement le NEIGHBOR-JOINING pour traiter nos séquences, car il est impossible d'étudier un nombre de groupes aussi important par le programme FITCH.

##### a - Analyse par la méthode du NEIGHBOR-JOINING

Notons tout d'abord que l'introduction des souches nouvellement caractérisées (figure 44), parmi l'ensemble de nos groupes, modifie plus ou moins l'allure des embranchements au niveau des distances très faibles (cas de *Beauveria*); cette introduction augmente le bruit de fond dû aux incertitudes de la méthode. Par l'analyse d'autant de groupes, nous approchons la limite de la méthode.

Pc et Pt s'intègrent dans l'ensemble des *Beauveria*., Pt est très proche de *B. bassiana*. Pc, identifiée comme *B. brongniartii*, est très distante des autres groupes de cette espèce. B96 est étroitement liée au groupe 1 des *B. brongniartii*. Elle apparaît relativement éloignée de la souche type de *M. oncoperae*.

B73 s'intègre aussi parfaitement à l'ensemble des *Beauveria*, alors que morphologiquement, elle ne possède rien de commun avec ce genre.

*P. javanicus* est aussi phylétiquement très proche de toutes les espèces de *Beauveria*.

Domaine D1

1	B. bassiana	5'	ACUUUAGCA	10	UAUCAUAAC	20	CGGAGGAAA	30	GAAACCAACA	40	CGGAUUGCC	50	CAGUAACGCC	60	GAGUGAAGCC	70	GCAACAGCUC	80	AAUUUUGAAA	90	UCUGCCUCU
2	B41																				
3	B73																				
4	B96																				
5	Pfr 63																				
6	Pfr 38																				
7	Pfr 52																				
8	Pc																				
9	P1																				
10	Pc																				
11	VC26																				

1		100	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
1		UCUGGUCUC	ACUUUUAUU	UUGUAGAGCA	UGUUUUUCC	UAUGGUUCCU	UCCCAAGUU	CCUUGGAACG	CGAGCCACA	CAGCCUGAGA	CCCCCUAAG	UCUUUUUUA
2												
3												
4												
5												
6												
7												
8												
9												
10												
11		A-U-U			A-A-U							C-A-C

1		210	220	230
1		CAUCCGAGC	UCUUUAAG	UCUUUCCAC
2				
3				
4				
5				
6				
7				
8				
9				
10				
11				

Domaine D2

1	B. bassiana	5'	ACUUGAAU	10	UUUGAAAG	20	GAAGCCCUA	30	UGACCAGACU	40	UGGGCCCGU	50	UAAUCACCA	60	CCUUUCUC	70	CCUGGCACU	80	UUCCCGCGU
2	B-1																		
3	B73																		
4	B96																		
5	Pfcb1																		
6	Pfr JB																		
7	Pfr 52																		
8	Pc																		
9	P1																		
10	Pc																		
11	VC26																		

1		90	100	110	120	130	140	150	160	170	180	190
1		ACUAGCCAG	UAUUAUUUA	UCUUUUUUA	UAAAGCCUUC	UGGAAUUGU	UCUUUUUUC	UGGAGUGUA	UAGCCCGUUC	UCUUAUUCU	UCUUUUUUU	ACUAGCCUAC
2												
3												
4												
5												
6												
7												
8												
9												
10												
11		C		UC A-C		C		U			A-C	U-CC-A

1		200	210	220	230
1		CCUUUAUUU	CCUACGAUC	UCUUUUUAU	GUCAUCAGCA
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					
11					

Figure43: Alignement des séquences des souches recaractérisées par rapport à la séquence de B. bassiana. Les positions des nucléotides sont numérotées à partir de l'extrémité 5' du domaine concerné.  
 (-) :nucléotide identique  
 (O) :délétion

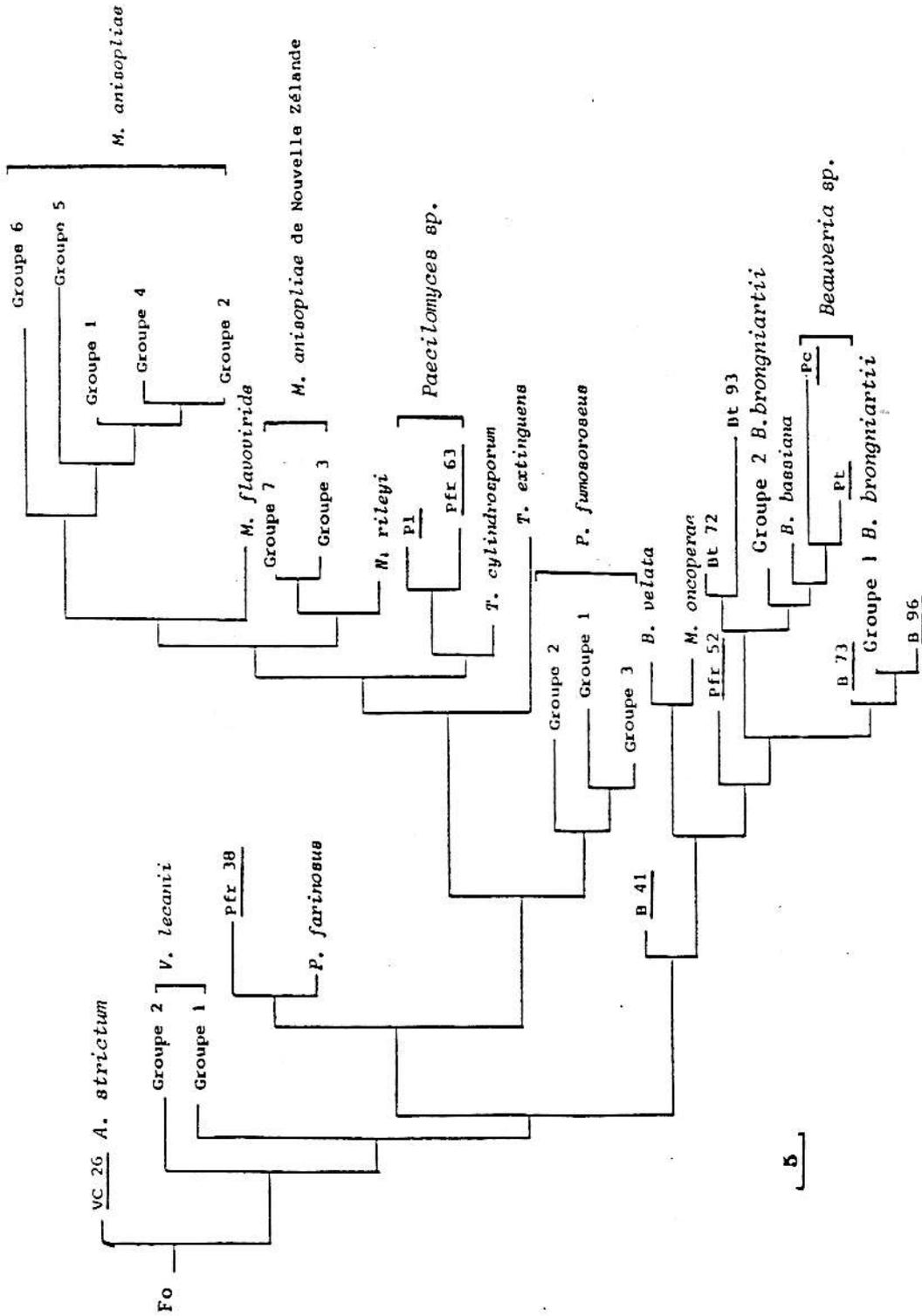


Figure 44: Positionnement des souches caractérisées (en souligné). Arbre obtenu par la méthode du NEIGHBOR-JOINING. Fo : *F. oxysporum* ; Pfr 52 : *P. javanicus* ; B73: *Paecilomyces sp.* B 96 : *M. oncoperae* ; B41 : *V. lecanii*  
 Echelle : 5nucléotides

Nombre de fois où deux objets se retrouvent ensemble sur 20 essais  
 6      8      10      12      14      16      18      20

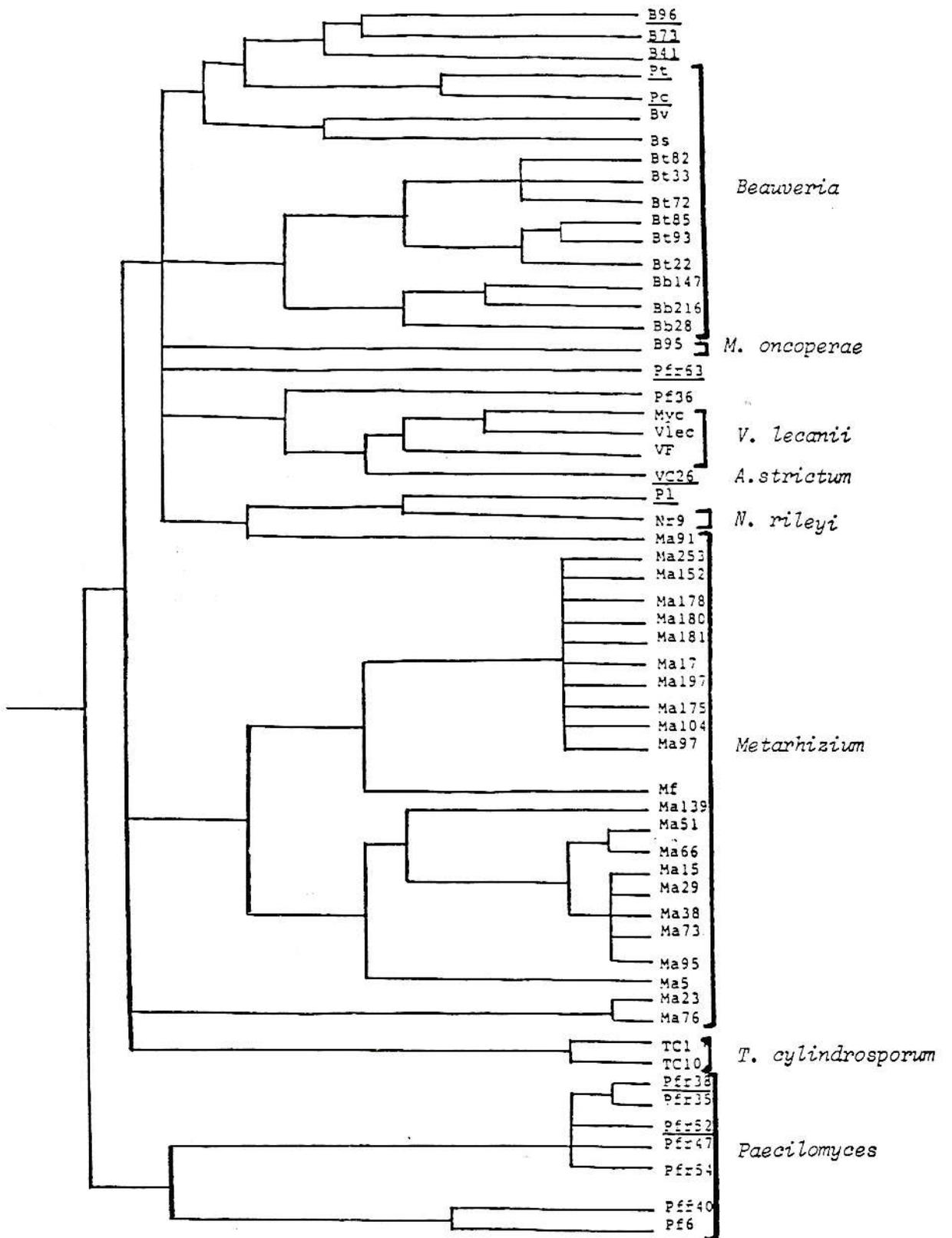


Figure 45: Positionnement des souches caractérisées. Dendrogramme obtenu par la méthode des nuées dynamiques.

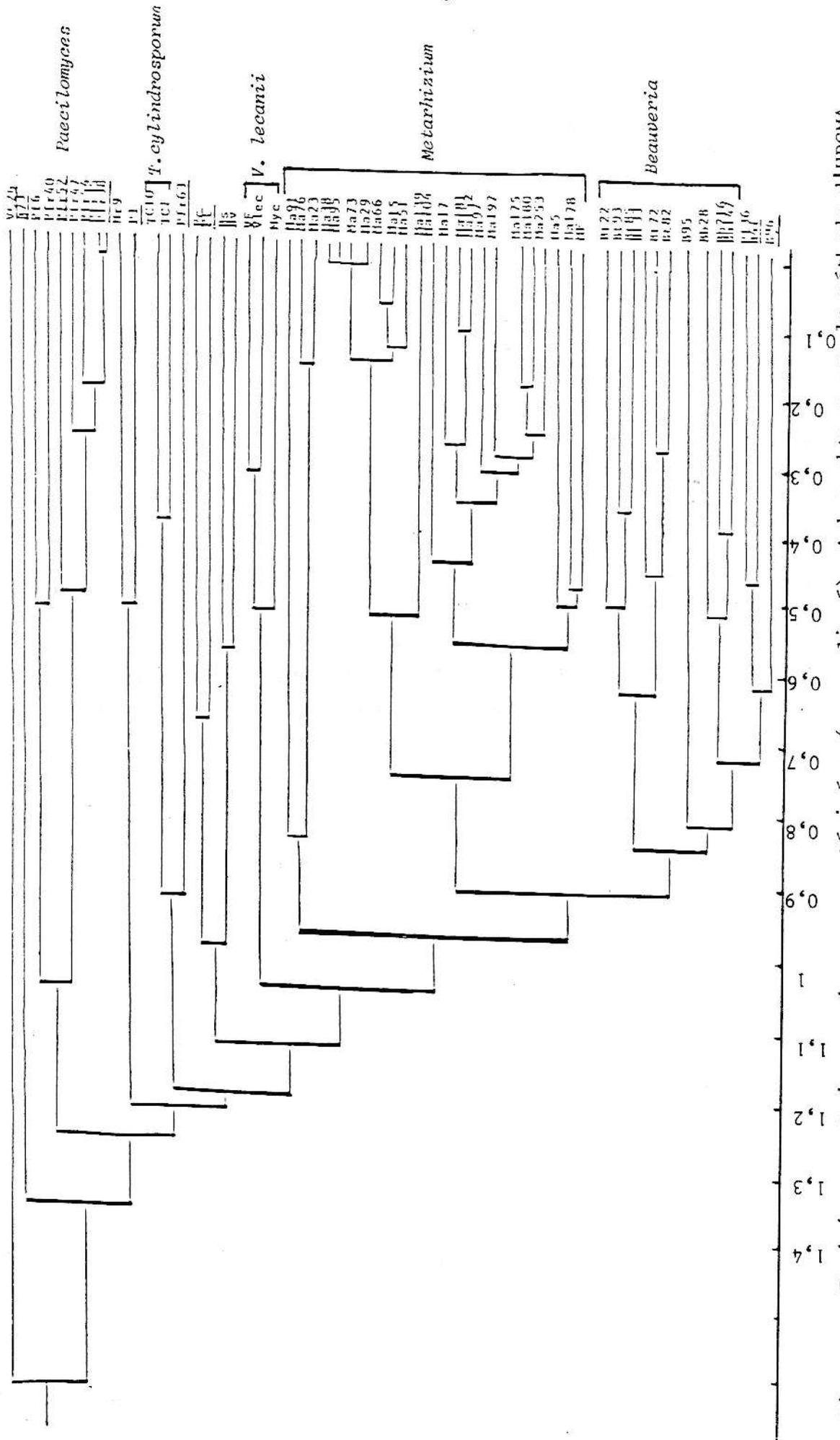


Figure 46: Positionnement des souches recharacterisées (en souligné). Arbre obtenu par la méthode d'UPGMA appliquée à des distances euclidiennes calculées à partir des coordonnées en AFC.

Les deux souches B73 et Pfr52 (*P. javanicus*), sont très éloignées des autres groupes et espèces de *Paecilomyces*. Ceci souligne tout à fait l'éclatement de ce genre.

La souche Pfr38 "intermédiaire" est phylétiquement distincte des deux espèces *P. farinosus* et *P. fumosoroseus*, mais se rapproche quand même plus de *P. farinosus* que de *P. fumosoroseus*.

Quant aux souches PI et Pfr63, dont nous n'avons pu trancher sur l'identification, elles sont très liées l'une à l'autre tout en étant très éloignées de toutes les autres *Paecilomyces*.

B41 (*Verticillium*) est très proche de *Beauveria* et VC26 (*Acremonium*) se distingue phylétiquement de tous les autres genres.

#### **b- Analyse par les isoenzymes**

La classification par les nuées dynamique (figure 45), ainsi que par UPGMA (figure 46) confirment l'éclatement du genre *Paecilomyces*. Par les nuées dynamiques, on retrouve effectivement Pt et Pc (*Beauveria*) au sein des *Beauveria*; cependant, l'UPGMA les en séparent totalement. Par cette méthode d'ailleurs, les espèces *B. velata* et *B. sulfurescens* sont aussi très éloignées des autres espèces de *Beauveria*. La souche d'*Acremonium* (VC26) s'intègre parmi les *V. lecanii*, alors que l'UPGMA la distingue totalement de tous les autres genres (comme par les séquences). La souche B41 (*Verticillium*), apparaît relativement très proche de *Beauveria* par les deux méthodes.

**D. POSITIONNEMENT DES HYPHOMYCETES  
ENTOMOPATHOGENES PAR RAPPORT A  
DES SOUCHES DONT LA FORME SEXUEE  
EST CONNUE**

On possède très peu d'informations sur les formes sexuées des champignons entomopathogènes; quand ces formes existent, on les trouve essentiellement sur l'hôte, mais jamais en culture pure . En prenant *F. oxysporum* comme espèce extérieure, nous nous sommes rendu compte que cette souche phytopathogène est phylétiquement très proche des souches entomopathogènes malgré leurs très nettes différences morphologique et parasitaire. A partir de cette observation, nous avons entrepris de positionner nos souches par rapport à des formes parfaites ou imparfaites de souches sexuées; ceci dans le but de chercher dans quelle classe éventuelle nous pourrions trouver la forme parfaite des différents genres étudiés. Dans un même temps, nous avons voulu comparer, d'une part, *V. lecanii* avec un *Verticillium* phytopathogène, d'autre part, une souche de *Penicillium citrinum* isolée de moustique avec un *Penicillium implicatum* (isolé du sol et non entomopathogène).

8 souches non entomopathogènes et 5 souches entomopathogènes ont été choisies (tableau 40). L'analyse phylétique (figure 46) a été entreprise par la méthode de Fitch, à partir de la matrice de distances (tableau 41) .Les séquences sont représentées figure 47.

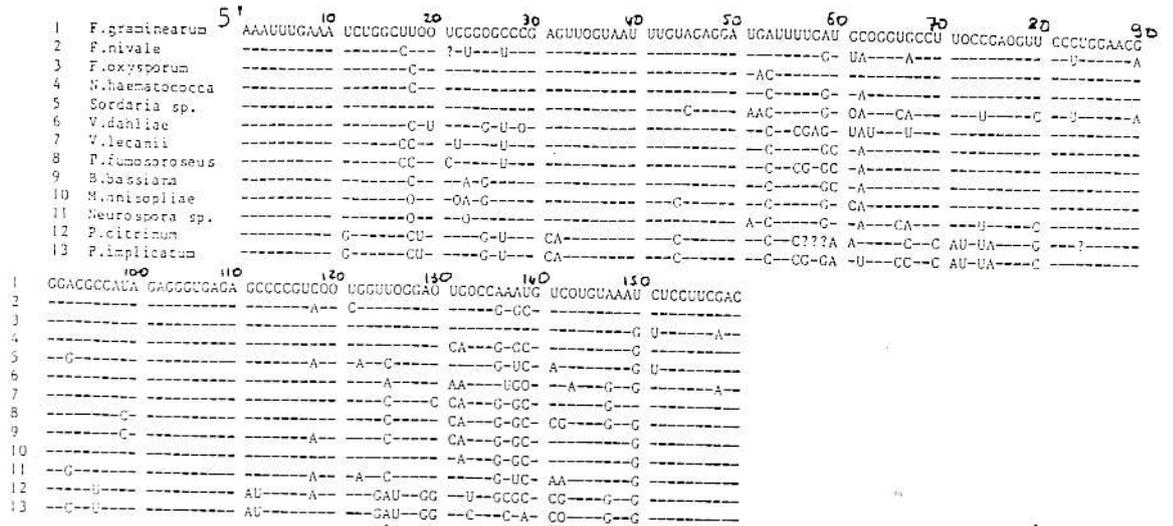
Les souches entomopathogènes forment un ensemble homogène, à l'exception de *P.citrinum* qui est phylétiquement très proche de *P.implicatum*. *Verticillium lecanii* est par contre très distante du *V. dahliae* ; cette souche a d'ailleurs été choisie comme espèce extérieure, car elle est très éloignée des autres souches. Malgré leur homogénéité, les souches entomopathogènes n'apparaissent pas très distantes des souches sexuées, en particulier de *N. haematococca* . Il est évident que la forme sexuée de nos souches (si elle existait), appartiendrait aux Ascomycètes (Pyrénomycètes); d'ailleurs, la forme parfaite de *Paecilomyces* est connue comme appartenant aux *Cordyceps* et aux *Torrubiella* (cf. descriptions des souches), qui sont toutes des Pyrénomycètes. Malheureusement, nous n'avons pas eu de séquences ou de souches de ces deux genres pour pouvoir bien positionner les nôtres; il nous aurait fallu en outre, élargir le nombre de formes parfaites étudiées ; ce que nous n'avons pu faire.

Tableau 40 : Liste des souches non entomopathogènes

Espèce	Isolat	Hôte d'origine
<i>Fusarium oxysporum</i>	Fom15	Melon
<i>Fusarium graminearum</i>	FG1	Maïs
<i>Fusarium nivale</i>	Fnivale 1	Blé
<i>Nectria haematococca</i>	CBS225/58	Sol
<i>Neurospora crassa</i>	N4317	?
<i>Sordaria</i> sp.	1903	Sol
<i>Verticillium dahliae</i>		?
<i>Penicillium implicatum</i>		Sol

Souches du laboratoire de Cryptogamie, Orsay

Domaine D1



Domaine D2

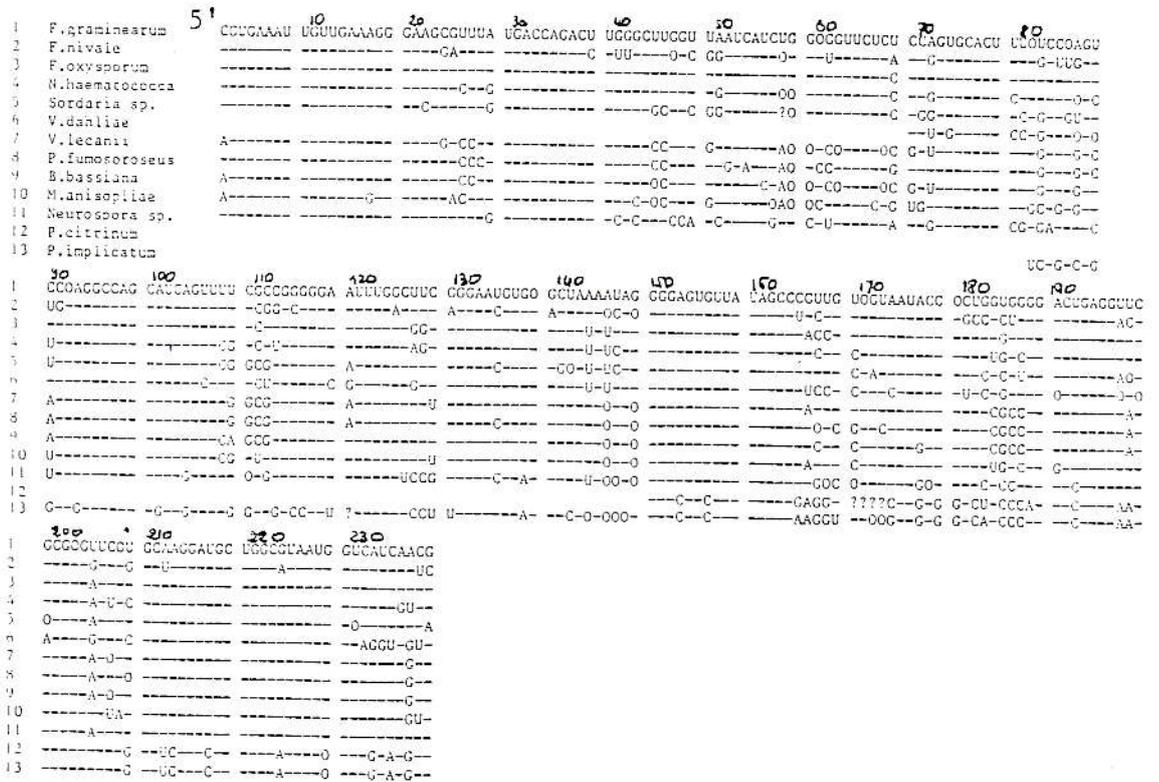


Figure 47: Alignement des séquences de souches entomopathogènes et des souches pathogènes de plantes par rapport à la séquence de *F.graminearum*.

- (-) : nucléotide identique
- (O) : délétion
- (?) : position non identifiée clairement

	FN	FO	NH	S	VD	VL	Pfr	Bb	Ma	N	Pcit	Pimp
<i>F. graminearum</i>	.303	.098	.19	.311	.443	.221	.302	.247	.219	.277	.815	.764
<i>F. nivale</i>		.366	.346	.378	.525	.394	.441	.402	.425	.409	.804	.822
<i>F. oxysporum</i>			.179	.323	.381	.211	.314	.236	.241	.286	.819	.766
<i>N. haematococca</i>				.344	.346	.149	.197	.122	.117	.316	.828	.828
<i>Sordaria</i> sp.					.591	.377	.435	.360	.395	.243	.901	.878
<i>V. dahliae</i>						.467	.474	.449	.417	.567	.919	.921
<i>V. lecanii</i>							.144	.101	.190	.334	.757	.737
<i>P. fumosoroseus</i>								.158	.304	.345	.746	.725
<i>M. anisopliae</i>									.195	.282	.748	.767
<i>N. crassa</i>										.376	.838	.847
<i>P. citrinum</i>											.774	.723
<i>P. implicatum</i>												.227

Figure 41: Matrice de distances de souches phytopathogènes et entomopathogènes. Distances exprimées en Knuc (D1 + D2 = 230 nucléotides)

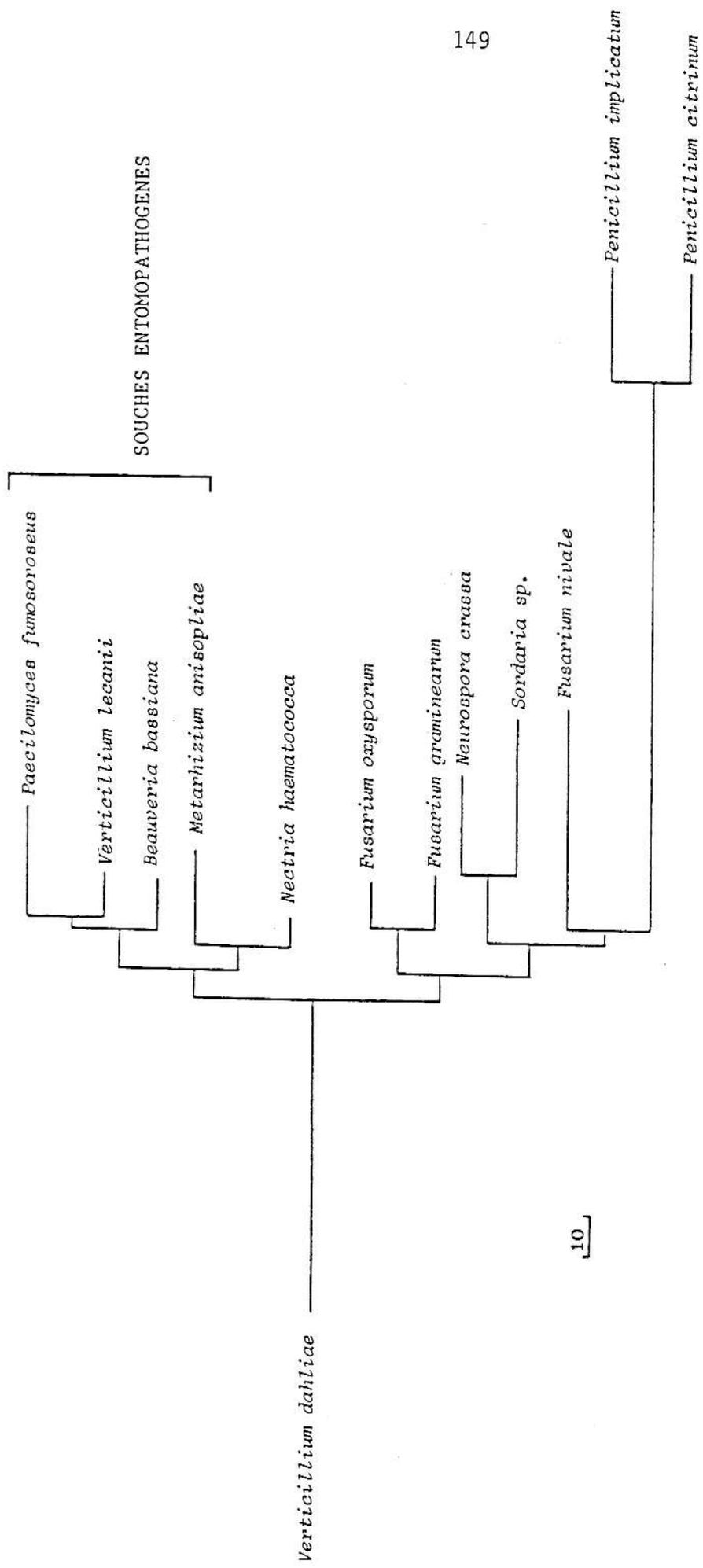


Figure 46: Positionnement des souches entomopathogènes par rapport à des souches phytopathogènes dont la forme sexuée est connue. Arbre obtenu par la méthode de FITCH.  
Echelle : 10 nucléotides

**E. *DISCUSSION ET CONCLUSIONS***

Nous avons essayé de concilier, les classifications moléculaire, biochimique et morpho-ontogénique de quelques genres et espèces d'hyphomycètes entomopathogènes. Ces trois classifications s'avèrent complémentaires entre elles; les critères utilisés sont intéressants à retenir pour une caractérisation fine des souches. Cette étude a pu fournir des réponses aux questions que nous nous sommes posées au départ tout en nous en imposant d'autres. En effet, les critères moléculaire et biochimique ont fait éclater des groupes et ont permis de définir des individus indifférenciables morphologiquement : tels les cas des souches de *P. fumosoroseus*, de *B. brongniartii* et *M. anisopliae*. D'autre part, ils ont fait rassembler des groupes ou des individus morphologiquement ou physiologiquement séparés : tels *N. rileyi* et *Metarhizium* ou *B. sulfurescens* et *B. bassiana* ou *Microhilum* et *Beauveria*.

Cette étude a permis de définir deux grands ensembles :

- l'ensemble des espèces de *Metarhizium* et de *N. rileyi*
- l'ensemble de tous les autres genres et espèces.

Les genres *Tolyposcladium* et *Paecilomyces*, paraissent phylétiquement très éclatés, si on les compare aux genres *Beauveria* et *Metarhizium*. Nous pensons que les deux espèces de *Tolyposcladium* n'appartiennent certainement pas au même genre. Pour le cas de *Paecilomyces*, nous en discuterons plus loin.

Les résultats montrent l'unicité phylétique des espèces: *B. bassiana*, *T. cylindrosporium*, *P. farinosus* et *N. rileyi*.

Mais à l'intérieur d'une espèce donnée, il peut aussi exister une certaine hétérogénéité. Au sein de *M. anisopliae*, cette variabilité concorde avec une variabilité pathologique ou physiologique. Les différences nucléotidiques observées entre les groupes établis, sont dans l'intervalle compris entre 2 à 30 nucléotides. Par contre, dans les espèces *P. fumosoroseus* et *B. brongniartii*, les variations entre les groupes sont moins importantes (10 nucléotides au maximum); l'existence de ces groupes n'est marquée par aucune distinction morphologique, parasitaire ou physiologique. Par ailleurs, les 2 espèces de *Metarhizium* qui sont morphologiquement bien distinguées, sont séparées l'une de l'autre par une vingtaine de nucléotides. Il y a donc, autant de différences entre ces 2 espèces bien définies qu'entre les groupes de *M. anisopliae*. Notons aussi que dans le genre *Beauveria*, les différences entre les groupes de *B. brongniartii* sont du même ordre qu'entre ces groupes et les autres espèces de *Beauveria* (*B. velata*-*B. brongniartii* ou *B. bassiana*-*B. brongniartii*).

Devant ces observations, le problème de la délimitation des espèces chez ces organismes se pose. En ce qui concerne les critères moléculaires, il faudra définir la

valeur et la signification de chaque variation; dans quelle mesure une variation est importante ou non; combien de nucléotides différents au minimum ou au maximum, peut-on accepter pour conclure à la proximité, à l'identité ou à l'éloignement de deux individus, de deux espèces ou de deux genres.

La taxonomie des organismes dépourvus de reproduction sexuée n'est pas aisée. Cependant, il est impératif que les notions de variétés, d'espèces et de genres soient bien clarifiées et stabilisées chez ces organismes. En particulier pour les germes à intérêt industriel ou agronomique, les noms des espèces et des genres doivent être bien standardisés, afin d'éviter toute confusion. Il faut donc déterminer les critères de base de distinction des différents regroupements. Pour cela, il est indispensable de connaître ou de définir les champs d'application et les limites des critères choisis. A partir des données acquises par les trois critères que nous avons utilisés, nous allons tenter d'apporter des ébauches de solutions.

### **E.1. Délimitation des espèces du genre *Metarhizium***

L'étude des séquences d'ARNr est une bonne technique de taxonomie moléculaire, dont la fiabilité n'est plus à démontrer. La classification moléculaire prétend établir une phylogénie, probablement très proche de la réalité.

Selon ce critère le genre *Metarhizium* constitue un ensemble relativement homogène. Cette étude a permis de confirmer :

- la séparation des deux espèces *M. flavoviride* et *M. anisopliae*
- les résultats obtenus par les analyses du polymorphisme des isoenzymes (Riba et al. 1986a,1987), à savoir que dans l'espèce *M. anisopliae*, on peut définir des "sous-populations qui ne sont pas tout à fait hermétiques"; on a pu ainsi regrouper toutes les souches de var. major dans un unique groupe et montrer que les souches en provenance du Brésil forment un ensemble à part.

Par ailleurs, on a mis aussi en évidence, la divergence de souches physiologiquement et géographiquement différentes. Ces souches apparaissent aussi éloignées (voire d'avantage) du groupe des anisopliae que ne l'est le groupe des major de ces derniers. Logiquement si on accepte la réelle existence des deux variétés, il faut considérer cette population Néo-Zélandaise comme étant une autre variété. Dans ce cas, l'espèce *M. flavoviride* est aussi une variété.

D'autre part, dans la même logique de raisonnement, si on accepte l'existence des deux espèces, alors, étant donné les différences moléculaires observées, la population Néo Zélandaise peut être prise comme une nouvelle espèce; ainsi, chacune des deux variétés aura également valeur d'espèce.

Les regroupements de la classification moléculaire sont tout à fait confirmés par ceux issus de l'analyse des isoenzymes. Nous avons donc, déjà, deux critères concordants; ce qui nous permet de conclure à la réalité phylétique et biologique des différents groupes établis. Chacun des ensembles de groupes possède des particularités. Cependant ces particularités ne sont pas basées sur un seul critère morphologique, pathologique ou physiologique. En considérant que ces trois critères soient complémentaires des critères moléculaire et biochimique, nous pouvons créer trois nouvelles espèces :

- une espèce formée par l'ensemble des souches avec de grandes conidies elliptiques (anciennement var. major)
- une espèce composée des souches à petites conidies elliptiques (var. anisopliae)
- et enfin une espèce constituée par des souches à optimum thermique de croissance de 20°C (souches Néo Zélandaises, de var. anisopliae aussi).

Cette option (création d'espèce) est la plus satisfaisante car les distances génétiques entre les groupes nous semblent trop importantes (20 / 476 nucléotides) pour définir des variétés. A partir de cet exemple, nous allons voir si ces hypothèses sont transposables à d'autres genres. Pourrions-nous alors, enfin, mettre une valeur "seuil" aux distances moléculaires qui séparent les différents types de regroupement?

## **E.II. Délimitation des espèces du genre *Beauveria***

Dans ce genre, les différences entre les groupes sont moins nombreuses que dans celui de *Metarhizium*. Cependant, on constate une situation analogue: il y a presque autant de différences à l'intérieur d'une espèce (*B. brongniartii*) qu'entre les espèces. Faut-il alors créer autant d'espèces que de groupes ? Si nous acceptons la réalité des espèces *B. bassiana*, *B. velata* et *B. brongniartii*, il faudra faire de chacun des groupes de *B. brongniartii* des espèces. En examinant plus précisément les différences entre les groupes et espèces de *Beauveria*, on note que pour les espèces, environ 12 nucléotides sur 476 les séparent et pour les groupes, 2 à 8. Est-ce que le

rapport de 8 nucléotides sur 476 est significativement différent de 12 sur 476? En fait pour trancher, il faut se baser sur les autres critères. Suivant les critères biochimiques, les souches de *B. brongniartii* forment un ensemble très homogène. Ces groupes ne sont pas différenciables entre eux, par aucun critère morphologique ou physiologique, contrairement au genre *Metarhizium*. Par contre ils peuvent être différenciés par leur pathogénie, puisque l'on a pu mettre dans un même groupe, toutes les souches isolées de *M. melolontha*.

Au vu de ces constatations, on peut affirmer que tous les groupes de *B. brongniartii*, établis par les critères moléculaires, appartiennent tous à la même espèce. Quant à la souche de *B. sulfurescens*, nous pensons qu'elle correspondrait à une variété de *B. bassiana*, indistinguishable de celle-ci par les critères moléculaires.

### **E.III. Délimitation des espèces du genre *Paecilomyces***

Ce genre est très éclaté. Les critères moléculaire et biochimique le prouvent. Les distances génétiques entre les espèces sont énormes (30 nucléotides sur 476). Si on se basait uniquement sur le seul critère moléculaire, il n'y aurait aucun doute sur la non appartenance de *P. fumosoroseus* et *P. farinosus* au même genre; il en serait de même des autres espèces (voir systématique des nouvelles souches). Mais il ne serait pas correct de tirer rapidement une telle conclusion. Comme nous l'avons déjà laissé entrevoir pour les deux précédents genres, pour affirmer l'existence d'un regroupement (variété ou espèce), il est nécessaire que tous les critères utilisés se confortent. Ainsi dans ce genre, nous gardons la systématique actuelle car morphologiquement, ces espèces possèdent des caractères bien définis et bien distincts qui les regroupent dans le même genre. Par ailleurs, le groupe 6 appartient sans nul doute à l'espèce *P. fumosoroseus*, car il n'est pas morphologiquement différenciable des souches de cette espèce.

### **E.IV. Avantages et limites des différentes méthodes de classification**

A partir des 3 exemples que nous venons d'aborder, nous avons pu éclaircir quelque peu les notions de variété et d'espèce. En résumé :

- l'espèce regroupe des individus possédant des caractères morphologiques et physiologiques majeurs et identiques, appuyés par des liens phylétiques étroits. L'existence de ces groupes, ainsi que les liens qui les unissent, doivent être confirmés par plusieurs critères différents.

- les individus, à l'intérieur d'une espèce, peuvent présenter des variations individuelles qui paraissent mineures mais sont discriminantes. Quand un ensemble d'individus se distinguent ainsi, on parlera de variété. Les distances phylétiques entre les variétés sont très faibles, voire nulles.

En se basant sur ces trois exemples, nous avons pu rapprocher des genres dont les caractères morphologiques distinctifs sont bien définis; tels sont les cas de *Metarhizium* et *Nomuraea*, ainsi que de *Microhilum* et *Beauveria*. Les distances entre ces genres ne sont pas plus grandes qu'entre les espèces d'un même genre. Ces proximités phylétiques ne sont pas toujours justifiables morphologiquement (cf. classification morphologique).

Nos résultats montrent une complémentarité certaine entre les différentes classifications. Ils prouvent que ces classifications n'ont pas les mêmes champs d'application :

- la classification morphologique n'est pas totalement dénuée de valeur; elle essaie de regrouper des souches suivant des caractères précis sans pour autant chercher à établir leurs liens phylétiques. Les critères morphologiques servent essentiellement à identifier et caractériser les souches.

- la classification biochimique par l'analyse des isoenzymes permet de caractériser des souches avec une valeur taxonomique certaine

- la classification moléculaire établit les " liens phylétiques" entre les groupes, mais ces critères ne peuvent pas servir à déterminer ou caractériser les souches.

Cette complémentarité affirmée ci-dessus, conjuguée avec la convergence des résultats obtenus, nous permet de conclure à l'identité, à la proximité ou à l'éloignement entre deux individus, deux espèces ou deux genres. C'est ainsi par exemple, que nous pouvons infirmer l'appartenance de *Toplypocladium* au genre *Beauveria* et que nous pouvons déduire que les deux espèces de *Toplypocladium* étudiées ne sont certainement pas du même genre.

Dans cette étude, nous montrons que, quand les distances entre les groupes sont assez grandes pour surmonter le bruit de fond ( cas de *Metarhizium* ), leurs relations phylétiques sont plus précises et plus fiables. Par contre, quand ces distances sont trop faibles, elles sont confondues avec le bruit de fond (cas de *Beauveria* )et ne permettent pas ainsi d'apprécier correctement les relations entre les groupes. De nos données, nous ne pouvions pas déterminer des valeurs "seuils" des distances entre les différents regroupements ; nous pouvons néanmoins affirmer qu'il nous avait fallu au moins 20 à 30 nucléotides sur 476, pour nous permettre de faire ressortir des valeurs significatives au dessus du bruit de fond.

Les liens phylétiques entre les genres, entre les espèces ou entre les individus ne sont pas toujours ceux que l'on espérait (en référence à la classification morphologique classique); cependant :

- Beaucoup d'électromorphes sont communs aux différents genres; ce qui nous permet d'affirmer qu'un lien très fort existe entre les genres d'hyphomycètes entomopathogènes. Par contre, au niveau de l'espèce, aucun électromorphe ne s'est avéré spécifique.

- Les distances génétiques entre les genres, que nous avons obtenues, sont relativement faibles car elles peuvent être parfois du même ordre de grandeur que celles obtenues entre deux espèces. Ceci témoigne de l'étroitesse des relations phylétiques entre ces différents genres.

Nous avons vu par ailleurs, que malgré la spécificité parasitaire de ces hyphomycètes, ils ne sont pas très éloignés des espèces non entomopathogènes. Malheureusement, la comparaison qui a été faite ne repose que sur les séquences d'ARNr; il aurait fallu comparer des zymogrammes pour voir si ces deux types d'hyphomycètes peuvent avoir des électromorphes en communs.

Cette étude a permis de comprendre et de mettre en évidence les relations phylétiques entre quelques genres et espèces d'hyphomycètes entomopathogènes. Avec les séquences d'ARNr 28S, nous avons un indicateur performant pour étudier les liens entre les différents genres. Cependant cette technique s'avère limitant quand il s'agit d'étudier des groupes très proches; les distances obtenues sont alors trop faibles et

donnent des liens plus ou moins ambigus. Dans ce cas, l'étude des longueurs des fragments de restriction serait plus discriminante.

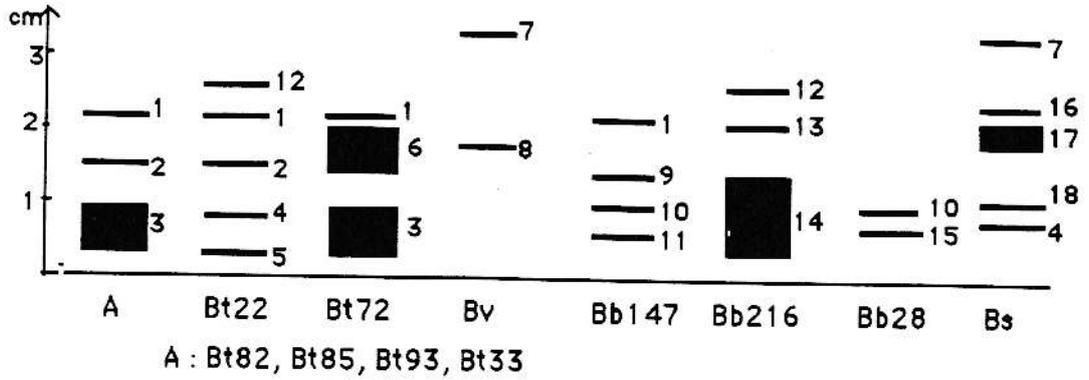
Notre attention est aussi portée sur les échantillons analysés. Dans cette analyse, quoique le nombre de souches étudiées ait été grand, il apparaît encore insuffisant et très différent selon l'espèce considérée; en effet, à l'intérieur de chaque genre, les espèces étudiées sont trop peu nombreuses. En plus, pour une espèce donnée, on n'a parfois qu'une souche ou deux; on peut se demander alors si elles sont réellement représentatives de l'espèce. Il aurait fallu se procurer d'autres souches, d'autres espèces. Et en particulier, dans les genres *Paecilomyces*, *Verticillium*, il nous aurait fallu des espèces pathogènes de plantes pour pouvoir bien positionner les souches entomopathogènes. Etant donné le nombre restreint d'espèces non entomopathogènes analysées, la comparaison qui a été faite ne nous apporte pas, hélas, d'information concluante.

Malgré cela, cette étude a apporté une contribution à la connaissance de la variabilité génétique et de la parenté des espèces fongiques utilisées en lutte biologique. Elle nous a permis de tester des critères en vue de la caractérisation fine des génomes. Ceci est une étape indispensable pour l'amélioration de ces germes. Dans un second temps, nous avons essayé, à partir de nos résultats et des différents critères à notre disposition, de bien définir les notions d'espèce ou de genre de ces organismes dépourvus de forme sexuée; ce qui nous n'a pas été possible. Car avant de poser de telles définitions, il est important d'élaborer une terminologie précise et universelle pour dénomer les différentes hiérarchies de classification de ces organismes, qui quoique l'on pense, existent; il est aussi indispensable de les classer pour pouvoir mieux les identifier et les caractériser.

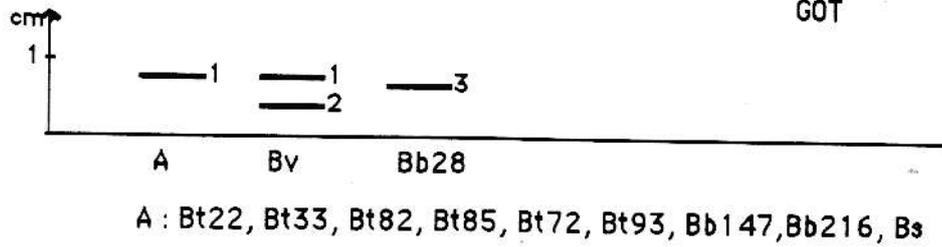
***ANNEXE I***

**ZYMOGRAMMES DES DIFFERENTES SOUCHES**

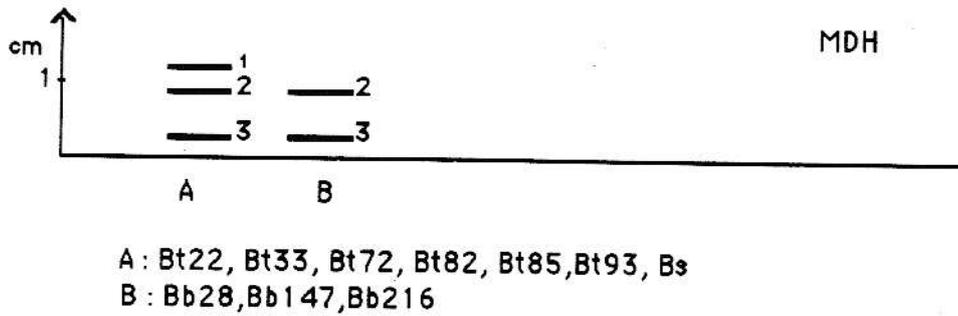
Estérases



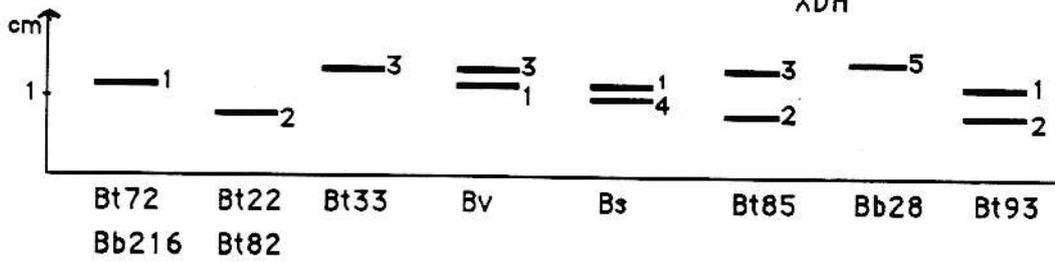
GOT



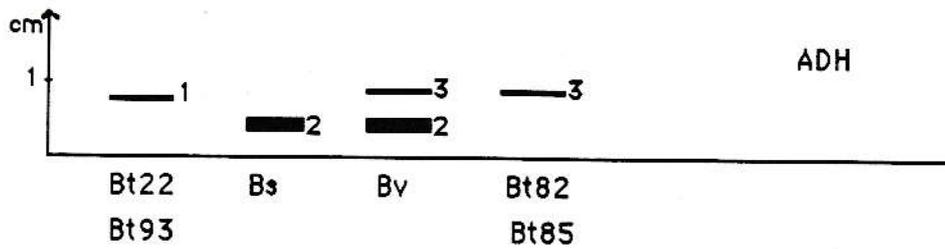
MDH



XDH



ADH



Bt33, Bt72, Bb28, Bb147, Bb216 Activité nulle

Figure 1a Zymogrammes des souches de Beauveria

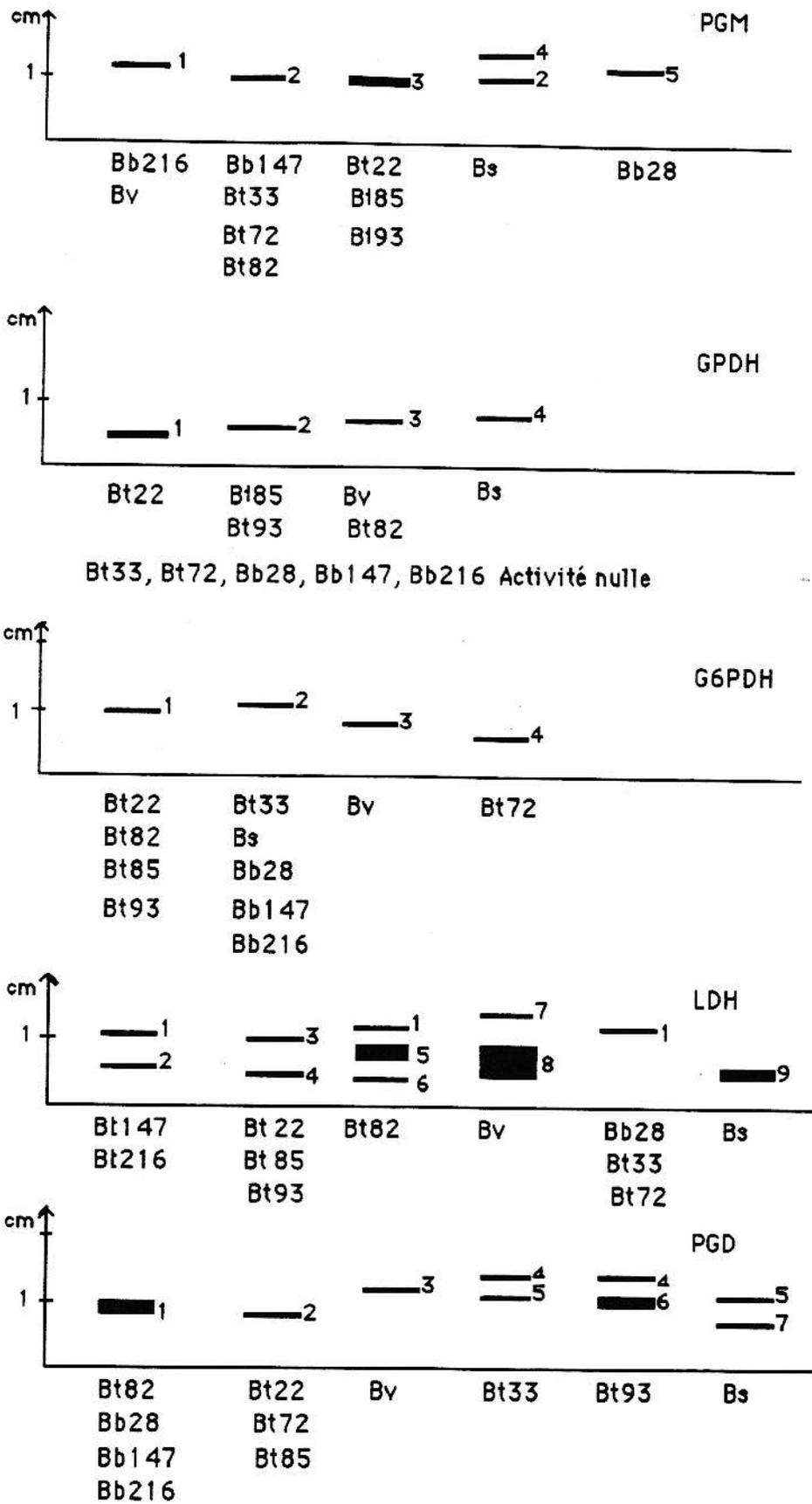


Figure 1b: Zymogrammes des souches de Beauveria

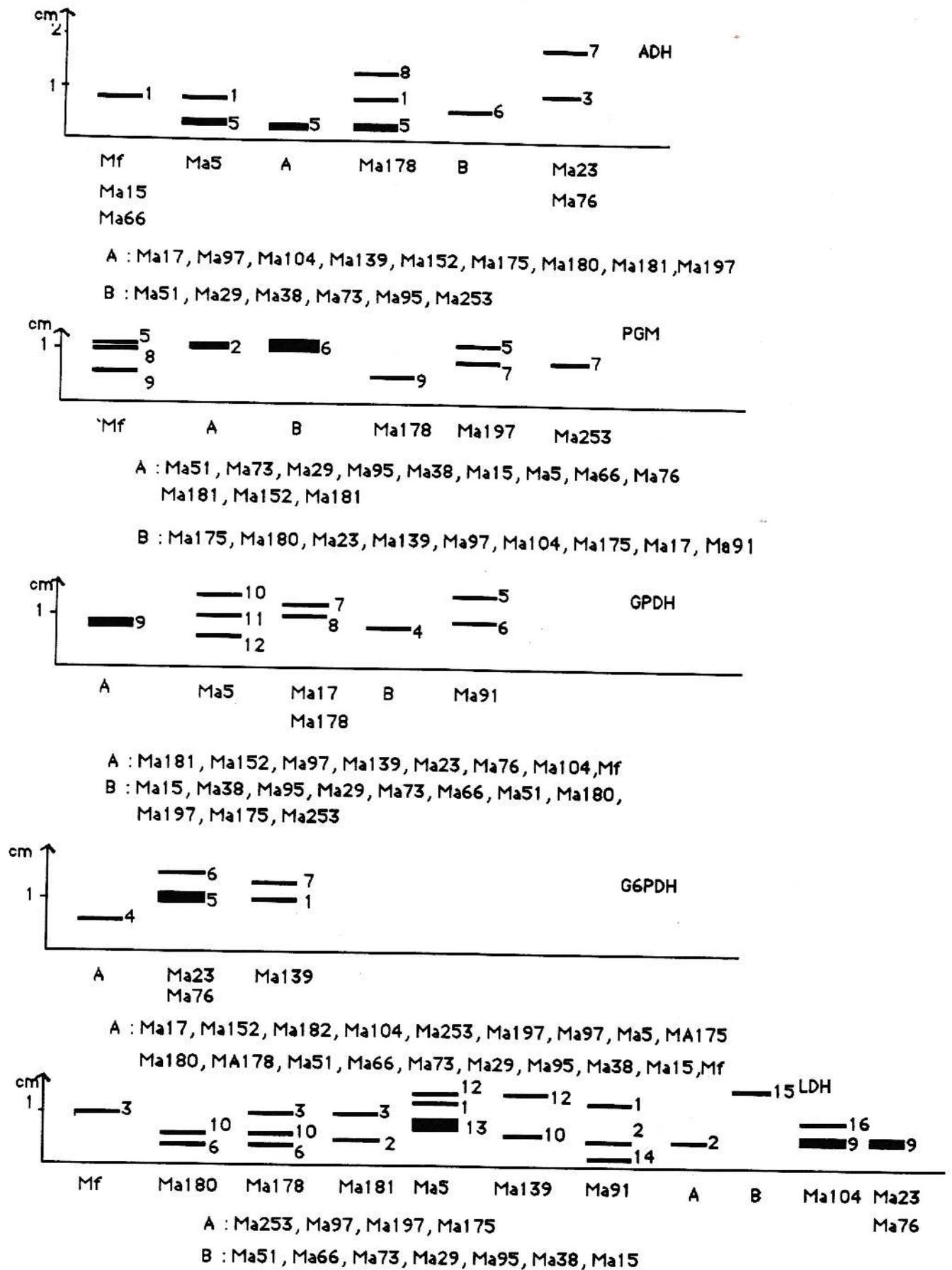


Figure 2a: Zymogrammes des souches de Metarhizium

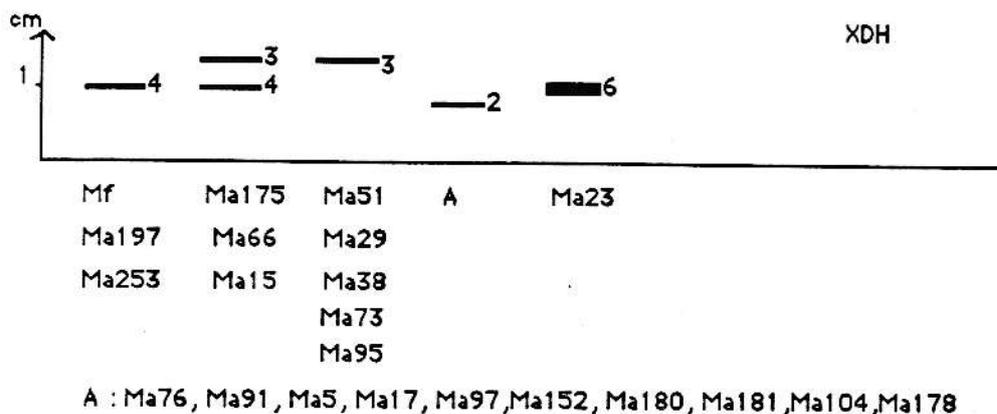
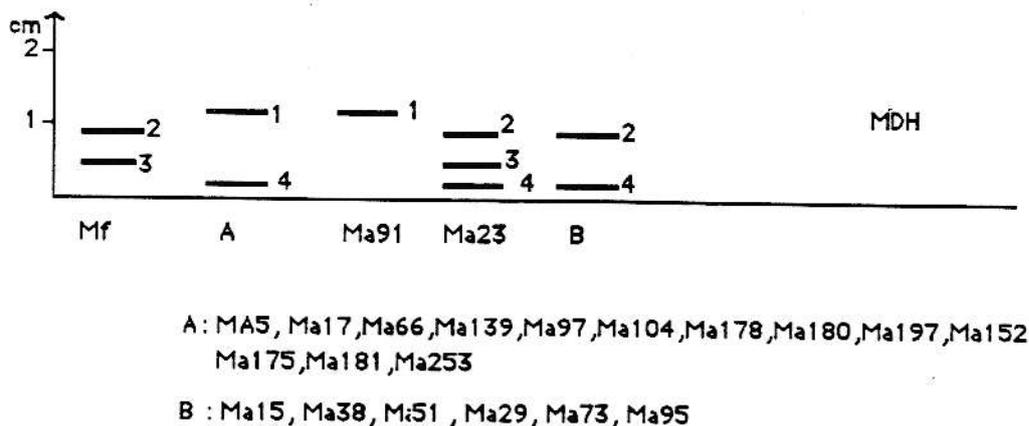
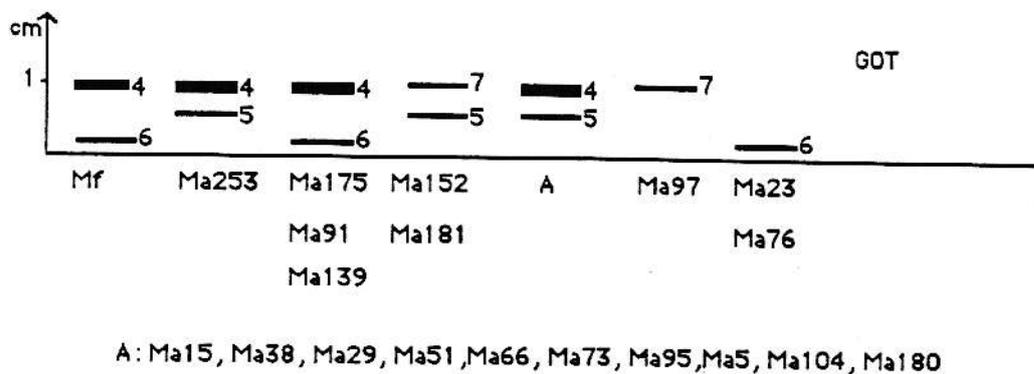
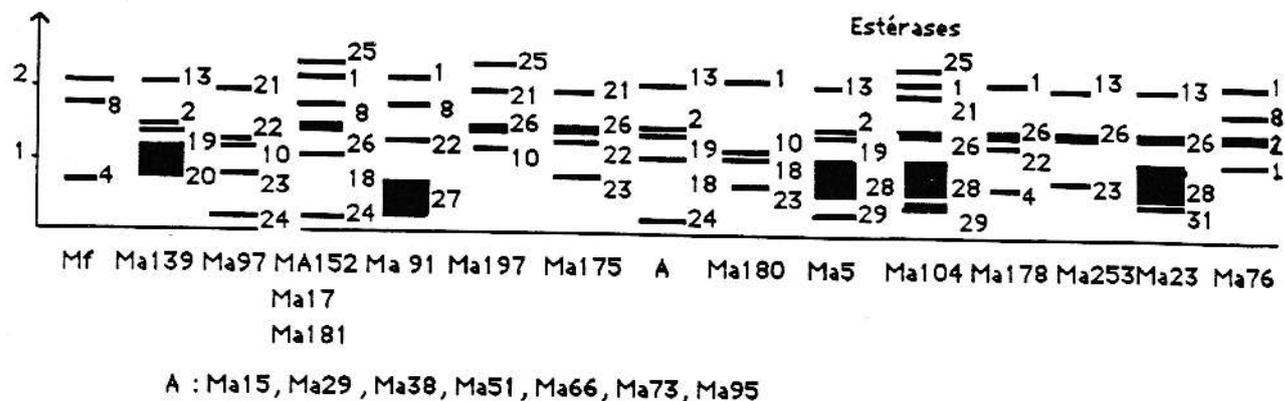


Figure 2b : Zymogrammes des souches de Metarhizium

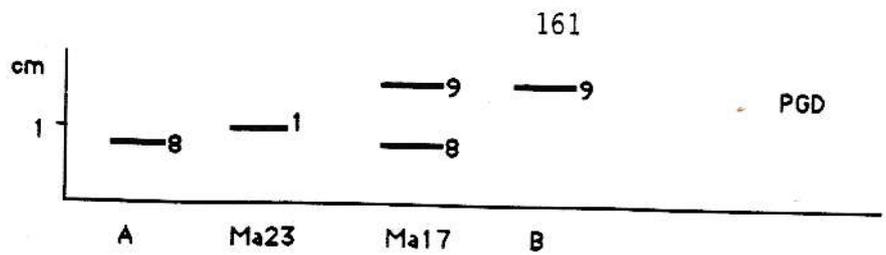
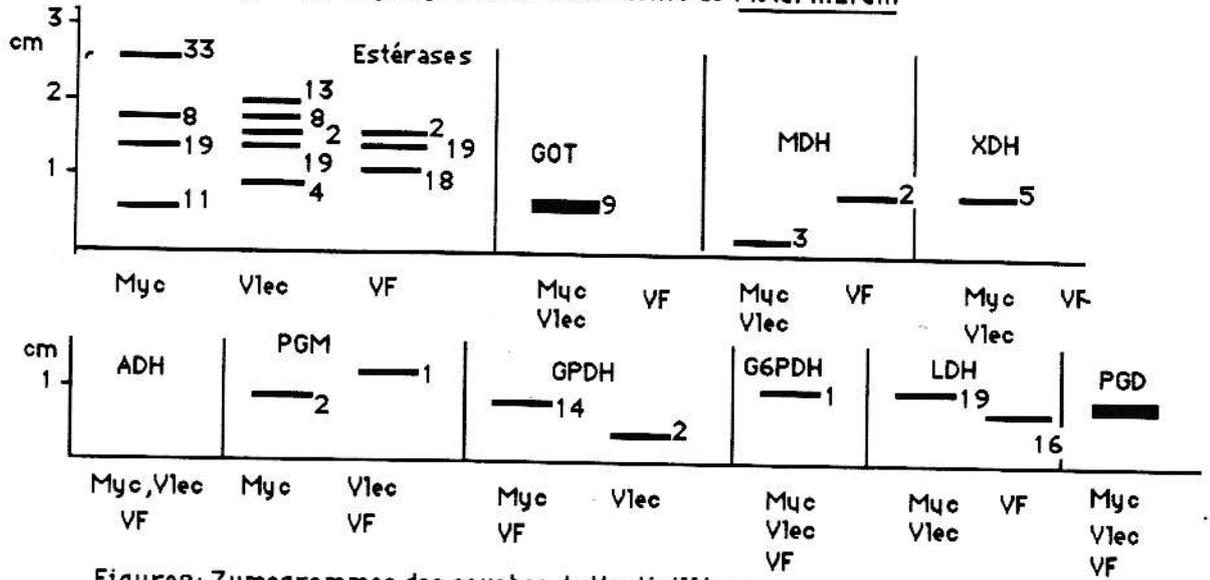


Figure 2c : Zymogrammes des souches de Metarhizium



Figures: Zymogrammes des souches de Verticillium

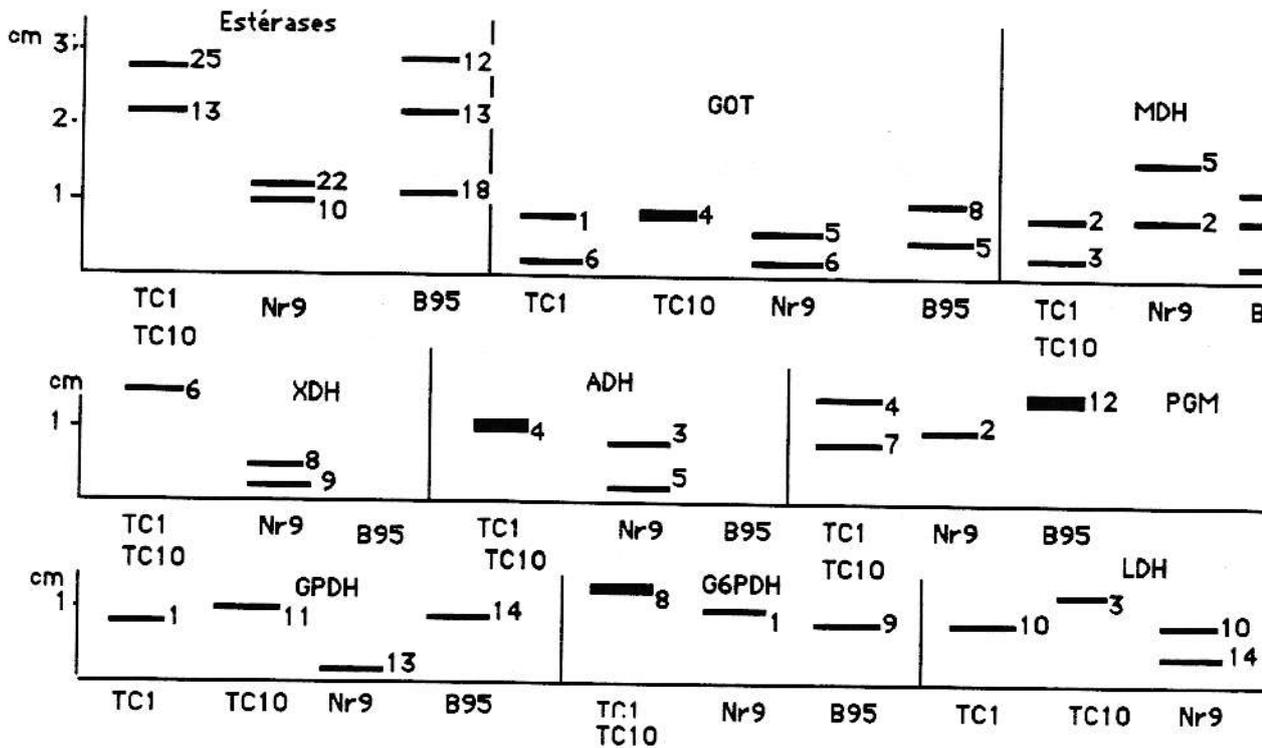
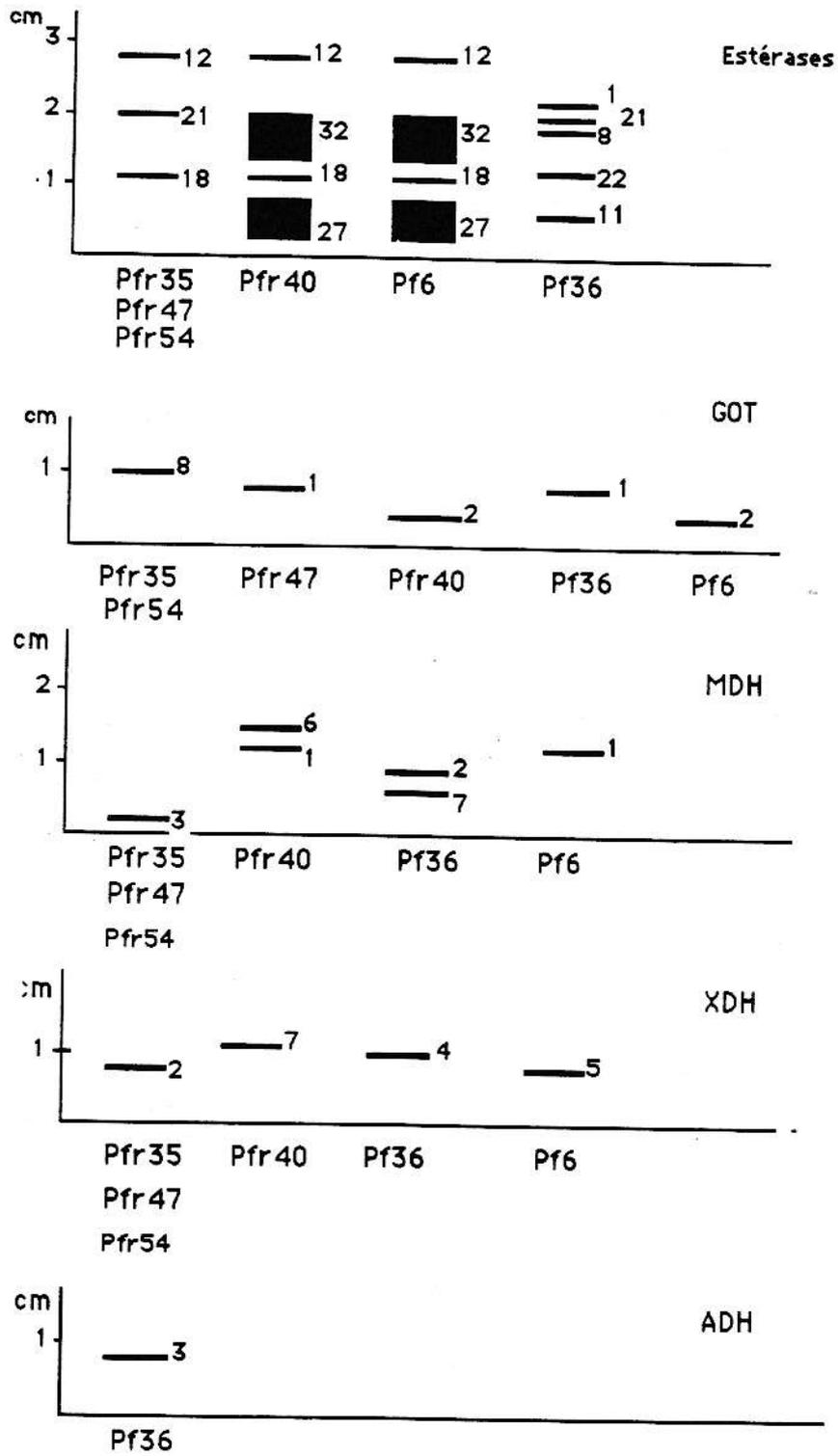


Figure 4: Zymogrammes des souches de Tolypocladium, Nomuraea, Microhizium



Pfr35, Pfr47, Pfr54, Pfr40, Pf6 Activité nulle

Fig 5a: Zymogrammes des souches de Paecilomyces

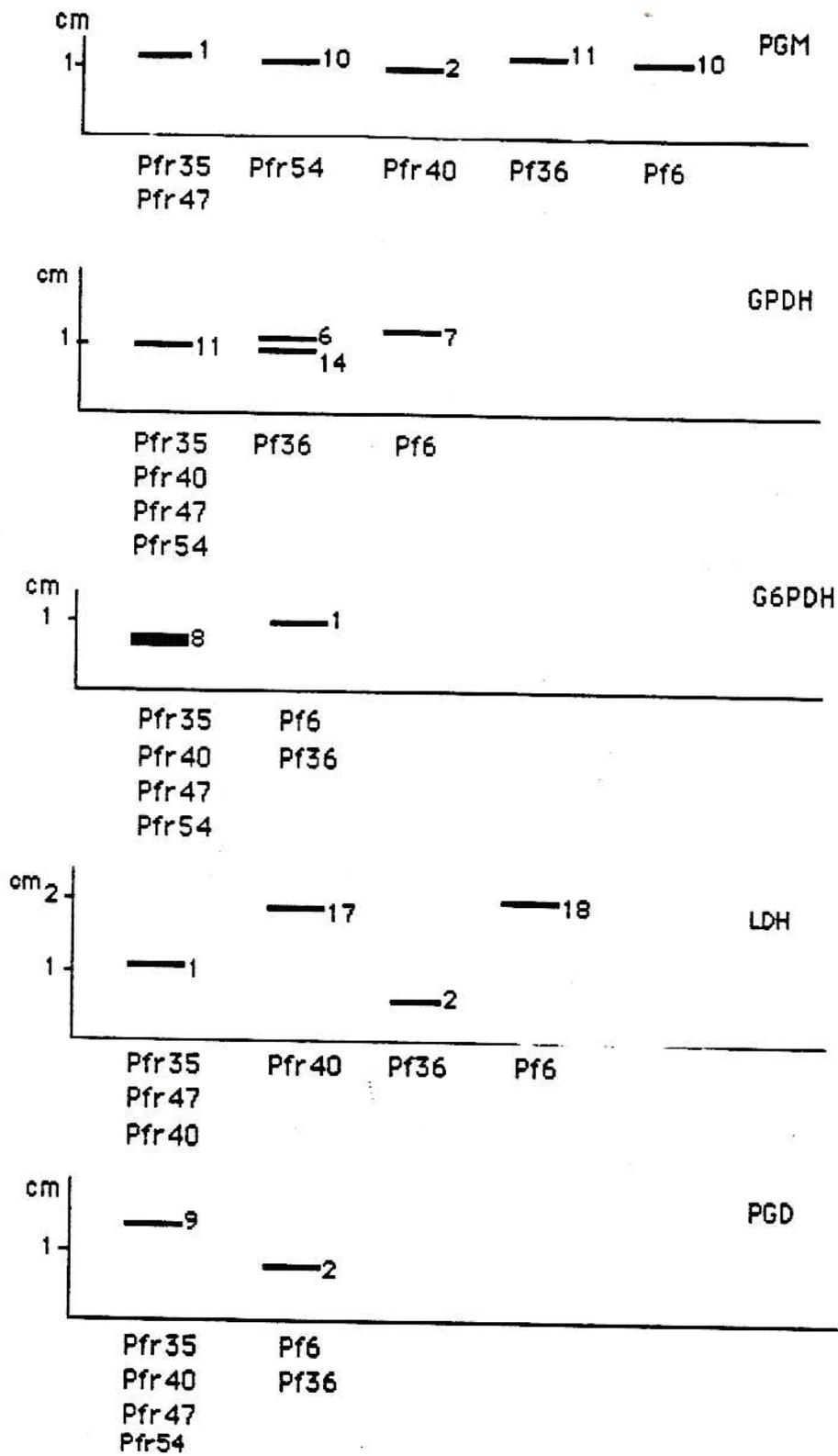
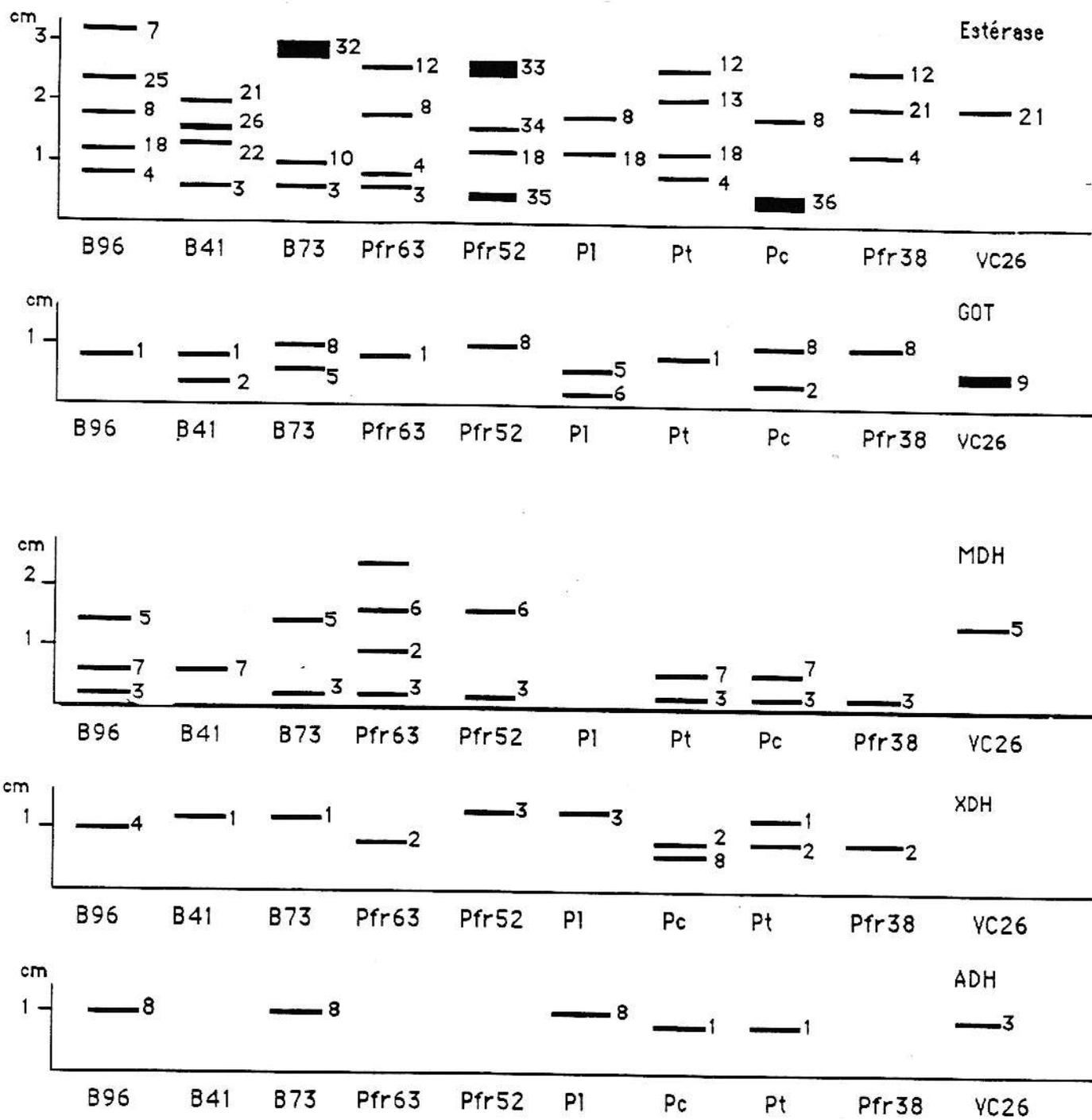
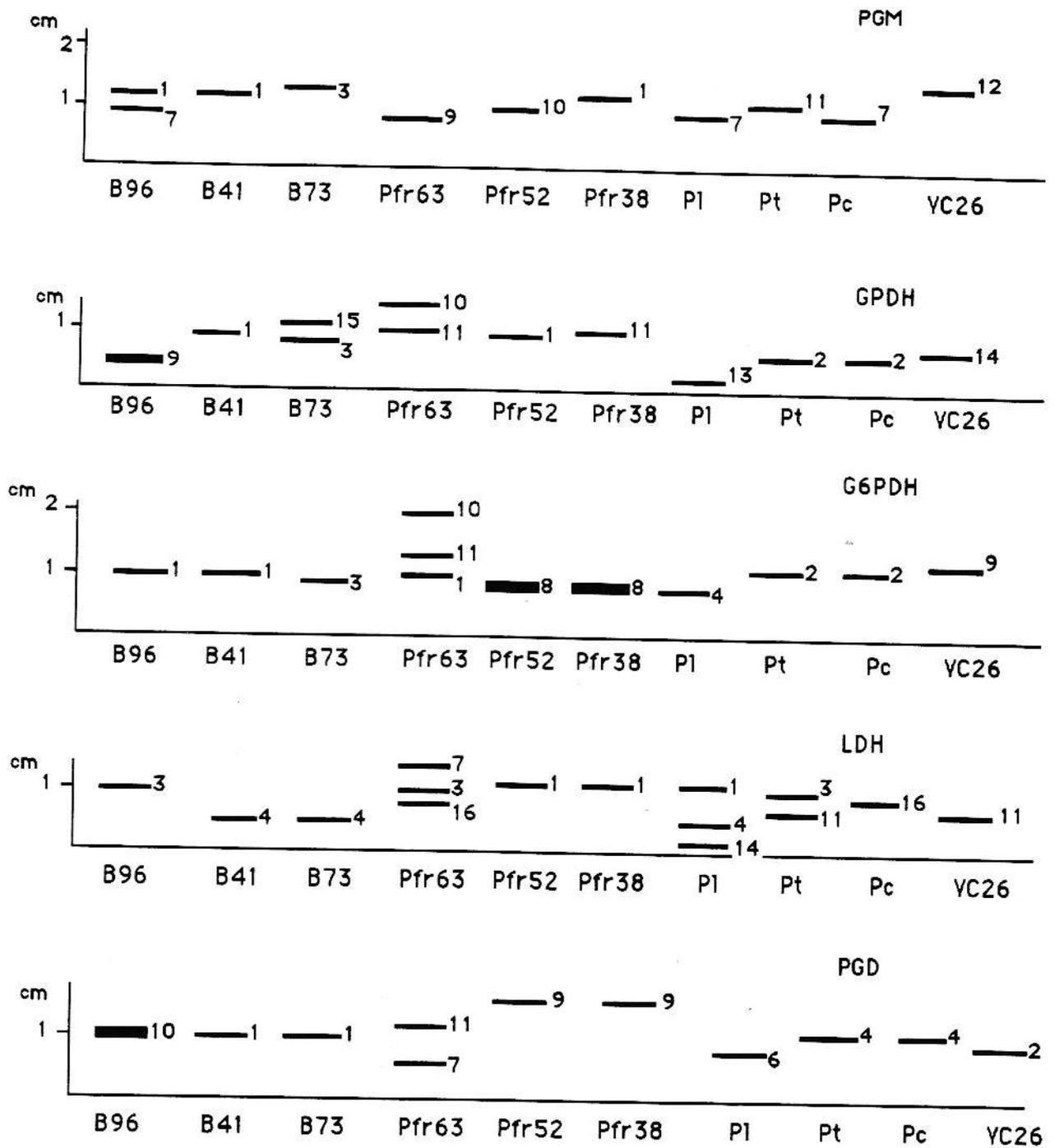


Fig 5b: Zymogrammes de souches de Paecilomyces



Figures: Zymogrammes des souches recharacterisées



Figures: Zymogrammes des souches recaractérisées

***ANNEXE II***

**MATRICE DE DISTANCES DE L'ANALYSE BIOCHIMIQUE  
DONNEES ENZYMATIQUES**







065	ESP	9196	9141	9182	9185	9173	9172	9193	91	98117	98215	98278	95	91825	91837	91835	91847	91863	91840		
31	YC76	1.40730	1.81000	4.37763	4.75741	3.66550	4.33866	4.57004	4.95841	4.35835	5.07270	4.31773	4.17467	4.60311	5.16454	4.37083	5.07055	4.39425	4.43134	4.35508	5.17777
32	PF10	2.32328	1.82100	1.50643	2.17189	3.57485	2.05748	2.18517	1.70615	1.50059	2.27277	2.45550	1.65516	1.65072	2.39818	2.35012	3.27843	2.58472	2.40814	1.87104	2.45482
33	PF22	1.55249	1.43524	1.26850	1.59659	2.33734	1.41774	1.47005	1.59154	1.51472	1.60195	1.67102	1.73110	1.72708	2.39134	2.27019	2.27918	2.01957	2.19800	3.03081	2.45482
34	YL	4.59145	4.59917	4.66427	4.65012	5.37547	4.77016	4.11152	4.22775	4.54449	2.98894	4.81240	4.40522	4.60938	4.02584	4.75542	4.31362	5.06044	4.66400	4.59427	5.31841
35	MB38	1.57237	1.59663	1.61155	2.06160	3.16854	1.64487	2.00490	1.91801	1.33145	2.02718	1.76211	1.72018	2.00405	2.13130	2.33493	2.11036	2.44863	1.51277	2.29142	3.41148
36	MB23	2.08450	1.93187	1.72540	4.27085	3.27157	3.37985	2.56784	2.46303	2.33598	2.97416	2.72492	2.72492	2.53744	2.53744	3.30655	2.53744	2.54045	2.44545	3.41148	3.56140
37	MB23	2.59923	2.02012	1.71690	2.55801	3.48881	1.60400	2.31963	2.55085	2.39198	2.91064	2.96445	1.78916	1.81009	2.03527	2.30351	3.12931	2.35793	2.97914	2.53063	3.56140
38	MB24	1.15775	1.64763	1.41350	2.33539	2.38164	2.79141	2.38745	2.18552	2.37345	2.87445	1.45400	1.82745	2.01431	2.44527	2.16772	2.41055	2.31910	2.43733	3.20161	3.20161
39	MB76	2.53226	1.89844	1.80646	2.69329	3.35648	2.91010	2.47537	2.35931	2.64581	2.97952	1.19250	1.91250	1.97847	2.42237	3.17621	3.68011	3.17621	2.30394	1.48947	1.48947
40	MB152	1.84144	1.83540	1.60744	2.10174	3.17028	1.97083	2.12313	2.12350	1.94127	2.03903	2.91106	1.71548	1.95174	2.12038	2.20184	2.41770	3.11684	2.42352	2.35814	3.16295
065	PF84	4.66975	3.35888	4.15747	4.47174	5.15223	2.69669	3.70463	3.19816	0.00000	4.11758	4.00998	5.28242	4.78401	4.50768	4.62562	4.23727	4.65407	4.21976	4.32542	4.32708
32	Y533	2.16561	1.90822	2.19156	1.91053	3.01355	2.09054	2.02265	1.64740	4.11558	0.00000	1.72712	3.77556	1.63092	2.21928	2.31018	1.93086	2.23288	1.76816	2.09327	2.06502
33	Y433	2.36091	1.67325	1.60451	1.64987	2.94475	2.24568	2.70776	4.00998	5.28242	3.77556	3.94350	0.00000	4.16695	4.46615	5.03217	4.54416	4.92045	4.04163	4.66000	4.71462
34	Y378	4.43978	5.23153	4.31627	4.04180	4.29713	5.14788	4.37761	4.83556	5.58849	5.28242	3.77556	3.94350	0.00000	4.16695	4.46615	5.03217	4.54416	4.92045	4.04163	4.66000
35	Y273	2.74695	1.65936	2.00545	1.33695	2.60981	2.74054	2.02941	2.01774	4.28401	1.63092	1.14000	4.16695	0.00000	1.33695	2.29322	2.29322	2.24850	0.90219	1.05664	1.30212
36	Y181	3.10042	2.08136	1.22523	2.24754	3.18279	1.49778	4.30263	2.12938	4.48415	1.33695	0.00000	1.33695	0.00000	1.33695	2.29322	2.29322	2.24850	0.90219	1.05664	1.30212
37	Y150	3.51760	3.47515	4.03649	2.91582	3.76645	2.87204	2.85441	4.62562	2.31018	5.04817	2.29322	1.40415	0.00000	1.40415	0.00000	1.68595	0.94077	2.19751	2.59756	2.31548
38	Y051	2.30016	1.95937	2.18145	1.14270	3.04151	2.91499	1.28945	4.32727	2.99086	1.27220	3.31416	1.27220	0.00000	1.27220	1.85255	0.00000	1.60536	0.13293	1.23203	0.18218
39	Y025	3.58767	1.85721	2.94113	2.88014	3.67665	2.91815	2.74451	4.85407	2.52248	2.79334	3.88015	2.79334	0.00000	2.79334	1.86341	0.30077	1.50816	0.00000	2.05862	2.18841
40	Y019	2.71932	1.77191	2.15031	2.00400	3.11085	2.89627	2.42265	2.29190	1.76816	1.02406	4.04163	0.50219	0.81847	1.13563	0.25954	0.00000	0.81529	0.00000	0.81529	0.53507
065	MB7	6691	MB139	MB181	MB17	MB157	MB15	MB51	MB104	MB1	MB10	MB11	MB9	MB15	MB29	MB21	MB24	MB23	MB25	MB28	MB18
31	4.35674	4.53572	3.81489	4.26538	4.47398	1.30746	1.30746	1.33391	4.41270	4.57594	4.98855	4.94789	4.41256	4.15567	4.45314	4.47514	4.47514	4.47514	4.47514	4.47514	4.47514
32	2.13258	1.68740	1.93200	1.77156	1.80848	2.07155	2.07155	1.70099	2.09915	2.31798	3.44175	3.30360	2.48300	3.19113	2.27175	2.37913	2.37913	2.37913	2.37913	2.37913	2.37913
33	1.49132	2.14054	1.45997	1.08659	1.24139	1.04341	1.28006	1.40719	1.71576	2.97402	2.71884	1.67861	1.67861	1.67861	1.67861	1.67861	1.67861	1.67861	1.67861	1.67861	1.67861
34	6.05636	6.76568	4.54608	4.09527	4.27844	4.07665	4.35946	4.74594	4.50354	4.61784	5.20432	5.11436	4.55868	5.04770	4.38994	4.65189	4.65189	4.65189	4.65189	4.65189	4.65189
35	1.57177	1.83292	1.47197	1.47197	1.11285	1.43863	1.48003	1.44134	1.93545	2.76491	2.41563	2.87867	3.27559	1.70627	1.91461	1.91461	1.91461	1.91461	1.91461	1.91461	1.91461
36	0.91495	2.10970	1.17818	0.76638	0.99172	0.60485	0.53959	1.49468	1.27776	1.05427	1.24686	1.01725	1.30550	1.00652	1.46447	1.50288	1.48288	1.48288	1.48288	1.48288	1.48288
37	2.00242	2.01000	2.18942	1.91115	2.18878	2.04203	1.91348	2.33500	2.45878	1.95856	3.54571	1.97379	2.77710	4.47274	2.67500	2.67500	2.67500	2.67500	2.67500	2.67500	2.67500
38	0.59493	1.85035	1.37179	0.62472	0.94820	0.59000	0.59494	1.54579	1.72860	2.31622	2.53174	2.53174	2.53174	2.90052	1.91204	2.01479	2.01479	2.01479	2.01479	2.01479	2.01479
39	1.87659	1.92759	2.25832	1.90394	1.97659	1.97661	1.85608	2.50051	1.96525	3.57409	3.51620	2.81648	2.81648	2.81648	2.81648	2.81648	2.81648	2.81648	2.81648	2.81648	2.81648
40	0.80597	1.06875	0.20121	0.60543	0.60001	0.72833	1.21006	1.48781	1.02512	3.12623	2.93466	2.31407	2.93466	1.87091	1.31145	1.31145	1.31145	1.31145	1.31145	1.31145	1.31145
065	ESP	8184	8141	8182	8185	8173	8172	8193	81	82147	82215	82278	85	81825	81837	81835	81847	81863	81840		
41	MB178	1.85453	1.88416	1.22939	2.01365	3.21105	1.47642	2.11145	2.94231	1.98195	3.00734	2.72997	2.30175	2.58118	2.79984	2.70985	3.10111	2.70985	2.55530	2.02130	3.04559
42	MB20	2.04774	1.97124	1.69425	2.19029	3.09934	1.15591	2.31019	2.31005	2.02001	2.35252	2.95681	1.91595	1.17126	2.31650	2.25104	2.64437	2.64437	2.64437	2.64437	2.64437
43	MB27	2.24504	2.04434	2.03359	2.57152	3.28773	2.47614	2.47614	2.37500	2.34730	3.16878	1.85155	2.28277	3.34809	2.99120	2.76532	2.63656	2.63656	2.63656	2.63656	2.63656
44	MB29	2.28154	2.05312	1.94905	2.55688	3.05153	2.66112	2.37791	1.93077	1.63950	3.17454	2.03520	2.14540	2.76155	2.61064	3.38950	3.03054	2.69788	2.69788	2.69788	2.69788
45	MB139	2.07489	1.97518	1.80479	2.35581	3.30592	2.85668	2.68205	2.48894	2.05110	2.27540	2.04007	1.51155	2.54259	2.70615	2.94336	3.45553	2.94336	2.94336	2.94336	2.94336
46	MB181	1.83292	1.40335	1.56139	2.10765	3.19723	2.02776	1.97815	1.97815	1.97815	2.88017	1.85113	1.85113	1.85113	1.85113	1.85113	1.85113	1.85113	1.85113	1.85113	1.85113
47	MB17	1.84364	1.89488	1.71474	2.25965	3.11113	1.95552	2.40981	1.26688	1.48220	1.71612	1.04163	1.92704	1.98468	2.35451	2.74595	2.50912	2.50912	2.50912	2.50912	2.50912
48	MB197	1.85683	1.70140	1.82191	2.58821	3.03381	2.29420	2.34130	2.08979	1.72748	1.87286	1.95201	1.87286	1.95201	1.72748	1.72748	1.72748	1.72748	1.72748	1.72748	1.72748
49	MB125	2.17278	1.90355	1.81940	2.41363	3.28457	2.43978	2.40006	2.16013	2.30853	2.37073	1.77146	1.77146	1.77146	1.77146	1.77146	1.77146	1.77146	1.77146	1.77146	1.77146
50	MB5	1.85265	1.86918	1.53415	1.97503	3.21668	1.48547	2.14919	1.11020	2.36214	1.74883	2.91018	1.45559	2.57149	2.70103	2.51165	1.35521	1.35521	1.35521	1.35521	1.35521

Tableau 2 (suite)

	PERSA	PFB	PF35	PL	PI	PC	MC	MLCC	VF	VC24	PF10	PF22	VL	MF58	MA35	MA23	MA24	MA16	MA152	MA178	MA150
41	2.31017	2.31290	1.86623	2.01010	1.96038	2.85003	2.43017	2.53117	4.31547	1.16480	1.99364	1.36075	2.59176	1.21203	2.48841	1.21203	2.48841	0.51539	0.00000	0.97574	0.00000
42	2.84025	2.78140	1.91779	1.91227	2.78406	3.22750	2.53137	4.31706	4.31706	1.01062	1.01062	1.01062	1.01062	0.68348	2.04144	0.68348	2.04144	0.53107	0.55554	0.00000	0.00000
43	2.94576	3.04467	1.94336	2.45489	2.45587	3.37481	2.81959	2.81959	4.31547	1.16480	1.99364	1.36075	2.59176	1.21203	2.48841	1.21203	2.48841	0.51539	0.00000	0.97574	0.00000
44	1.13374	1.91042	1.41525	2.49410	2.91767	3.45840	2.65355	2.91767	4.31547	1.16480	1.99364	1.36075	2.59176	1.21203	2.48841	1.21203	2.48841	0.51539	0.00000	0.97574	0.00000
45	1.15913	2.31514	1.70311	1.91843	2.94331	3.24352	2.52584	2.02484	1.91843	3.81489	1.43397	1.43397	1.43397	1.43397	1.43397	1.43397	1.43397	1.43397	1.43397	1.43397	1.43397
46	2.81019	2.73125	1.81159	2.73016	2.00350	3.08707	2.51783	2.31900	2.81019	1.70311	1.70311	1.70311	1.70311	1.70311	1.70311	1.70311	1.70311	1.70311	1.70311	1.70311	1.70311
47	2.71571	2.47351	1.70684	2.20151	2.05501	3.09181	2.78104	2.07440	4.31547	1.16480	1.99364	1.36075	2.59176	1.21203	2.48841	1.21203	2.48841	0.51539	0.00000	0.97574	0.00000
48	2.91131	3.09423	1.91580	2.08215	2.03357	3.04625	3.09181	2.58200	2.45115	1.01341	1.01341	1.01341	1.01341	1.01341	1.01341	1.01341	1.01341	1.01341	1.01341	1.01341	1.01341
49	2.71050	2.48507	1.89243	1.87205	2.45571	3.22290	3.07331	2.43441	4.31547	1.16480	1.99364	1.36075	2.59176	1.21203	2.48841	1.21203	2.48841	0.51539	0.00000	0.97574	0.00000
50	2.73010	2.47247	1.80370	2.45576	1.74949	2.71993	2.86522	1.93534	4.31547	1.16480	1.99364	1.36075	2.59176	1.21203	2.48841	1.21203	2.48841	0.51539	0.00000	0.97574	0.00000
085	ESP	B19	B10	B15	B12	B13	B14	B11	B16	B17	B18	B19	B20	B21	B22	B23	B24	B25	B26	B27	B28
51	1.8013	1.80774	1.44951	0.91124	0.82336	1.18936	1.21584	1.16531	1.8013	1.24490	3.17778	2.84017	2.43417	2.01150	2.70836	2.70836	2.70836	2.70836	2.70836	2.70836	2.70836
52	1.90294	1.81458	1.72761	0.55407	0.18925	0.67348	0.71131	1.37142	1.37142	1.37142	1.37142	1.37142	1.37142	1.37142	1.37142	1.37142	1.37142	1.37142	1.37142	1.37142	1.37142
53	1.90900	1.81995	1.73763	0.31271	1.16974	0.72749	0.51608	1.86476	1.91884	1.09111	3.54548	3.32033	2.90794	2.90794	2.90794	2.90794	2.90794	2.90794	2.90794	2.90794	2.90794
54	1.86935	1.89314	1.89314	1.89314	1.89314	1.89314	1.89314	1.89314	1.89314	1.89314	1.89314	1.89314	1.89314	1.89314	1.89314	1.89314	1.89314	1.89314	1.89314	1.89314	1.89314
55	1.86935	1.89314	1.89314	1.89314	1.89314	1.89314	1.89314	1.89314	1.89314	1.89314	1.89314	1.89314	1.89314	1.89314	1.89314	1.89314	1.89314	1.89314	1.89314	1.89314	1.89314
56	1.86935	1.89314	1.89314	1.89314	1.89314	1.89314	1.89314	1.89314	1.89314	1.89314	1.89314	1.89314	1.89314	1.89314	1.89314	1.89314	1.89314	1.89314	1.89314	1.89314	1.89314
57	1.86935	1.89314	1.89314	1.89314	1.89314	1.89314	1.89314	1.89314	1.89314	1.89314	1.89314	1.89314	1.89314	1.89314	1.89314	1.89314	1.89314	1.89314	1.89314	1.89314	1.89314
58	1.86935	1.89314	1.89314	1.89314	1.89314	1.89314	1.89314	1.89314	1.89314	1.89314	1.89314	1.89314	1.89314	1.89314	1.89314	1.89314	1.89314	1.89314	1.89314	1.89314	1.89314
59	1.86935	1.89314	1.89314	1.89314	1.89314	1.89314	1.89314	1.89314	1.89314	1.89314	1.89314	1.89314	1.89314	1.89314	1.89314	1.89314	1.89314	1.89314	1.89314	1.89314	1.89314
60	1.86935	1.89314	1.89314	1.89314	1.89314	1.89314	1.89314	1.89314	1.89314	1.89314	1.89314	1.89314	1.89314	1.89314	1.89314	1.89314	1.89314	1.89314	1.89314	1.89314	1.89314

Tableau 2 (suite)

005	M497	M491	M4135	M4181	M411	M4197	M4175	M45	M451	M4104	TC1	TC10	PC1T	M89	M415	M479	M438	M473	M455	M666	
51	2.2226	2.4319	1.8039	1.4884	3.3432	1.5806	1.5015	1.7463	0.0000	1.9753	3.2643	3.0495	2.3254	3.1791	0.79318	0.31074	0.31074	0.31074	0.31074	0.31074	0.31074
52	1.0911	2.0205	1.4130	0.9136	1.0211	1.0211	1.1114	1.0709	1.9757	0.0000	3.4679	3.1315	2.4745	3.3138	2.1451	2.7518	2.2518	2.2518	2.2518	2.2518	2.2518
53	3.1418	3.5792	3.1416	3.1722	3.0915	3.0432	3.3356	3.4235	3.2643	3.4271	0.0000	0.9342	1.6785	3.5019	3.4005	3.4510	3.4510	3.4510	3.4510	3.4510	3.4510
54	3.3273	3.5194	2.9275	2.8349	2.7125	2.8029	3.1308	2.9925	5.0054	3.1315	0.9242	0.0000	1.3090	3.9250	3.0795	3.1448	3.1448	3.1448	3.1448	3.1448	3.1448
55	2.9071	3.1091	2.3775	2.3495	2.1501	2.3509	2.6722	2.5747	2.3250	2.4750	1.4184	3.0090	0.0000	3.7941	2.3142	2.3142	2.3142	2.3142	2.3142	2.3142	2.3142
56	2.9616	2.4424	2.3609	2.0392	2.8648	2.9547	2.6364	3.2558	3.1791	3.1138	3.5709	3.9250	3.1942	3.3120	0.0000	0.3518	3.5184	3.5184	3.5184	3.5184	3.5184
57	2.1463	2.4592	1.7135	1.6325	1.5071	1.7432	1.7017	1.3499	0.3918	2.1131	3.4603	3.0735	2.3142	3.1320	0.0000	0.2757	0.2757	0.2757	0.2757	0.2757	0.2757
58	2.3749	2.2152	1.3193	1.1192	1.8405	1.8405	1.5349	1.5435	0.3106	2.2518	1.4510	3.1448	2.3142	3.1320	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
59	2.2749	2.2152	1.3193	1.1192	1.8405	1.8405	1.5349	1.5435	0.3106	2.2518	1.4510	3.1448	2.3142	3.1320	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
60	2.2749	2.2152	1.3193	1.1192	1.8405	1.8405	1.5349	1.5435	0.3106	2.2518	1.4510	3.1448	2.3142	3.1320	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
005	ESP	8196	8141	8182	8125	8173	8122	8153	8133	8172	8155	BE1WT	82216	BE1E	EE	PF838	PF832	PF847	PF843	PF840	PF840
61	M895	2.5784	2.50630	1.90266	2.5354	3.45328	2.5124	2.7012	2.2986	2.13948	2.34825	2.30684	2.16640	2.40869	2.41206	3.99167	3.23350	2.97167	2.71887	2.91030	1.37761
62	M416	2.40597	2.35585	1.71443	2.34851	3.35480	2.28350	2.4884	2.13818	2.05145	2.6030	2.2759	2.10706	2.56831	2.56412	2.91410	3.27638	2.91660	2.46545	2.71668	3.23921
005	PF85A	PF8	PF836	PF8																	
61	M897	3.10061	2.44124	2.5162	2.5154	3.55442	2.84375	2.27338	2.78344	4.47546	3.53913	1.49861	4.65789	1.91421	1.58358	2.43940	2.63479	2.71975	1.81145	2.20214	1.21911
62	M897	2.54164	2.32186	2.39280	2.30083	3.25565	2.81759	2.21639	2.21579	4.45991	2.19746	1.49390	4.58423	1.67500	1.42028	2.43498	1.82495	2.70040	3.40172	1.92914	1.53113
005	M897	M451	M4139	M4181	M417	M4197	M4175	M45	M453	M4104	TC1	TC10	PC1T	M89	M415	M479	M438	M473	M455	M455	M455
61	M897	2.72152	1.21393	1.81198	1.41706	1.89640	1.83497	1.51553	0.37076	2.27518	3.4510	3.1448	2.3142	3.35191	0.2757	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
62	M897	2.40591	1.32216	1.55805	1.44059	1.71015	1.68847	1.27515	0.25334	2.06290	3.44069	3.10590	2.37557	3.27331	0.1307	0.34937	0.34937	0.34937	0.34937	0.34937	0.34937

Tableau 2 (suite)

***ANNEXE III***

**PROTOCOLES, MILIEUX, SOLUTIONS ET TAMPONS**

## **Protocole 1**

### **Extraction d'ARN**

- 1) Remplir au tiers un tube Eppendorf de 2,2 ml avec du mycélium lyophilisé (ou congelé) et broyé dans un mortier)
- 2) Ajouter 900  $\mu$ l de tampon d'extraction (TE) et mélanger
- 3) Ajouter 900  $\mu$ l de phénol chloroforme
- 4) Mélanger énergiquement
- 5) Centrifuger 15 min à 10 000 tpm et à 2°C
- 6) Récupérer la phase aqueuse
- 7) Ajouter 900  $\mu$ l de phénol chloroforme
- 8) Mélanger
- 9) Centrifuger 15 min à 10 000 tpm et à 2°C
- 10) Recommencer avec 700  $\mu$ l de phénol-chloroforme
- 11) Rajouter 70  $\mu$ l NaCl 3M à la phase aqueuse, puis 1400  $\mu$ l d'éthanol. Agiter
- 12) Mettre 15 min dans la glace
- 13) Laisser 2 h à -20°C
- 14) Centrifuger 15 min à 10 000 tpm et à 2°C
- 15) Resuspendre le culot dans 400  $\mu$ l Tris 10 mM pH 7,4

### **Purification**

- 16) Rajouter 1200  $\mu$ l de LiCl 4M et laisser une nuit à 20°C
- 17) Centrifuger 15 min à 10 000 tpm et à 2°C
- 18) Eliminer le surnageant et laver le culot avec 400  $\mu$ l de LiCl 2M
- 19) Centrifuger 15 min à 10 000 tpm et à 2°C
- 20) Resuspendre le culot dans 250  $\mu$ l de Tris 10 mM

### Protocole 1(suite) Dosage des ARN

- 21) Regrouper les deux suspensions dans un seul tube
- 22) Préparer une solution diluée 100 fois
- 23) Faire un spectre d'absorption entre 200-320  $\lambda$
- 24) Lire la DO à 260  $\lambda$  et déduire la concentration d'ARN (1unité DO=40  $\mu\text{g}$  ARN/ml)
- 25) Précipiter à l'éthanol: 50  $\mu\text{l}$  NaCl 3M et 1500  $\mu\text{l}$  alcool
- 26) Laisser 2 h à  $-20^{\circ}\text{C}$
- 27) Centrifuger 15 mn à 10 000 rpm et à  $2^{\circ}\text{C}$
- 28) Sécher le culot
- 29) Resuspendre dans le tampon Tris 10 mM pour avoir une concentration finale de 4  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

### Tampon d'extraction

NaCl	150 mM
Tris pH 7,4	50 mM
EDTA	5 mM
SDS	5 %

### Mélange Phénol-Chloroforme

Phénol	50 ml
Chloroforme	50 ml
Alcool isoamylique	1 ml
8 Hydroxyquinoléine	100 ml
$\beta$ mercaptoéthanol	200 ml

## Protocole 2

### Mini extraction d'ADN de champignon

- 1) Remplir au tiers un tube Eppendorf de 2,2 ml avec du mycélium lyophilisé (ou congelé) et broyé dans un mortier
- 2) Ajouter 1 ml de tampon (EDTA 50 mM, SDS 0,2%, pH 8,5). bien mélanger avec une tige de verre et passer au vortex légèrement
- 3) Incuber 15 min à 70°C
- 4) Centrifuger 15 min à 13000 tpm
- 5) Récupérer le surnageant
- 6) Ajouter 100 µl d'Acétate de potassium 5M bien mélanger le tout et laisser précipiter pendant 30 min dans la glace
- 7) Centrifuger 15min à 10 000 tpm et prélever le surnageant
- 8) Ajouter 800 µl de phénol-chloroforme isoamylique (48-48-4) saturé avec du Tris 10mM pH7,5, vortexer et centrifuger 10 min à 10 000 tpm à température ambiante
- 9) Prélever le surnageant
- 10) Ajouter 800 µl de phénol-chloroforme isoamylique (48-48-4) saturé avec du Tris 10 mM pH7,5, vortexer et centrifuger 10 min à 10 000 tpm à température ambiante
- 11) Ajouter 800 µl de chloroforme alcool isoamylique (48-2) vortexer et centrifuger 2 min à 10 000 tpm
- 12) Prélever le surnageant et ajouter 1 ml d'éthanol, agiter et centrifuger 15 min à 13000 tpm
- 13) Laver le culot à l'alcool 70% (1,5 ml)
- 14) Centrifuger 15 min à 13 000 tpm et éliminer le surnageant
- 15) Laver le culot à l'alcool 70° (1,5 ml)
- 16) Centrifuger 15 min à 13 000 tpm et éliminer le surnageant
- 17) Sécher le culot à la SPEED VAC (10') et resuspendre dans 100 µl de Tris EDTA
- 18) Mettre 10 µl de RNase (10 mg/ml) et incuber 30 min à 37°C
- 19) Conserver à 4°C ou congeler

### Protocole 3

## SEQUENCAGE d' ARNr par ELONGATION d'une amorce

pour 5 réactions c'est à dire 1 ARN

#### HYBRIDATION

Mélanger l'ARNr et l'amorce en force ionique nulle :

Mettre - 80 000 coups d'amorce kinasé (~15µl)

Sécher et rajouter l'eau et l'ARN

-H <sub>2</sub> O :	5,0 µl
-ARN total (4µg/µl)	6,0 µl
	11,0 µl

Chauffer 5mn à 55° et rajouter dans le même tube 2,5 µl de tampon de transcriptase reverse (BRL 5X)

Chauffer 5mn à 55° et laisser refroidir lentement jusqu'à 35° (15mn) (sortir le bloc du bain-marie à sec)

**PREPARER LES TUBES DE SEQUENCES** : Prendre 15 µl de chacune des solutions mères et les mettre dans leur tube correspondant c'est à dire de la même couleur

Reprendre le tube d'hybridation et rajouter

-Actinomycine (1 mg/ml)	3,0 µl
-Tampon de transcriptase reverse (BRL 5X) :	2,5 µl
-Transcriptase reverse	3,0 µl
-H <sub>2</sub> O :	4,0 µl
	26,0 µl

**ELONGATION à 0°** : Rajouter 5µl du mélange précédent dans chacun des tubes de sequence

30 mn 37°

**CHASSE** : 15 mn à 37°

**HYDROLYSE ALCALINE** : Précipiter à l'alcool :

par tube	- NaCl 2,5M	3µl
	- EtOH froid	75 µl
	2h. à -20°, centrifuger 20 mn et sécher le culot.	

Reprendre dans 60µl de NaOH 0,3N 15h à 37°

Neutralisation :	- Acide acétique	8 µl
	- Acétate de Na pH 7,5 (2M)	25 µl
	- H <sub>2</sub> O	50 µl

Précipitation alcoolique : - Etanol 450 µl  
 2h à -20°, centrifuger 20mn, enlever le surnageant et rajouter 200µl d'alco  
 70%, centrifuger, bien sécher le culot et le reprendre dans 2µl d'H<sub>2</sub>O

**BIEN MELANGER**

+ 2µl de Mix blue

Dénaturer 3mn à 90° (tubes ouverts) et mettre dans la glace avant de déposer sur le gel

## PREPARATION DES TUBES DE SEQUENCES

**dX s : Solution mère de déoxynucléotides**

80 µl	de dC (1mM)
80 µl	de dA (1mM)
80 µl	de dT (1mM)
80 µl	de dG (1mM)
320 µl	d'H <sub>2</sub> O
-----	
640 µl	

Concentration finale de chacun des déoxy. = 125µM dans la solution mère

### Tubes de sequences

**ddC/dC =5    ddA/dA=5    ddT/dT=5    ddG/dG=5**

### Solutions mères pour 20ARN

	Tube C Jaune	Tube A Vert	Tube T Rouge	Tube G Blanc
ddC (1 mM)	80 µl	-	-	-
ddA (1 mM)	-	80 µl	-	-
ddT (1 mM)	-	-	80 µl	-
ddG (1 mM)	-	-	-	80 µl
dXs(A+T+G+C) (Solution mère)	160 µl	160 µl	160 µl	160 µl
Tampon BRL 5X	60 µl	60 µl	60 µl	60 µl
H <sub>2</sub> O	0	0	0	0
	300 µl	300 µl	300 µl	300 µl

**Prendre 15µl de chaque tube pour 1 ARN**

**Concentrations finales dans chacun des tubes de séquence  
au moment de l'élongation**

ddC	200 µM	-	-	-	-
ddA	-	200 µM	-	-	-
ddT	-	-	200 µM	-	-
ddG	-	-	-	200 µM	-
dC	40 µM	40 µM	40 µM	40 µM	40 µM
dA	40 µM	40 µM	40 µM	40 µM	40 µM
dT	40 µM	40 µM	40 µM	40 µM	40 µM
dG	40 µM	40 µM	40 µM	40 µM	40 µM

## Protocole 4

### Marquage $^{32}\text{P}$ des oligomères

-Mélanger

2,0  $\mu\text{l}$  d'ATP (suivant age) (20,0  $\mu\text{Ci}$   $\gamma$   $^{32}\text{P}$ -ATP)  
 1,5  $\mu\text{l}$  de mercaptoethanol 0,1 M  
 3,0  $\mu\text{l}$  d'oligomères (200,0 ng)  
 2,0  $\mu\text{l}$  de kinase  
 1,5  $\mu\text{l}$  de  $\text{MgCl}_2$  0,2 M Boehringer : T4 polynucleotide Kinase  
 1,0  $\mu\text{l}$  de tampon 10X  
 qsp 30,0  $\mu\text{l}$  d' $\text{H}_2\text{O}$

-37° pendant 45'

-65° pendant 10' (Arrêt de la réaction)

-Purification sur colonne G 50/Triéthylamine

Sur une colonne de Sephadex G50 les oligonucléotides passent en tête et le solvant (Triéthylamine 0,05 M neutralisé à pH 7,5 par barbotage de  $\text{CO}_2$  ou avec de la carboglace, solution mère 0,5M) est ensuite éliminé par évaporation.

-Contrôle de la purification

Prendre 10  $\mu\text{l}$  de chaque fraction et les mettre dans 200  $\mu\text{l}$  d'eau

Lire au compteur sur le programme A9 puis return

**Tableau 1**  
**Composition du milieu semi-synthétique (MC)**

Eau distillée	1 000 ml
Phosphate monopotassique	0,39 g
Phosphate disodique	1,42 g
Sulfate de Magnésium	0,60 g
Chlorure de Potassium	1,00 g
Nitrate d'Ammonium	0,70 g
Glucose	10,00 g
Extrait de Levure	5,00 g
Gélose	15,00 g

Stérilisation à l'autoclave 120°C, 20 min

**Tableau 2**  
**Composition du milieu pour *Nomuraea rileyi***

Eau distillée	1 000 ml
Sulfate de Magnésium	1,00 g
Phosphate monopotassique	0,10 g
Extrait de Levure	20,00 g
Tryptophane	0,50 g
Tween	0,50 g
Gélose	18,00 g

Stérilisation à l'autoclave 120°C, 20 min

**Tableau 3**  
**Solutions et Tampons de gel**

<b>Tampon Tris-Borate</b>		
Tp 10X	108 g Tris OH 55 g Acide Borique 9,3 g EDTA 1 000 ml	pH 8,8
<b>Solution Stock Acrylamide 40%</b>		
Acrylamide	38 g	
Bis Acrylamide	2 g	
H <sub>2</sub> O q.s.p.	100 ml	
<b>Solution gel 6 %</b>		<b>Solution gel 8 %</b>
Urée	48 g	48g
Solution stock Acrylamide 40%	15 ml	20 ml
TBE 5X pH 8,8	20 ml	20 ml
H <sub>2</sub> O q.s.p.	100 ml	100 ml
<b>APS 10%</b>		
Persulfate d'Ammonium	10 g	
H <sub>2</sub> O	100 ml	
Stable à 4°C plusieurs semaines		
<b>Solution de charge (Mix Bleu)</b>		
Formamide désionisée	100 ml	
Xylène Cyanol	100 mg	
Bleu Bromophénol	100 mg	
EDTA 500 mM pH8	4 ml	
<b>Solution pour mini-gel</b>		
TBE 1X pH 8,8	40 ml	
Agarose	320 mg	
<b>Solution polyacrylamide pour plaque 20-50</b>		
Solution gel 6 % ou 8 %	60 ml	
APS 10 %	360 µl	
TEMED	60 µl	

**Tableau 4**  
**Solutions de révélation correspondant aux**  
**10 systèmes enzymatiques analysés**

Système enzymatique	Solution de révélation
$\alpha$ -Estérase	100 ml tampon phosphate(1,51 g Phosphate monosodique, 10,22 g Phosphate disodique pour 400 ml) pH7,2 80 mg $\alpha$ -naphtyl acétate, 60 mg Fast Blue RR.
Glutamate oxalate transaminase GOT	100 ml tampon Tris HCl 0,1 M pH 8; 4 g L-Aspartic acid, 220 mg acide $\alpha$ -Kétoglutarique, 200 mg Fast Blue. BB
Phosphoglucomutase PGM	100 ml tampon tris HCl 0,05 M pH 8; 30 mg NBT, 100 mg Glucose-1-phosphate, 15 mg NADP, 4 mg PMS 200 mg MgCl <sub>2</sub> , 30 unités G-6-PDH.
Alcool déshydrogénase ADH	100 ml tampon Tris HCl 0,05 M pH 8,6; 20 mg NBT, 4,5 ml Isopropanol, 20 mg NAD, 4 mg PMS.

NAD             $\beta$  Nicotinamide adenine dinucléotide  
NAD             $\beta$  Nicotinamide adenine dinucléotide phosphate  
NBT            Nitroblue tétrazolium  
PMS            Phénazine méthosulfate

**Tableau 4(suite)**  
**Solutions de révélation correspondant aux**  
**10 systèmes enzymatiques analysés**

Système enzymatique	Solution de révélation
Malate déshydrogénase MDH	100 ml tampon Tris HCl 0,1 M pH7; 35 mg NBT, 20 mg NAD, 5 mg PMS
Xanthine déshydrogénase XDH	100 ml tampon Tris HCl 0,025 M pH7,5; 20 mg NBT, 100 mg Hypoxanthine, 25 mg NAD 15 mg KCl, 5 mg PMS.
6-Phosphogluconate déshydrogénase PGD	100 ml tampon Tris HCl 0,05 M pH 8; 15 mg NBT, 80 mg acide 6-Phosphogluconique, 10 mg NADP, 5 mg PMS, 200 mg MgCl <sub>2</sub> .
$\alpha$ -Glycérophosphate déshydrogénase GPDH	100 ml tampon Tris HCl 0,05 M pH 8,6; 20 mg NBT, 400 mg $\alpha$ -Glycérophosphate, 25 mg NAD, 90 mg EDTA, 5 mg PMS.
Glucose-6-phosphate déshydrogénase G6PDH	100 ml tampon Tris HCl 0,1 M pH 7,4; 20 mg NBT, 100 mg Glucose-6-phosphate, 15 mg NADP, 5 mg EDTA, 5 mg PMS.
Lactate déshydrogénase LDH	100 ml tampon Tris HCl 0,025 M pH 7,5; 25 mg NBT, 8 ml lactate de sodium, 25 mg NAD, 5 mg PMS.

**Tableau 5**  
**Composition du milieu Adamek**

Corn steep liquor	30 g
Tween	5 g
Eau distillée	1 000 ml
Autoclave 120°C, 30 min	
Glucose	40 g
Extrait de levure	40 g
Répartir par 50 cc dans Erlenmeyer de 150 ml	
Stérilisation à l'autoclave 120°C	

**Tableau 6**  
**Tampon d'extraction des Enzymes**

Tris 1M pH 8,2	10 ml
EDTA 10 <sup>-1</sup> M	50 ml
Eau distillée	1 000 ml

***REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES***

- AGUDELO F., FALCON L.A., 1983 - Mass production, infectivity and field application studies with the entomogenous fungus *Paecilomyces farinosus*. J. Invertebr. Pathol. 42, 124-132.
- AL-AIDROOS K., ROBERTS D.W., 1978 - Mutants of *Metarhizium anisopliae* with increased virulence towards mosquito larvae. Can. J. Genet. Cytol. 20, 211-219.
- BALAZY S., 1973 - A review of entomopathogenic species of genus *Cephalosporium Corda* (Mycota, Hyphomycetales). Bull. Soc. Amis Sci. Lett. Poznan ser. D 14, 101-137.
- BARRON G.L., 1980 - Fungal parasites of rotifers, a new *Tolypocladium* with underwater conidiation. Can. J. Bot. 58, 439-442.
- BARRON G.L., 1981 - Two new fungal parasites of bdelloid rotifers. Can. J. Bot. 59, 1449-1455.
- BASSI A., 1835 - Del mal del segno, calcinaccio o moscardino malattie di libbararne le bifattaie anche le pice infestate. Parte Prima Teorica, Orcesi, Lodi. 67p.
- BEAUVÉRIE J., 1914 - Les Muscardines, le genre *Beauveria* Vuillemin. Rev. Gen. Bot. 26, 81-105.
- BISSET J., 1983 - Notes on *Tolypocladium* and related genera. Can. J. Bot. 61, 1311-1329.
- BRIMACOMBE R., STIEGE W., 1985 - Structure and Function of ribosomal RNA. Biochem. J. 229, 1-17.
- BROWN A. H. S., SMITH G., 1957 - The genus *Paecilomyces* Bainier and its perfect stages *Byssochlamys* Westling. Trans. Brit. Mycol. Soc. 40, 17-89.
- CHARLES, 1936 - The synonymy of *Botrytis rileyi* Farlow. Mycologia 28, 397-398.
- COLES R.B., PINNOCK D.E., 1982 - Control of the pasture cockchafer with the fungal pathogen *Metarhizium anisopliae*. Proc. 3rd Austr. Conf. Grassl. Invert. Ecol., 191-198.

- CONTI de E, MESSIAS C., de SOUZA H., AZEVEDO J.L., 1980 - Electrophoretic variation in esterases and phosphatases in eleven wild-type strains of *Metarhizium anisopliae*. *Experientia* 36, 293-294.
- DIDAY E., 1971 - Une nouvelle méthode en classification automatique et reconnaissance des formes: la méthode des nuées dynamiques. *Revue de Statistique Appliquée*, XIX, 19-33.
- DE HOOG G.S., 1972 - The genera *Beauveria*, *Isaria*, *Tritirachium* and *Acrodontium*. *Stud. Mycol.* 1, 1-41.
- DE HOOG G.S., 1978 - Notes on fungicolous Hyphomycetes and their relatives. *Perssonia* 10,33-81.
- DOBERSKI J.W., 1981 - Comparative laboratory studies on three fungal pathogens of elm barkbeetle *Scolytus scolytus*. *J. Invertebr. Pathol.* 37, 188-194.
- EASWARAMOORRY S.A., JAYARAJ S., 1978 - Effectiveness of white halo fungus, *Cephalosporum lecanii*, against field populations of Coffee green bug, *Coccus viridis*. *J. Invertebr. Pathol.* 32, 88-96.
- FARGUES J., 1981 - Spécificité des Hyphomycètes entomopathogènes et résistances inter-spécifiques des larves d'insectes. Thèse Doct. d'Etat Univ. ParisVI, 2 vol.
- FARGUES J., ROBERT P.H., 1985 - Persistence des conidiophores des Hyphomycètes entomopathogènes *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., *Metarhizium anisopliae* (Metsh.) Sor., *Nomuraea rileyi* (F.) Samson et *Paecilomyces fumosoroseus* Wize, dans le sol, en conditions contrôlées. *Agronomie* 5, 73-80.
- FERRON P., 1972 - Observations sur l'endémisme de la mycose à *Beauveria tenella* (Delacr.) Siemaszko dans les populations de *Melolontha melolontha* L. *C.R. Acad. Agric. Fr., Séance 6 déc. 1972*, 1399-1402.
- FERRON P., 1978 - Biological control of insect pests by entomogenous fungi. *Ann. Rev. Entomol.* 23, 409-442.
- FILATOV V.P., 1981 - Verticillin against white flies. *Zashchita Rastenii* 10, 47.
- FITCH W.M., MARGOLIASH E., 1967 - Construction of phylogenetic trees. *Science* 155, 279-284.

- FRAPPIER F., PAIS M., ELSWORTH J.F., GROVE J.P., 1978 - Revised structure of beauvellide a cyclodepsipeptide from *Beauveria tenella*. *Phytochemistry* 17, 545-546.
- FRIEDERICHS, 1920 - Über die Pleplage des Insektenpilzes, *Metarrhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. *Centralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten* 50, 335-356.
- FUXA J.R., 1984 - Dispersin and spread of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi* in a Soybean field. *Environ. Entomol.* 13, 252.
- GAMS W., 1971 a - *Tolypocladium*, eine Hyphomycetengattung mit geschwollenen Phialiden. *Persoonia* 6(2), 185-191.
- GAMS W., 1971 b - "*Cephalosporium* artige schimmelpilze Hyphomycetes" Gustav Fischer Verlag. Stuttgart.
- GAMS W., ROZSYPAL J., 1973 - *Metarrhizium flavoviride* n. sp. isolated from insects and from soil. *Acta bot. Neerl.* 22, 518-521.
- GERBI S., 1985 - *Molecular Evolutionary Genetics*. Chap.7. Plenum Press New York and London.
- GIARD A., 1893 - *L'Isaria densa* (Link)Fries, champignon parasite du Hanneton commun (*Melolontha vulgaris* L.). *Bull. Scient. France et Belgique* 24, 1-112.
- GLOTZ C., BRIMACOMBE, 1980 - An experimentally derived model for the secondary structure of 16S RNA from *Escherichia Coli*. *Nucleic Acids Res.* 8, 2377-2395.
- GOETTEL M.S., St LEGER R.J., BHAIRI S., ROBERTS D.W., STAPLES R.C., 1989 - Transformation of the entomopathogenic fungus *Metarrhizium anisopliae* using the benA3 gene from *Aspergillus nidulans*. *J. Cell. Biochem. Suppl* 0, 13 (1),170.
- GOTTWALD T.R., TEDDERS W.L., 1983 - Suppression of pecan weevil (Coleoptera: *Curculionidae*) populations with entomopathogenic Fungi. *Environm.Ent.* 12, 471-474.

- GUADET J., JULIEN J., LAFAY J.F., BRYGOO Y., 1989 - Phylogeny of some *Fusarium* species, as determined by large-subunit rRNA sequence comparison. *Mol. Biol. Evol.* 6(3), 227-242.
- HALL R.A., 1980 - Effect of repeat subculturing on agar and passaging through an insect host on pathogenicity, morphology and growth rate of *verticillium lecanii*. *J. Invertebr. Pathol.* 36, 216-222.
- HALL R.A., 1981 - The fungus *Verticillium lecanii* as a microbial Insecticide against Aphids and Scales. In : *Microbial Control of Pests and Plants Diseases. 1970-1980.* Burges H.D. Ed., Academic Press, London, 483-498.
- HALL R.A., BURGESS H.D., 1979 - Control of aphids in glasshouses by the fungus *Verticillium lecanii*. *Ann. Appl. Biol.* 93, 235-246.
- HALL R.A., PAPIEROK B., 1982 - Fungi as biological control agents of arthropods of agricultural and medical importance. *Parasitology* 84, 205-240.
- HAMILL R.L., HIGGINS H.E., BOAZ H.E., GORMAN M., 1969 - The structure of Beauvericin a new depsipeptide antibiotic toxic to *Artemia salina*. *Tetrahedron. Lett.* 49, 4255-4258.
- HENDY M.D., PENNY D., 1982 - Branch and Bound algorithms to determine minimal evolutionary trees. *Mathematical Biosciences* 59, 277-290.
- HORI H., OSAWA S., 1987 - Origin and evolution of organism as deduced from 5S ribosomal RNA sequences. *Mol. Biol. Evol.* 4, 445-472.
- HUGHES S.J., 1953 - Conidia, Conidiophores and Classification. *Can. J. Bot.* 31, 577-659.
- HUGHES S.J., 1958 - Revisiones Hyphomycetum aliquot cum appendice de *Nominibus reficiendis*. *Can. J. Bot.* 36, 727-836.
- HUGUES J.C., GILLEPSIE A.T., 1985 - Germination and penetration of aphid *Macrosiphoniella sanborni* by two strains of *Verticillium lecanii*. XVIII th Meeting of Society for Invertebrate Pathology. Sault Ste Marie, p28.

- IGNOFFO C.M., 1981 - The fungus *Nomuraea rileyi* as microbial insecticide. In: Microbial Control of Pests and Plants Diseases, 1970-1980. Burges H.D. Ed. Academic Press, 513-538.
- IGNOFFO C.M., 1982 - Environmental persistence of *Nomuraea rileyi*. Proc. IIIrd Intern. Coll. Invert. Pathol. Brighton UK 331-335.
- IGNOFFO C.M., MARSTON N.L., HOSTETTER D.L., PUTTLER B., BELL J.V., 1976 - Natural and induced epizooties of *Nomuraea rileyi* in soybean caterpillars. J. Invertebr. Pathol. 27, 191-198.
- JACKSON C.W., 1984 - Genetical studies on the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viegas. Ph.D Thesis, Queen Elizabeth College University of London.
- JACKSON C.W., HEALE J.B., 1987 - Parasexual crosses by hyphal anastomosis and protoplast fusion in entomopathogen *Verticillium lecanii*. J. Gene. Microb. 133, 3537-3547.
- JAYARAMAN K.S., 1988 - Cyclosporin yielding fungus found. Nature Vol 332, n°6166.
- JOHNSON D.W., KISH L.P., ALLEN G.E., 1976 - Field evaluation of selected pesticides on the natural development of the entomogenous Fungus, *Nomuraea rileyi*, on the velvetbean caterpillar in soybean. Environ. Entomol. 5, 964-966.
- JOHNSTON J.R., 1915 - The entomogenous fungi of Porto Rico. Government of Porto Rico Board of Commissioners of Agriculture. Rio Pedras Bulletin 10.
- KANAGRATAM P., HALL R.A., BURGESS H.D., 1982 - Controls of glasshouse whitefly, *Trialeurodes vaporariorum* by an aphid strain of the fungus *Verticillium lecanii*. Ann. Appl. Biol. 100, 213-219.
- KAWULA T.H., LING A.J., 1984 - Production of protoplasts from *Beauveria bassiana* blastospores. J. Invertebr. Pathol. 43, 282-284.
- KELLER S., 1986 - Control of may beetle grubs (*Melolontha melolontha* L.) with the fungus *Beauveria brongniartii* (Sacc.) Petch. In: Fundamental and applied aspects in invertebrate pathology (Eds R.A. SAMSON, J.M. VLAK & D. PETERS). Foundat. Fourth Int. Colloq. Invertebr. Pathol. Wageningen Netherlands, 525-528.

- KISH L.P., ALLEN G.E., 1976 - A pilot program for predicting infection rates of *Nomuraea rileyi* on *Anticarsia gemmatalis* in soybean. Proc. 1st. Colloq. Invertebr. Pathol. Kington, 436-447.
- KISH L.P., ALLEN G.E., 1978 - The biology and ecology of *Nomuraea rileyi* and a program for predicting its incidence on *Anticarsia gemmatalis* in soybean. Fla. Agric. Exp. Stn. Bull., 795.
- KISH L.P., SAMSON R.A., ALLEN G.E., 1974 - The genus *Nomuraea* Maublanc. J. Invertebr. Pathol. 24, 154-158.
- KIMURA M., 1980 - A simple method for estimating evolutionary rates of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences. J.Mol.Evol. 16,111-120.
- KNITOWA K., BAJAN C., WOJCIECHOWSKA M., 1977 - Differences in pathogenicity of entomopathogenic fungi from France and Poland. Pol. Ecol. Stud. 3,115-126.
- KODAIRA Y., 1962 - Studies on the new toxic substances to insects; Dextruxin A and B produced *Oospora destructor*. Agr. Biol. Chem. 26, 36-42.
- KOTTHOFF P., 1937 - *Verticillium coccorum* (Petch), Westerdijk als Parasit auf *Puccinia chrysanthemi* Roze. Angewandte Botanik 19, 127-130.
- KRASSILSTCHIK J., 1888 - La production industrielle des parasites végétaux pour la destruction des insectes nuisibles. Bull. Sci. France, Belgique 19, 461-472.
- KUCERA M., 1971 - Toxins of the entomophagous fungus *Beauveria bassiana* II. Effect of nitrogen sources on formation of the toxic protease in submerged culture. J. Invertebr. Pathol. 17, 211-215.
- KUCERA M., SAMSINAKOVA A., 1968 - Toxins of entomophagous fungus *Beauveria bassiana*. J. Invertebr. Pathol. 12, 316-320.
- LANE D.J., PACE B., OLSEN G.L., STAHL D.A., SOGIN M.L., PACE N.R., 1985 - Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 6955-6959.

- LANGERON M., 1947 - *Tritirachium brumpti* (Langeron et Lichaa 1934) Langeron 1947 et le genre *Tritirachium* Limber 1940. Anns. Parasit. Hum. Comp. 22, 94-99.
- LECUONA R. 1989 - Rôle des lipides épicuticulaires des insectes dans la pathogénèse des Hyphomycètes. Thèse d'Université Paris VI. 208 pp.
- LEEMING A.R., 1976 - Studies on mildew infecting the *Gramineae*. D. Phil. Thesis. University of Oxford.
- LINGG A.J., DONALDSON M.D., 1981 - Biotic and abiotic factors affecting stability of *Beauveria bassiana* in soil. J. Invertebr. Pathol. 38, 191-200.
- Mac ALPINE D., HILL W.H., 1985 - The entomogenous fungi of Victoria. Proc.R. Soc. Victoria 7, 159-165.
- Mac CARROLL R., OLSEN G.J., STAHL Y.D., WOESE C.R., SOGIN M.L., 1983 - Nucleotide sequence of the *Dictyostelium discoïdeum* small-subunit ribosomal ribonucleic acid inferred from the gene sequence: evolutionary implications. Biochemistry 22, 5858-5868.
- Mac GEARY F.M., HASTIE A.C., 1981 - Hybridation of *Verticillium albo atrum* strains from tomato and leucerne. In : Abstracts of the 3rd International *Verticillium* Symposium. Bari Italy p.42.
- Mac LEOD, 1954 - Natural and cultural variations in entomogenous Fungi Imperfecti. Ann. N.Y.Acad.Sci. 60, 58-70.
- MARCHAL M., 1977 - Fungi Imperfecti isolés d'une population naturelle d'*Otiorhynchus sulcatus* Fabr. (Col: *Curculionidae*). Rev. Zool. Agric. Pathol. vég 76, 101-108.
- MARTYN E.J., 1960 - The ecology of *Oncoperae intricata* Walker and *Oncoperae infobrunnea* Tindale (Lepidoptera, *Hepialidae*). Research Bulletin 3. Department of Agriculture. Tasmania.
- MAUBLANC, 1903 - Sur les quelques espèces nouvelles de champignons inférieurs. Bull. Soc. Mycol. France 19, 291-296.
- MESSIAS C.L., AZEVEDO J.L., 1980 - Parasexuality in the Deuteromycetes *Metarhizium anisopliae*. Trans. Br. Mycol. Soc. 75(3), 473-477.

- METSCHNIKOFF E., 1879 - Insect harmful to agriculture (series). Issues III. The grain weevil. Pub. by the Commission attached to the Odessa Zemstvo Office for investigation of the problem of insects harmful to agriculture. Odessa 32 p.
- MICHEL B., 1981 - Recherches expérimentales sur la pénétration des champignons pathogènes chez les insectes. Thèse 3ème cycle. Univ. Sci. Tech. Languedoc (Montpellier).
- MICHOT B., BACHELLERIE J.P., 1987 - Comparisons of large subunit rRNAs reveal some eukaryote specific elements of secondary structure. *Biochimie* 69, 11-23.
- MICHOT B., HASSOUNA H., BACHELLERIE J.P., 1984 - Secondary structure of mouse 28S rRNA and general model for the folding of the large rRNA in eukaryote. *Nucleic Acids Res.* 12 (10), 4259-4279.
- MOHANAN C., VARMA R.V., 1988 - *Paecilomyces farinosus*, a potential biocontrol agent of some lepidopterous tree pests in India. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 90 (1), 119-122.
- MUGNAI L., BRIDGE P.D., EVANS H.C., 1989 - A chemotaxonomic evaluation of the genus *Beauveria*. *Mycol. Res* 92 (2), 199-209.
- MULLIS K.B., FALOUNA F.A., 1987 - Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalysed chain reaction. In: WU R. ed *Methods in enzymology*. Vol 155, San Diego, CA, Academic Press, 335-350.
- NICHOLSON R.L., 1984 - Adhesion of fungi to the plant cuticle. In: *Infection process of fungi* (Eds. D.W. ROBERTS & J.R. AIST). *Publs. Rockefeller Fdn*, 74-89.
- NOMURA M., GOURSE R., BAUGHMAN G., 1984 - Regulation of synthesis of ribosomes and ribosomal components. *Annu. Rev. Biochem.* 53, 75-117.
- PANT C., 1986 - Ecology and control of vectors; use of biological agents as a component of integrated vector control programmes. In: *Fundamental and applied aspects of invertebrate pathology* (Eds. R.A. SAMSON, J.M. VLAK & D. PETERS). *Foundat. Fourth Int. Colloq. Invertebr. Pathol.* Wageningen, Netherlands, 501-509.

- PEKRUL S., GRULA E.A., 1979 - Mode of infection of the corn earworm (*Heliothis zea*) by *Beauveria bassiana* as revealed by scanning electron microscopy. J. Invertebr. Pathol. 34, 238-247.
- PETCH T., 1925 - Entomogenous Fungi and their use in controlling insects pests. Bull. Depart.Agric. Ceylon 71, Government printer. Colombo pp40.
- PILLAI, 1982 - The biology and pathology of the imperfect fungi with vector control potential. Proc.Third Int. Colloq. Invertbr. Pathol. Brighton, 404-408.
- PINNOCK D.E., GARCIA R., CUBBIN C.M., 1973 - *Beauveria tenella* as a control agent for mosquito larvae. J. Invertebr.Pathol. 22, 143-147.
- POPRAWSKI T.J., MARCHAL M., ROBERT P.H., 1985 - Comparative susceptibility of *Otiorhynchus sulcatus* and *Sitona lineatus* (Coleoptera: Curculionidae) early stages to five entomopathogenic Hyphomycetes. Envir. Entomol. 14, 557-561.
- QU H.T., 1986 - Structuration et évolution de l'ARN ribosomique 28S chez les Eucaryotes. Etude systématique de la région 5' terminal. Thèse de l'Université Paul Sabatier. Toulouse 230p.
- QU H.T., NICOLOSO M., BACHELLERIE J.P., 1988 - Phylogenetic calibration of 5' terminal domain of large rRNA achieved by determining twenty eucaryotic sequences.J. Mol. Evol. 28, 113-124.
- QUIOT J.M., VEY A., VAGO C., 1985 - Effects of mycotoxins on invertebrate cells in vitro.In : Advances in cells culture. Vol 4. Ed. K. MARAMOROSCH, Academic Press N.Y.199-212.
- RATAULT C., VEY A. , 1977 - Production d'estérasés et de N-acetyl D-glucosaminidase dans le tégument du coléoptère *Oryctes rhinoceros* par le champignon entomopathogène *Metarhizium anisopliae*. Entomophaga 29, 41-48.
- RHADA K., NIRULA K.K., MENON K.V.P., 1956 - The muscardine disease of *Oryctes rhinoceros* .2. The causal organism. Indian Cocan. J. 9, 83-89.
- RIBA G., 1978 - Recombinaison après hétérocaryose chez le champignon entomopathogène *Paecilomyces fumosoroseus* (Deutéromycète). Entomophaga 23, 417-421.

- RIBA G., 1985 - Contribution à l'étude génétique de quelques Hyphomycètes entomopathogènes. Thèse de Doctorat d'Etat Paris VI, 261 pp.
- RIBA G., 1986 - Perspectives offertes par le champignon entomopathogène *Beauveria bassiana* (Bal.) Vuill. dans la lutte contre les ravageurs de grandes cultures. Colloq. INRA.
- RIBA G., BOUVIER-FOURCADE I., CAUDAL A., 1986 a - Isoenzymes polymorphism in *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycètes) entomogenous fungi. Mycopathologia 96, 161-169.
- RIBA G., SOARES G.G., J.R., R.A. SAMSON, J.ONILLON, CAUDAL., 1986 b - Isoenzyme Analysis of Isolates of the Entomogenous Fungi *Tolypocladium cylindrosporum* and *Tolypocladium extinguens* (Deuteromycotina: Hyphomycetes). J. Invertebr. Pathol. 48, 362-367.
- RIBA G., LOURDES de AQUINO M., ALVES RIBEIRO S., 1987 - Polymorphisme chez des souches brésiliennes de l'Hyphomycète entomopathogène *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin infectés à des *Cercopidae*. Agronomie 7 (10), 763-768.
- RIBA G., RAVELOJAONA A.M., 1984 - The parasexual cycle in the entomopathogenic fungus *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) Brown and Smith. Can. J. Microbiol. 30, 922-926.
- ROBERTS D.W., 1966 - Toxins from the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae*. II-Symptoms and detection in moribund hosts. J. Invertebr. Pathol. 8, 222-227.
- ROBERTS D.W., 1969 - Toxins from the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae*: Isolation of destruxins from submerged cultures. J. Invertebr. Pathol. 14, 82-88
- ROBERTS D.W., 1981 - Toxins of entomopathogenic fungi In: BURGESS H.D. Microbial control of pests and plant diseases 1970-1980 p. 441-464 Academic Press. New York
- ROBINSON R.K., 1966 - Studies on penetration of insect integument by Fungi. Pans, B, 12, 131-142.

- ROMBACH M.C., HUMBER R.A., EVANS H., 1987 - *Metarhizium album*, a fungal pathogen of leaf and planthoppers of rice. Trans. Br. mycol. Soc. 88 (4), 451-459.
- ROMBACH M.C., HUMBER R.A., ROBERTS D.W., 1986 - *Metarhizium flavoviride* var. minor var. nov., a pathogen of plant. and leafhoppers (Homoptera, *Auchenorrhyncha*) of rice. Mycotaxon 26, 87-92.
- SACCARDO, 1886 - Hyphomycetes. Sylloge Fungorum.
- SAITOU N., NEI M., 1987 - The Neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol. 4(4), 406-425.
- SAMSINAKOVA A., BAJAN C., KALALOVA S., KNITOVA K., WOJCIECHOWSKA M., 1977 - The effect of some entomophagous Fungi on the Colorado beetle and their enzyme activity. Bull. Acad. Pol. Sci. ser Sci. Biol. 25, 521-526.
- SAMSINAKOVA A., KALALOVA S., 1975 - Artificial infection of scale insect with entomophagous fungi *Verticillium lecanii* and *Aspergillus candidus*. Entomophaga 20.361-364.
- SAMSINAKOVA A., KALALOVA S., 1978 - The *Paecilomyces farinosus* Brown et Smith (Deuteromycetes) a study on conditions of its use for the control of the Colorado Beetle. Zeitschrift für Angewandte Entomologie 87. 68-75
- SAMSINAKOVA A., MISIKOVA S., LEOPOLD J., 1971 - Action enzymatic systems of *Beauveria bassiana* on the greater wax moth larvae (*Galleria mellonella*). J. Invertebr. Pathol. 18, 322-330.
- SAMSON A.R., 1974 - *Paecilomyces* and some allied hyphomycetes . Studies in Myc. 6.
- SAMSON A.R., EVANS C.H., 1982 - Two New *Beauveria* spp . from South America. J. Invertebr. Pathol. 39. 93-97.
- SAMSON A.R., SOARES G.G., 1984 - Entomopathogenic species of the Hyphomycete genus *Tolypocladium*. J. Invertebr. Pathol. 43. 133-135.
- SAMSON A.R., EVANS H., LATGE J.P., 1988 - Atlas of entomogenous fungi. Springer - Verlag. Berlin, Heidelberg New York, London, Paris, Tokyo.
- SANDERS R.D., 1972 - Microbial mortality factors in *Aedes sierrensis* populations. Proc. Calif. Mosq. Control. Assoc. 40. 66-68

- SANGER F., NICKLEN S., COULSON A.R., 1977 - DNA Sequencing with chain terminating inhibitors. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 74 . 5463-5467.
- SCHABEL H.G., 1978 - Percutaneous infection of *Hylobius pales* by *Metarrhizium anisopliae*. J. Invertebr. Pathol. 31. 180-187.
- SMITHIES O., 1955 - Biochem. J. 61, 629.
- SNEATH , SOKAL, 1973 - Numerical taxonomy. W.H. Freeman. San Francisco.
- SOARES G.G. Jr., 1979 - A study of *Tolypocladium cylindrosporum* Gams, a new naturally occurring fungal pathogen of mosquitoes (with notes on *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill.). Ph. Diss. Univ. Calif. Berkeley, 177 pp.
- SOARES G.G. Jr., 1982 - Pathogenesis of infection by the hyphomycetous Fungus, *Tolypocladium cylindrosporum* Gams in *Aedes sierrensis* and *Culex tarsalis* (Diptera: Culicidae). Entomophaga, 27, 283-300.
- SOARES G.G. Jr. , PINNOCK D.E.,SAMSON R.A., 1979 - *Tolypocladium*, a new fungal pathogen of mosquito larvae with promise for use in microbial control. Proc.47th Ann.Conf. Calif. Mosq. Control Assn. pp . 51-54.
- SOARES G.G. Jr., RIBA G.,CAUDAL A., VINCENT J.J., 1985 - Comparative studies of eleven isolates of the fungal entomopathogen *Tolypocladium cylindrosporum* Gams. and two isolates of *Tolypocladium extinguens* Samson and Soares. J. Invertebr. Pathol.46, 115-120.
- SODERHALL K., 1982 - Prophenoloxidase activating system and melanization. A recognition mechanism of arthropods. A review. Dev. Comp. Immunol., 6, 601-611.
- SODERHALL K.,UNESTAM T., 1979 - Activation of serum prophenoloxidase in arthropod immunity. The specificity of cell wall glycan activation and activation by purified fungal glycoproteins of crayfish phenoloxydase. Can. J. Microbiol. 25, 406-414.
- SOROKIN. ,1883 - Plant parasites of Man and Animals as causes of infections diseases, 2,268-291.

- TAKESHI O., NOMIYAMA H., YOSHIDA H., KUKITA T., KUHARA S., SAKAKY Y., 1983 - Complete nucleotide séquence of the 26S rRNA gena of *Physarum polycephalum* . Its significance in gene evolution. Proc. Natl. Acad. Sci. USA .Vol. 80, 3163-3167.
- TINKINE R.D., NOVIELLO C., 1971 - Heterokaryons in the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae*. Mycologia 63, 701-712.
- TULLOCH M., 1976 - The genus *Metarhizium*. Trans. Br. mycol. Soc 66 (3), 407-411.
- UNESTAM T., SODERHALL K., 1977 - Soluble fragments from fungal cell walls elicit defense reactions in crayfish. Nature , 267, 45-46.
- Von ARX J.A., 1986 - *Toplyocladium*, a synonym of *Beauveria*. Mycotaxon Vol. xxv (1), 153-158.
- VUILLEMIN P., 1910 - Les conidiosporés. Bull. Soc. Sci. Nancy sér. III, II, 129-172.
- VUILLEMIN P., 1912 - *Beauveria*, nouveau genre de verticilliacées. Bull. Soc. Bot. Fr. 29, 34-40.
- WAT C.K., Mc INNES A.G., SMITH D.G., WRIGHT J.L., VINING L.C., 1977 - The yellow pigments of *Beauveria* sp. Structures of tenellin and bassianin. Can. J. Chem. Vol 55,4090-4098.
- WEISER J., PILLAI J.S., 1981 - *Tolypocladium cylindrosporum* Gams (Deuteromycètes, Moniliales) a new pathogen of mosquito larvae. Entomophaga 26 , 357-361.
- W.H.O. 1984 - Report of the seventh meeting of the scientific working group on biological control of vectors. Geneva 31 pp.
- WOESE C.R., 1980 - In Ribosomes : Structure, Function and Genetics (CHAMBLIN G, CRAVEN G.R., DAVIES J. , DAVIS K., KAHAU et NOMURA M. eds.). University Park Press Baltimore pp. 357-373.
- YIP H.Y., RATH A.C., 1989 - *Microhilum oncooperae* gen. et sp. nov. (Deuteromycotina : Hyphomycètes) : The cause of mycosis on the larvae of *Oncoperae intricata* (Lepidoptera: *Hepialidae*). J. Invert. Pathol. 53, 361-364)

- ZACHARUK R.Y., 1970a - Fine structure of the fungus *Metarrhizium anisopliae* infecting three species of larval Elateridae (Coleoptera).II. Conidial germ tubes and appressoria . J. Invertebr. Pathol.15, 81-91.
- ZACHARUK R.Y.,1970b - Fine structure of the fungus *Metarrhizium anisopliae* infecting three species of larval *Elateridae* (Coleoptera) III. Penetration of the host integument. J. Invertebr. Pathol. 15, 372-396.
- ZIMMERMANN G., 1981 - Gewächshausversuche zur Bekämpfung des Gefurchten Dickmaulrüsslers, *Otiorhynchus sulcatus* F. , mit dem Pilz *Metarrhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. Nachrichtenbl. Deutsch. Pflanzenschutzd 33, 103-108.
- ZIMMERMANN G., 1984 - Weitere Versuche mit *Metarrhizium anisopliae* (Fungi imperfecti, Moniliales) zur Bekämpfung des Gefurchten Dickmaulrüsslers, *Otiorhynchus sulcatus* F, an Topfpflanzen im Gewächshaus. Nachrichtenbl. Deutsch. Pflanzenschutzd 36, 55-59.
- ZIMMERMANN G., SIMONS W.R., 1986 - Experiences with biological control of the black vine weevil *Otiorhynchus sulcatus* (F) In : Fundamental and applied aspects of invertebrate pathology (Eds R.A. SAMSON, J.M. VLAK & D. PETERS). Foundat. Fourth Int. Colloq. Invert. Pathol. Wageningen. Netherlands. pp 529-533.

## Résumé

L'étude de la variabilité génétique de quelques genres et espèces d'Hyphomycètes entomopathogènes et de leurs liens phylétiques, a été entreprise par l'analyse comparative des séquences d'ARNr 28S ainsi que par l'analyse de quelques systèmes enzymatiques. Différentes méthodes ont été utilisées pour construire les arbres: Fitch, parcimonie et Neighbor-joining pour les séquences d'ARN; UPGMA et nuées dynamiques pour les enzymes. Des résultats originaux ont été mis en évidence :

- la proximité phylétique de *N. rileyi* avec le genre *Metarhizium* et celle de *M. oncoerpeae* avec le genre *Beauveria*
- l'éclatement des genres *Tolypocladium* et *Paecilomyces*
- la séparation totale des genres *Tolypocladium* et *Beauveria*
- l'unicité phylétique des espèces: *B. bassiana*, *B. velata*, *N. rileyi*, *V. lecanii*, *P. farinosus* et *T. cylindrosporum*
- la relative hétérogénéité des espèces: *M. anisopliae*, *B. brongniartii* et *P. fumosoroseus*
- la stricte homologie des séquences de *B. sulfurescens* et de *B. bassiana*

Par ailleurs, nous confirmons la divergence des souches de *M. anisopliae* variété major par rapport aux autres souches de *Metarhizium* et nous mettons en évidence l'originalité des souches de *M. anisopliae* originaires de Nouvelle-Zélande.

Enfin, cette étude a conduit à une meilleure compréhension des relations phylétiques entre les espèces entomopathogènes et des espèces pathogènes de plantes.

Mots clés: Phylogénie, Polymorphisme enzymatique, Classification morpho-ontogénique, séquences d'ARNr 28S, Hyphomycètes entomopathogènes, *Beauveria*, *Paecilomyces*, *Metarhizium*, *Verticillium lecanii*, *Nomuraea rileyi*, *Microhilum oncoerpeae*.

## Résumé

L'étude de la variabilité génétique de quelques genres et espèces d'Hyphomycètes entomopathogènes et de leurs liens phylétiques, a été entreprise par l'analyse comparative des séquences d'ARNr 28S ainsi que par l'analyse de quelques systèmes enzymatiques. Différentes méthodes ont été utilisées pour construire les arbres: Fitch, parcimonie et Neighbor-joining pour les séquences d'ARN; UPGMA et nuées dynamiques pour les enzymes. Des résultats originaux ont été mis en évidence :

- la proximité phylétique de *N. rileyi* avec le genre *Metarhizium* et celle de *M. oncoperae* avec le genre *Beauveria*
- l'éclatement des genres *Tolypocladium* et *Paecilomyces*
- la séparation totale des genres *Tolypocladium* et *Beauveria*
- l'unicité phylétique des espèces: *B. bassiana*, *B. velata*, *N. rileyi*, *V. lecanii*, *P. farinosus* et *T. cylindrosporium*
- la relative hétérogénéité des espèces: *M. anisopliae*, *B. brongniartii* et *P. fumosoroseus*
- la stricte homologie des séquences de *B. sulfurescens* et de *B. bassiana*

Par ailleurs, nous confirmons la divergence des souches de *M. anisopliae* variété major par rapport aux autres souches de *Metarhizium* et nous mettons en évidence l'originalité des souches de *M. anisopliae* originaires de Nouvelle-Zélande.

Enfin, cette étude a conduit à une meilleure compréhension des relations phylétiques entre les espèces entomopathogènes et des espèces pathogènes de plantes.

Mots clés: Phylogénie, Polymorphisme enzymatique, Classification morpho-ontogénique, séquences d'ARNr 28S, Hyphomycètes entomopathogènes, *Beauveria*, *Paecilomyces*, *Metarhizium*, *Verticillium lecanii*, *Nomuraea rileyi*, *Microhilum oncoperae*.