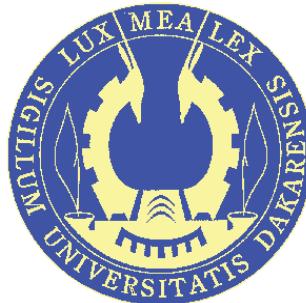


UNIVERSITÉ CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR
FACULTÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE ANIMALE



THÈSE d'ÉTAT

Présentée par

Monsieur Fawrou SEYE

Pour obtenir le grade de

Docteur d'Etat ès Sciences

**CONTRÔLE DU DÉVELOPPEMENT DES
MOUSTIQUES VECTEURS (*ANOPHELES GAMBIAE*
ET *CULEX QUINQUEFASCIATUS*) ET PUCERONS
PAR L'UTILISATION DE BIOPESTICIDES
(PRODUITS DE NEEM ET CHAMPIGNONS)**

Soutenue le: 28 décembre 2013

Devant la commission d'examen :

Président : M. Ousmane FAYE, Professeur, FST, UCAD

Membres : M. Cheikh Tidiane BA, Professeur, FST, UCAD

M. Karamoko DIARRA, Professeur, FST, UCAD

M. Oumar FAYE Professeur, FMPOS, UCAD

M. Mady NDIAYE, Professeur, FST, UCAD (Directeur de Thèse)

Directeur de Thèse, Professeur Mady NDIAYE (UCAD)

RENDRE GRÂCE :

Je rends grâce à ALLAH le tout puissant et Le Prophète MOUHAMED (PSL).

DEDICACES

Je dédie ce travail:

- *À mon père Mor SEYE, que Dieu vous accorde longue vie et santé de fer*
- *À ma défunte mère Aïda SECK, Que DIEU vous accueille à son Paradis*
- *À ma tante Anta NDIAYE, mes frères, sœurs, cousins et cousines, en témoignage de ma sincère affection qui nous unit.*
- *À Tous mes camarades et promotionnaires du laboratoire.*
- *À Tous mes enseignants du primaire à l'université*

AVANT-PROPOS

La présente étude a été réalisée dans l'Unité d'Entomologie, Rickettsiologie, Bactériologie et Virologie dirigée par Monsieur Mady NDIAYE Professeur au Laboratoire de Biologie de la Reproduction dirigé par le Professeur Omar Thiom THIAW, département de Biologie Animale, Faculté des Sciences et Techniques, U.C.A.D.

Pour la partie Scientifique de ce travail, je dois une profonde reconnaissance à mon Maître Monsieur Mady NDIAYE. Vous qui avez accepté de nous initier à la recherche au DEA, et de continuer à nous guider dans la Thèse. J'ai beaucoup appris, à votre contact à faire miennes des qualités essentielles : détermination, rigueur et abnégation dans le travail. Je n'oublierai jamais la confiance que vous m'avez faite. Que DIEU vous accorde longue vie et santé ainsi qu'à tous les membres de la famille.

Je me dois d'exprimer ma gratitude et mes remerciements au Professeur Ousmane FAYE d'avoir accepté de présider ce Jury. En tant que spécialiste en Entomologie, j'espère pouvoir bénéficier de vos remarques et suggestions.

Mes remerciements s'adressent également au Professeur Cheikh Tidiane BÂ, Chef du Département de Biologie Animale, d'avoir accepté d'examiner ce travail. Vous nous avez beaucoup apporté au cours de notre cursus universitaire, nous saluons beaucoup votre grande humanité et votre ouverture.

J'exprime ma profonde gratitude à l'endroit du Professeur Karamoko DIARRA. Nous apprécions beaucoup votre ouverture et votre disponibilité. Vos critiques et suggestions nous permettront sans nul doute de parfaire ce document.

Mes remerciements s'adressent au Pr Oumar FAYE, de la Faculté de Medecine, de Pharmacie et d'Ontostomatologie d'avoir accepté d'être un rapporteur de cette thèse. Vous nous faites l'honneur d'être membre du jury, vos critiques et remarques contribueront à parfaire ce document.

Mes remerciements s'adressent également au Professeur Omar Thiom THIAW Chef du Laboratoire de Biologie de la Reproduction. Vous nous avez beaucoup apporté au cours de notre formation. Que DIEU vous accorde longue vie et santé, et pour toute la famille.

Je remercie le Ministère de la Recherche et de l'Enseignement supérieur d'avoir financé une partie de cette étude dans le cadre des projets "FIRST"

Je remercie toutes les autorités de l'Université Cheikh Anta Diop de Dakar, tous les enseignants de la Faculté des Sciences et Techniques en général et ceux du département de Biologie Animale en particulier.

Je remercie La Banque Islamique du Développement de nous avoir octroyé une bourse d'études pour les hautes technologies ainsi qu'au Professeur Frédéric FRANCIS et tous les membres de l'Unité d'Entomologie Fonctionnelle et Evolutive à Gembloux (Université de Liège).

Je remercie Mme Seynabou NIANG, Louise NIANG et tout le personnel de la Direction des examens et concours pour m'avoir aidé dans le tirage des documents.

Je ne saurais terminer, sans remercier le personnel technique du département de Biologie Animale, plus particulièrement MM. Daouda DIOUF, Doudou NGOM, Mohamed MBENGUE, Edouard COLY, Emmanuel COLY, Ibrahima DIOUF et Michel SARR.

Je remercie également Mme Rokhaya Diouf SENGHOR et Adama MANE Secrétaires au département de Biologie Animale.

LISTE DES FIGURES

<u>Figure 1</u> : Collections d'eau et densité de la population dans la banlieue de Dakar en 1986. (Source : Salem <i>et al.</i> , 1994)	5
<u>Figure 2</u> : Position cartographique des différentes zones de la banlieue de Dakar (images obtenues à partir de Google earth)	5
<u>Figure 3</u> : Evolution des gîtes et des densités larvaires à Thiaroye sur mer du mois d'avril 2009 au mois de mars 2010.....	10
<u>Figure 4</u> : Evolution des densités larvaires et de certains facteurs des gîtes larvaires à Thiaroye sur mer du mois d'avril 2009 au mois de mars 2010	11
<u>Figure 5</u> : Evolution morphologique des gîtes larvaires à SAM-SAM 3 du mois d'avril 2009 au	13
<u>Figure 6</u> : Evolution des densités larvaires et de certains facteurs des gîtes larvaires du mois d'avril 2009 au mois de mars 2010 à Sam-Sam 3	14
<u>Figure 7</u> : Evolution morphologique des gîtes larvaires à Pikine rue 10 du mois d'avril 2009 au mois de mars 2010	16
<u>Figure 8</u> : Evolution des densités larvaires et de certains facteurs des gîtes larvaires du mois d'avril 2009 au mois de mars 2010 à Pikine rue 10	17
<u>Figure 9</u> : Evolution morphologique des gîtes larvaires à Pikine Gnéty mbare du mois d'avril 2009 au mois de mars 2010	19
<u>Figure 10</u> : Evolution des densités larvaires et de certains facteurs des gîtes larvaires du mois d'avril 2009 au mois de mars 2010 à Pikine Gnéty mbare	20
<u>Figure 11</u> : Evolution morphologique des gîtes larvaires à Gadaye du mois d'avril 2009 au mois de mars 2010.....	22
<u>Figure 12</u> : Evolution des densités larvaires et de certains facteurs des gîtes larvaires du mois d'avril 2009 au mois de mars 2010 à Gadaye	23
<u>Figure 13</u> : Les espèces de moustiques échantillonnées dans la banlieue de Dakar	27
<u>Figure 14</u> : Bandes de migration de l'ADN des anophèles échantillonnés dans la banlieue de Dakar du mois d'avril 2009 au mois de mars 2010. 1s à 12s= sam-sam3, 1t à 3t= Thiaroye sur mer, 1p à 6p= Pikine rue 10, 1N à 3N= Pikine Gnéty mbare, 1G à 8G= Gadaye, L= Lader.	28
<u>Figure 15</u> : Méthodes de culture du champignon <i>Aspergillus clavatus</i> (spores et métabolites) en milieu semi-liquide dans un bio-réacteur.	46

Figure 16: Produits de culture d' <i>Aspergillus clavatus</i> : spores (A et C) et métabolites (B) et évolution du pH dans le bioréacteur (D)	49
Figure 17 : Développement du champignon <i>Aspergillus clavatus</i> sur les larves en 24h (A), 48h (B), 72h (C) et sur les adultes (D) de <i>Culex quinquefasciatus</i> après traitement aux spores.	52
Figure 18 : Pourcentage de survie des adultes de <i>Culex quinquefasciatus</i> traités aux produits S+A ou S.....	61
Figure 19 : Pourcentage de mortalités cumulées des adultes de <i>Culex quinquefasciatus</i> traités aux produits S+A ou S.	61
Figure 20: <i>Culex quinquefasciatus</i> mâle non infecté (A) et infecté (B) par <i>Aspergillus clavatus</i> 7 jours après incubation. Ab. = Abdomen, Ai= Aile, An. = Antenne, T. = Tête, Th. = Thorax	62
Figure 21 : Pourcentage de survie des adultes d' <i>Anopheles gambiae</i> et de <i>Culex quinquefasciatus</i> traités avec la formulation huileuse (Suneem) du <i>Métarhizium anisopliae</i> au cours du temps.....	69
Figure 22: Pourcentage de survie des adultes d' <i>Anopheles gambiae</i> et de <i>Culex quinquefasciatus</i> traités avec la formulation aqueuse du <i>Métarhizium anisopliae</i> au cours du temps.	69
Figure 23: Adultes d' <i>Anopheles gambiae</i> (A) et <i>Culex quinquefasciatus</i> (B) infectés après traitement avec le champignon <i>Metarhizium anisopliae</i> et non infectés (témoin) (C et D). (X40)	71
Figure 24: Larves d' <i>Anopheles gambiae</i> infectées par <i>Metarhizium anisopliae</i> formulé avec l'huile de neem (Suneem) en 24h (A et B) et 48h (C et B) (x 400). c= cuticle, At= antenne, Csp= conidiospore, Cs= comb.	79
Figure 25: Nymphes d' <i>Anopheles gambiae</i> infectées par <i>Metarhizium anisopliae</i> formulé avec l'huile de neem (Suneem) en 48h (A et B) (x400). AB= abdomen, C= cuticUle, Pe= palettes, T= thorax.....	79

Figure 26 : Pourcentage cumulés de l'émergence des adultes d' <i>Anopheles gambiae</i> sl avec le traitement de la formulation huileuse du <i>Metarhizium anisopliae</i> et le Suneem au niveau des bacs artificiels en milieu semi-naturel en saison des pluies.....	80
Figure 27: Pourcentages cumulés de l'émergence des adultes de <i>Anopheles gambiae</i> sl traités avec la formrlution huileuse du <i>Metarhizium anisopliae</i> et avec le Suneem en milieu semi-naturel pendant la saison des pluies	80
Figure 28: Coupes transversales de larve de <i>Culex quinquefasciatus</i> non traitée (A) avec des muscles, un épithélium intestinal en bon état entourant la colonne alimentaire, et celles traitées avec les spores d' <i>Aspergillus clavatus</i> présentant un épithélium en destruction (flèches) entourant la lumière intestinale remplie progressivement de spores après 8h (B), 12h (C) et 24h (D). m= muscle, ep= épithélium, n= noyau, ps= plateau strié, mp= membrane péritrophique, sp= spores.	88
Figure 29: Ultrastructures de spores d' <i>Aspergillus clavatus</i> dans le tube digestif des larves de <i>Culex quinquefasciatus</i> après 8h (A), 12h (B) et 24h (C) d'exposition. Gl= globule lipidique, tg= tube germinatif, m pl= membrane plasmique, mp= membrane péritrophique, p= paroi.....	90
Figure 30: Ultrastructure de l'épithélium intestinal d'une larve de <i>Culex quinquefasciatus</i> non traitée (A), et delarves traitées avec des spores d' <i>Aspergillus clavatus</i> 8h (B), 12h (C) et 24h (D) après. Lu= lumière, N= noyau, v= vacuole, mv= microvillosités	90
Figure 31: Ultrastructure du tissu musculaire d'une larve de <i>Culex quinquefasciatus</i> non traitée (A) et de larves traitées avec les spores d' <i>Aspergillus clavatus</i> 8h (B), 12h (C) et 24h (D) après. (a + m) = filaments d'actine et de myosine, sr= reticulum sarcoplasmique.....	92
Figure 32: Ultrastructure de l'épithélium cuticulaire d'une larve de <i>Culex quinquefasciatus</i> non traitée (A) et de larves traitées avec les spores d' <i>Aspergillus clavatus</i> après 8h (B), 12h (C) et 24h (D) d'exposition, Cep= cellule épithéliale, C= Cuticule, N= noyau, m= mitochondrie, er= réticulum endoplasmique, v= vacuoles.	93
Figure 33 : Dispositif d'élevage (A) et de traitement (B et C) des pucerons	99

Figure 34: Adultes de puceron (*Acyrthosiphon pisum*) non traité (A) et traités avec *Aspergillus clavatus* (B), *Metarhizium anisopliae* (C) et *Metarhizium sp* (D) 48h après incubation. (T= tête, Th= thorax, ab= abdomen). Des filaments apparaissent sur la cuticule des insectes (flèches) comparés au témoin (A). Les adultes traités ont été infectés par les champignons *A. clavatus* (B) qui s'est plus développé que *M. anisopliae* (C) et *Metarhizium sp* (D)..... 104

Figure 35: Effets des champignons *Aspergillus clavatus*, *Metarhizium anisopliae* et *Metarhizium sp* sur le taux intrinsèque de la formation de nouvelles générations du puceron *Acyrthosiphon* 106

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Amores des différentes espèces du complexe <i>Anopheles gambiae</i> utilisés .	7
Tableau 2 : Conditions de la PCR	8
Tableau 3 : Paramètres géographiques des différentes zones	9
Tableau 4 : Evolution du pH dans les gîtes au cours du temps.....	12
Tableau 5: Evolution du pH dans les gîtes de Sam-sam au cours du temps	15
Tableau 6 : Evolution du pH dans les gîtes au cours du temps.....	18
Tableau 7: Evolution du pH dans les gîtes au cours du temps.....	21
Tableau 8: Evolution du pH dans les gîtes au cours du temps.....	24
Tableau 9: Tableau de présence des larves de moustiques dans les différents sites entre avril 2009 et mars 2010	24
Tableau 10 : Productivité de trois souches fongiques (<i>Aspergillus clavatus</i> , <i>Metarhizium anisopliae</i> et <i>Metarhizium sp</i>) cultivées sur deux milieux basés sur du son de blé ou du riz décortiqué selon trois états (solide, semi-solide et liquide). Les valeurs d'une même colonne suivies par des lettres différentes sont significativement différentes ($P \leq 0,05$) selon le test de Scheffé associé à l'analyse de variance.....	37

Tableau 11: Doses létales (DL ₅₀ et DL ₉₀) des trois souches fongiques (<i>Aspergillus clavatus</i> , <i>Metarhizium anisopliae</i> et <i>M. sp</i>) produites sur milieu solide de son de blé contre des larves de <i>Culex quinquefasciatus</i> de 3 ^e et 4 ^e stades	38
Tableau 12: Pourcentages de Mortalité (moyenne et écart type) des larves de <i>Culex quinquefasciatus</i> traitées avec des spores d' <i>Aspergillus clavatus</i> produites dans un bioreacteur en phase semi-liquide.	51
Tableau 13: Pourcentages de Mortalité (moyenne et écart type) des adultes de <i>Culex quinquefasciatus</i> traités avec des spores d' <i>Aspergillus clavatus</i> produites dans un bioreacteur en phase semi-liquide.	51
Tableau 14: Mortalités des larves de <i>Culex quinquefasciatus</i> traitées avec différentes doses de solution de métabolites d' <i>Aspergillus clavatus</i>	54
Tableau 15: Mortalités des adultes de <i>Culex quinquefasciatus</i> traités avec deux doses de la solution de métabolite d' <i>Aspergillus clavatus</i>	54
Tableau 16 - Pourcentage de mortalités cumulées des adultes mâles et femelles de <i>Culex quinquefasciatus</i> traités au S+A ou S (A= <i>Aspergillus clavatus</i> , S= Suneem, T= Témoin).	60
Tableau 17: Pourcentage de survie des adultes d' <i>Anopheles gambiae</i> sl traités avec la formulation huileuse et aqueuse de <i>Metarhizium anisopliae</i> à $1,3 \times 10^{10}$ spores/m ²	70
Tableau 18: Pourcentage de survie des adultes de <i>Culex quinquefasciatus</i> traités avec la formulation huileuse et aqueuse de <i>Metarhizium anisopliae</i> à $1,3 \times 10^{10}$ spores/m ²	70
Tableau 19: Doses létales (DL ₅₀ et DL ₉₀) de <i>Metarhizium anisopliae</i> formulate avec le Suneem 1% contre les larves d' <i>Anopheles gambiae</i> dans les conditions de laboratoire (26 ± 2°C, humidité relative 75 ± 4%).	78
Tableau 20: mortalités des pucerons adultes d' <i>Acyrthosiphon pisum</i> traités avec différentes doses de trois souches de champignons <i>Aspergillus clavatus</i> , <i>Metarhizium anisopliae</i> et <i>Metarhizium sp</i>	102
Tableau 21: Doses léthales de trois souches de champignons (<i>Aspergillus clavatus</i> , <i>Metarhizium anisopliae</i> et <i>Metarhizium sp</i>) contre les adultes d' <i>Acyrthosiphon pisum</i>	103
Tableau 22: Taux intrinsèque de la variation des doses de spores d' <i>Aspergillus clavatus</i> , <i>Metarhizium anisopliae</i> et <i>Metarhizium sp</i> sur la production de nymphes d' <i>Acyrthosiphon pisum</i>	106

SOMMAIRE

INTRODUCTION GÉNÉRALE :	1
PARTIE I : ÉCOLOGIE : CARACTÉRISATION MORPHOLOGIQUE DE QUELQUES GITES ET DYNAMIQUE DES POPULATIONS LARVAIRES DES MOUSTIQUES DANS CERTAINES ZONES INONDÉES DE LA BANLIEUE DE DAKAR	3
I- INTRODUCTION.....	4
II MATÉRIEL ET MÉTHODES	4
A. Présentation de la zone d'étude (banlieue de Dakar)	4
B. Récolte des larves et caractérisation des gîtes	6
a. Visite des différentes zones	6
b. Recueil de données.....	6
b1. Coordonnées géographiques :	6
b2. Étude des densités larvaires.....	6
C. Identification des moustiques au laboratoire.....	6
a. Identification morphologique	6
b. Identification par PCR du complexe gambiae.....	7
b1- Extraction de l'ADN :	7
b2- La PCR :	7
III. RESULTATS	9
A. Position géographique des zones étudiées.....	9
B. Evolution morphologique et des facteurs entre avril 2009 et mars 2010	9
1- Thiaroye sur mer	9
2- Sam-sam 3	12
3- Pikine rue 10	15
4- Pikine gnéty mbare	18
5- Gadaye (Guédiawaye)	21
C. Présence des larves dans les gîtes	24
D. Les moustiques échantillonnés:	26
I. DISCUSSION :.....	29
CONCLUSION :	30

PARTIE 2 : LUTTE BIOLOGIQUE CONTRE LES MOUSTIQUES PAR L'UTILISATION DE BIOPESTICIDES (CHAMPIGNONS ENTOMOPATHOGÈNES ET PRODUITS DE NEEM)	31
CHAPITRE 1 : SÉLECTION D'UN MILIEU DE CULTURE POUR UNE PRODUCTION EN MASSE DE CHAMPIGNONS ENTOMOPATHOGÈNES CONTRE LES MOUSTIQUES	32
I. INTRODUCTION	33
II MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	34
A.Isolement des souches	34
B. Production en masse des champignons :	34
C. Récupération et comptage des spores :	34
D. Les moustiques :	35
E. Tests de pathogénicité sur les larves :	35
F. Relevé et analyse des données :	35
III. RÉSULTATS	36
A. Productivité des milieux de culture :.....	36
B. Tests de pathogénicité :.....	37
IV. DISCUSSION.....	38
CONCLUSION :	41
CHAPITRE 2 : PRODUCTION DE CHAMPIGNON EN BIOINDUSTRIE ET TESTS DE PATHOGENICITE SUR LES MOUSTIQUES	42
I. INTRODUCTION	43
II. MATERIEL ET METHODES.....	44
A. Le champignon	44
B. Inocula.....	44
C. Confection du packing	44
D. Bioréacteur	44
E. Récupération des spores	45
F. Filtration des métabolites	47
G. Elevage des moustiques	47
H. Tests de toxicité	47

1. Test Sur des larves	47
2. Test sur les adultes	47
III. RESULTATS ET DISCUSSION.....	48
A. Les produits du système de culture	48
B. Pathogénicité des spores sur <i>Culex quinquefasciatus</i>	50
C. Pathogénicité des métabolites contre <i>Culex quinquefasciatus</i>	53
CONCLUSION.....	55
CHAPITRE 3 : FORMULATION DES CHAMPIGNONS CONTRE LES MOUSTIQUES VECTEURS	56
 FORMULATION DU CHAMPIGNON <i>ASPERGILLUS CLAVATUS</i> CONTRE LES MOUSTIQUES ADULTES <i>CULEX QUINQUEFASCIATUS</i> 57	
I. INTRODUCTION	57
II. MATÉRIEL ET MÉTHODES	58
A. Huile de neem (Suneem 1%).....	58
B. Le champignon	58
D. Les moustiques.....	58
E. Préparation du produit	58
F. Test de toxicité sur les moustiques:	58
G. Analyse des données	59
III. RÉSULTATS	59
IV. DISCUSSION.....	63
CONCLUSION :	64
 FORMULATION DU <i>METARHIZIUM ANISOPliae</i> CONTRE LES ADULTES D'<i>ANOPHELES GAMBIAE</i> SL 65	
I. INTRODUCTION	65
II. MATERIEL ET METHODES	66
A. Echantillonnage des moustiques	66
B. Formulation du champignon:	66
C. Pulvérisation sur les adultes	67
III. RESULTATS	67
IV. DISCUSSION:.....	72
CONCLUSION:.....	74

FORMULATION DU <i>METARHIZIUM ANISOPliaE</i> CONTRE LES LARVES D'<i>ANOPHELES GAMBIAE</i> SL EN MILIEU SEMI-NATUREL	75
I. INTRODUCTION	75
II. MATERIEL ET METHODES.....	76
A. Les larves de moustique.....	76
B. Formulation du champignon.....	76
C. Tests de laboratoire	76
D. Traitement en milieu semi-naturel	77
E. Traitement de données	77
III. RESULTATS	78
A. Tests de laboratoire.....	78
B. Observations Microscopiques	78
C. En milieu semi-naturel	80
IV. DISCUSSION.....	82
CONCLUSION.....	83
PARTIE 3 : HISTOPATHOLOGIE DES LARVES DE <i>CULEX QUINQUEFASCIATUS</i> TRAITEES AU CHAMPIGNON <i>ASPERGILLUS CLAVATUS</i>	84
I. INTRODUCTION	85
II. MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	85
A. Les larves de moustique	85
B. La suspension de spores	86
C. Application des spores sur les larves.....	86
D. Etudes histologiques	86
III. RÉSULTATS	87
A. Microscopie optique	87
B. Microscopie Electronique à Transmission (MET).....	89
1. Activité des spores	89
2. Au niveau du tube digestif	89
3. Au niveau des muscles	91
4. Au niveau de l'épithélium cuticulaire	91
IV. DISCUSSION	94
CONCLUSIONS.....	95

PARTIE 4 : PATHOGENICITE DES CHAMPIGNONS SUR LES PUCERONS :	
<i>ACYRTHOSIPHON PISUM</i> (HARRIS, 1776) (APHIDIDAE)	96
I. INTRODUCTION:	97
II. MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	98
A. Les champignons	98
B. Elevage des pucerons.....	98
C. Tests de pathogénicité	98
D. Traitement des données	100
III. RÉSULTATS ET DISCUSSION.....	100
A. Pathogénicité contre les pucerons adultes.....	100
B. Effets des champignons sur la reproduction	105
CONCLUSION:	107
CONCLUSION GÉNÉRALE	108
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	110
ANNEXES.....	133

INTRODUCTION GÉNÉRALE :

Les moustiques appartenant aux genres *Culex*, *Aedes* et *Anopheles*, sont des vecteurs de parasites responsables de maladies telles que le paludisme, la fièvre jaune et les filariose.

Les conditions climatiques (humidité et température) sont des facteurs abiotiques qui influencent beaucoup la prolifération des moustiques. Les travaux de Robert *et al.* (1998) avaient montré que la prolifération des moustiques à Dakar, précisément *Anopheles arabiensis* était liée à des facteurs abiotiques (pH, turbidité, température, substances minérales) mais aussi biotiques (prédateurs, densité larvaire et présence de végétaux). Salem *et al.* (1994) avait montré l'extension démographique par rapport à l'étendue d'eau dans la banlieue de Dakar. Cependant, depuis quelques années, de fortes pluviométries ont été enregistrées au Sénégal, plus précisément à Dakar accentuant ainsi l'ampleur des étendues d'eau responsables des inondations. Une des zones les plus touchées, est la zone des niayes, caractérisée par une nappe phréatique pas assez profonde. Les étendues d'eaux pérennes ont favorisé le développement des moustiques vecteurs. Avec les pulvérisations fréquentes et utilisations des moustiquaires imprégnées d'insecticides chimiques, des cas de résistances de certaines espèces de moustiques sont apparus. Pour trouver une alternative, la lutte biologique est l'une des méthodes les plus convoitée par les chercheurs. Ceux-ci s'intéressent aux micro-organismes tels que des bactéries, des virus et surtout des champignons entomopathogènes. C'est dans ce cadre que nous avions isolées une souche d'*Aspergillus clavatus* contre des larves d'*Anopheles gambiae*, d'*Aedes aegypti* et de *Culex quinquefasciatus* récoltées à Dakar (Seye *et al.*, 2009). D'autres champignons tels que *Metarrhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* et d'autres espèces du genre *Aspergillus*, ont aussi montré leur efficacité contre les insectes en générale et contre les moustiques en particulier. Pour augmenter l'efficacité de ces champignons, plusieurs méthodes de production en masse et de formulation ont été proposées. Les résultats les plus récents ont révélé la possibilité de produire des métabolites secondaires en milieu de culture liquide contre les moustiques. Cependant, les procédés industriels ont rencontré un certain nombre de problèmes liés à la production de ces produits en bioréacteur tout en contrôlant les paramètres. Une des difficultés de l'utilisation des spores de champignon est la formulation huileuse contre les moustiques (larves et adultes).

Dans cette Thèse, nous avons adopté une démarche logique nous permettant d'atteindre les objectifs suivants :

- montrer l'évolution morphologique des gîtes et les densités larvaires des moustiques dans la banlieue de Dakar pendant 12 mois,
- sélectionner des champignons pathogènes contre ces moustiques et un milieu de culture productif en spores,
- mettre au point une méthode de production industrielle de produits d'origine fongique contre les moustiques,
- obtenir une formulation efficace des spores contre les moustiques,
- montrer la pathogénicité des spores en histologie (histopathologie),
- montrer le spectre d'action des champignons sur un autre modèle d'insecte vecteur tel que le puceron (*Acyrthosiphon pisum*).

PARTIE I : ECOLOGIE

**CARACTÉRISATION MORPHOLOGIQUE DE QUELQUES GÎTES ET DYNAMIQUE
DES POPULATIONS LARVAIRES DES MOUSTIQUES DANS CERTAINES ZONES
INONDÉES DE LA BANLIEUE DE DAKAR**

I- INTRODUCTION

Les moustiques sont des insectes vecteurs se développant en grande partie dans les zones de climat tropical. Certains facteurs biotiques et abiotiques influencent leur développement. Toutes les espèces n'ont pas les mêmes exigences pour assurer leur cycle biologique. Les larves des espèces appartenant au genre *Culex* se développent généralement dans les gîtes plus ou moins pollués, contrairement aux espèces d'anophèles qui préfèrent les gîtes constitués d'eau claire et moins profondes (Robert *et al.*, 1998).

Toutefois, des études ont pu montrer qu'au Sénégal et plus particulièrement à Dakar, le développement de ces moustiques est favorisé également par une forte urbanisation (Salem *et al.*, 1994).

La présence de manière endémique de certaines maladies telles que le paludisme dans certaines zones à Dakar serait due à la présence annuelle des vecteurs. Une lutte ne serait efficace contre ces insectes sans pour autant faire une étude sur la potentialité des gîtes larvaires et sur certains facteurs qui favoriseraient leur développement.

Les objectifs visés dans cette étude sont :

- Caractériser certains gîtes larvaires pendant 12 mois,
- Déterminer les densités larvaires dans chaque gîte,
- Identifier les espèces qui s'y développent.

II- MATERIEL ET METHODES

A- Présentation de la zone d'étude (banlieue de Dakar)

Notre zone d'étude se situe entre 14° 44' N et 17° 20' W. C'est une zone en pleine extension démographique avec plus de 2,5 millions d'habitants. Les travaux de Salem *et al.*, 1994 ont montré l'évolution de cette extension démographique par rapport aux étendues d'eaux (fig.1). Cependant, les fortes pluies enregistrées lors des dernières années font que ces zones connaissent beaucoup de difficultés liées à des inondations saisonnières (hivernage), favorisant ainsi l'extension d'eaux aux niveaux des dépressions et des cuvettes. Ce qui explique aujourd'hui l'existence de plusieurs gîtes larvaires en périodes hivernale et post-hivernale. Malgré cela, la population continue à occuper les zones à proximité des gîtes larvaires après comblement des dépressions.

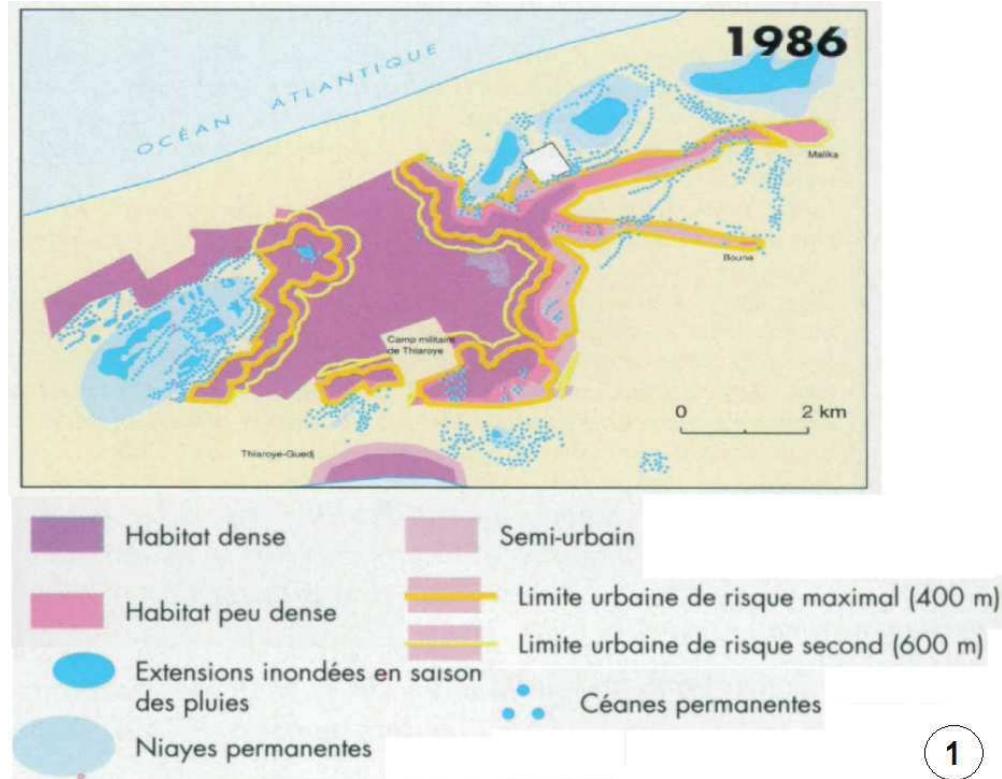


Figure 1 : Collections d'eau et densité de la population dans la banlieue de Dakar en 1986.

(Source : Salem *et al.*, 1994)



Figure 2 : Position cartographique des différentes zones de la banlieue de Dakar (images obtenues à partir de Google earth)

B- Récolte des larves et caractérisation des gîtes

Les sorties de prospection se sont déroulées pendant la première quinzaine de chaque mois du mois d'avril 2009 au mois de mars 2010. Pour chaque sortie, nous avons effectué les opérations suivantes:

a- Visite des différentes zones

Au niveau de chaque site, nous avons prospecté les gîtes (étendues d'eaux) pour choisir ceux présentant des larves de moustiques. Ces gîtes sont ainsi ciblés et suivis durant une année. Après avoir constaté la présence de larves, nous avons effectué des mesures.

b- Recueil de données

b1-Coordonnées géographiques :

Une fois un gîte repéré, nous avons pris les coordonnées géographiques avec le GPS (5 mesures par gîte). La moyenne des 5 valeurs obtenues est prise comme repère géographique. Ces valeurs nous ont permis de cartographier les différentes zones en utilisant un logiciel libre (Google earth). Nous avons ensuite caractérisé les gîtes par des mesures du pH de l'eau, de la température (ambiante et de l'eau) et de l'humidité relative. Chaque gîte a été photographié.

b2-Etude des densités larvaires

Pour chaque gîte, nous avons utilisé une épuisette de 13 cm de diamètre. Le prélèvement des larves s'est fait à plusieurs endroits au niveau du gîte. Les larves sont prélevées d'un seul coup pour le comptage. Elles ont été ensuite remises au même endroit. Cette opération a été effectuée 3 fois. La moyenne des 3 prélèvements constitue la densité (nombre de larves par coup de prélèvement).

C- Identification des moustiques au laboratoire

a- Identification morphologique

Après avoir étudié la densité larvaire, nous avons récolté et transporté des larves dans des seaux à couvercle troué pour permettre aux larves de respirer.

Du mois de mai 2009 au mois de mars 2010, nous avons fait une sortie par mois. Pour chaque sortie, nous avons effectué les mêmes opérations (étudier la densité, mesurer les facteurs externes, photographier les sites et récolter des larves pour identification).

b- Identification par PCR du complexe gambiae

b1- Extraction de l'ADN :

Pour chaque site, les anophèles adultes ont été conservés dans différents tubes contenant du Carnoy 2. Pour chaque échantillon, l'extraction s'est faite sur les moustiques entiers. Ils ont été broyés dans 200 µl de tampon CTAB 2% (Cetyl trimethyl ammonium bromide) et placés au Bain-marie 65° C pendant 5 mn. 200 µl de chloroforme ont été ensuite ajoutés avant de secouer. Le tout a été centrifugé à 12000 tr/mn. La phase supérieure a été ensuite prélevée et mise dans un autre tube. Nous avons ensuite ajouté 200µl d'isopropanol sur ce surnageant et mélangé par inversion avant de centrifuger à 12000 tr/mn pendant 15 mn. L'isopropanol a été retiré avant d'égouter et d'ajouter 200µl d'éthanol 70%. Nous avons centrifugé ensuite à 12000 tr/mn avant de vider l'éthanol. Après séchage pendant 5 mn au speed-vac, nous avons repris dans 20 µl d'H₂O sans vortexer et laisser en suspension pendant toute la nuit.

b2- La PCR :

Pour la PCR, nous avons utilisé ces amorces du complexe gambiae (Scott *et al.*, 1993):

Tableau 1 : Amorces des différentes espèces du complexe *Anopheles gambiae* utilisés

	Amorces
UN	GTGTGCCGCTTCCTCGATGT
<i>Anopheles gambiae</i> ss	CTGGTTGGTCGGCACGTTT
<i>Anophels merus</i>	T GACCAACCCACTCCCTTGA
<i>Anopheles arabiensis</i>	:AAGTGTCCCTCTCCATCCTA
<i>An. quadriannulatus</i>	: CTGGTTGGTCGGCACGTTT

Pour un volume de 25 µl par réaction (par échantillon), nous avons utilisé le master mix indiqué dans le tableau 2

Tableau 2 : Conditions de la PCR

Réactifs	Concentration finale	Pour un échantillon à 25 µl
Tampon de Taq 10x	1 X	2,5 µl
Contenant 15 Mm MgCl ₂		1,5 mM
5 mM dNTP	0,2 mM	1,0 µl
Primer UN (10 µM)	5 pmoles	0,5 µl
Primer AG	5 pmoles	0,5 µl
Primer AA	5 pmoles	0,5 µl
Primer AM	5 pmoles	0,5 µl
Taq DNA Polym (5 U/µl)	0,25 U	0,05 µl
ddH ₂ O		17,95 µl
DNA template (1 à 5 ng/µl)		1,5 µl

Amplification : 3' [30'', 30'', 10''] 40°c 5' à 56°C

La taille attendue pour chaque espèce est de :

An. gambiae ss: 390bp

An. arabiensis : 315pb

An. melas : 464 pb

Le gel d'agarose a été utilisé avec des trous dans lesquels les échantillons mélangés au bleu d'ADN ainsi que le lader comme référence ont été introduits. Chaque trou correspond à un échantillon de récolte pour chaque zone. La migration a été faite grâce à une cuve d'électrophorèse.

III- RESULTATS

A- Position géographique des zones étudiées

Tableau 3 : Paramètres géographiques des différentes zones

	Sites				
Paramètres géographiques	Thiaroye/mer	Sam-sam 3	Pikine technopole	Pikine mbar	niéty (Gadiaye)
Position géographique	14°44'31''N 17°23'53''W	14°45'41''N 17°21'25''W	14°45'32''N 17°23'53''W	14°46'04''N 17°22'32''W	14°46'55''N 17°22'00''W
Altitude	19 m	19 m	14 m	19 m	17 m

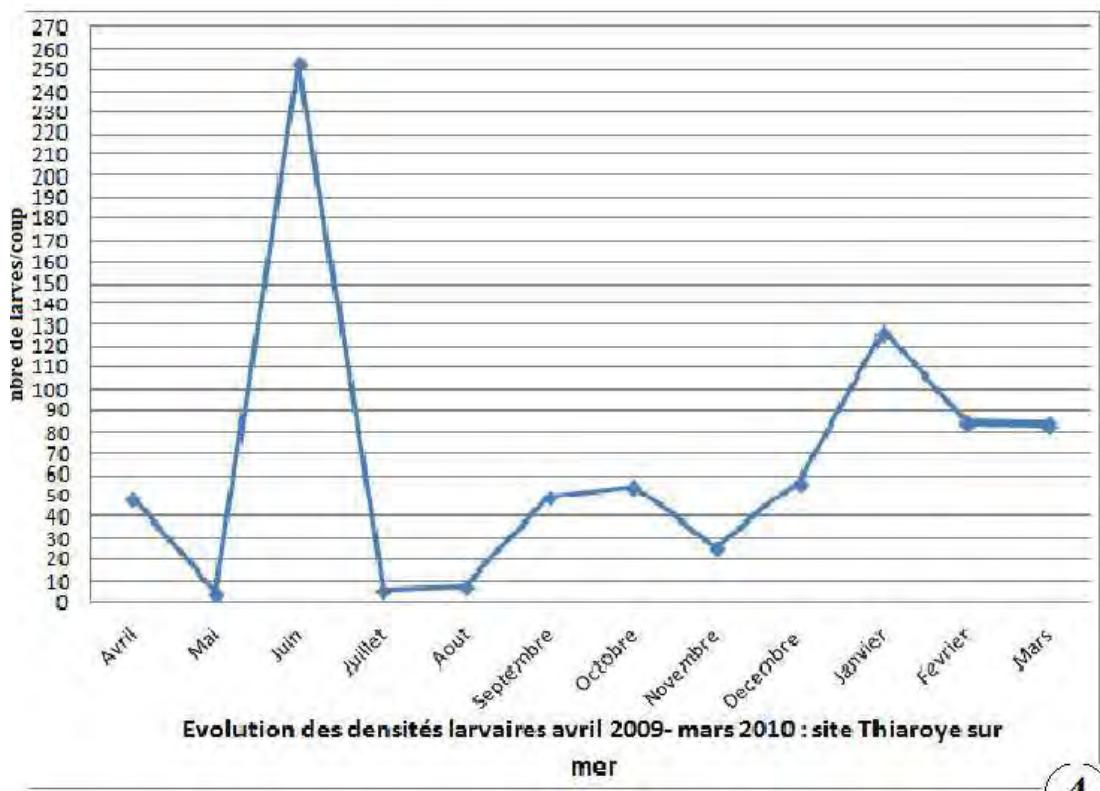
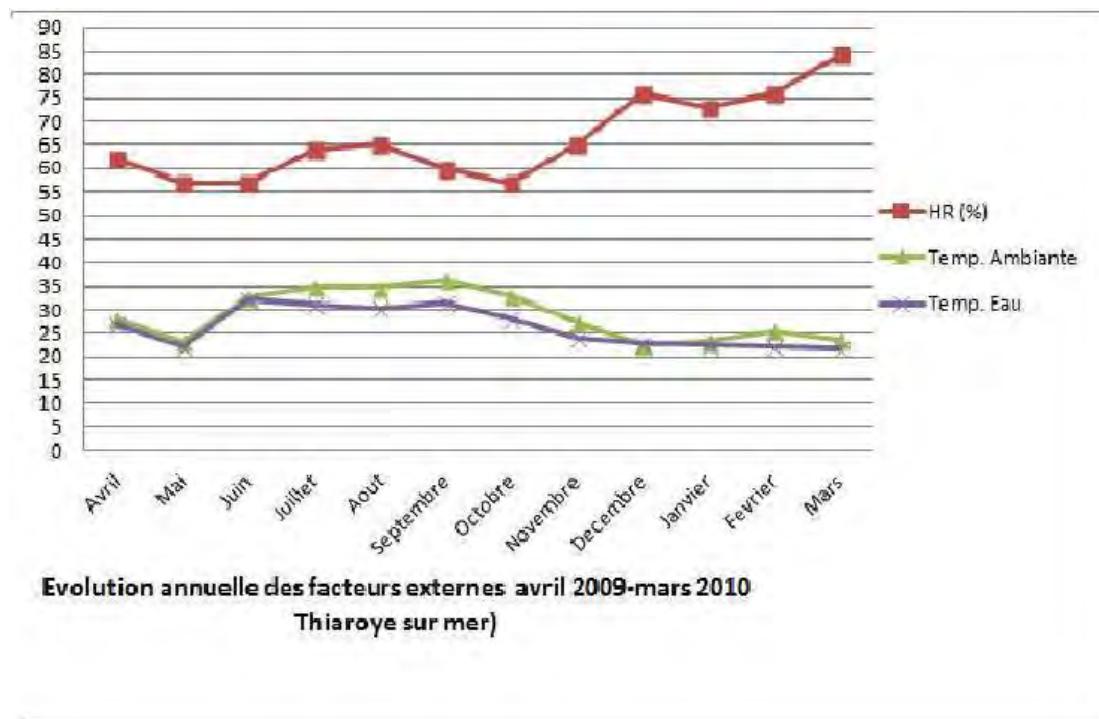
B- Evolution morphologique et des facteurs entre avril 2009 et mars 2010

1- Thiaroye sur mer (fig 3)

Dans cette zone, le canal d'évacuation d'eau venant du quartier LANSAR vers la mer, constitue un gîte pérenne. Les moustiques s'y développent durant toute l'année. En période des pluies, le canal est débordé à cause des eaux de pluies (Figure 3). L'eau s'élargit ainsi tout au tour du canal (de juillet à septembre) pour constituer d'autres gîtes temporaires. L'action de l'homme a joué un rôle positif par le désherbage du canal mais aussi un rôle négatif car, ce canal sert un lieu de dépôt d'ordures et d'eaux usées par les habitants environnants. Ce qui favorise davantage la prolifération des moustiques du genre *Culex*.



Figure 3 : Evolution des gîtes et des densités larvaires à Thiaroye sur mer du mois d'avril 2009 au mois de mars 2010



4

Figure 4 : Evolution des densités larvaires et de certains facteurs des gîtes larvaires à Thiaroye sur mer du mois d'avril 2009 au mois de mars 2010

Tableau 4 : Evolution du pH dans les gîtes au cours du temps

Avril	Mai	Juin	Juillet	Août	Septembre	Octobre	Novembre	Décembre	Janvier	Février	Mars
8,27	7,83	9,28	8,9	8,5	8,39	7,9	7,95	7,4	7,49	7,8	7,93

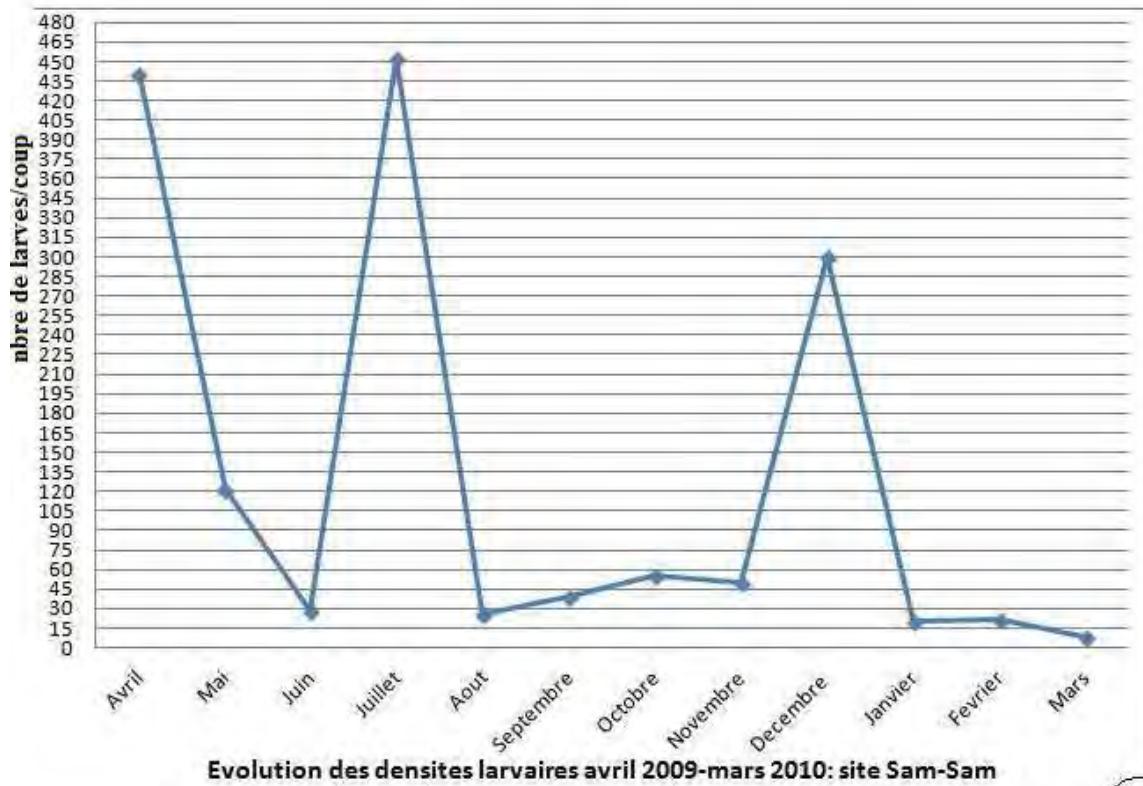
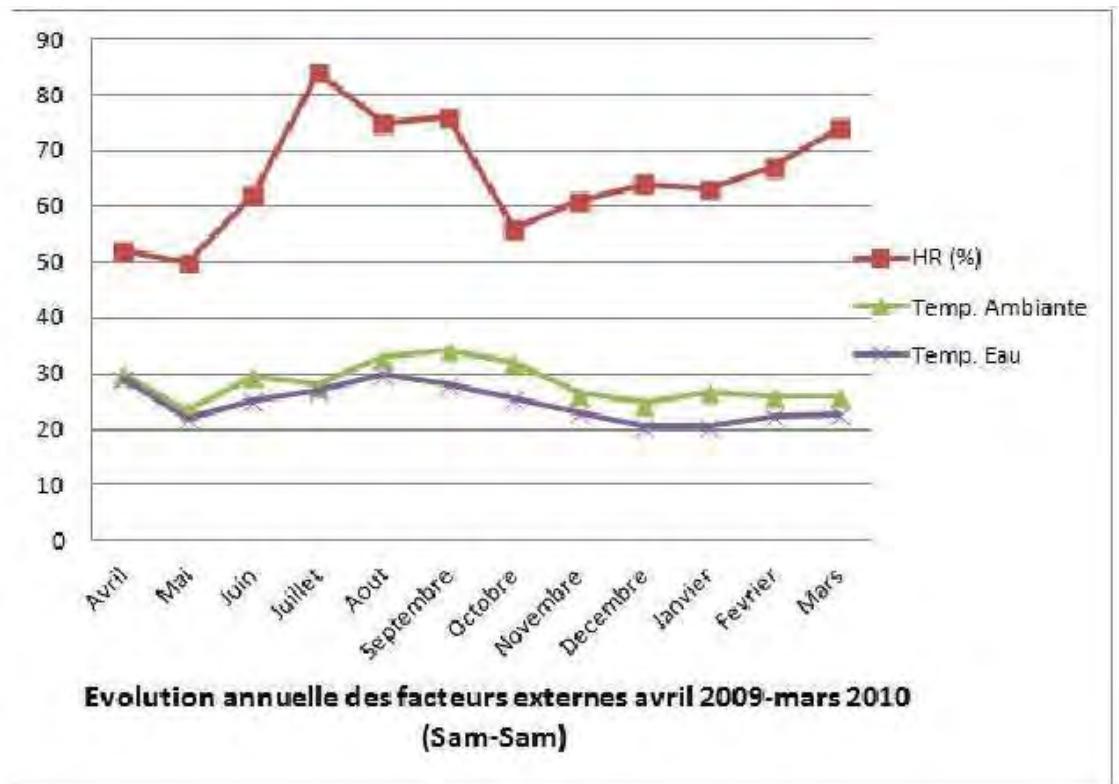
Les valeurs enregistrées au niveau de cette zone montrent deux périodes où l'humidité relative est plus élevée (juin-août et novembre- janvier). Par contre, c'est seulement pendant la première période où les températures (ambiante et de l'eau) sont plus élevées (fig 4), la température de l'eau étant toujours inférieure à celle ambiante. Pour l'évolution des densités larvaires (fig 4), le plus grand pic a été observé au mois de juin avec ($\text{pH}= 9,28$) avant de commencer à diminuer. Un autre pic a été observé au mois de janvier.

2- SAM-SAM 3 (fig 5)

Ce site comprend plusieurs gîtes pérennes constitués pour la grande partie d'eaux d'inondation. L'école " KELESAN" (Fig. 5) est complètement envahie par les eaux qui débordent en période hivernale (juillet à octobre). L'activité de l'homme par la présence de pompes motorisées, a joué un grand rôle dans l'instabilité de ces gîtes (turbidité des eaux). Par contre, le retrait de l'eau laisse sur place des cuvettes remplies d'eau claire présentant des larves d'*An. gambiae*.



Figure 5 : Evolution morphologique des gîtes larvaires à SAM-SAM 3 du mois d'avril 2009 au mois de mars 2010



6

Figure 6 : Evolution des densités larvaires et de certains facteurs des gîtes larvaires du mois d'avril 2009 au mois de mars 2010 à Sam-Sam 3

Tableau 5: Evolution du pH dans les gîtes de Sam-sam au cours du temps

Avril	Mai	Juin	Juillet	Août	Septembre	Octobre	Novembre	Décembre	Janvier	Février	Mars
7,9	8,2	7,6	8,8	8,1	8,9	9,8	8,5	8,3	8,4	8,2	9,4

Les courbes montrent deux périodes où l'humidité relative est plus élevée (juin-septembre et novembre- mars). Nous avons constaté 3 pics de densités larvaires (avril, juillet et décembre) (fig 6). Le pH varie rarement durant toute la période d'étude.

3- Pikine rue 10 (fig 7)

C'est un site dont la majeure partie de l'eau vient du technopole (partie Est). Il existe des soubassements de la périphérie du gîte provoquant ainsi l'arrivée de l'eau du technopole qui est pauvre en matières organiques. Cependant nous avons constaté des perturbations régulières des gîtes avec des densités larvaires qui présentent des fluctuations dues à l'activité de l'homme (remblayage pour construction et importants dépôts d'ordures). L'humidité relative a montré un taux élevé entre juin-septembre et au mois de mars (fig 7). Nous avons constaté une augmentation du pH entre juin et novembre coïncidant avec l'arrivée d'eaux de pluie et du technopole.



Figure 7 : Evolution morphologique des gîtes larvaires à Pikine rue 10 du mois d'avril 2009 au mois de mars 2010

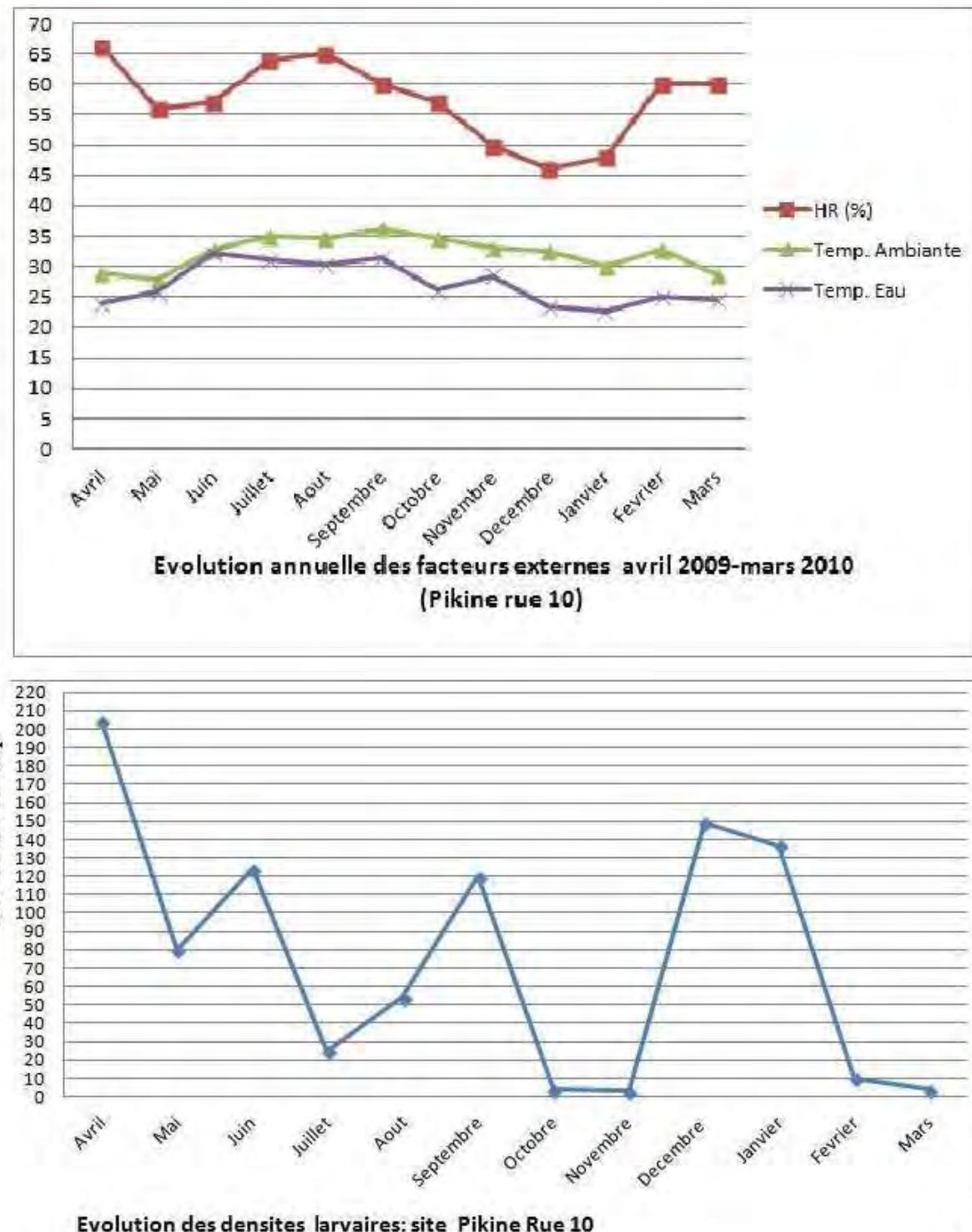


Figure 8 : Evolution des densités larvaires et de certains facteurs des gîtes larvaires du mois d'avril 2009 au mois de mars 2010 à Pikine rue 10

Tableau 6 : Evolution du pH dans les gîtes au cours du temps

Avril	Mai	Juin	JUILLET	Août	Septembre	Octobre	Novembre	Décembre	Janvier	Février	Mars
7,92	7,1	9,29	8,9	8,51	8,39	9,04	10,35	7,58	7,63	7,52	8,3

Le pH augmente en période hivernale de juin à fin Novembre avant de diminuer vers le mois de février.

4- Pikine niéty mbare (fig 9)

C'est un site à découvert avec de vieilles maisons abandonnées pleines d'eaux. La matière organique y est très concentrée car c'est une zone de dépôt d'ordures et d'eaux usées par les habitants. En période hivernale, nous avons constaté un élargissement des gîtes constitués d'eaux de pluie mélangées à de la matière organique.



Figure 9 : Evolution morphologique des gîtes larvaires à Pikine Gnety mbare du mois d'avril 2009 au mois de mars 2010

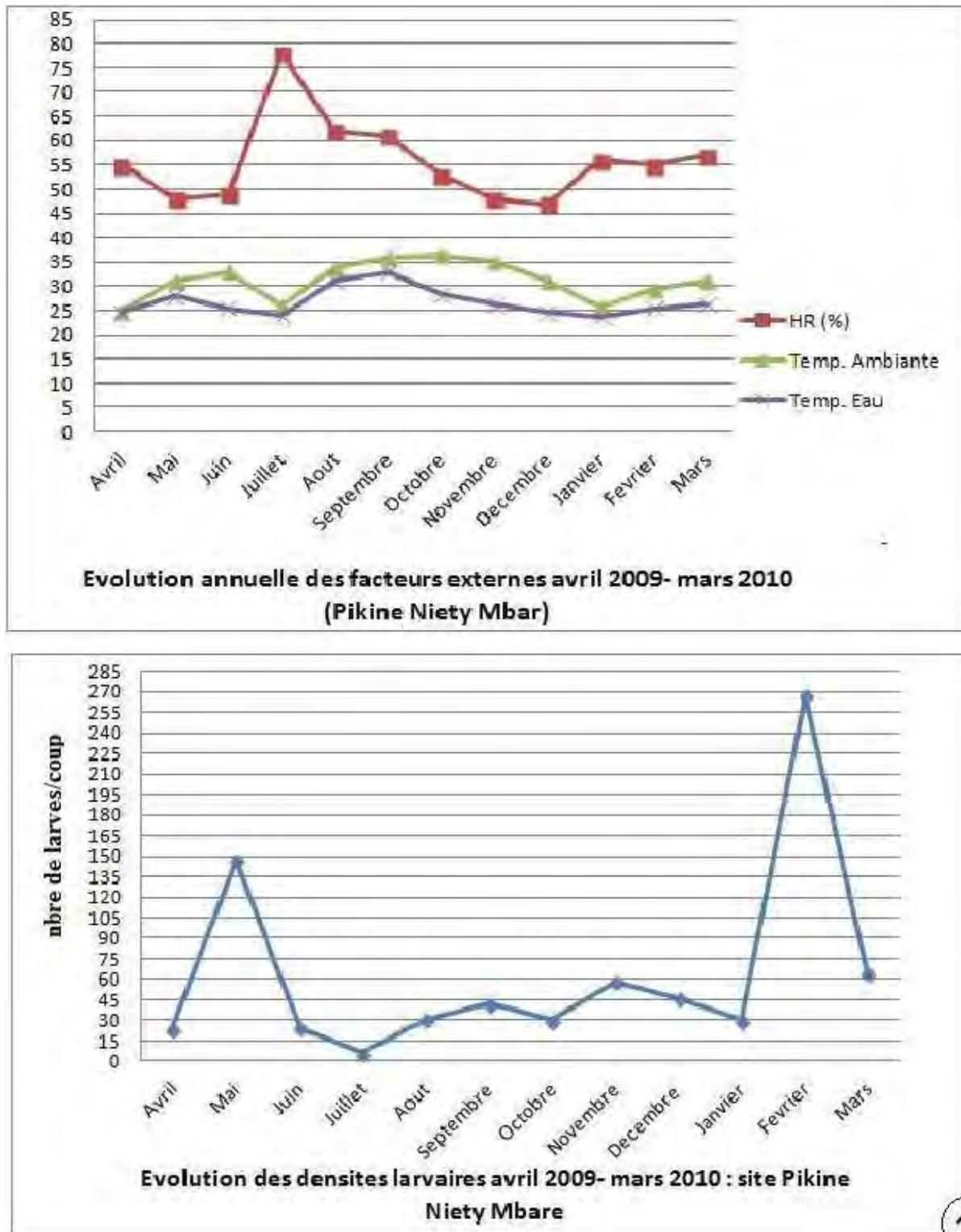


Figure 10 : Evolution des densités larvaires et de certains facteurs des gîtes larvaires du mois d'avril 2009 au mois de mars 2010 à Pikine Gnéty mbare

Tableau 7: Evolution du pH dans les gîtes au cours du temps

Avril	Mai	Juin	Juillet	Aout	Septembre	Octobre	Novembre	Décembre	Janvier	Février	Mars
7,5	7,7	8,6	8,7	7,7	9,1	8,46	7,6	7,5	7,8	7,9	7,8

Les eaux ont un pH favorable au développement d'*An. gambiae* (pH>8) de juin à octobre. L'humidité relative a été plus élevée au mois de juillet où nous avons constaté une baisse de la température (fig 10). Les 2 pics de densités larvaires sont observés en mai et en février correspondant à la période post-hivernale. La nature des gîtes est plus favorable pour le genre *Culex* avec les ordures dans les maisons à moitié détruites en dehors des habitations. Alors qu'en période hivernale, nous avons constaté une forte présence de prédateurs (têtards, Odonates etc). Les eaux avaient envahi presque la totalité du site rendant difficile l'accès à certains endroits pour pouvoir couvrir toute la zone.

5- Gadaye (Guédiawaye) (fig 11)

Ce site est une grande étendue d'eau colonisée par des typhas. C'est une zone à forte activité humaine avec les activités maraîchères nécessitant parfois la création de creusage qui sert de moyen de captage d'eau de la nappe phréatique en dehors de la période hivernale. Ce qui crée en même temps des gîtes artificiels. Dans ce site, l'arrivée des eaux de pluie au mois d'août a entraîné un remplissage de ces fossés créant un élargissement des gîtes. L'humidité relative a varié temporairement, mais les fortes densités larvaires sont enregistrées en juin et en février.



Figure 11 : Evolution morphologique des gîtes larvaires à Gadiye du mois d'avril 2009 au mois de mars 2010

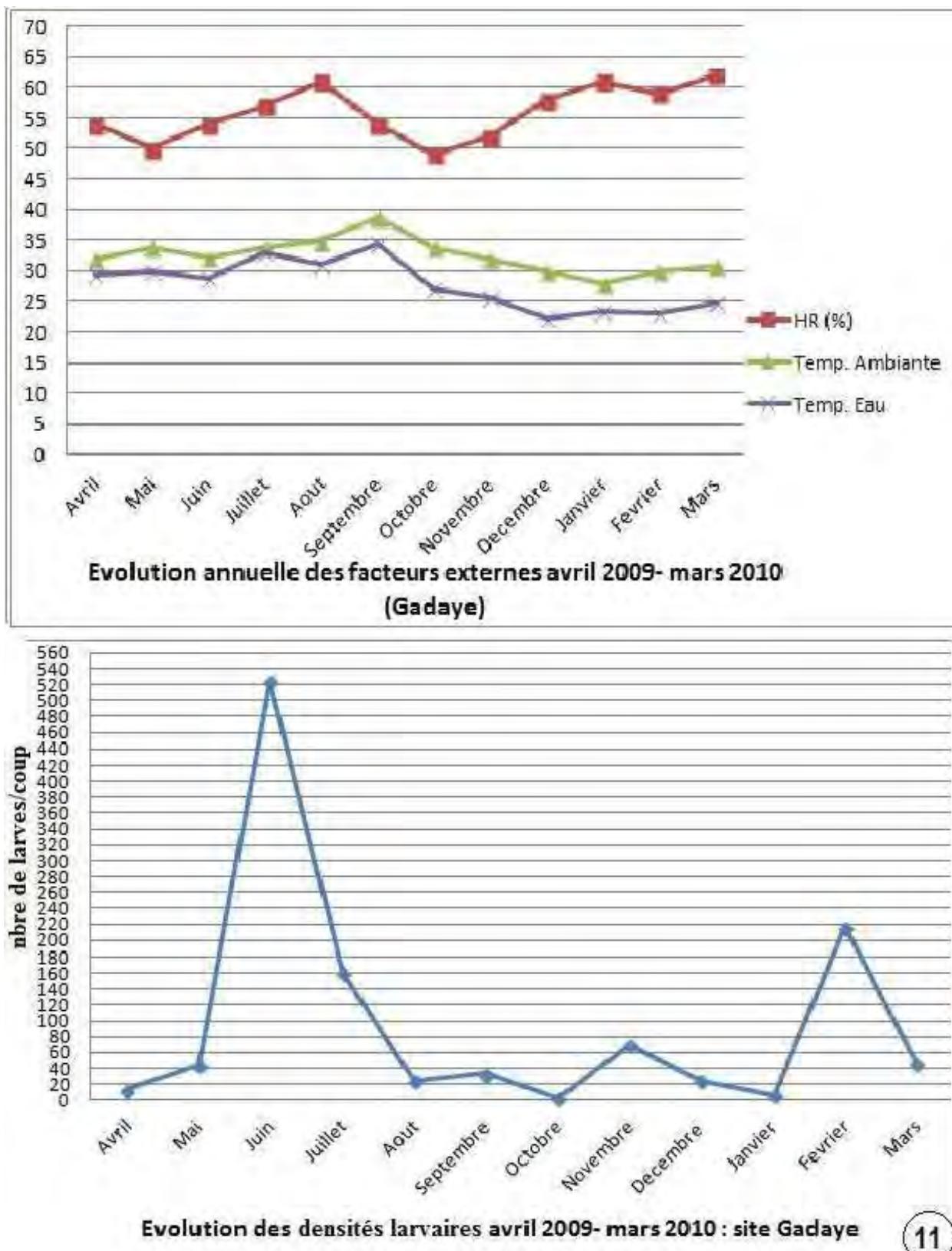


Figure 12 : Evolution des densités larvaires et de certains facteurs des gîtes larvaires du mois d'avril 2009 au mois de mars 2010 à Gadaye

Tableau 8: Evolution du pH dans les gîtes au cours du temps

Avril	Mai	Juin	JUILLET	Aout	Septembre	Octobre	Novembre	Décembre	Janvier	Février	Mars
8,5	8,9	8,1	8,7	7,8	8,1	7,9	7,7	7,5	8,1	7,9	8,1

C- Présence des larves dans les gîtes**Tableau 9:** Tableau de présence des larves de moustiques dans les différents sites entre avril 2009 et mars 2010

Especes	Zones prospectées				
	Thiaroye	Sam-Sam	Pikine rue 10	Pikine niéty mbar	Gadaye (Guédiawaye)
Avril					
<i>An. gambiae</i>	-	+	-	--	++
<i>Cx quinquefasciatus</i>	+	++	++	+	++
<i>Cx tigripes</i>	--	--	--	--	--
Mai					
<i>An. gambiae</i>	--	+	--	--	++
<i>Cx quinquefasciatus</i>	+	++	++		+
<i>Cx tigripes</i>	--	--	--	--	--
Juin					
<i>An. gambiae</i>	--	+	+	--	+
<i>Cx quinquefasciatus</i>	++	++	++	++	++
<i>Cx tigripes</i>	--	--	--	--	+
JUILLET					
<i>An. gambiae</i>	-	+	+	-	+
<i>Cx quinquefasciatus</i>	++	++	++	++	++
<i>Cx tigripes</i>	+	-	-	+	+

Août					
<i>An. gambiae</i>	+	++	++	++	++
<i>Cx quinquefasciatus</i>	+	+	+	+	+
<i>Cx tigripes</i>	+	-	-	+	+
Septembre					
<i>An. gambiae</i>	++	++	++	++	++
<i>Cx quinquefasciatus</i>	+	+	+	+	+
<i>Cx tigripes</i>	-	-	-	+	+
Octobre					
<i>An. gambiae</i>	--	++	++	++	+
<i>Cx quinquefasciatus</i>	--	++	+	+	--
<i>Cx tigripes</i>	--	-	-	-	--
Novembre					
<i>An. gambiae</i>	--	++	+	--	+
<i>Cx quinquefasciatus</i>	+	-	--	++	++
<i>Cx tigripes</i>	--	--	--	--	+
Décembre					
<i>An. gambiae</i>	--	+	--	--	-
<i>Cx quinquefasciatus</i>	++	++	++	++	+
<i>Cx tigripes</i>	--	--	--	--	--
Janvier					
<i>An. gambiae</i>	-	+	-	--	--
<i>Cx quinquefasciatus</i>	++	+	++	+	+
<i>Cx tigripes</i>	-	--	++	--	--
Février					
<i>An. gambiae</i>	--	+	--	--	--

<i>Cx</i>					
<i>quinquefasciatus</i>	++	+	+	++	++
<i>Cx tigripes</i>	--	--	+	--	--
Mars					
<i>An. gambiae</i>	+	+	-	--	--
<i>Cx</i>					
<i>quinquefasciatus</i>	++	--	--	++	+
<i>Cx tigripes</i>	--	--	--	--	+

++ = abondante, + = moyenne, - = faible, -- = non trouvée

Ce tableau montre que, *Anophèles gambiae* s.l. est retrouvée dans tous les sites visités avec des périodes où elle est plus fréquente (août-octobre). Cependant, cette espèce est plus présente à Sam-Sam où elle est récoltée pendant toute l'année, suivi du site Guédiawaye où elle est retrouvée du mois d'avril au mois de novembre. Elle est aussi plus abondante en période hivernale qu'en période post-hivernale pour chaque site.

Par contre, l'espèce *Culex quinquefasciatus* est retrouvée dans tous les sites durant toute l'année (tableau 9). Cependant, elle est moins abondante en période hivernale par rapport à *An. gambiae*. *Culex tigripes* a été récolté au niveau de tous les sites, mais elle est très rare à Sam-Sam. Elle est plus fréquente à Gadaye et à Pikine Niéty mbare.

D- Les moustiques échantillonnés:

Les clés d'identification morphologiques nous a permis de répertorier les espèces suivantes : *Anopheles gambiae* sl (Fig. 13 A, B et E) , *Culex quinquefasciatus* (fig. 13 C et F) et *Culex tigripes* (Fig. 13 D). Avec les échantillons d'anophèles, la Technique de PCR nous a permis de préciser que c'était *Anopheles arabiensis* avec des bandes qui apparaissent à 315 pb (fig 14). La PCR révèle qu'*An. arabiensis* était présent durant 12 mois à Sam-Sam3 (d'avril 2009 à mars 2010), en août, septembre et mars à Thiaroye sur mer, de juin à novembre à Pikine rue 10, d'août à octobre à Pikine niéty mbar et d'avril à novembre à Gadaye.

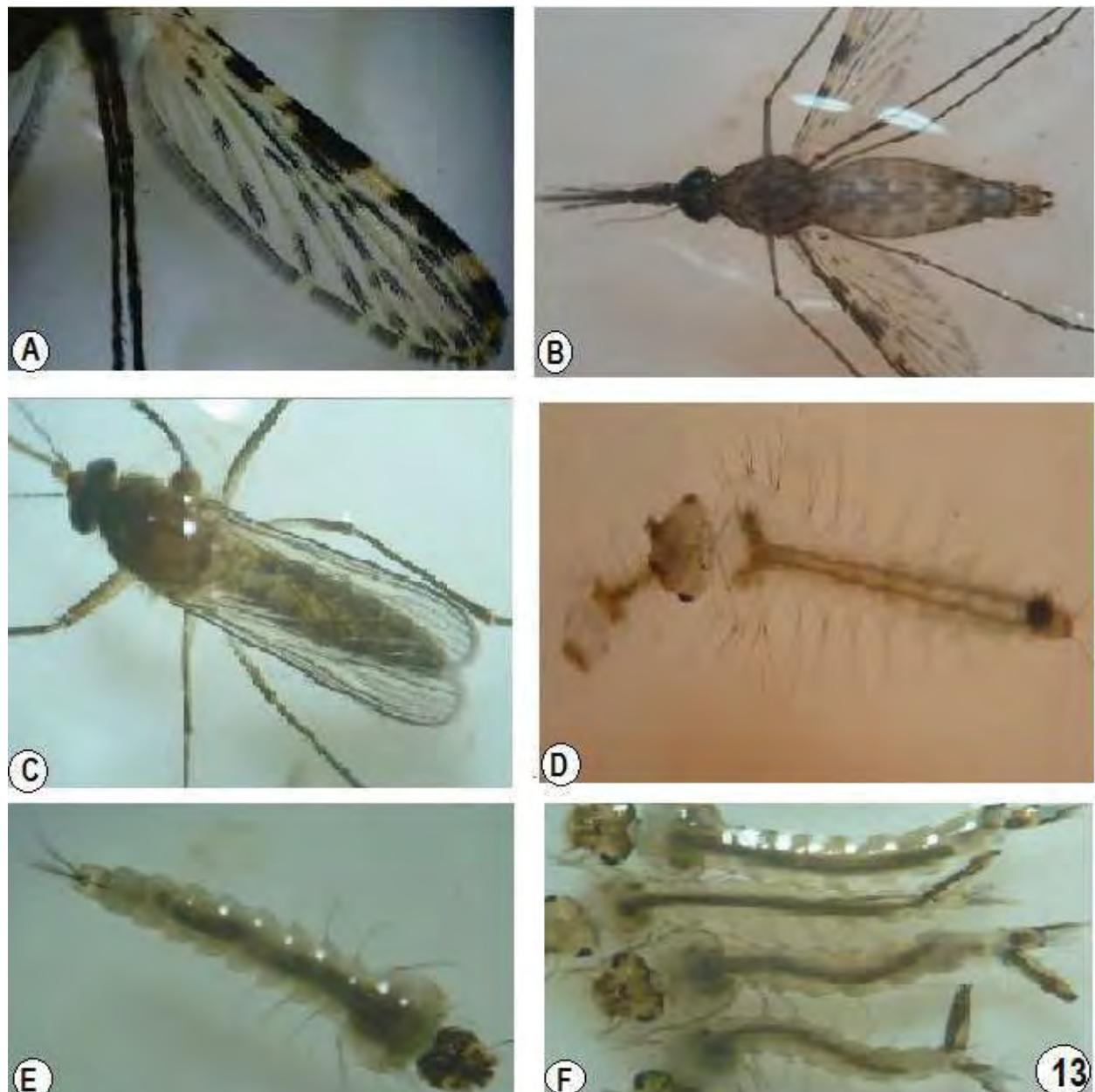
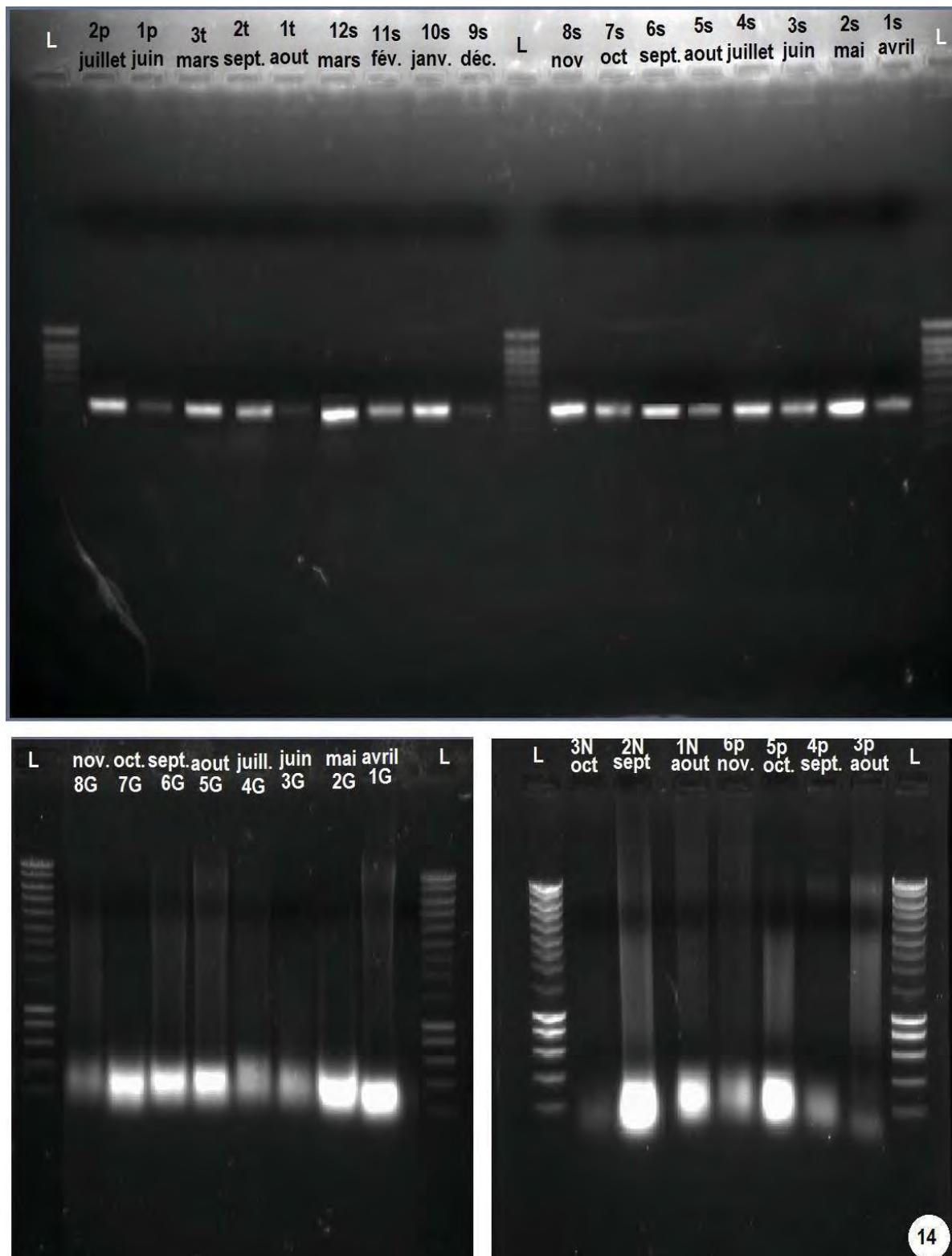


Figure 13 : Les espèces de moustiques échantillonnées dans la banlieue de Dakar



IV-DISCUSSION :

Les données que nous avons recueillies entre le mois d'avril 2009 et le mois de mars 2010 ont montré que les larves de *Culex quinquefasciatus* se développaient dans tous les sites que nous avons visités. Les larves d'*Anopheles gambiae* s.l. n'étaient récoltées que dans les gîtes constitués d'eau claire en période post-hivernale. Avec le site pikine gnéty mbare, nous avons constaté une baisse significative de larves lors de nos sorties en période hivernale. Ce qui serait due à un phénomène de lessivage pendant les fortes pluies constatées. Pour tous les sites, les larves de *Culex quinquefasciatus* deviennent moins abondantes contrairement aux larves d'*Anopheles gambiae* s.l. pendant la période hivernale. Cette abondance d'*An. gambiae* sl constatée en période hivernale confirme d'ailleurs les travaux de Robert *et al.*, 1998. Ces larves d'anophèles se développaient dans les eaux plus claires avec un pH basique mais le plus souvent dans des gîtes pas assez larges, ce qui rejoint les travaux de Sunahara *et al.* (2002). Ceci est du au fait que, ces deux espèces se développent dans des gîtes préférentiels à pH bien déterminé. Cependant, nous avons constaté que, *Cx quinquefasciatus* et *An. gambiae* sl peuvent se retrouver dans un même gîte mais à pH ≥ 8 . En effet, les larves de *Culex quinquefasciatus* ont été récoltées dans les gîtes où le pH varie entre 7,1 et 8,27. Ce qui confirme bien les travaux de Umar et Don-Pedre, 2008. Cependant, *An. gambiae* sl peut aussi se développer exceptionnellement dans des gîtes à un pH<8 en même temps que les larves de *Culex quinquefasciatus*, ce qui a été observé à Thiaroye sur mer au mois de mars (pH= 7,9).

Les modifications observées au niveau des gîtes pendant la période hivernale, sont typiquement les mêmes sur le plan caractérisation (augmentation progressive du niveau d'eau, de la température, et du pH). Cependant, les densités larvaires ont varié suivant les gîtes temporaires ou pérennes et suivants les sites. Des travaux de Paaijmans *et al.*, 2008 ont montré que les facteurs environnementaux telles les conditions chimiques et physiques déterminent la densité et le développement des larves. Malgré les inondations qui ont rendu difficiles l'accès à certains gîtes, d'autres se sont créés avec pratiquement la présence des larves d'*An. gambiae* s.l. Ces larves étaient plus abondantes à Sam-Sam 3 que dans les autres sites. Cette zone présente des gîtes pérennes notamment à l'école « KERESAN » où les larves d'*An. gambiae* sl sont observées depuis le mois d'avril 2009 jusqu'au mois de mars 2010. Ce qui pourrait être une cause de la pérennisation du paludisme dans cette zone.

L'échantillonnage des larves de *Culex tigripes* a été effectué seulement dans quelques zones et sont moins abondantes que les autres. Elles sont très voraces par rapport aux autres espèces de

moustiques (fig. 13 D). Elle est plus présente en période hivernale qu'en période post-hivernale. Cette voracité pourrait être un aspect bénéfique dans la régulation de la densité larvaire. Avec la difficulté de distinguer les espèces du complexe *Anopheles gambiae*, plusieurs méthodes ont été proposées (Chauvet, 1969 ; Mahon *et al.*, 1976 ; Miles, 1979). La technique PCR que nous avons utilisée nous a montré que les anophèles que nous avons récoltés dans les 5 sites contiennent uniquement *An. arabiensis* une des principales espèces vectrices de plasmodium responsables du paludisme au Sénégal. Ces travaux montrent également que c'est une espèce non seulement urbaine Robert *et al.* (1998) mais également péri-urbaine. Cependant, nous n'avions pas étudié d'autres facteurs biotiques et abiotiques pouvant influer sur leur évolution pérenne dans certaines zones comme à Sam-Sam 3. Nous n'avions pas également fait des prospections dans les habitations pour pouvoir dénicher des gîtes temporaires surtout d'anophèles. Un suivi devrait être fait étant donnée qu'une possibilité de présence d'autres espèces du genre *Anopheles* (*An. funestus*, *An. gambiae* ss (forme m ou s) etc) n'est pas à écartée avec les phénomènes d'inondation.

CONCLUSION :

Dans cette partie, nous avons montré suivant les deux saisons, que *Anopheles gambiae* sl est plus présent en période hivernale qu'en période post-hivernale.

Les fortes densités larvaires en période hivernale sont dues à la prolifération d'*An. gambiae* sl qui est supérieur en nombre tandis qu'en période post-hivernale les larves de *Cx quinquefasciatus* sont plus abondantes.

La PCR a révélé que l'espèce d'anophage récoltée dans les 5 zones est *An. arabiensis*

Dès lors, une méthode de lutte efficace est indispensable et devrait être menée dans certaines zones où cette espèce vectrice de parasites responsables du paludisme est présente durant toute l'année.

PARTIE 2 :

**LUTTE BIOLOGIQUE CONTRE LES MOUSTIQUES PAR L'UTILISATION DE
BIOPESTICIDES
(CHAMPIGNONS ENTOMOPATHOGÈNES ET PRODUITS DE NEEM)**

CHAPITRE 1

SÉLECTION D'UN MILIEU DE CULTURE POUR UNE PRODUCTION EN MASSE DE CHAMPIGNONS ENTOMOPATHOGÈNES CONTRE LES MOUSTIQUES

I- INTRODUCTION

Dans la recherche d'alternative aux insecticides chimiques de synthèse, des agents pathogènes tels que les bactéries et les champignons entomopathogènes sont de plus en plus utilisés. Plus de 800 espèces de champignons ont été reconnues comme pathogènes d'insectes et/ou d'acariens (Regnault-Roger, 2005). Les espèces utilisées appartiennent pour la plupart aux classes des Zygomycètes et des Hyphomycètes (Shah et Pell, 2003). Plusieurs isolats fongiques des genres *Lagenidium* (Oomycètes), *Coelomomyces* (Chytridiomycètes), *Entomophthora* (Zygomycètes Entomophthorales), *Culicinomyces* (Hyphomycètes), *Beauveria* (Hyphomycètes) et *Metarhizium* (Hyphomycètes) ont montré leur pathogénicité contre les moustiques (Scholte *et al.* 2004a). Le pouvoir pathogène d'une souche d'*Aspergillus clavatus* sur des larves d'*Aedes aegypti*, *Anopheles gambiae* et *Culex quinquefasciatus* a également été démontré (Seye *et al.*, 2009).

De nombreux champignons sont relativement faciles à produire en masse et peuvent être formulés en suspensions aqueuses ou huileuses afin d'augmenter leur pouvoir infectieux avant d'être pulvérisés (Visalakshy *et al.*, 2006 ; Sahayaraj *et al.*, 2011). Selon les souches, la persistance au sein de la population d'insectes ciblés permet de restreindre les applications dans l'environnement (Shah et Pell, 2003). L'action de ces champignons s'exerce généralement par la sécrétion d'une large gamme d'enzymes et de toxines (Kanzok et Jacobs-Lorena, 2006). Plusieurs souches de champignons produisent également des métabolites secondaires dont certains ont démontré un pouvoir毒ique, et qui pourraient être valorisés en tant que biopesticides à part entière (Butt and Copping, 2000). Cependant, contre les moustiques, seul un produit basé sur *Lagenidium giganteum* fut commercialisé (Laginex®, AgraQuest) pour lutter contre les espèces de *Culex* aux USA (Scholte *et al.*, 2004b).

L'efficacité des spores de ces champignons nécessite une bonne méthode de production, de formulation et de stratégie d'application sur les différents stades de développement des moustiques. Dans cette optique, plusieurs méthodes utilisant des céréales telles que le blé et le riz ont été proposées pour la production en masse (Sahayaraj et Namasivayam, 2008). Cependant, des sous-produits de céréales dont le son de blé, devraient être testés vis-à-vis de la productivité ainsi que la pathogénicité des spores produites sur ces substrats. La présente étude consistait à :

- 1- Évaluer la production en masse de trois souches de champignons entomopathogènes sur son de blé par rapport au riz décortiqué en milieu solide, semi-solide et liquide,
- 2- Tester la pathogénicité des spores obtenues par la méthode la plus productive sur des larves de *Culex quinquefasciatus* (Say, 1823) (Diptères : Culicidae),

II- MATÉRIEL ET MÉTHODES

A- Isolement des souches

Aspergillus clavatus a été isolé à partir du criquet *Oedaleus senegalensis* (Seye *et al.*, 2009) de même que la souche de *Metarhizium anisopliae*. *Metarhizium sp* a été isolé sur des larves de taupins.

B- Production en masse des champignons

Les trois souches ont été cultivées dans des boîtes de Pétri contenant un milieu constitué de Peptone 1%, Extrait de levure, 1,5% Agar et 2% Glucose. Après sporulation, les spores de chaque souche ont été prélevées et diluées dans 10 ml d'eau distillée contenant 0,05% de Tween 80. La concentration de chaque solution mère ainsi créée a été évaluée au moyen d'un hématimètre (cellule de Thoma®) et ajustée à 5×10^6 spores/ml. Des fioles de 250 ml contenant chacune 5 g de son de blé ou de riz décortiqué ont été utilisées. L'ensemble a été stérilisé à l'autoclave à 121 °C pendant 20 minutes. Pour chaque souche, des volumes de 20, 40 et 70 ml d'une solution d'extrait de levure à 1% de peptone de caséine à 1% ont été ajoutés pour respectivement les milieux solide, semi-solide et liquide. Pour le milieu solide, les substrats ont été trempés dans la solution peptonée pendant 2 h conformément à Sahayaraj et Namasivayam (2008), puis le surplus de liquide a été retiré. Pour faciliter la sporulation en milieu liquide, un packing (assemblage en acier inoxydable provenant d'un garnissage structuré de colonne à distillée industrielle) a été introduit dans la fiole. Après inoculation de 1 ml de la solution mère de spores dans chaque fiole, l'ensemble a été maintenu en incubation à 30 °C en moyenne. Pour les milieux de culture liquide et semi-solide, les fioles ont été déposées sur l'agitateur à 140 tr/mn.

Pour chaque méthode et pour chaque souche, quatre répétitions de productions ont été faites à différentes périodes.

C- Récupération et comptage des spores :

Après 7 jours d'incubation, le restant de la solution contenue dans les fioles a été retiré avant d'ajouter 150 ml d'eau distillée contenant 0,05% de Tween 80 pour le lavage. L'ensemble a été ensuite déposé sur l'agitateur à 120 tr/mn pendant 2 h afin d'obtenir une solution aqueuse de spores. Les différentes solutions ont été filtrées séparément par une double couche de gaz (Cambric Leger) afin de retenir toute particule de céréales provenant des milieux de culture. Quatre séries de comptage ont été réalisées pour chaque solution de spores avec une lame à hématimètre (cellule de Thoma®).

Les solutions de rinçage ont été centrifugées à 5100 tr/mn et 4 °C pendant 5 minutes. Le surnageant a été éliminé et les spores récupérées sous forme de culot. Elles ont ensuite été compilées dans un tube Falcon® unique puis resuspendues dans une solution d'eau distillée contenant 0,05% de Tween 80. La teneur en spores des solutions mères ainsi obtenues a été déterminée et ajustée à 10^9 spores/ml pour effectuer les tests sur les larves.

D- Les moustiques :

Les adultes de *Culex quinquefasciatus* (souche S-Lab, sensible, date d'isolement : 1979, originaire de Riverside (Californie)) ont été élevés dans des cages en toile (Bugdorm®) de 50 x 50 x 50 (cm). Les conditions d'élevage ont été de 25 ± 2 °C et une photopériode de 16 h de lumière par jour. Ils ont été nourris avec du sucre à 10%. Le repas de sang des femelles a été effectué sur des membranes artificielles (Hemotek® membrane feeding systems). L'oviposition a été réalisée dans des pondoirs noirs remplis d'eau distillée. Les nacelles d'œufs ont été récupérées avec un pinceau et placées dans des bacs en plastique (30 x 10 x 5 (cm)) remplis à moitié d'eau distillée. Après éclosion, les larves ont été nourries avec un mélange de paillettes pour poissons tropicaux (Tetramin®) et de pastilles de levures de bière naturelles (Biover®) (proportions 1:1). Les colonies ont été maintenues dans des conditions identiques à celles du test.

E- Tests de pathogénicité sur les larves :

Des tests de toxicité classiques en suspensions aqueuses ont été menés afin d'évaluer le potentiel larvicide des différentes souches microbiennes et déterminer les doses létales (DL₅₀ et DL₉₀) selon OMS (OMS, 2005). Chaque lot correspond à une concentration. Les conditions de laboratoire ont été à 25 ± 2 °C en moyenne, 75% d'humidité relative (HR) et une photopériode fixée à 16 h de lumière par jour.

Après comparaison des méthodes de production en masse, les spores obtenues avec le milieu le plus productif, ont été utilisées pour les tests de toxicité. Des dilutions ont été faites à partir des solutions mères pour obtenir une gamme de concentrations finales : 5×10^7 ; 1×10^8 ; $1,5 \times 10^8$; 2×10^8 et $2,5 \times 10^8$ spores/ml. Les larves ont été nourries comme précédemment.

F- Relevé et analyse des données :

a- Productivité des souches fongiques.

Quatre répétitions ont été réalisées pour chaque souche et chaque type de milieu. Les résultats sont exprimés en moyennes et écarts-types. Ces valeurs ont été utilisées pour faire des analyses

ANOVA à un facteur et test non-paramétrique de Kruskal-Wallis avec le logiciel Statistica 9. Le seuil de signification a été fixé à 5%.

b- Tests de pathogénicité.

Pour les différents tests, quatre répétitions ont été réalisées pour chaque gamme de concentrations. Les constats de mortalité ont été faits toutes les 24 h et les larves mortes ont été retirées à chaque temps d'observation. Un test est invalide si (1) plus de 20% de mortalité est observée dans le contrôle associé aux groupes traités et (2) plus de 10% des larves venaient d'entrer en nymphose au cours de l'expérience.

Les DL₅₀ et DL₉₀ ont été calculées avec le même logiciel que précédemment. Les mortalités ont été corrigées sur un intervalle [0,1] par la formule d'Abbott (Abbott 1925) : $P = (M_t - M_c) / (T - M_c)$ (M_t = nombre de morts dans le groupe traité ; M_c = nombre de morts dans le groupe témoin correspondant ; T = nombre total d'individus pour chaque groupe). Une transformation logit de ces proportions de mortalité a été ensuite réalisée de manière à linéariser les données par la relation (Dagnelie, 1970) : $\text{logit}(p) = \ln(p/1-p)$. La qualité du modèle obtenu a été mesurée en utilisant le coefficient de détermination R².

IV-RÉSULTATS

A- Productivité des milieux de culture :

L'analyse de variance a montré des différences significatives entre les milieux de culture pour chaque souche ($P < 0,0001$). Le milieu solide est le plus productif pour les deux types de céréale (Tableau 10). Les comparaisons fournies par le test de Scheffé révèlent que le son de blé en milieu solide est plus productif que les autres pour respectivement *Aspergillus clavatus* ($161,20 \pm 34,63 \times 10^6$ spores/ml), *Metarhizium anisopliae* ($109,10 \pm 60,12 \times 10^6$ spores/ml) et *Metarhizium* sp ($74,40 \pm 27,07 \times 10^6$ spores/ml). Par contre, la productivité du riz en milieu solide est moins importante que son équivalent de son avec $73,61 \pm 43,74 \times 10^6$ spores/ml, $43,80 \pm 17,37 \times 10^6$ spores/ml et $15,12 \pm 25,92 \times 10^6$ spores/ml respectivement pour ces souches (Tableau 10).

Tableau 10 : Productivité de trois souches fongiques (*Aspergillus clavatus*, *Metarhizium anisopliae* et *Metarhizium* sp) cultivées sur deux milieux basés sur du son de blé ou du riz décortiqué selon trois états (solide, semi-solide et liquide). Les valeurs d'une même colonne suivies par des lettres différentes sont significativement différentes ($P \leq 0,05$) selon le test de Scheffé associé à l'analyse de variance.

Milieu	Type de Céréales	Teneur ± Ecart Type (10⁶ spores /ml)		
		<i>Aspergillus clavatus</i>	<i>Metarhizium anisopliae</i>	<i>Metarhizium</i> sp
Solide	Son de blé	161,20 ± 34,63 ^a	109,10 ± 60,12 ^a	74,40 ± 27,07 ^a
	Riz décortiqué	73,61 ± 43,74 ^b	43,80 ± 17,37 ^{a,b}	15,12 ± 25,92 ^b
Semi-solide	Son de blé	6,59 ± 3,81 ^c	24,65 ± 33,95 ^b	23,47 ± 4,54 ^b
	Riz décortiqué	2,26 ± 1,49 ^c	5,03 ± 2,74 ^b	3,86 ± 1,67 ^b
Liquide	Son de blé	18,33 ± 7,27 ^{b,c}	6,08 ± 6,02 ^b	3,57 ± 2,24 ^b
	Riz décortiqué	0,99 ± 0,20 ^c	4,42 ± 4,84 ^b	1,37 ± 0,46 ^b

B- Tests de pathogénicité :

Les doses létales contre les larves de *Culex quinquefasciatus* (Tableau 11) sont atteintes en 24 h pour *A. clavatus* ($DL_{50} = 1,70 \times 10^8$ et $DL_{90} = 7,10 \times 10^8$, $P < 0,0001$), en 48 h pour *M. anisopliae* ($DL_{50} = 1,60 \times 10^8$ et $DL_{90} = 6,50 \times 10^8$, $P = 0,0003$), et en 72 h pour *Metarhizium* sp ($DL_{50} = 1,75 \times 10^8$ et $DL_{90} = 9,90 \times 10^8$; $P = 0,0046$). L'analyse de ce tableau montre également que les doses létales des différentes souches peuvent être atteintes avec des doses plus faibles mais avec une durée plus longue. Pour une même dose testée, le temps nécessaire pour obtenir les DL_{50} et DL_{90} sont plus faibles pour *A. clavatus* suivi par *M. anisopliae* et *Metarhizium* sp.

L'analyse de la variance des données a permis d'affirmer que la régression appliquée a un sens pour *A. clavatus* à 24 h ($F_{(1,18)} = 28,01$), 48 h ($F_{(1,18)} = 32,61$) et 72 h ($F_{(1,18)} = 39,08$). Tandis que cette régression n'a un sens qu'à partir de 48 h pour *M. anisopliae* ($F_{(1,18)} = 19,91$; $F_{(1,18)} = 44,44$) et 72 h pour *Metarhizium* sp ($F_{(1,17)} = 10,36$). Les P-valeurs associées aux résultats de la régression permettent d'affirmer un lien significatif entre les doses testées et la mortalité observée aux temps pour chaque souche.

Tableau 11. Doses létales (DL_{50} et DL_{90}) des trois souches fongiques (*Aspergillus clavatus*, *Metarhizium anisopliae* et *M. sp*) produites sur milieu solide de son de blé contre des larves de *Culex quinquefasciatus* de 3^e et 4^e stades.

Souches	Temps	Doses létales (spores/ml)			
		DL_{50}	DL_{90}	R^2	P
<i>Aspergillus clavatus</i>	24h	$1,70 \times 10^8$	$7,10 \times 10^8$	0,61	< 0,0001
	48h	$1,45 \times 10^8$	$6,80 \times 10^8$	0,64	< 0,0001
	72h	$1,35 \times 10^8$	$5,00 \times 10^8$	0,68	< 0,0001
<i>Metarhizium anisopliae</i>	24h	-	-	0,34	0,0520
	48h	$1,60 \times 10^8$	$6,50 \times 10^8$	0,52	0,0003
	72h	$1,30 \times 10^8$	$4,00 \times 10^8$	0,71	< 0,0001
<i>Metarhizium sp</i>	24h	-	-	0,01	0,4641
	48h	-	-	0,1	0,1736
	72h	$1,75 \times 10^8$	$9,90 \times 10^8$	0,38	0,0046

V- DISCUSSION

La production des champignons montre une grande différence selon le substrat et les conditions de culture. Le son de blé qui est un sous-produit, est ici comparé au riz décortiqué dans la productivité. La supériorité des milieux solides basés sur un substrat de son de blé par rapport aux équivalents à base de riz décortiqué est visualisée dans nos résultats. En effet, les analyses statistiques révèlent que ce type de milieu permet une productivité significativement plus abondante que les autres dans la plupart des cas. Ceci confirme les résultats de Sahayaraj et Namasivayam (2008) qui ont mis en évidence une production plus abondante sur grains de blé que sur le riz chez *Beauveria bassiana*, *Paecilomyces fumosoroseus* et *Verticillium lecanii* en milieu solide. Cependant, dans le cas présent, le son de blé présente à poids égal plus de surface de contact et absorbe plus facilement le liquide que le riz décortiqué. Or, la peptone de caséine et l'extrait de levures constituant la solution peptonée permettent un apport de carbone, d'azote et de vitamines favorisant la croissance mycélienne et se révèle parfois même nécessaire pour certaines souches (Im *et al.* 1988). De plus, il faut remarquer que, si les productivités en milieux

semi-liquide et liquide sur le son de blé paraissent plus importantes que leurs équivalents respectifs sur le riz, la différence n'est pas significative du point de vue statistique.

D'une part, la forte productivité en spores fait de la fermentation en substrat solide un processus plébiscité (Assamoi *et al.*, 2009) et largement appliqué en laboratoire à des champignons entomopathogènes tels que *M. anisopliae* (Dorta *et al.*, 1996 ; Arzumanov *et al.*, 2005 ; Prakash *et al.*, 2008 ; van Breukelen *et al.*, 2011). Cependant avec les substrats solides, les paramètres du milieu (pH, température, humidité, oxygène dissous ou encore accumulation de CO₂) sont mal contrôlés à l'échelle industrielle et rendent cette technique très difficile à mettre en œuvre. Les métabolites produits sont également plus difficilement extraits (Assamoi *et al.*, 2009). D'autre part, les productivités plus faibles en spores des milieux semi-solides et liquides sont compensées par la formation de pellets mycéliens, comme il l'a également été constaté par Fargues *et al.* (2002). La fermentation en conditions submergées est bien contrôlée au niveau des bioréacteurs industriels, et convient surtout à la production de métabolites associés à la croissance mycélienne. Cependant elle ne permet pas la production de spores en grande quantité (Prescott *et al.*, 2003). Ainsi, dans une optique de production à grande échelle, ces milieux peuvent se révéler complémentaires par la technique dite de culture diphasique (Burges et Hussey, 1981).

L'intérêt de substituer le son de blé au riz ne saurait être opportun que si les spores produites ont une pathogénicité sur les moustiques. En effet, Shah *et al.* (2005) ont déjà montré que le substrat qui supporte la plus grande productivité de spores ne garantit pas forcément leur pathogénicité. Avec des doses proches, les différentes souches de champignons que nous avons utilisées ont montré leur efficacité contre les larves de *Cx quinquefasciatus*. Cependant, cette pathogénicité diffère selon la souche. Les DL₅₀ et DL₉₀ que nous avons déterminées sont obtenues en 24 h pour *A. clavatus* contrairement aux deux souches de *Metarhizium* (48 h voire 72 h).

Certaines espèces du genre *Aspergillus* ont montré la possibilité d'être utilisées contre les moustiques (Hati et Gosh, 1965 ; Nnakumusana, 1985 ; de Moraes *et al.*, 2001 ; Seye *et al.*, 2009 ; Mohanty et Prakash, 2010). Cependant, les doses létales que nous avons déterminées avec les deux souches de *Metarhizium* et d'*A. clavatus* sont plus élevées que celles déterminées par la plupart de ces auteurs. Cette différence serait due soit au substrat utilisé pour la production de spores, à la méthode de récupération de spores ou à la différence des souches elles-mêmes. En effet, après culture en milieu solide, nous avons effectué un lavage suivi de centrifugation des spores. Alors que pour le cas d'*A. clavatus*, Seye *et al.* (2009) ont récupéré les spores sèches

qu'ils ont appliquées directement dans l'eau sans ajout de Tween 80. En général, les spores sèches appliquées directement dans l'eau restent à la surface et les larves sont infectées surtout au niveau du siphon respiratoire lorsqu'elles remontent à la surface de l'eau, même si une partie est ingérée (Seye *et al.*, 2009, Bukhari *et al.*, 2010). Il serait également possible que dans les travaux de Seye *et al.*, 2009, les particules de poudre de blé présentes dans le mélange aient servi de transporteur organique et appâté les larves comme indiqué par Bukhari *et al.*, 2011 ; ou encore favorisé une activation des spores, mais aussi le stress dû à la compétition (Bukhari *et al.*, 2010). Dans nos travaux, nous avons constaté que quelques heures après application des spores, celles-ci se retrouvent pratiquement au fond des bocaux. Ce qui diminue les possibilités de contact avec les larves.

D'autres espèces du genre *Aspergillus* ont été testées contre *Cx. quinquefasciatus*. C'est ainsi que *A. sulphureus* a induit 96% de mortalité après 24 h d'exposition à la dose de $4,13 \times 10^6$ spores/ml, tandis que différentes souches d'*A. flavus* provoquent plutôt un retard du développement larvaire par rapport au contrôle à des doses similaires (de Moraes *et al.*, 2001). Ces résultats sont différents de ceux de Mohanty et Prakash (2010) qui ont révélé après 72 h des DL₅₀ de $3,54 \times 10^6$ et $1,07 \times 10^8$ spores/ml de *A. flavus* et *A. fumigatus* respectivement. Ce qui reflète bien l'hétérogénéité de la virulence des souches d'*Aspergillus* contre les moustiques. Plusieurs souches de *Metarhizium* ont montré leurs effets pathogènes contre les moustiques (Scholte *et al.*, 2003 ; 2004a ; 2004b; 2006 ; Kovandan *et al.*, 2012). Avec les deux souches que nous avons utilisées, des doses létales n'ont pu être déterminées qu'après 48 h (*M. anisopliae*) et 72 h (*Metarhizium* sp). Ce qui montre la grande hétérogénéité de la virulence des souches de *M. anisopliae* contre les moustiques. En effet, Alves *et al.* (2002) ont testé six souches de *M. anisopliae* et observé des mortalités différentes de larves de *Cx quinquefasciatus* pour une même dose. Pereira *et al.* (2009) ont quant à eux testé pas moins de huit souches et observé des mortalités de larves d'*Aedes aegypti* allant de 8% à 88%. Cependant, ils ont utilisé des doses plus faibles mais avec des temps plus longs (respectivement, 5 et 8 jours). Nos résultats ont montré également que si les doses sont plus faibles, le temps d'action des champignons est plus long. Notons également que les DL₅₀ ($1,09 \times 10^5$ spores/ml) et DL₉₀ ($1,9 \times 10^{13}$ spores/ml) de *M. anisopliae* déterminées par Bilal *et al.*, (2012) contre *Aedes albopictus* sont bien plus élevées que celles que nous avons déterminées contre *Cx quinquefasciatus*.

Cependant, les champignons peuvent ré-émerger sur les moustiques traités assurant ainsi leur rémanence.

Un impact moins spectaculaire mais tout à fait remarquable, c'est la possibilité d'utiliser une nouvelle technique du point de vue de la production de métabolites. Dans nos travaux, l'utilisation du packing en milieu liquide dans des fioles de 250 ml a montré qu'il serait possible de combiner les deux types de fermentation (solide et liquide) pour produire des spores en même temps que des métabolites secondaires. Alors que des travaux ont montré les effets de métabolites secondaires de différents champignons entomopathogènes contre les moustiques (Mohanty et Prakash, 2008 ; Mohanty *et al.*, 2008 ; Singh et Prakash, 2011). La méthode utilisant un packing pourrait donc être extrapolée en utilisant des bioréacteurs à l'échelle industrielle pour produire une quantité importante de ceux-ci. Une approche similaire pourrait être tentée avec le son de blé en tant que substrat submergé en fermenteur.

CONCLUSION :

A l'issu de nos travaux, le son apparaît bénéfique pour la production de champignons entomopathogènes (*Aspergillus clavatus*, *Metarhizium anisopliae* et *Metarhizium sp*). Les spores produites sont pathogènes contre les larves de *Culex quinquefasciatus*.

Il serait donc intéressant de proposer un système de production industrielle des produits d'origine fongique contre les moustiques vecteurs.

CHAPITRE 2 :
PRODUCTION DE SPORES ET METABOLITES DE CHAMPIGNONS EN
BIOINDUSTRIE ET TESTS DE PATHOGÉNICITÉ CONTRE LES MOUSTIQUES

I- INTRODUCTION

Plusieurs espèces de moustiques vecteurs sont résistantes à certains insecticides chimiques. Des agents biologiques pathogènes contre ces vecteurs sont dès lors de plus en plus utilisés dans le contrôle de ces vecteurs. Les moustiques du genre *Culex* se développent aussi bien en période hivernale qu'en période post-hivernale. Ils sont responsables de certaines maladies telles que les filariose mais aussi causent des nuisances. Avec l'utilisation progressive des agents pathogènes, les champignons sont de plus en plus ciblés et présentent des résultats très prometteux. *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* et certaines espèces d'*Aspergillus* sont les plus utilisés dans le but de trouver une alternative aux insecticides chimiques contre les moustiques (Nnakumusana, 1985; De Moraes *et al.*, 2001; Scolt *et al.*, 2005; Kikankie *et al.*, 2010). Des études ont montré l'efficacité de métabolites d'*Aspergillus flavus* et d'*Aspergillus parasiticus* contre *Cx quinquefasciatus* (Govindarajan *et al.*, 2005). *Aspergillus clavatus* a montré une forte pathogénicité contre les moustiques (Seye et Ndiaye, 2008; Seye *et al.*, 2009). Soni et Prakash (2011) ont montré la possibilité d'utiliser des métabolites provenant de *Aspergillus niger* contre les larves de *Cx quinquefasciatus*, *Anopheles stephensi* et *Aedes aegypti*.

Pour la production en masse des spores de champignons, certains produits d'origine agro-industrielle ont montré leur forte productivité (Sahayaraj et Namasivayam, 2008). La fermentation solide est la méthode la plus utilisée pour cette production (Dorta *et al.*, 1996; Arzumanov *et al.*, 2005; Santa *et al.*, 2005; Prakash *et al.*, 2008; van Breukelen *et al.*, 2011). Une fermentation complémentaire entre phase solide et liquide a été démontrée par des cultures séquentielles (Burges et Hussey, 1981). Cependant, chacun de ces types de fermentation (solide et liquide) a ses limites. En effet, la production simultanée de spores et métabolites est limitée par une difficulté de contrôler les paramètres tels que le pH, la Température, l'oxygène dissout ou le CO₂. Avec le développement de la technologie en bio-industrie, il est possible de produire des métabolites dans des bioréacteurs. La plupart de ces réacteurs sont utilisés pour la production de mycéliums. Cependant, Su et He, (1997) ont développé un système de production de métabolites à partir des cultures de pellets par infusion continue dans un bioréacteur. Xu *et al.* (2006) ont aussi établi et optimisé des paramètres physiques d'un procédé de bioréacteur en culture submergé. Parallélement, des études ont montré la toxicité des métabolites produits en milieu liquide contre les moustiques (Mohanty *et al.*, 2008; Singh et Prakash, 2011). Il serait donc possible de produire simultanément dans un bioréacteur des spores et des métabolites qui seraient toxiques contre les moustiques tout en pouvant contrôler les paramètres. Pour cela, nous nous sommes fixés comme objectifs:

- d'établir une nouvelle méthode de production simultanée en milieu submergé des spores et de métabolites d'origine fongique dans un bioréacteur,
- de montrer la pathogénicité de ces produits contre les moustiques.

II- MATÉRIEL ET MÉTHODES

A- Le champignon

La souche d'*Aspergillus clavatus* (Desmazières) utilisée dans cette partie a été isolée au Laboratoire de Biologie de la Reproduction, Département de Biologie Animale, Université Cheikh Anta Diop (Dakar, Sénégal). Son efficacité a été démontrée contre les larves d'*Anopheles gambiae*, *Aedes aegypti* et *Culex quinquefasciatus* (Seye *et al.*, 2009). Elle a été cultivée dans des boîtes de Pétri contenant le milieu PDA (potato dextrose agar) et conservée à 4°C.

B- Inocula

La préculture d'*Aspergillus clavatus* a été faite dans un Erlenmeyer (500 mL) contenant un milieu de culture constitué de 300 mL d'eau distillée, 1% peptone, 1% extrait de levure et 2% glucose le tout a été stérilisé à 120°C pendant 20mn. L'incubation a été faite pendant 48h sur un agitateur (140 trs/mn) à 30° C pour la production de pellets.

C- Confection du packing

Pour faciliter la fixation des pellets et la sporulation dans le bioréacteur, un “packing” a été fabriqué. Le packing est constitué de lammelle de grillages rectangulaires de dimensions allant de 15 x 30 cm à 2 x 30 cm comme décrit par Zone *et al.*, 2013. Il est constitué de 28 grillages avec des mailles de 2 mm. Ils sont disposés de manière symétrique constituant ainsi un cylindre de 15 cm de diamètre environ. Le tout a été entouré par un autre grillage pour former un bloc (fig 15). Une des bases a été fermée par une lammelle circulaire pouvant retenir le milieu solide (son) à introduire dans le packing.

D- Bioréacteur

La fermentation a été faite dans un bioréacteur Biolafitte de 20 L. Le son de blé (200 g) a été introduit comme source de carbone dans le packing entre les lammelles de grillage. Le tout a été suspendu dans le fermenteur (Fig.15). Soixante (60) g de Peptone et d'extrait de levure ont été préalablement introduits dans la partie inférieure du fermenteur contenant 6 L d'eau distillée et

5% de chloramphénicol comme agent bactéricide. Le tout a été stérilisé à 120°C. La préculture contenant les pellets obtenus dans l'Erlenmeyer a été ensuite injectée dans le bioréacteur grâce à une seringue stérile. Avec une pompe péristaltique (120 rpm), la culture contenant les pellets produits dans la phase liquide est injectée de façon continue dans le packing contenant le son de blé. Le milieu liquide est agité par un système de flux d'air 3 L/min. La température a été fixée à 30°C par un système de circulation d'eau contrôlé. La variation du pH est enregistrée automatiquement de façon continue grâce à un système relié à l'ordinateur. La culture a été maintenue pendant 7 jours.

E- Récupération des spores

Une semaine après le fonctionnement du bioréacteur, la phase liquide a été aspirée par la pompe et injectée dans une bonbonne en plastique et conservée à -80°C. Le packing a été retiré et lavé avec de l'eau distillée contenant 0,05% de Tween 80. L'eau contenant les spores a été filtrée à travers un tissu de gaz pour retenir les particules provenant du son. Cette solution a été centrifugée à 5100 rpm (4°C). Le surnageant a été récupéré et le culot contenant les spores a été transféré dans un flacon.

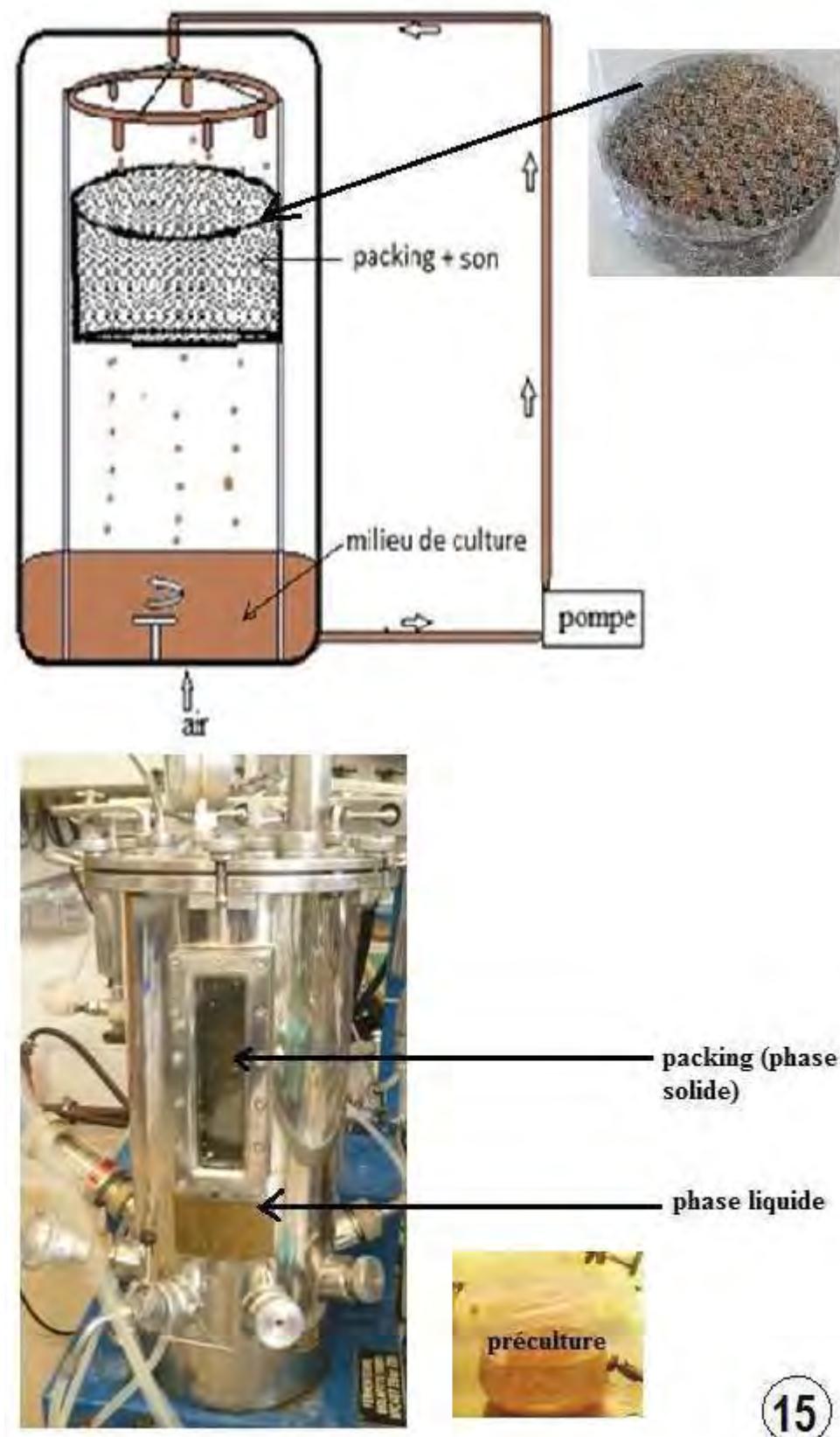


Figure 15 : Méthodes de culture du champignon *Aspergillus clavatus* (spores et métabolites) en milieu semi-liquide dans un bio-réacteur

F- Filtration des métabolites

La phase liquide (6 L) a été ensuite centrifugée (8000 rpm, 30 min) pour éliminer les impuretés. Elle a été ensuite filtrée avec un appareil filtre Prep/Scale – TFF-1 Cartridge (Millipore) de 5,8 cm de diamètre et 15,2 cm de long avec une membrane de filtration polyethersulfone (colonne 1 ft2 cartridge). L'appareil sépare ainsi deux solutions dont l'une est plus concentrée ((fig. 16) 800 mL) avec des molécules de poids moléculaires supérieurs à 10 kD ($M>10\text{kD}$). Cette solution a été maintenue à -80°C pour effectuer des tests de toxicité. La deuxième solution ayant montré un résultat négatif sur les moustiques n'a pas été conservée.

G- Elevage des moustiques

Des adultes de *Culex quinquefasciatus* (S-Lab) ont été élevés dans des cages de 50 x 50 x 50 cm et nourris avec une solution de 10% de sucre. Les femelles ont été gorgées sur des oiseaux (cailles). Après éclosion, les larves ont été maintenues dans des bocaux (25 x 15 x 5 cm) contenant de l'eau distillée avec les conditions de laboratoire ($25 \pm 2^\circ\text{C}$, $70 \pm 5\%$ d'Humidité Relative, et photopériode 16/8). Elles ont été alimentées avec de la nourriture de poisson (Tetramin®).

H- Tests de toxicité

1- Sur Les larves.

D'une part, des lots de 20 larves ont été exposés à des doses de $2,5 \times 10^7$, 5×10^7 , $7,5 \times 10^7$, 10×10^7 et $12,5 \times 10^7$ spores/ml dans des bocaux séparés contenant de l'eau distillée. Pour chaque test, le témoin est constitué d'un lot maintenu dans de l'eau distillée. Les larves mortes ont été comptées, récupérées et rinçées avec de l'eau distillée pour éliminer les spores non adhérées afin de les examiner au microscope.

D'autre part, des lots de larves ont été exposés à des doses correspondant à des dilutions de la solution concentrée en métabolites (10, 20, 40, 60, 80 et 100 % (v/v)). Dans le témoin, les larves ont été maintenues dans de l'eau distillée.

Toutes les larves sont nourries avec le même produit. Les mortalités ont été comptées toutes les 24h.

3- Sur les adultes

Une partie des spores produites dans le bioréacteur a été formulée avec de l'huile de tournesol et de l'eau distillée à 5% (V. huile/V. eau). Les mêmes doses utilisées contre les larves ont été appliquées sur des lots de 20 adultes d'âge compris entre 3 et 5 jours. Le lot du témoin a été pulvérisé avec de l'eau distillée. Ils ont été maintenus dans des cages de 25 x 25 x 25 cm et nourris avec la solution de sucre. Les adultes morts ont été retirés et observés au microscope optique.

En parallèle, deux volumes (5 et 10 ml) de la solution concentrée en métabolites ont été pulvérisés directement sur deux lots de 20 adultes introduits dans deux cages séparées. Le lot du témoin a été pulvérisé avec de l'eau distillée.

Tous les tests ont été faits dans les conditions de laboratoire: $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, photopériode de 16/8h.

Pour chaque test, 4 répétitions ont été faites. Les mortalités ont été corrigées avec la formule d'Abbott (Abbott, 1925).

III- RESULTATS ET DISCUSSION

A- Les produits du système de culture

Dans cette étude, nous avons réussi une nouvelle technique de production simultanée de spores (fig. 16 C) et de métabolites (fig. 16B) dans un bioréacteur. Lorsque les spores ont été ensemencées dans l'Erlenmeyer, des pellets sous forme de boules ont été produits en 48h. Cette production de pellets était continue dans la phase liquide au niveau du bioréacteur. Au niveau de cette phase liquide, la variation des paramètres tels que le pH (fig. 16 D) et la température était enregistrée progressivement. Les paramètres sont donc bien contrôlables. Au niveau du parcking en suspension dans le bioréacteur, les pellets étaient fixés sur le son ou sur le métal et continuaient ainsi leur prolifération avant de sporuler. Sous l'action de la pompe péristaltique, la production simultanée de spores et de métabolites était continue. Ce nouveau procédé permet d'éclairer la possibilité d'optimiser ses paramètres pouvant augmenter la production de spores et de métabolites. L'intérêt que porte ce système est par ailleurs, la méthode de récupération des métabolites contenus dans la phase liquide pendant son fonctionnement.

L'enregistrement des paramètres a révélé que le pH décroît de 7,78 (jour 1) à 5,55 (jour 3) avant de remonter et de se stabiliser à 8,87 (jour 7) (fig. 16 D). Cette variation du pH pourrait être due à l'assimilation des éléments nutritifs pour la production de pellets (jour 1 à jour 3) suivie par la phase de sécrétion progressive de métabolites (jour 4 à jour 7).

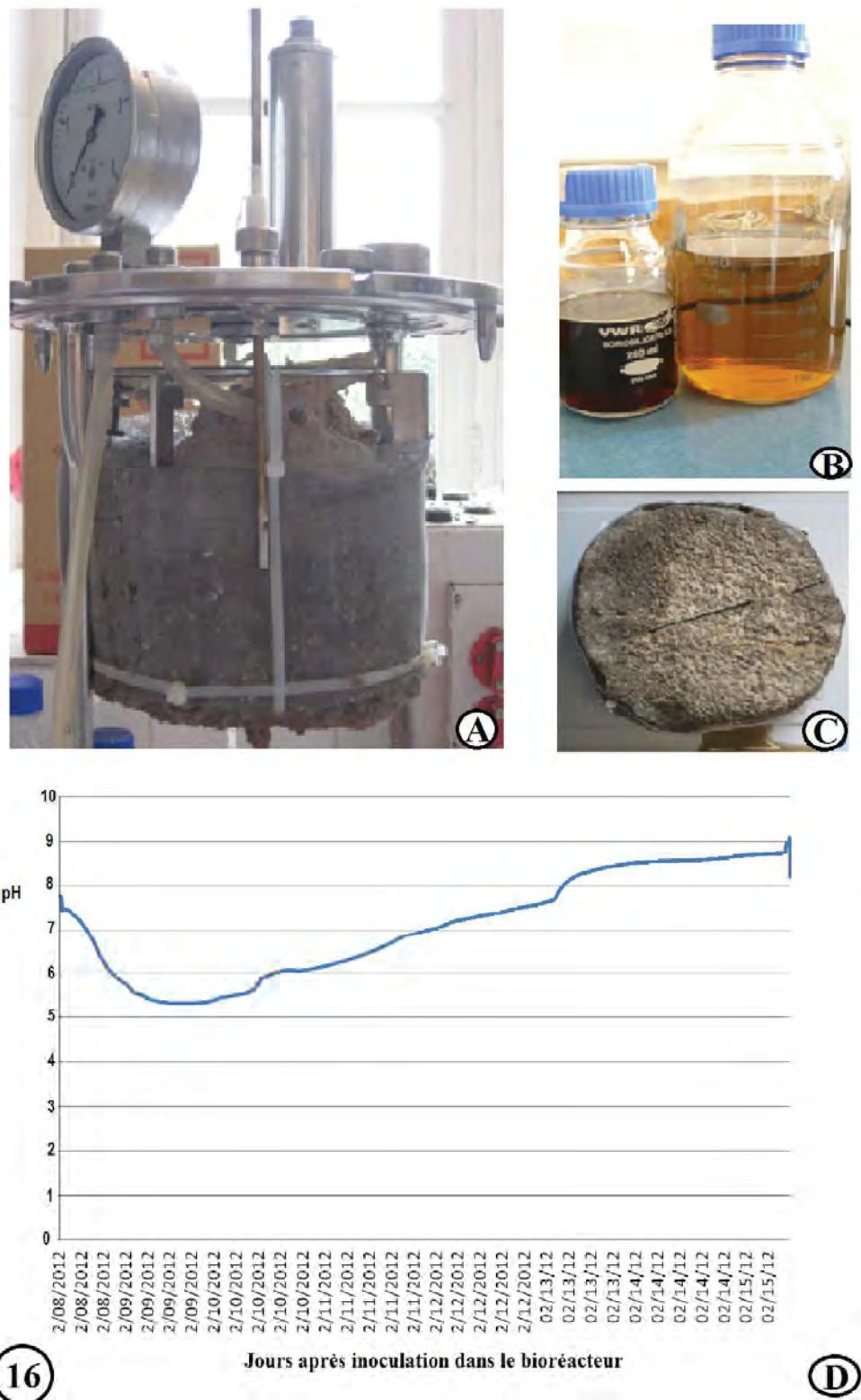


Figure 16: Produits de culture d'*Aspergillus clavatus* : spores (A et C) et métabolites (B) et évolution du pH dans le bioréacteur (D)

Pour une perspective visant à mieux vulgariser les champignons entomopathogènes, *Metarhizium anisopliae* et *Beauveria bassiana* qui sont les espèces les plus utilisées et admises devraient être utilisées dans ce système pour une production industrielle.

B- Pathogénicité des spores sur *Culex quinquefasciatus*

Les tests ont montré que les spores et métabolites d'*Aspergillus clavatus* sont pathogènes contre les larves et adultes de *Culex quinquefasciatus*. Le tableau 12 montre que les pourcentages de mortalité larvaires augmentent de $37,2 \pm 15$ à $86,32 \pm 5$ % suivant les doses dans les 72h après traitement. Cependant une légère baisse d'efficacité est observée comparée au travaux de Seye *et al.*, 2009. Ce qui pourrait être due au substrat de son utilisé tel que discuté par Shah *et al.* (2005). Néanmoins, la pathogénicité des spores contre les adultes est pratiquement plus élevée comparée à celle observée par Seye *et al.* (2008) qui ont obtenu $86 \pm 1,7$ % de mortalité en 5 jours avec $7,910^7$ spore/ml, alors que les mortalités enregistrées ici vont de $35,75 \pm 2,1$ à $85,25 \pm 1,5$ % en 3 jours (tableau 13). L'huile de tournesol utilisée dans la formulation des spores, a certes facilité l'adhésion des spores sur les adultes comme l'huile de neem utilisée dans la formulation du même champignon par Seye *et al.* (2008) contre *Cx. quinquefasciatus*. Les observations à la loupe, ont révélé l'émergence du champignon et la sporulation. Ce qui montre que les spores ont pu pénétrer la cuticule des adultes, se développer avant de sporuler à la surface.

Les observations avec le microscope optique ont montré également par transparence la présence de spores dans le tube digestif des larves (fig. 17 A). Les spores ont pu germer et produire des filaments mycéliens (figs 17 A et B). Ce qui confirme les travaux de Seye *et al.*, 2009 qui ont montré ce développement mycélien du tube digestif vers l'extérieur. La pathogénicité serait donc due en partie par les toxines secrétées par les spores pendant leur développement dans le tube digestif.

Tableau 12: Pourcentages de Mortalité (moyenne et écart type) des larves de *Culex quinquefasciatus* traitées avec des spores d'*Aspergillus clavatus* produites dans un bioreacteur en phase semi-liquide.

	Heures d'exposition	Doses (10^7 spores/ml)				
		2,5	5	7,5	10	12,5
Mortalités (%) ± ET	24h	15,78 ± 1	17,1 ± 17	30,26 ± 20	38,15 ± 15	60,52 ± 15
	48h		25 ± 6	35,52 ± 22	42,1 ± 30	47,36 ± 9
	72h	37,2 ± 15	55,26 ± 5	65,78 ± 9	73,68 ± 6	86,32 ± 5

Tableau 13: Pourcentages de Mortalité (moyenne et écart type) des adultes de *Culex quinquefasciatus* traités avec des spores d'*Aspergillus clavatus* produites dans un bioreacteur en phase semi-liquide.

	Heures d'exposition	Doses (10^7 spores/ml)				
		2,5	5	7,5	10	12,5
Mortalités (%) ± ET	24h	20 ± 3	20 ± 0,4	24,75 ± 2	28,25 ± 8	37,5 ± 1,1
	48h	25,75 ± 5	55,75 ± 2	50 ± 0,15	60 ± 3,1	75,75 ± 0,8
	72h	35,75 ± 2	56,5 ± 0,9	65,5 ± 0,7	75 ± 14	85,25 ± 1,5

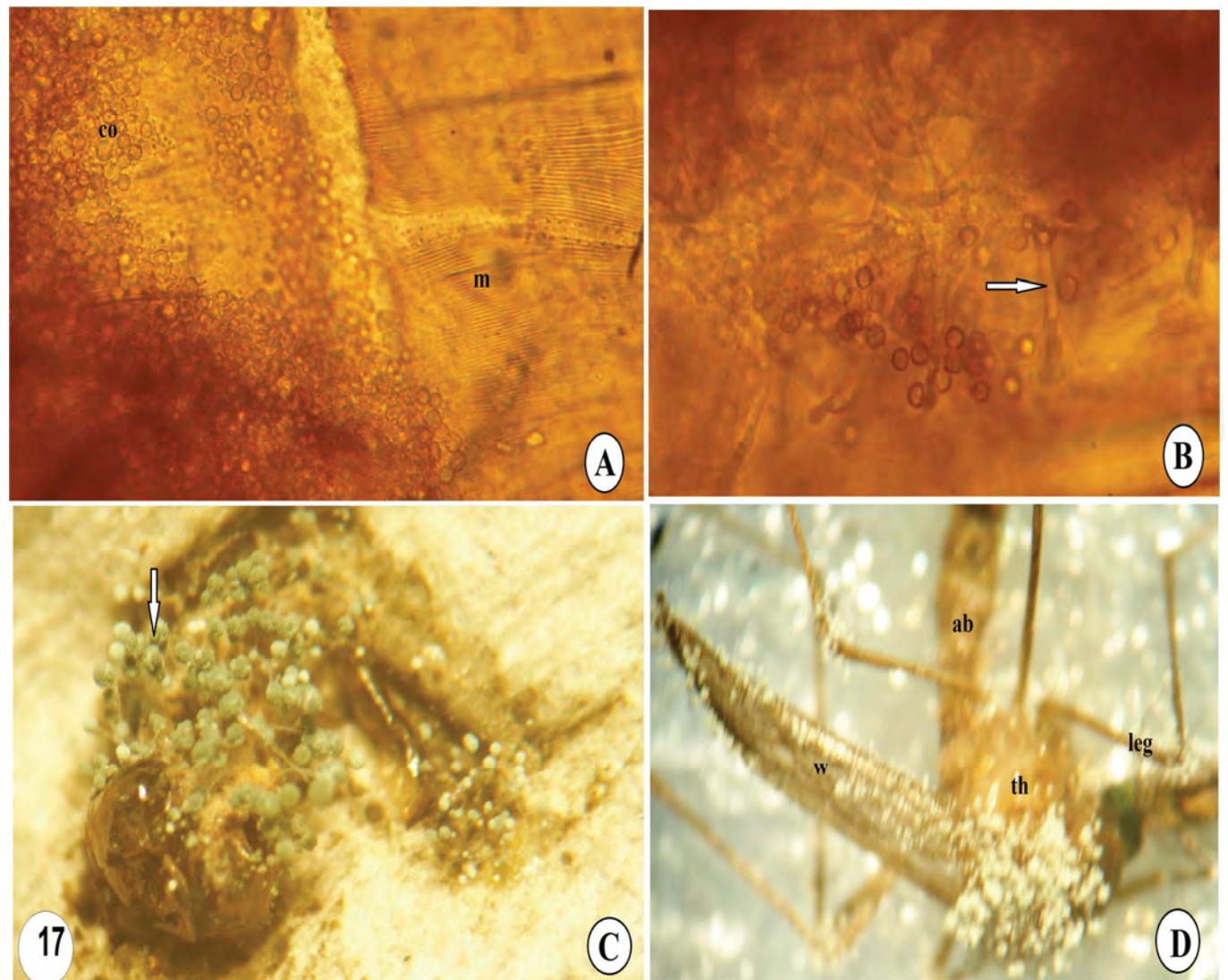


Figure 17 : Développement du champignon *Aspergillus clavatus* sur les larves en 24h (A), 48h (B), 72h (C) et sur les adultes (D) de *Culex quinquefasciatus* après traitement aux spores.

C- Pathogénicité des métabolites contre *Culex quinquefasciatus*

Comme pour les spores, les métabolites secondaires produits par *A. clavatus* dans le bioréacteur ont montré leur pathogénicité contre les larves et adultes de *Cx. quinquefasciatus*. En effet, le tableau 14 montre que les mortalités larvaires augmentent avec les concentrations de la solution. Elles vont de $23,68 \pm 1,5$ à $100 \pm 0,00$ % en 72h. Pour les deux doses appliquées contre les adultes, les mortalités sont respectivement $45,5 \pm 2,4$ et $75,6 \pm 1,6$ % en 72h (Tableau 15). Ces résultats portant sur la possibilité d'utiliser des métabolites contre les moustiques confirment d'autres résultats similaires (Vyas *et al.*, 2007; Singh et Prakash, 2011; Singh et Prakash, 2012). Singh et Prakash (2012) ont montré la pathogénicité des métabolites de *A. niger* contre *Cx. quinquefasciatus*. Même si les méthodes de purification des métabolites ne sont pas les mêmes, les efficacités sont pratiquement identiques. En effet, dans notre étude nous avons obtenu la solution de traitement par filtration. Alors que dans d'autres travaux, les métabolites extracellulaires ont été filtrés sur papier Whatman (Mohanty et Prakash, 2009; Singh et Prakash, 2011). Dans tous les cas, les propositions de la filtration visent à minimiser le taux d'impureté dans le milieu afin d'acroître l'efficacité du produit.

Dans notre présente étude, la solution de métabolite d'*A. clavatus* a été efficace contre les larves et les adultes en 72h. Pour la voie d'action, les métabolites agiseraient par contact sur les adultes et/ou ingestion sur les larves. D'autres études ont révélé que, des métabolites d'origine fongique tel que *Tolypocladium inflatum* (Deuteromycetes) peuvent attaquer les larves en causant des dégâts histologiques (Weiser *et al.*, 1992). Par ailleurs, la germination d'*A. clavatus* est accompagnée par une sécrétion de toxines (Bergel *et al.*, 1944; Lopez and Flannigan, 1997; Sabater-Vilar *et al.*, 2004). Ce qui suggère que les métabolites secondaires produits par ce champignon agissent sur les tissus des moustiques tels que ceux du tube digestif des larves (Vey et Quiot, 1989; Weiser *et al.*, 1992, Seye *et al.*, 2009).

Cependant, les métabolites testés dans cette présente étude méritent d'être purifiée, isolés et identifiés. Leur mécanisme d'action devrait être étudié ainsi que leur toxicité sur les organismes non cibles avant toute application sur le terrain.

Tableau 14: Mortalités des larves de *Culex quinquefasciatus* traitées avec différentes doses de solution de métabolites d'*Aspergillus clavatus*.

	Heures d'expositio n	Doses (% ml)					
		10	20	40	60	80	100
Mortalités (%) ± ET	24h	2,63 ± 3	22,36 ± 16	27,63 ± 10	67,1 ± 8	76,31 ± 6	93,42 ± 5
	48h	11,84 ± 13	26,31 ± 15	38,15 ± 15	73,68 ± 4	78,94 ± 4	97,36 ± 3
	72h	23,68 ± 15	39,47 ± 27	55,26 ± 5	76,31 ± 6	82,89 ± 2	100 ± 0,0

Tableau 15: Mortalités des adultes de *Culex quinquefasciatus* traités avec deux doses de la solution de métabolite d'*Aspergillus clavatus*.

	Heures	Solution de métabolites (ml)	
		5	10
Mortalité ± ET	24h	7,7 ± 0,1	18,5 ± 0,2
	48h	40,1 ± 2	65,3 ± 3,6
	72h	45,5 ± 1,4	75,6 ± 2,6

IV- CONCLUSION

Dans cette étude, nous avons montré la possibilité de produire simultanément des spores et des métabolites secondaires d'*Aspergillus clavatus* en milieu submergé. Ces produits ont montré leur pathogénicité contre les larves et adultes de *Culex quinquefasciatus*. Cette nouvelle technique basée sur le fonctionnement de bioréacteur pourrait être optimisée pour une production industrielle de produits d'origine fongique contre les moustiques vecteurs. Cependant, une meilleure connaissance des voies d'action, des molécules impliquées dans la pathogénicité permettrait d'apporter plus de précisions dans le mode d'action. Il est nécessaire de faire d'autres études sur l'action de ces produits sur les autres organismes aquatiques et dans l'environnement.

CHAPITRE 3

FORMULATION DES CHAMPIGNONS AVEC LE SUNEEM CONTRE LES MOUSTIQUES VECTEURS

FORMULATION DU CHAMPIGNON *ASPERGILLUS CLAVATUS* CONTRE LES MOUSTIQUES ADULTES *CULEX QUINQUEFASCIATUS*

I- INTRODUCTION

En Afrique, certaines espèces de moustique appartenant aux genres *Anopheles*, *Aedes* et *Culex* sont responsables de la transmission de parasites responsables de maladies (malaria, fièvre jaune, filarioses etc.). Dans la lutte contre les moustiques vecteurs, des études ont montré l'efficacité de produits de neem (Ndione *et al.*, 2005 ; Seye *et al.*, 2006 a, b ; Okumu *et al.*, 2007) et de champignons (Su *et al.*, 2001 ; Scolte *et al.*, 2003, 2004 a, b ; Govindarajan *et al.*, 2005 ; Scolte *et al.*, 2007). Certaines espèces de champignons appartenant au genre *Aspergillus* sont connues pour leur effet pathogène contre les larves de moustiques (*A. parasiticus* (Hati et Ghosh, 1965), *A. flavus* et *A. parasiticus*, (Govindarajan *et al.*, 2005)). Cependant, l'application des spores de champignon contre les moustiques adultes nécessite une formulation pour permettre l'adhésion et la pénétration par la cuticule. Selon Bradley et Britton (1995), les spores de champignons tels que *Beauveria bassiana* et d'autres espèces entomopathogènes sont fortement hydrophobes et difficiles à suspendre dans l'eau. Beaucoup d'applications des mycètes utilisant l'eau, les suspensions détersives, ou les poudres mouillables, emploient les argiles comme aides de suspension ou poudre sèche. Cependant, dans des suspensions en eau, les spores peuvent germer et perdre leur infectiosité après seulement vingt-quatre heures (Bradley et Britton (1995)). Actuellement, seules certaines espèces de champignons telles que *Metarrhizum anisopliae* (Bateman *et al.*, 1993 ; Hernadez *et al.*, 2000 ; Kaaya et Hassan, 2000) et *Beauveriae bassiana* (Hirose *et al.*, 2001) sont utilisées dans des formulations huileuses. La compatibilité entre l'huile de neem et certains champignons entomopathogènes (*M. anisopliae* et *Beauveriae bassiana*) a été montrée (Hirose *et al.*, 2001). Par contre, la compatibilité entre l'huile de neem et certaines espèces appartenant au genre *Aspergillus* telle qu'*Aspergillus clavatus* n'a pas été montrée.

Cette présente étude consiste à montrer la compatibilité entre *A. clavatus* et une huile de neem émulsionnable (Suneem1%) contre des adultes mâles et femelles de moustique vecteur de filariose *Culex quinquefasciatus*.

II- MATÉRIEL ET MÉTHODES

A- Huile de neem (Suneem 1%)

Le Suneem 1% est formulée par une industrie chimique Sénégalaise (SENCHIM=Sénégal=Chimie). C'est une formulation émulsionnable obtenue à partir de l'huile de neem pure enrichie en matière active (m.a.) (Azadirachtine).

B- Le champignon

La souche d'*A. clavatus* a été isolée à l'Université Cheikh Anta Diop de Dakar et identifié au laboratoire. Après culture sur farine de blé stérilisée à 120°C pendant 10 mn, les spores ont été récupérées et conservées au froid. La teneur en spores (nombre de spores par gramme) a été effectuée sur lame hématifluorique.

C- Les moustiques

Des larves de *Culex quinquefasciatus* ont été récoltées au niveau des bacs du Département de Biologie Animale (Université Cheikh Anta Diop de Dakar, Sénégal). Elles ont été élevées dans des bocaux de dimension 10 x 10 x 7 cm à une humidité relative de 70 à 85% et une température moyenne de 26°C. Elles ont été nourries avec de la chapelure de pain. Après émergence des adultes dans des cages de dimension 50 x 50 cm, nous avons séparé les femelles des mâles dans deux cages. Tous les adultes ont été nourris avec une solution de sucre 10 % pendant 48 h avant les tests.

D- Préparation du produit

Dans un Erlenmeyer de 250 ml contenant 100 ml de Suneem 1%, nous avons versé une quantité de 1 g de spores sèches (79×10^9 spores). Le tout est placé sur un agitateur pendant 2h pour avoir un produit mixte S+A (79×10^7 spores/ml et 10 mg m.a./ml).

Pour la solution de pulvérisation nous avons dilué 10 ml de cette solution S+A avec 90 ml d'eau distillée dans un tube de 250 ml. La teneur de cette solution est donc $7,9 \times 10^7$ spores/ml.

E- Test de toxicité sur les moustiques:

Trois séries de traitements ont été faites pour la même dose. Pour chaque série, nous avons utilisé 3 cages cubiques (50 x 50 cm). Dans chaque cage, nous avons mis 50 mâles et 50 femelles de *Culex quinquefasciatus*. Nous avons pulvérisé séparément la formulation du champignon et l'huile de neem à une dose de 40 ml/m² respectivement dans les deux premières cages, la troisième ayant servi de témoin (pas de pulvérisation). Nous avons choisi cette dose en spores en nous référant sur la gamme de doses choisies par Scholte *et al.* (2003). Les tests avec l'huile de neem formulée (Suneem) sont réalisés pour voir son effet sur les adultes.

La pulvérisation a été faite à travers les mailles de la toile moustiquaire. Les moustiques seront donc infectés directement au moment de la pulvérisation ou au moment du repos sur la toile moustiquaire. Les constats de mortalité et du nombre de survie (mâle et femelle) ont été effectués toutes les 24h (pendant 5 jours). Ces deux constats sont faits pour vérifier l'effectif total (50 mâles et 50 femelles). Pour vérifier l'infection des adultes par le champignon, les moustiques morts ont été placés dans des boîtes de Pétri avec papier filtre imbibé d'eau distillée. Les observations ont été effectuées à la loupe 7 jours après incubation.

F- Analyse des données

Les pourcentages de survie mâle et femelle sont utilisés pour l'analyse de survie avec le logiciel Statview. Les mortalités sont corrigées avec la formule d'Abbott (Abbott, 1925). Les mortalités cumulées des adultes traités avec la formulation S+A et S sont utilisées pour effectuer le test t de Student.

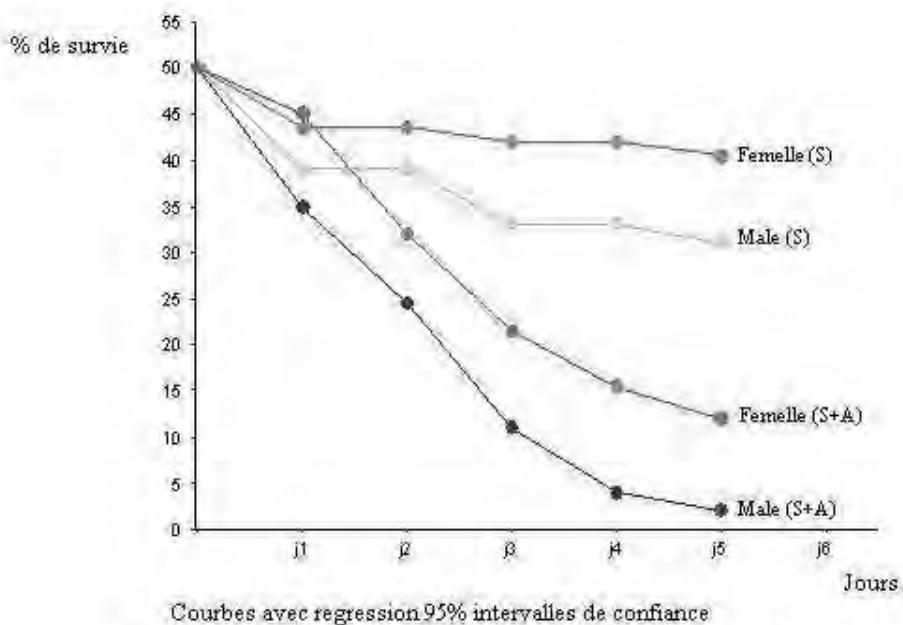
III- RÉSULTATS

Tout juste après pulvérisation des deux produits S+A et S sur les moustiques adultes, nous avons constaté une chute rapide d'environ 90% des adultes. Quelques minutes après (30 mn), presque 95% avaient repris leur vol et se trouvaient sur les parois de la cage. Vingt quatre heures après pulvérisation, nous avons commencé à constater les mortalités. Les résultats ont montré que les courbes de régression de survie des adultes traités aux deux produits sont plus basses chez les mâles que chez les femelles (Fig. 18). Cependant, les mortalités cumulées (Fig. 19) ont été plus importantes avec la formulation (S+A) qu'avec le Suneem seul (S) ($p= 0,06$) ou le témoin ($P= 0,008$). L'incubation des adultes morts pendant 7 jours sur papier filtre humide

montre une forte germination (>95%) du champignon *A. clavatus* (Fig. 20). Par contre, aucune germination n'a été observée sur les adultes non traités au champignon.

Tableau 16 - Pourcentage de mortalités cumulées des adultes mâles et femelles de *Culex quinquefasciatus* traités au S+A ou S (A= *Aspergillus clavatus*, S= Suneem, T= Témoin).

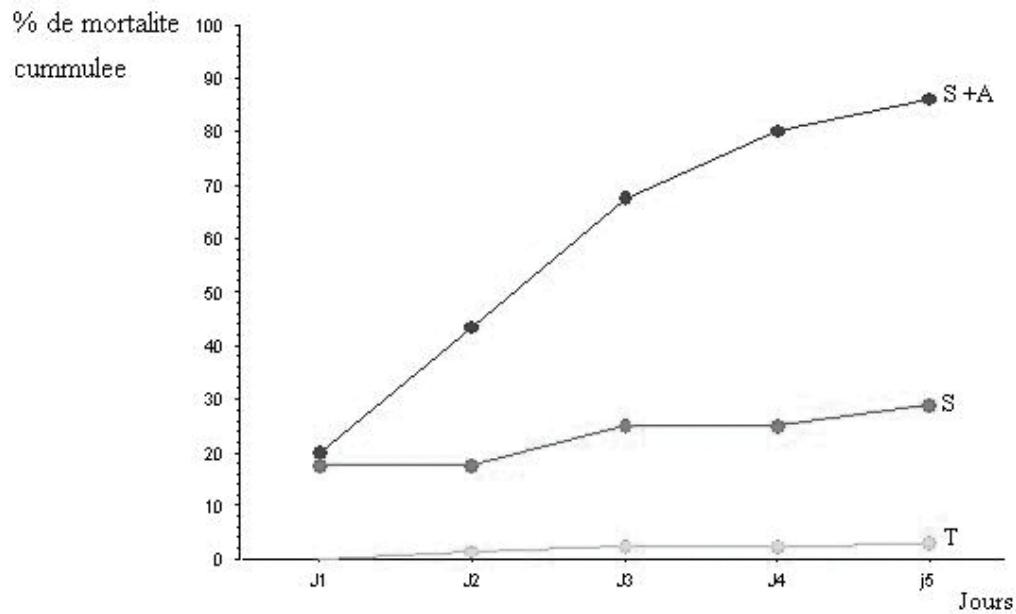
Jours	S+A			S			T
	Male	Femelle	Total	Male	Femelle	Total	
J1	15 ± 0,7	5 ± 0,4	20 ± 0,11	11 ± 0,1	6,5 ± 1,5	17,5 ± 1,6	0 ± 0,0
J2	25,5 ± 1,3	18 ± 0,01	43,5 ± 1,3	12 ± 0,5	6,5 ± 0,4	18,5 ± 0,9	1,5 ± 0,4
J3	39 ± 0,2	28,5 ± 0,1	67,5 ± 0,3	17 ± 0,4	8 ± 1,3	25 ± 1,7	2,5 ± 0,3
J4	46 ± 0,7	34 ± 0,6	80 ± 1,3	17 ± 0,4	8 ± 0,09	25 ± 0,5	2,5 ± 1,2
J5	54 ± 1,3	32 ± 0,4	86 ± 1,7	19 ± 1,1	10 ± 0,3	29 ± 1,14	3 ± 1,1



Courbes avec régression 95% intervalles de confiance

18

Pourcentage de survie des adultes male et femelle de Culex quinquefasciatus traités aux produits S ou (S+A). S= Suneem, A = Aspergillus clavatus.



Mortalités cumulées des adultes de Culex quinquefasciatus traités aux produits S ou S+A. S= Suneem, A= Aspergillus clavatus.

19



Figure 20- *Culex quinquefasciatus* mâle non infecté (A) et infecté (B) par *Aspergillus clavatus* 7 jours après incubation. Ab. = Abdomen, Ai= Aile, An. = Antenne, T. = Tête, Th. = Thorax.

IV- DISCUSSION

Selon Kirschbaum (1985), les champignons pathogènes aux insectes et leurs dérivés peuvent être une approche prometteuse pour la lutte biologique contre les moustiques. Plusieurs espèces de champignons appartenant au genre *Aspergillus* telles que *Aspergillus parasiticus*, *A. flavus* ont montré leur effet pathogène contre les larves de moustique. Cependant, l'effet pathogène d'une espèce de champignon appartenant au genre *Aspergillus* n'a pas été montré sur les moustiques adultes.

Dans nos travaux, l'utilisation d'*Aspergillus clavatus* formulé avec une huile émulsionnable (Suneem) a montré un effet adulticide contre *Culex quinquefasciatus*. Cependant, les mortalités diffèrent selon le sexe du moustique adulte. Comparés aux travaux de Scholte *et al.* 2003, *A. clavatus* a les mêmes effets que *Metarhizium anisopliae* contre les adultes de *Cx quinquefasciatus*. En effet, nos résultats ont montré que 5 jours après application de la formulation de *A. clavatus*, les mortalités observées chez les adultes mâles sont plus importantes ($54 \pm 1,3\%$) que celles observées chez les femelles ($32 \pm 1,1\%$). Cependant, Scholte *et al.* 2003 ont obtenu avec *M. anisopliae* un TL_{50} de 5 jours chez les adultes avec $1,6 \times 10^{10}$ spores/m² alors que nous avons obtenu avec *A. clavatus* une mortalité de $86,5 \pm 0,71\%$ pour une dose de $3,16 \times 10^9$ spores/m². Cette différence de mortalité pourrait être expliquée par la sensibilité de *Cx quinquefasciatus* par rapport aux deux espèces de champignon ou par l'huile de formulation du champignon. En effet, Scholte *et al.* 2003 ont utilisé l'huile de tournesol, alors que dans nos travaux nous avons utilisé le Suneem contre la même espèce de moustique. Par ailleurs, des travaux ont montré que le Suneem a un effet larvicide sur *Anopheles gambiae* (Ndione *et al.*, 2007). Des travaux ont montré également que les produits de neem ont un effet de blocage sur l'oogenèse du moustique *Anopheles stephensi* (Lucantoni *et al.*, 2006) et un effet répulsif (Ravindran *et al.*, 2002 ; Sharma *et al.*, 1995). L'utilisation du Suneem expliquerait donc les fortes mortalités que nous avons obtenues en 5 jours ($86,5 \pm 0,71\%$) avec une dose de $3,16 \times 10^9$ spores/m². Néanmoins, cette mortalité obtenue sur *Cx quinquefasciatus* est proche de celle trouvée par Scholte *et al.*, 2007 sur *Aedes aegypti* ($87,1 \pm 2,67\%$) et sur *Aedes albopictus* ($89,3 \pm 2,2\%$) avec l'utilisation du *M. anisopliae* mais à une dose plus forte que la notre ($1,6 \times 10^{10}$ spores/m²). Dans leurs travaux, ils ont aussi montré cette différence de sensibilité entre les mâles et les femelles vis-à-vis du champignon.

Les fortes mortalités observées avec le champignon formulé pourraient aussi être expliquées par un effet de synergie entre *A. clavatus* et l'azadirachtine contenue dans l'huile de neem. La germination du champignon sur les adultes montre la compatibilité entre le Suneem et *A. clavatus*. Des études ont montré également des cas de synergisme entre différents biopesticides

contre les moustiques (George et Vincent, 2005). Cela montre donc la possibilité de combiner différents biopesticides compatibles pouvant agir en synergie. Cette nouvelle approche pourrait être une alternative à l'utilisation de certains insecticides chimiques pour une lutte efficace contre les moustiques vecteurs.

Nos travaux ont montré la compatibilité de l'huile de neem (Suneem) avec *A. clavatus*, leur action adulticide sur *Cx. quinquefasciatus* et une possibilité de synergisme. Cependant, l'azadirahine contenue dans l'huile de neem est sensible aux rayonnements ultraviolets et a une durée de vie déterminée (Scott et Kaushik, 2000). Selon Bradley et Britton (1995), les spores sont mieux protégées par les formulations huileuses contre les rayons ultraviolets mais avec une durée de vie de 40 jours. Nos travaux n'ont pas montré la durée de la compatibilité entre *A. clavatus* et le Suneem. Il est donc nécessaire d'étudier d'une part l'effet synergique et la durée de la compatibilité entre l'huile de neem formulée et *Aspergillus clavatus*; et d'autre part utiliser cette huile dans la formulation du *M. anisopliae* contre d'autres espèces comme *Anopheles gambiae*.

CONCLUSION :

Dans cette étude, nous avons montré la possibilité de formuler les spores d'*Aspergillus clavatus* avec le Suneem contre les adultes de *Culex quinquefasciatus*. Le suneem a un effet synergique avec les spores en facilitant leur adhésion sur la cuticule des moustiques. Cependant, les adultes mâles sont plus sensibles que les femelles.

L'utilisation du Suneem dans la formulation d'autres champignons contre d'autres moustiques vecteurs tels que les espèces appartenant au genre *Anopheles* devrait être évaluée.

FORMULATION DU *METARHIZIUM ANISOPLIAE* AVEC LE SUNEEM CONTRE LES ADULTES D'*ANOPHELES GAMBIAE* SL

I- INTRODUCTION:

Certaines espèces de moustiques telles que *Anopheles gambiae* et *Culex quinquefasciatus* sont vectrices de plusieurs parasites responsables de maladies telles que le paludisme et les filariose. Dans les pays sub-sahariens tel que le sénégal, le taux élevé du paludisme est pratiquement lié à une urbanisation rapide (Trape *et al.*, 1992 ; Fontenille *et al.*, 1997 ; Robert *et al.*, 2006 ; Pagès *et al.*, 2008 ; Machault *et al.*, 2009). Les méthodes de lutte chimiques et mécaniques sont les plus utilisées contre ces vecteurs. Une des stratégies majeures pour éliminer le paludisme est la protection individuelle utilisant des moustiquaires imprégnées d'insecticides (Talani *et al.*, 2005 ; Kweka *et al.*, 2008).

Dans la lutte contre les moustiques, beaucoup d'efforts ont été fournis dans l'utilisation des insecticides de synthèse. Cependant, certains de ces produits ont causé des cas de résistance de certaines espèces de moustiques (Akogbeto et Yakoubou, 1999 ; Darriet *et al.*, 2000 ; Weill *et al.*, 2003). Pour une alternative, l'utilisation de biopesticides est de plus en plus convoitée. Parmi ces agents biocides, des extraits de plantes, (Pushpalatha et Muthukrishnan, 1999 ; Seye *et al.*, 2006 ; Nazar *et al.*, 2009 ; El-Sheikh, 2009), des bactéries (Geetha *et al.*, 2011) et des champignons entomopathogènes (Scolte *et al.*, 2003 ; 2006 ; Kannan *et al.*, 2008 ; Seye *et al.*, 2009 ; Mynone *et al.*, 2009 a, b ; Paula *et al.*, 2011 ; Garcia-Munguia *et al.*, 2011,) demeurent les plus prometteux. Cependant au Sénégal, la lutte biologique contre les moustiques est moins connue.

Plusieurs études ont montré l'efficacité des champignons contre les moustiques (Scholte *et al.*, 2003 ; 2006, Kannan *et al.*, 2008 ; Paula *et al.*, 2011 ; Mynone *et al.*, 2009 a, b). Ces champignons infectent généralement les insectes par contact directe avec la cuticule. Cependant un problème lié à une bonne formulation des spores facilitant la pulvérisation doit être résolu. Des études ont montré la possibilité d'utiliser les spores avec des extraits de plantes (Seye et Ndiaye, 2008), des insecticides chimiques (Zurek *et al.*, 2002 ; Hornbostel *et al.*, 2005, Farenhorst *et al.*, 2010), mais aussi sous forme d'agrégats (Daoust *et al.*, 1982) contre les insectes. Mahmoud, 2009 et Mnyone *et al.*, 2009 a, ont même montré la possibilité de combiner des souches différentes de champignons entomopathogènes contre les insectes. Récemment, des formulations huileuses de champignon ont montré des résultats satisfaisants

dans le contrôle des insectes (James, 2003) et particulièrement des moustiques (Mnyone *et al.*, 2009a, Visalakshy *et al.*, 2006). Certains ont trouvé cependant une faible efficacité de la combinaison de certaines huiles de neem avec des champignons (Bajan *et al.*, 1998, Hirose *et al.*, 2001, Depieri *et al.*, 2005), ce qui n'est pas le cas pour d'autres (Visalakshy *et al.*, 2006, Rodrigues-Lagunes *et al.*, 1997). Parmi ces huiles, le Suneem n'a pas été utilisée pour la formulation du *Metarhizium anisopliae* et évaluée contre les moustiques.

L'objectif de cette étude était de démontrer la possibilité de formuler les spores de *Metarhizium anisopliae* avec l'huile de neem (Suneem) contre les adultes d'*Anopheles gambiae* s.l et de *Culex quinquefasciatus*.

II- MATERIEL ET METHODES

A- Echantillonnage des moustiques

Les larves d'*Anopheles gambiae* s.l. et de *Culex quinquefasciatus* ont été collectées dans différentes zones de la banlieue de Dakar: Thiaroye sur mer ($14^{\circ}44'31''N$ et $17^{\circ}23'53''W$), Sam-Sam III ($14^{\circ}45'41''N$ et $17^{\circ}21'25''W$) Pikine rue 10 ($14^{\circ}45'32''N$ et $17^{\circ}23'53''W$) Pikine Niéty Mbar ($14^{\circ}46'04''N$ et $17^{\circ}22'32''W$) et Guédiawaye ($14^{\circ}46'55''N$ et $17^{\circ}22'00''W$). Les gîtes de récoltes étaient composés de: canaux d'irrigation, eaux temporaires et des canaux de drainage. Les larves ont été ensuite transportées dans des bocaux contenant des eaux de gîtes. Au laboratoire, les larves ont été séparées et identifiées selon Hopkins, (1852) et Glick, (1992). Après émergence, les adultes ont été nourris avec une solution de sucre à 10%. A ce stade, une autre identification a été faite pour confirmer l'identification au stade larvaire.

B- Formulation du champignon:

Le *Metarhizium anisopliae* utilisé est une souche locale isolée sur le criquet *Oedaleus senegalensis* Krauss, 1877 (Orthoptera: acrididae), au Laboratoire de Biologie de la Reproduction en 2006. Le champignon a été cultivé sur des grains de riz stérilisés dans des boîtes de Pétri de dimensions 9 cm de diamètre et 3 cm de profondeur. Les spores ont été récoltées 15 jours après et stockées dans une bouteille en verre Pyrex stérilisée à $110^{\circ}C$. Une formulation a été faite avec le suneem et une autre avec de l'eau distillée. Le Suneem 1% est une huile émulsible dans l'eau formulée avec un solvant Tetrahydrofurfuryl Alcohol (THFA) qui est un produit biodégradable. Pour la formulation huileuse, 10 ml de Suneem 1% ont été mélangés avec 2 g de spores sèches. Le tout a été homogénéisé pendant 15 min.

après la détermination de la teneur en spores avec un hémacytomètre (modèle Thoma), nous avons dilué la solution avec 500 ml d'eau distillée pour obtenir une concentration finale de 6×10^7 spores / ml.

La formulation aqueuse a été préparée avec le même volume d'eau distillée.

Pour la formulation huileuse, nous avons fait des tests préliminaires pour vérifier qu'il n'y avait pas un effet négatif sur l'inhibition de la sporulation du champignon.

C- Pulvérisation sur les adultes

Pour chaque produit, 4 cages de dimensions 30 x 30 x 30 cm contenant 50 mâles et 50 femelles âgés entre 5 et 7 jours ont été traités. Avec un pulvérisateur à main, nous avons appliqué chaque formulation à travers les mailles du tissu moustiquaire pour atteindre les moustiques adultes. Un volume de 20 ml de la formulation huileuse correspondant à une dose de 6×10^7 spores / ml ($1,3 \times 10^{10}$ spores/m²) a été appliqué. Pour le témoin, nous avons appliqué le même volume de la solution de Suneem.

Pour la formulation aqueuse de champignon, la même dose a été appliquée. Pour le témoin, le même traitement a été fait avec de l'eau distillée. Les conditions ont été de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ et $75 \pm 2\%$ d'humidité relative (HR). Ils ont été nourris avec une solution de sucre 10% durant tout le traitement.

Le nombre de moustiques vivants a été compté toutes les 24h pour calculer le taux de survie pendant 4 jours. Les adultes morts ont été déposés sur un papier Whatman stérile et humide pour l'incubation (25°C et 75% HR) dans des boîtes de Pétri afin de suivre l'émergence du champignon. Après émergence, la sporulation a été visualisée avec un microscope optique Motic (x 40) connecté à un ordinateur.

Les expériences ont été répétées quatre fois à différentes périodes pour chaque test. Les résultats représentent des moyennes.

Les données ont été traitées avec le logiciel Statview.

III- RESULTATS

Après l'application des produits sur les adultes, le taux de survie des moustiques adultes d'*Anopheles gambiae* et de *Culex quinquefasciatus* diminue dans le temps et avec les doses (Figs. 21 et 22). Cependant, la survie des adultes a été plus faible avec le traitement de la formulation huileuse du *Metarhizium anisopliae* qu'avec la formulation aqueuse de même qu'avec le Suneem seul. Pour la formulation huileuse du champignon, les pourcentages de

survie vont de $67 \pm 3,4$ à $5 \pm 0,5\%$ pour *An. gambiae*, et de $51 \pm 4,1$ à $12 \pm 1,1\%$ pour *Cx quinquefasciatus* en l'espace de 4 jours. Pour le Suneem, le pourcentage de survie au quatrième jour était plus élevé ($82 \pm 2,5\%$ pour *An. gambiae* et $89 \pm 1,3\%$ pour *Cx quinquefasciatus*).

Pour la formulation aqueuse du champignon, les pourcentages de survie ont été de $97 \pm 3,2$ à $58 \pm 2,1\%$ pour *An. gambiae* et de $95 \pm 2,5$ à $70 \pm 2,1\%$ pour *Cx quinquefasciatus* en l'espace de 4 jours. Pour ces deux formulations, le T-test a montré une différence très significative de l'effet des produits sur la survie des adultes par rapport au témoin ($p < 0,0001$) (Tableaux 17 et 18). Par ailleurs, le test univarié a montré que la formulation huileuse du champignon a été plus efficace contre les adultes d'*Anopheles gambiae* ($P = 0,001$) et de *Culex quinquefasciatus* ($P = 0,002$) que la formulation aqueuse.

Dans tous les cas, l'infection du champignon a été vérifiée par son émergence sur les adultes morts 7 jours après incubation (Figs. 23 A et B). Cette émergence a été observée au niveau de la tête, du thorax et de l'abdomen des adultes. Cependant, aucune émergence du champignon n'a été observée sur les adultes non traités avec le champignon (Figs. 23 C et D).

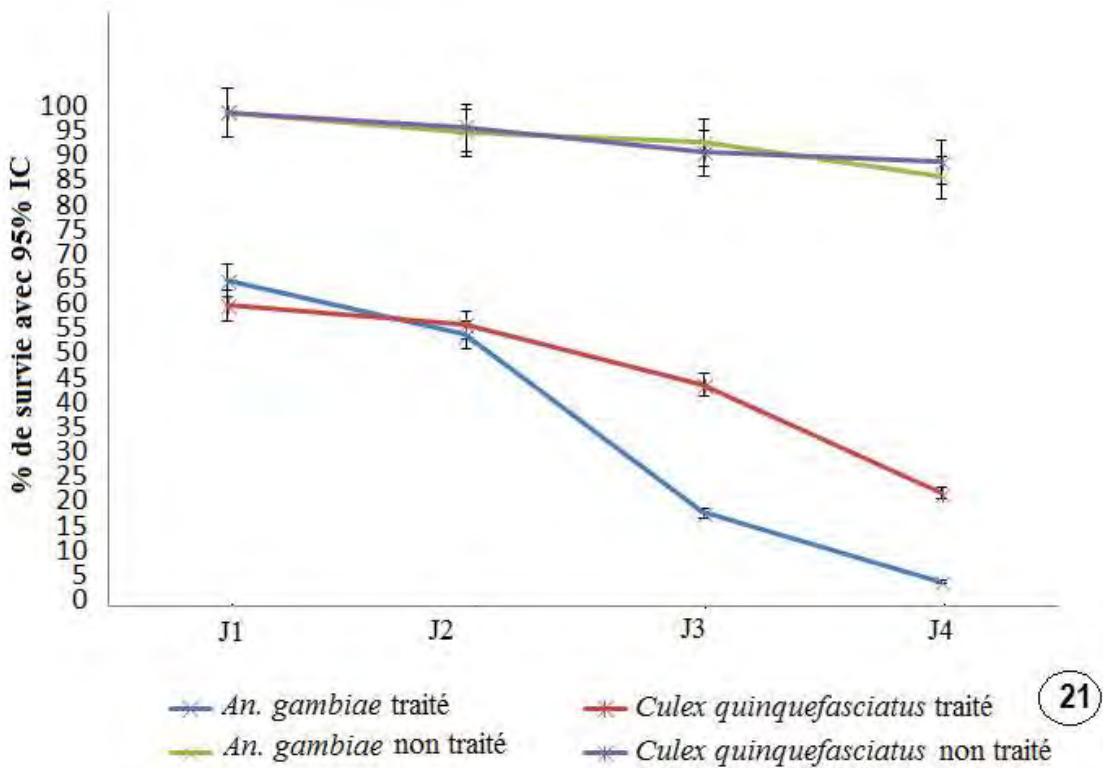


Figure 21 : Pourcentage de survie des adultes d'*Anopheles gambiae* et de *Culex quinquefasciatus* traités avec la formulation huileuse (Suneem) du *Métarhizium anisopliae* au cours du temps.

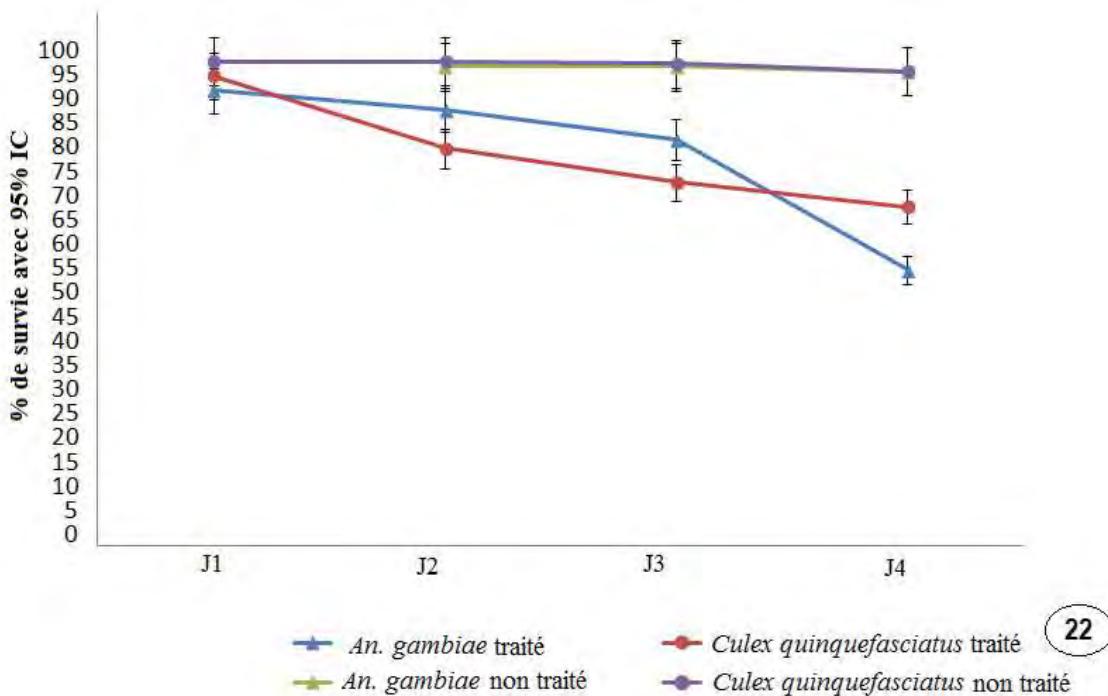


Figure 22: Pourcentage de survie des adultes d'*Anopheles gambiae* et de *Culex quinquefasciatus* traités avec la formulation aqueuse du *Métarhizium anisopliae* au cours du temps

Tableau 17: Pourcentage de survie des adultes d'*Anopheles gambiae* sl traités avec la formulation huileuse et aqueuse de *Metarhizium anisopliae* à $1,3 \times 10^{10}$ spores/m².

Jours après traitement	Formulation huileuse	Témoin Suneem	P	Formulation aqueuse	Témoin (Eau)	P
	Average percentage of survey ± SE				Average percentage of survey ± SE	
J1	67 ± 3,4	100 ± 0,0	< 0,0001	97 ± 3,2	100 ± 0,1	= 0,0678
J2	61 ± 2,1	93 ± 1,4	< 0,0001	94 ± 2,4	99 ± 1,8	= 0,0008
J3	14 ± 1,5	86 ± 2,1	< 0,0001	82 ± 1,5	99 ± 4,2	< 0,0001
J4	5 ± 0,5	82 ± 2,5	< 0,0001	58 ± 2,1	98 ± 2,1	< 0,0001

Tableau 18: Pourcentage de survie des adultes de *Culex quinquefasciatus* traités avec la formulation huileuse et aqueuse de *Metarhizium anisopliae* à $1,3 \times 10^{10}$ spores/m².

Jours après traitement	Formulation huileuse	Suneem (témoin)	P	Formulation aqueuse	Témoin (eau)	P
	Pourcentage de survie ± ET				Pourcentage de survie ± ET	
J1	65 ± 4,1	100 ± 0,0	< 0,0001	95 ± 2,5	100 ± 0,0	= 0,0008
J2	58 ± 2,2	96 ± 1,2	< 0,0001	84 ± 1,8	98 ± 0,2	< 0,0001
J3	48 ± 2,0	95 ± 2,1	< 0,0001	75 ± 4,2	98 ± 0,1	< 0,0001
J4	12 ± 1,1	89 ± 1,3	< 0,0001	70 ± 2,1	97 ± 0,0	< 0,0001

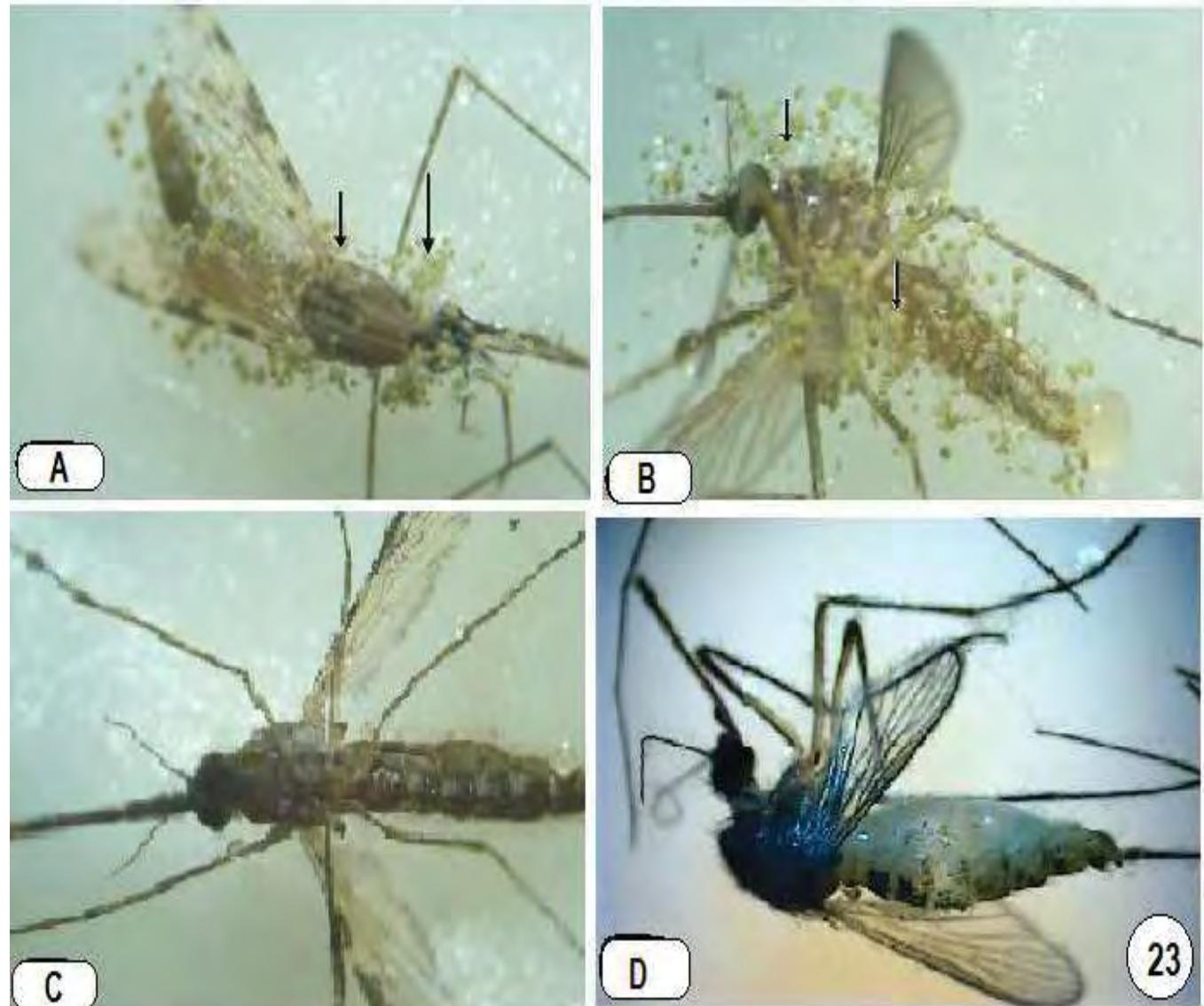


Figure 23: Adultes d'*Anopheles gambiae* (A) et *Culex quinquefasciatus* (B) infectés après traitement avec le champignon *Metarhizium anisopliae* et non infectés (témoin) (C et D). (X40)

IV-DISCUSSION:

Dans cette étude, la pathogénicité du *Metarhizium anisopliae* formulé avec l'huile de neem (Suneem 1%) a été démontrée sur les adultes d'*Anopheles gambiae* et de *Culex quinquefasciatus*. La diminution de la survie des adultes observée, confirme d'autres résultats portant sur l'effet de ce champignon sur les moustiques adultes (Scolte *et al.*, 2003 ; 2004 a, b; 2006). Dans ce travail, nous n'avons observé aucun effet d'inhibition du Suneem sur la pathogénicité du champignon contre les moustiques adultes. En effet, les résultats ont révélé que la formulation huileuse du champignon a été plus efficace que la formulation aqueuse ou le Suneem seul contre les adultes. Ce qui confirme nos résultats précédents portant sur la compatibilité du Suneem avec les champignons tel qu'*Aspergillus clavatus* (Seye et Ndiaye 2008). D'autres études ont également montré la possibilité de combiner l'huile de neem avec les spores de champignon contre les insectes (Mohanty *et al.* 2008 ; Islam *et al.*, 2010). Cependant, certaines huiles ne sont pas très compatibles avec ces champignons (Hirose *et al.*, 2001 ; Depieri *et al.*, 2005 ; Rodrigues-Lagunes *et al.*, 1997). L'huile facilite non seulement la pulvérisation (Bukhari *et al.*, 2011), mais aussi joue un rôle synergique sur la toxicité (Depieri *et al.*, 2005 ; Seye et Ndiaye 2008) et facilite l'adhésion des spores sur la cuticule des insectes (Visalakshy *et al.*, 2005 ; 2006). L'effet bénéfique du suneem est aussi sa toxicité contre les insectes comme les larves de moustiques (Seye *et al.*, 2006 b). La faible pathogénicité du Suneem seul sur les adultes comparée à d'autres utilisées dans d'autres travaux (Farenhorst et Knols, (2010), Farenhorst *et al.*, 2011), serait due à la dilution de la solution concentrée de l'huile (1 /50).

D'une manière générale, le choix porté sur l'huile est primordial pour accroître la pathogénicité des champignons entomopathogènes. Certaines huiles peuvent inhiber la germination du champignon, donc affectent le pouvoir pathogène (Hornbostel *et al.*, 2005). De ce fait, la composition de l'huile joue un rôle très importante sur l'efficacité des spores (Sidhu *et al.*, 2004).

Dans nos travaux, nous avons pu observer une agitation des adultes juste après pulvérisation des produits huileux comme l'ont déjà montré d'autres études (Xue *et al.*, 2003), mais aussi un "knockdown" éphémère. Ce qui serait due dans le cas de notre étude, au solvant volatile (THFA) présent dans le Suneem.

Dans cette étude, la dose utilisée contre *An. gambiae* et *Cx quinquefasciatus* a été de 6×10^7 spores / ml. Ce qui est inférieure à celle utilisée par Kannan *et al.* (2008) contre *Anopheles stephensi* (1×10^8 spores / ml d'huile en suspension), ou celle de *M. anisopliae* formulé avec l'huile de tournesol contre des moustiques adultes à $1,6 \times 10^{10}$ spores/ml (Scholte *et al.*, 2003). Cependant les méthodes d'application ne sont pas les mêmes. Nous avons appliqués les produits directement sur les adultes à travers les mailles du tissu qui peut retenir les spores. Les moustiques seraient donc continuellement en contact avec les spores durant les 4 jours de suivi. Ce qui montre également que la méthode d'application peut jouer sur les résultats, même si pour Farenhorst et Knols, (2010), l'utilisation d'une méthode standard (sur un substrat), permet d'optimiser l'efficacité des doses en spores et le temps d'exposition. Certains tests de laboratoires ont aussi utilisé un substrat comme le papier filtre (Geetha *et al.*, 2011 ; Scholte *et al.*, 2006) ou d'autres types de substrats (Farenhorst et Knols, (2010) ; Mnyone *et al.*, 2011 ; Howard *et al.*, 2010).

Cette efficacité pourrait être due aussi par leur âge (de 5 à 7 jours), ce qui rejoignent Mnyone *et al.*, 2011 qui ont montré que les moustiques âgés et n'ayant pas pris un repas sanguin sont plus sensibles que les plus jeunes.

Par ailleurs, la différence d'efficacité par rapport à ces travaux pourrait s'expliquer sur la nature des surfaces de contact de l'insecte avec les spores (tarses, tête, thorax, abdomen et les antennes). Puisque la germination du champignon dépend de l'humidité et d'autres facteurs (Holder et Keyhani , 2005), la richesse en eau de ces éléments (tête, thorax et abdomen) montrent plus de germination que les autres parties de l'insecte. Ce qui pourrait expliquer le taux d'infection à ces endroits contrairement aux tarses et antennes. De ce fait, si l'application du champignon se fait sur un substrat uniquement (Howard *et al.*, 2010), les adultes seraient en contact par les tarses, les ailes ou les antennes et rarement par le reste du corps de l'insecte.

Nous avons utilisé 50 mâles et 50 femelles dans une même cage pendant 4 jours. Ce qui pourrait augmenter les contacts entre les moustiques adultes et donc l'efficacité du champignon. Ce qui voudrait dire que le nombre de mâles et de femelles joue sur l'efficacité grâce à leur activité d'accouplement confirmant les travaux de Scholte *et al.*, 2004.

Etant donné que l'infection due au champignon pourrait atteindre le développement du parasite Plasmodium au sein des moustiques vecteurs (Blanford *et al.*, 2005), des investigations devraient être menées dans le sens d'optimiser la méthode de lutte utilisant les produits d'origine fongique.

CONCLUSION:

La souche de *Metarhizium anisopliae* utilisée dans cette étude est compatible avec le Suneem 1% et peut affecter les moustiques adultes après pulvérisation. La surface de contact et la durée d'exposition augmentent l'efficacité du produit. Il serait donc intéressant de mener des études plus approfondies sur cette formulation afin de vulgariser son utilisation dans la lutte biologique contre les moustiques vecteurs au Sénégal. Ainsi, une technique de pulvérisation devrait être développée pour des applications au niveau des gîtes larvaires afin de contrôler leur développement.

FORMULATION DU *METARHIZIUM ANISOPLIAE* AVEC LE SUNEEM CONTRE LES LARVES D'*ANOPHELES GAMBIAE* SL EN MILIEU SEMI-NATUREL

I- INTRODUCTION

Au sénégal, la transmission du paludisme est fortement liée à l'urbanisation (Fontenille *et al.*, 1997 ; Robert *et al.*, 2006 ; Pagès *et al.*, 2008). Avec les fortes pluies enregistrées depuis 2005, certaines zones de Dakar sont fréquememnt inondées. Ce qui serait à l'origine du développement des moustiques de genres *Anopheles*, *Aedes* et *Culex* en périodes hivernale et post-hivernale.

Plusieurs efforts sont fournis dans le cadre de la lutte contre le paludisme utilisant les insecticides chimiques et surtout des moustiquaires imprégnées (Talani *et al.*, 2005 ; Kweka *et al.*, 2008 ; Adeogun *et al.*, 2012). Avec l'apparition des cas de résistance de moustiques (Akogbeto et Yakoubou, 1999 ; Weill *et al.*, 2003) une méthode alternative s'impose. Les agents biologiques tels que les bactéries et les champignons entomopathogènes sont d'actualité.

Plusieurs études ont montré que les champignons occupent une place importante dans cette nouvelle méthode de lutte contre les moustiques (Scholte *et al.*, 2003; 2004a, b; 2006; Kannan *et al.*, 2008; Seye *et al.*, 2008 ; Bilal *et al.*, 2011; Seye *et al.*, 2012). Pour faciliter leur pulvérisation et augmenter leur efficacité, plusieurs huiles ont été utilisées (Visalakshy *et al.*, 2006 ; Seye et Ndiaye 2008; Sahayaraj *et al.*, 2011). *M. anisopliae* a été formulé avec des huiles contre des moustiques adultes (Mnyone *et al.*, 2011 ; Seye *et al.*, 2012), mais rarement contre les larves (Bukhari *et al.*, 2011). Ces derniers auteurs ont montré que la formulation du *M. anisopliae* avec un solvant dérivé du pétrole réduit le pourcentage de formation de nymphes d'*Anopheles gambiae* sl dans les conditions de laboratoire et sur le terrain.

Parallèlement, des huiles de neem ont été aussi utilisées même si certaines ont un effet d'inhibition sur les spores (Bajan *et al.*, 1998; Hirose *et al.*, 2001; Depieri *et al.*, 2005). Suneem a été utilisé dans la formulation du *M. anisopliae* contre les adultes d'*An. gambiae* (Seye *et al.*, 2012). Pour montrer son spèctre d'action, l'efficacité contre les larves devrait être une investigation.

Cette présente étude a comme objectif d'évaluer cette formulation contre les larves d'*An. gambiae* afin de montrer sa potentialité sur le terrain.

Pour cela, nous nous sommes fixés comme objectifs spécifiques:

- 1) de déterminer au laboratoire les doses létales DL₅₀ et DL₉₀ de *Metarhizium anisopliae* formulé avec le Suneem sur des larves d'*An. gambiae*
- 2) d'évaluer l'efficacité de la DL₉₀ en milieu semi-naturel contre l'émergence des adultes.

II- MATERIEL ET METHODES

A- Les larves de moustique

Les larves d'*An. gambiae* ont été récoltées dans ces zones : Thiaroye sur mer (14°44'31"N et 17°23'53"W), Sam-Sam 3 (14°45'41" N et 17°21'25"W), Pikine rue 10 (14°45'32"N et 17°23'53"W), Pikine Niéty Mbare (14°46'04"N et 17°22'32"W) et Guédiawaye (14°46'55"N et 17°22'00"W). En saison sèche, les moustiques ont été échantillonnés seulement à Sam-Sam 3 car étant la seule zone où nous avions pu trouver des larves d'Anophèles. Les larves ont été transportées dans des seaux contenant de l'eau des gîtes. Au laboratoire, elles ont été triées et séparées des autres espèces en se basant sur leur morphologie. Elles ont été utilisées pour respectivement les tests de laboratoire et en milieu semi-naturel.

B- Formulation du champignon

La formulation a été décrite dans nos travaux antérieurs (Seye *et al.*, 2012). Après avoir déterminé la teneur en spores, 10 ml de la formulation concentrée a été diluée avec 500 ml d'eau distillée pour obtenir une solution finale de 6×10^7 spores / ml. Le pourcentage en huile était de 0,02% (v/v).

C-Tests de laboratoire

Cent (100) larves en stades 3 et 4 ont été placées dans des bocaux en plastiques stériles de dimensions 7 x 7 x 10 cm et contenant 500 ml d'eau distillée. 5 bocaux ont été utilisés pour la détermination des DL₅₀ et DL₉₀ en appliquant des doses correspondant à 4, 6, 8, 10 et 12 % (v/v). Pour le témoin, les larves n'ont pas été traitées avec le champignon. Elles ont été nourries avec du "Tetra WaferMix". Les larves mortes ont été comptées et les nymphes éventuellement formées ont été retirées toutes les 24 h. Les larves ont ensuite été rinçées avec de l'eau distillée et observées individuellement au microscope optique (x 400) pour examiner l'infection du champignon (adhésion et germination).

D- Traitement en milieu semi-naturel

Des gîtes artificiels se trouvant au Département de Biologie Animale ont été utilisés pour examiner l'émergence des moustiques adultes traités avec le champignon. Deux périodes de traitement (hivernale et post-hivernale) ont été effectuées. Cinq bacs de dimensions 50 x 50 x 30 cm ont été choisis pour chaque traitement. 400 larves d'*An. gambiae* ont été introduites dans chaque bac contenant l'eau de pluie (en période des pluies) ou de l'eau de robinet (en saison sèche). En saison sèche, nous avions laissé les débris végétaux provenant de l'environnement du milieu pour simuler un peu les conditions des eaux de gîtes naturels. Chaque bac a été recouvert d'une cage enveloppée d'un tissu moustiquaire servant de piège des adultes émergés. La profondeur de l'eau des bacs a été fixée à environ 20 cm. Les larves ont séjourné 24h dans ces conditions pour leur permettre de s'adapter avant les traitements.

Avec un pulvérisateur à main, nous avons appliqué la dose létale choisie (DL_{90}) dans 4 bacs. Quatre autres bacs contenant le même nombre de larves ont été traités avec le Suneeum seul à 0,02% (v/v), deux autres ont servi de témoins blancs (pas de produit).

Les pourcentages cummulées d'adultes émergés ont été relevés toutes les 24h. Les constats ont été arrêtés après avoir constaté l'absence de larve ou de nymphe vivante dans les bacs. Les traitements pendant les deux périodes ont été faits suivant la disponibilité des larves d'*An. gambiae* dans les gîtes naturels.

Les quatre tests effectués pour chaque produit constituent les repliquats et les résultats représentent des moyennes.

E- Traitement de données

Les mortalités observées dans les tests de laboratoire ont été corrigées avec la formule d'Abbott (Abbott, 1925). La détermination des doses létales a été effectuée grâce à l'équation probite en utilisant le logiciel Statistica 9 et la relation: $\ln(p/1-p) = \beta_0 + \beta_1 \times \ln(\text{dose})$ (Finney, 1971). β_0 et β_1 étant les coefficients fournis par le logiciel.

Pour les traitements en milieu semi-naturel, l'émergence moyenne (E) au niveau de chaque bac a été calculée en se basant sur le nombre de larves au départ en utilisant cette formule: (% E = T x 100/C) en se référant à OMS (WHO, 2005).

Avec T = émergence dans les bacs traités et C = émergence dans le témoin

Le T-test a été utilisé pour voir s'il y avait une différence significative entre les larves traitées et non traitées et entre les deux périodes de traitement. Les résultats sont considérés non significatifs si $p > 0,05$.

IV-RESULTATS

A- Tests de laboratoire

En 24h, seule la DL_{50} a été obtenue avec la dose de $4,4 \times 10^6$ spores/ml (tableau 19). En 48h, la DL_{50} est inférieure à celle obtenue en 24h ($3,1 \times 10^6$) et la DL_{90} était à $5,3 \times 10^6$. Durant les tests, peu de nymphes ont pu se former avec les faibles doses et n'ont pas pu se transformer en adultes et meurent dans les 24h qui suivent

Tableau 19: Doses létales (DL_{50} et DL_{90}) de *Metarhizium anisopliae* formulée avec le Suneem 1% contre les larves d'*Anopheles gambiae* dans les conditions de laboratoire ($26 \pm 2^\circ\text{C}$, humidité relative $75 \pm 4\%$).

Temps	Doses létales (spores/ml)		R^2	Equation	P
	DL_{50}	DL_{90}			
24h	$4,4 \times 10^6$	-	0,833	$Y = 1,44 x + 0,10$	< 0,0001
48h	$3,1 \times 10^6$	$5,3 \times 10^6$	0,975	$Y = 1,69 x + 1,79$	< 0,0001

B- Observations Microscopiques

Après le traitement, des spores ont été retrouvées sur la cuticule des larves mortes (cuticule, abdomen et antennes) en 24h (figs. 24 A et B). Le développement des mycéliums a été plus important dans les 48h (fig. 24 C) et les 72 h (fig. 24 D) avec apparition de tube germinatif et un début de sporulation. L'agression des spores a été observée autour des nymphes au niveau de la tête et des palettes (figs. 25 A et 25 B). Le champignon se dévelope sur les nymphes et empêche le processus de l'émergence en adulte.

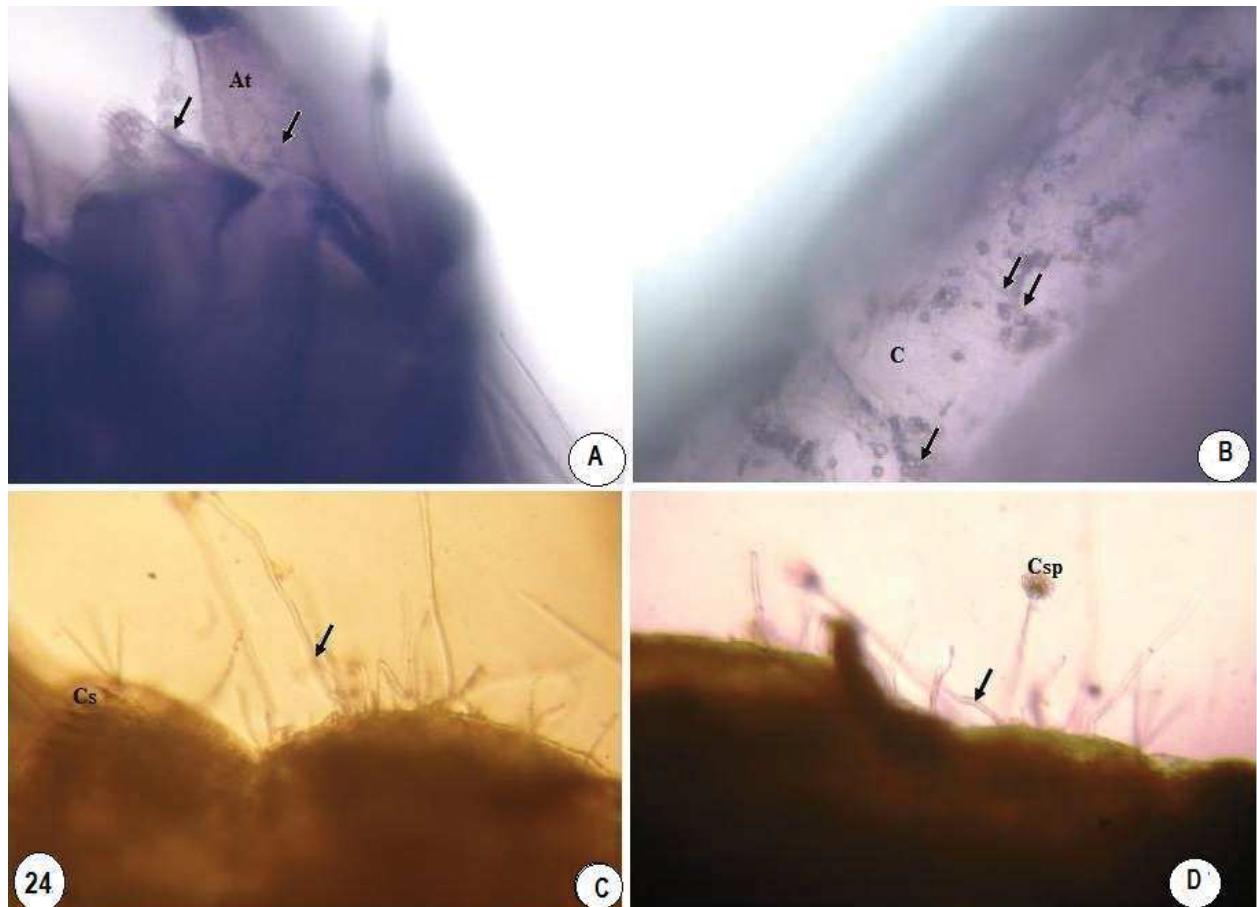


Figure 24: Larves d'*Anopheles gambiae* infectées par *Metarhizium anisopliae* formulé avec l'huile de neem (Suneem) en 24h (A et B) et 48h (C et D) ($\times 400$). c= cuticle, At= antenne, Csp= conidiospore, Cs= comb.

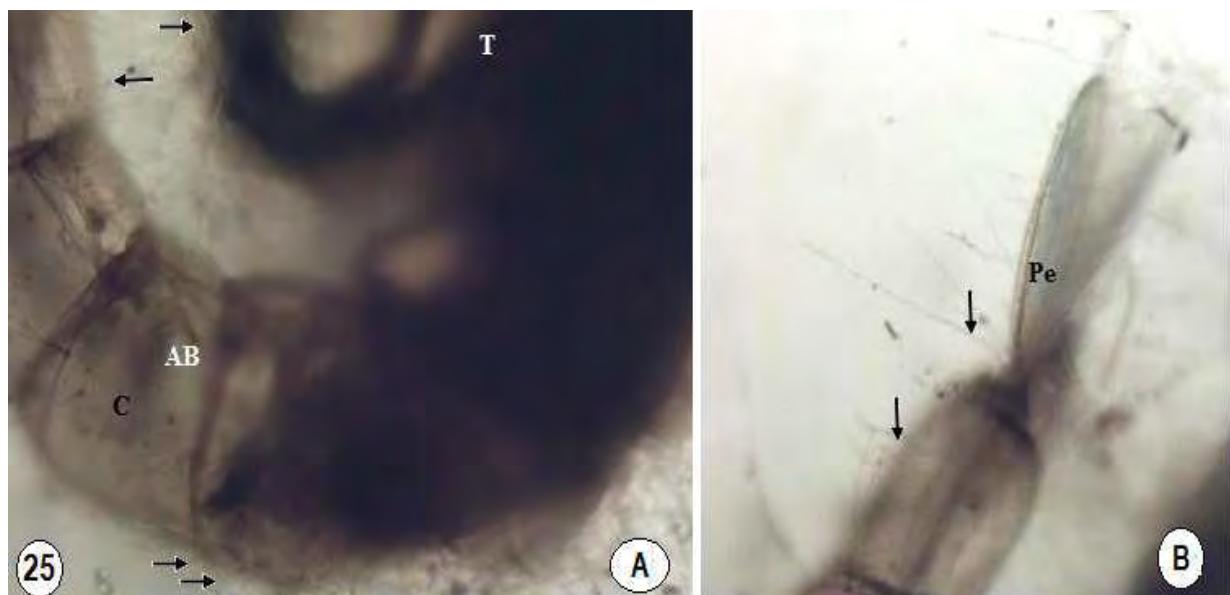


Figure 25: Nymphes d'*Anopheles gambiae* infectées par *Metarhizium anisopliae* formulé avec l'huile de neem (Suneem) en 48h (A et B) ($\times 400$). AB= abdomen, C= cuticule, Pe= palettes, T= thorax

C- En milieu semi-naturel

L'application de la DL₉₀ de la formulation huileuse du *M. anisopliae* (FH) en milieu semi-naturel a inhibé l'émergence des moustiques adultes (figs 26 et 27). Les proportions d'adultes émergés et collectés au niveau des pièges sont très faibles au cours du temps comparés au témoin pour les deux périodes de traitement. Cette inhibition a été plus importante avec la formulation huileuse qu'avec l'huile seule (S) ou le témoin. En période des pluies, l'émergence au huitième jour a été de 1,25 ± 0,15%, 30,25 ± 1,23% et 98 ± 0,76 % pour respectivement la formulation huileuse, le suneem et le témoin. La température ambiante était de 28,11 °C et celle de l'eau à 25,32°C durant cette période.

En saison sèche, l'application de la DL₉₀ (5,3 X 10⁶ spores/ml) a provoqué une inhibition de l'émergence de 97,25 ± 1,56 % ; 28 ± 1,07% et 2,25 ± 0,03% pour respectivement la formulation huileuse, le suneem et le témoin. La température moyenne ambiante était à 27,73°C et celle de l'eau à 24,92°C.

Le T-test a montré que l'émergence des moustiques adultes n'avait pas de différence significative entre la période des pluies et la saison sèche ($p= 0,3$). Toutefois, le Suneem a montré son effet négatif contre l'émergence des adultes.

Après ces traitements, certains adultes, certaines larves ainsi que certaines nymphes ont été retrouvés à la surface de l'eau présentant des mycéliums en phase de sporulation

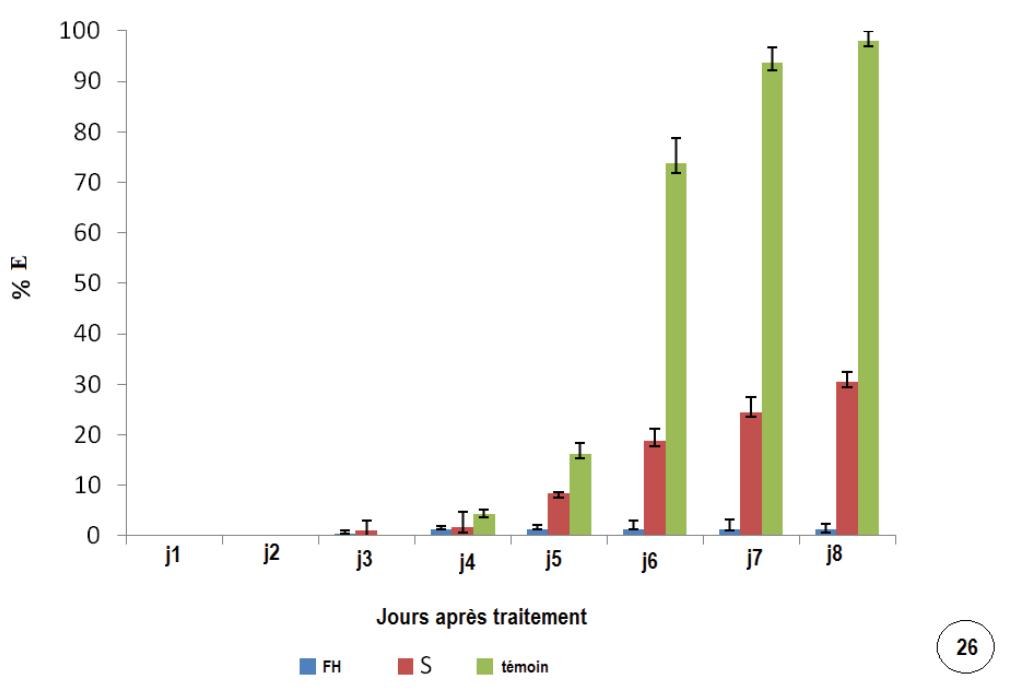


Figure 26 : Pourcentage cumulés de l'émergence des adultes d'*Anopheles gambiae* sl avec le traitement de la formulation huileuse du *Metarhizium anisopliae* et le Suneem au niveau des bacs artificiels en milieu semi-naturel en saison des pluies.

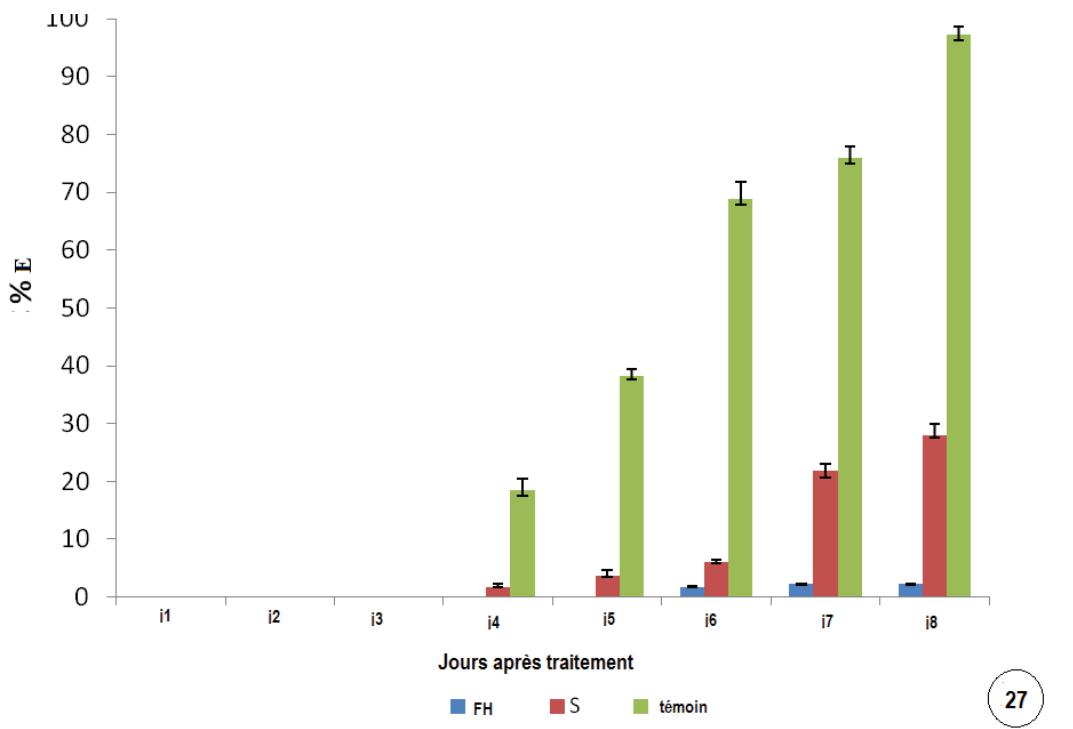


Figure 27: Pourcentages cumulés de l'émergence des adultes de *Anopheles gambiae* sl traités avec la formrlution huileuse du *Metarhizium anisopliae* et avec le Suneem en milieu semi-naturel pendant la saison des pluies.

III- DISCUSSION

Les champignons entomopathogènes tels que *Metarhizium anisopliae* sont couramment utilisés comme agents de lutte biologique. L'intérêt fondamental de son utilisation sous forme de formulation huileuse est sa pathogénicité contre les larves et les adultes de différentes espèces de moustiques. Nous avons récemment montré que *M. anisopliae* formulé avec le Suneem était efficace contre les adultes au laboratoire (Seye *et al.*, 2012). Dans cette présente étude, son efficacité sur l'inhibition de l'émergence d'adultes vient d'être démontrée en milieu semi-naturel. Nous supposons que l'huile utilisée dans cette formulation protège les spores contre l'effet des conditions environnementales, et facilite également leur adhésion sur la cuticule des insectes. D'autant plus que l'efficacité de cette huile a été démontrée sur les larves (Vatandoost et Vaziri , 2004) et les nymphes (Seye *et al.*, 2006) même si le pourcentage d'huile dans la formulation est faible (0,02%) comparée à celle (0,5%) utilisée par Depieri *et al.* (2005). Certains auteurs trouvent une faible efficacité de la combinaison d'huile avec les champignons (Bajan *et al.*, 1998 ; Hirose *et al.*, 2001; Depieri *et al.*, 2005), ce qui n'est pas général (Visalakshy *et al.*, 2006; Rodrígues-Lagunes *et al.*, 1997; Seye et Ndiaye 2008). Par contre, l'utilisation d'extrait de graines de neem à une concentration supérieure à 2,5%, peut provoquer un effet fongicide (Rodrígues-Lagunes *et al.*, 1997). Il est donc possible de formuler les champignons entomopathogènes tel que *M. anisopliae* en tenant compte des composants de l'huile pour lutter contre les insectes. Dans ce contexte, Sahayaraj *et al.* (2011) ont montré l'importance sur la compatibilité entre les champignons et des insecticides à base d'extraits de plantes.

Dans cette étude, nous avons montré que le champignon a infecté les larves et nymphes en émergeant à travers la cuticule. Ce qui a été observé dans nos travaux antérieurs avec *Aspergillus clavatus* (Desmazières) (Seye *et al.*, 2009). De manière générale, les spores peuvent pénétrer la cuticule avant de se développer dans l'hémolymphé et sporuler à la surface. Mais également, les spores ingérées par les larves peuvent secréter des toxines dans le tube digestif et/ou par voie mécanique détruisent les tissus larvaires provoquant la mort (Gillespie et Clayton 1989; Clarkson et Charnley, 1996). Les observations microscopiques ont aussi révélé que le développement des nymphes a pu être bloqué, provoquant une baisse de la formation d'adultes. Ce qui confirme les travaux de Bukhari *et al.*, (2011).

Par ailleurs, en dehors du temps d'exposition au champignon, la présence des éléments nutritifs et la densité larvaire dans les gîtes peuvent avoir un impact sur la survie des larves (Koenraadt *et al.*, 2004; Bukhari *et al.*, 2010). Pelizza *et al.* (2007) ont montré qu'une forte

densité défavorise la mortalité car réduisant le pourcentage de contact entre les spores et les larves. Dans notre étude la densité était de 0,16 larves /cm². Par contre la formulation a facilité les chances de contact et l'ingestion des spores par les larves. Ce qui ne serait pas le cas si nous avions appliqué les spores sèches à la surface de l'eau. En effet, avec les spores sèches, le champignon ne serait pas bien dispersé dans l'eau et cela réduirait le pourcentage de contact.

Puisque certains facteurs de l'environnement pourraient avoir un effet négatif dans l'efficacité des spores (Zimmermann, 2007), l'action de ces facteurs sur la formulation devrait être étudiée. La résistance des spores devrait favoriser la rémanence du produit pouvant affecter les adultes venant pondre à la surface des eaux traitées.

CONCLUSION

Dans cette étude, nous avons déterminé des doses létales DL₅₀ et DL₉₀ de la formulation huileuse du *M. anisopliae* contre les larves d'*An. gambiae*.

En milieu semi-naturel, l'application de la DL₉₀ a montré son efficacité contre l'émergence des adultes en période hivernale et post-hivernale.

Pour promouvoir son utilisation dans la lutte contre les moustiques vecteurs, des études devraient être menées sur sa rémanence dans l'environnement et sur l'action des organismes non cibles.

PARTIE 3

HISTOPATHOLOGIE DES LARVES DE *CULEX QUINQUEFASCIATUS* TRAITEES AU CHAMPIGNON *ASPERGILLUS CLAVATUS*

I- INTRODUCTION

Plusieurs variétés de microorganismes tels que les virus (Wei *et al.*, 2006), bactéries (Silva *et al.*, 2008), et champignons (Scholte *et al.*, 2003; 2004a; 2004b; Govindarajian *et al.*, 2005; Scholte *et al.*, 2006; Seye et Ndiaye , 2008; Seye *et al.*, 2009; 2012) ont été montré comme agents pathogènes contre les insectes. Cependant, ces agents non pas le même mécanisme ou voie d'infection. L'infection de certains agents tels que les champignons passe par plusieurs étapes incluant l'adhésion, la pénétration de la cuticule des insectes suivies de la prolifération dans les tissus et hémolymphé causant des dommages (Mahmoud *et al.*, 2000; Shoulkamy *et al.*, 2001; St Leger *et al.*, 1996; Tiago *et al.*, 2002). Cette infection est généralement liée à des activités enzymatiques et protéolitiques (Murad *et al.*, 2006).

Des espèces d'*Aspergillus* ont montré leur pathogénicité contre les moustiques (Hati & Gosh, 1965 ; Nnakumusana, 1985 ; de Moraes *et al.*, 2001; Kumar *et al.*, 2004; Seye *et al.*, 2009). Dans nos travaux précédents, nous avons montré la pathogénicité des spores d'*A. clavatus* contre les larves d'*Anopheles gambiae*, d'*Aedes aegypti* et de *Culex quinquefasciatus* (Seye *et al.*, 2009). Nous avons montré que les spores agissent par pénétration de la cuticule des adultes (Seye *et al.*, 2008) et des larves (Seye *et al.*, 2009). Des études ont également montré que la germination de ce champignon est accompagnée par la sécrétion de toxines tels que clavatol (Bergel *et al.*, 1944), ascladiol (Suzuki *et al.*, 1971), tryptoquivalone et tryptoquivalin (Clardy *et al.*, 1975), glyantrypin (Penn *et al.*, 1992), cytochalasin E (Lopez et Flannigan, 1997), acide kojic et xanthocilin (Pitt, 2000), et la patuline (Sabater-Vilar *et al.*, 2004). Il est donc nécessaire de voir l'évolution de ces spores après ingestion par les larves et l'action des toxines sécrétés sur les tissus.

L'objectif principal de cette présente étude est de montrer de façon chronologique, l'action des spores ingérées par les larves sur les tissus au cours du temps.

II- MATÉRIEL ET MÉTHODES

A- Les larves de moustique

Les larves de *Culex quinquefasciatus* (Say, 1823) proviennent d'une souche de laboratoire de Riverside (California). Elles ont été élevées dans les conditions de laboratoire à l'Unité d'Entomologie Fonctionnelle et Evolutive, Agro Bio-Tech, Université de Liège. Les adultes émergés ont été élevés dans des cages de dimensions 50 × 50 × 50 cm et nourris avec une solution de sucre à 10%.

B- La suspension de spores

Aspergillus clavatus a été cultivé dans un Erlenmeyer de 250 ml contenant un milieu solide constitué de 5 g de son de blé et 20 ml d'une solution nutritive (1% peptone, 1% d'extrait de levure). L'ensemble a été stérilisé à 121 °C pendant 20 min. 7 jours après, le milieu contenant les spores a été rinçé avec 150 ml d'eau distillée contenant 0,05% de Tween 80 à 150 rpm pendant 2h. La solution a été filtrée et centrifugée (8000 rpm, 15 min) pour séparer et récupérer les spores qui seront appliquées sur les larves.

C- Application des spores sur les larves

Des larves de troisième et quatrième stades ont été utilisées pour appliquer la dose létale (DL_{50}) déterminée par Seye *et al.* (2009) en 24h. Dans le témoin, les larves ont été traitées avec de l'eau distillée contenant 0,05 % de Tween 80. Des prélèvements ont été effectués pour les temps d'expositions suivantes 8h, 12h, et 24h. Les larves ont été utilisées pour les études microscopiques. Les conditions de laboratoire ont été à 25 ± 2 °C, 75% RH et une photopériode de 16 /8 h.

D- Etudes histologiques

Chaque larve prélevée a été segmentée entre la tête et le siphon pour faciliter l'imprégnation des produits du fixateur (2,5% glutaraldéhyde dans du cacodylate de sodium 0,1 M à pH = 7,3) pendant 12h. Les fragments ont été ensuite rinçés avec 0,2 M de cacodylate buffer.

Après une post-fixation avec 1% de tetroxide d'osmium (1h), les larves ont été rinçées avec une solution de cacodylate buffer (2 x 10 min). Pour la déshydratation, 3 rinçages avec de l'eau ont été effectués suivis de bains croissants d'éthanol (30%, 50%, 70%, 90%, (1 x 10 min) et 100% (3 x 20 min).

Les échantillons ont été ensuite traités avec de l'epoxy-1, 2 propane (2 x 30 min) avant de la traiter avec un mélange de résine (SPI-PON 812, SPI-CHEM) et d'epoxypropane (1:1, 2h30). Finalement, ils ont été laissés dans la résine pure pendant une nuit. Les blocs ont été faits avec la silicone et placés dans une étuve à 60 °C pendant 72 heures pour la polymérisation. Les coupes semi-fines de 1 à 2 µm et ultrafine de 60 à 80 nm ont été faites entre le deuxième et le quatrième segment de l'abdomen avec un ultra-microtome (Reichert-Jung Ultracut E).

Les coupes semi-fines ont été colorées avec 1% de bleue de Toluidine (pH 9) et montées entre lame et lamelle pour les observations en microscopie photonique (Olympus Provis Ax70) équipé d'une caméra (Olympus DP50-CU).

Les coupes ultrafines ont été contrastées avec de l'acétate d'uranyl et du citrate de plomb. Les observations ont été faites avec un microscope électronique à transmission JEOL JEM 100 SX.

III- RÉSULTATS

Les photos en microscopie photonique ont montré une occupation progressive du tube digestif des larves par les spores au cours du temps. Les photos en microscopie électronique ont montré l'activité de ces dernières pour les temps 8h, 12h et 24h d'exposition. La pathogénicité a été révélée par des dommages histologiques.

A- Microscopie optique

Avec les coupes semi-fines, les figures 28 A, 28 C et 28 D montrent une accumulation progressive des spores dans le tube digestif comparé au témoin (fig. 28 A). Cette accumulation est accompagnée d'une destruction progressive de l'épithélium gastrique et d'une détérioration des muscles. Cependant, nous n'avons pas révélé une destruction de la membrane péritrophique.

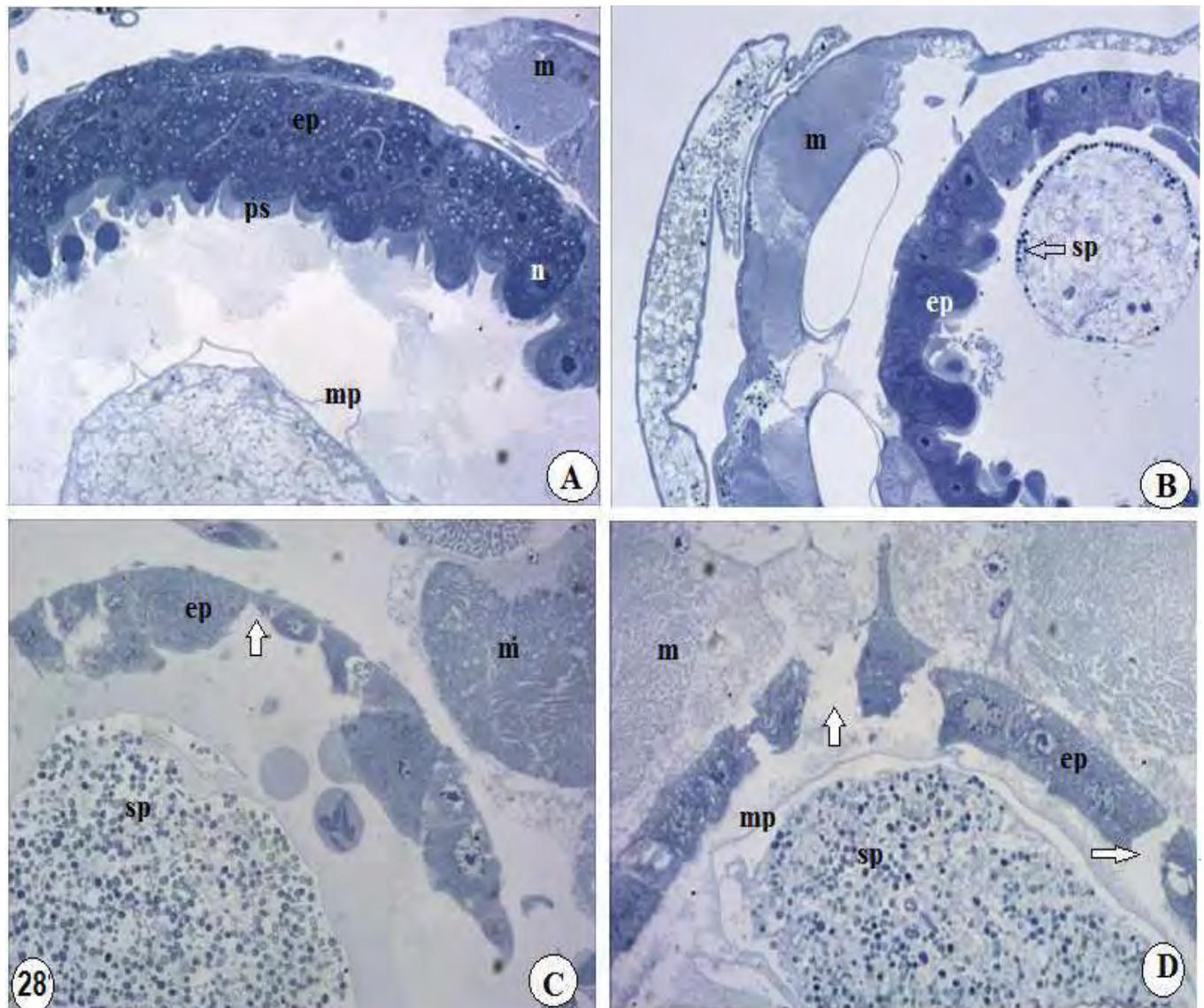


Figure 28: Coupes transversales de larve de *Culex quinquefasciatus* non traitée (A) avec des muscles, un épithélium intestinal en bon état entourant la colonne alimentaire, et celles traitées avec les spores d' *Aspergillus clavatus* présentant un épithélium en destruction (flèches) entourant la lumière intestinale remplie progressivement de spores après 8h (B), 12h (C) et 24h (D). m= muscle, ep= épithélium, n= noyau, ps= plateau strié, mp= membrane péritrophique, sp= spores.

B- Microscopie Electronique à Transmission (MET)

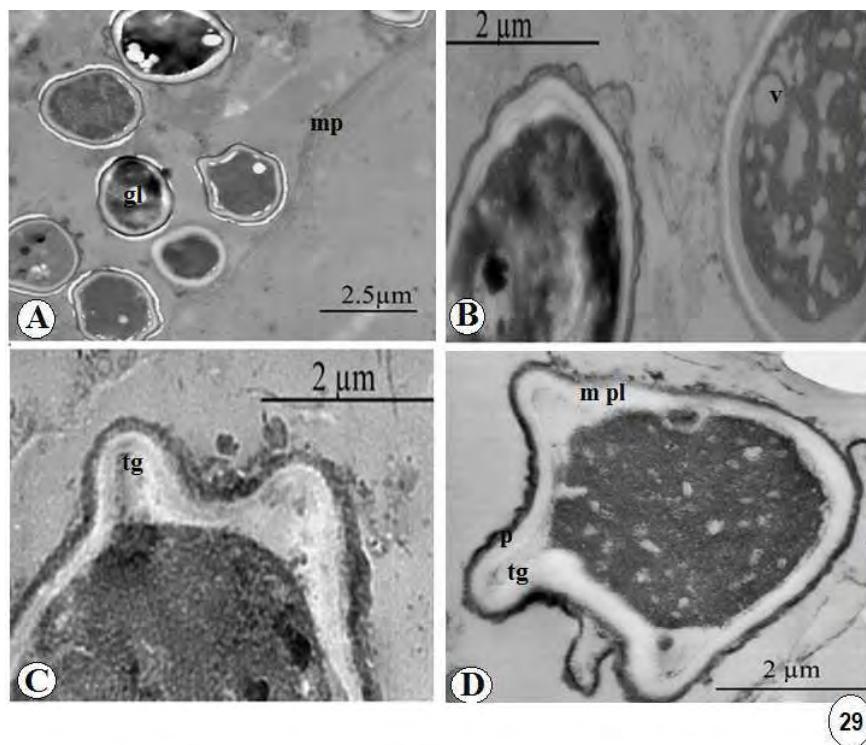
L'activité des spores dans le tube digestif en 24 h et les dommages histologiques sont décrits dans les sections suivantes.

1- Activité des spores

La microscopie électronique a révélé qu'après ingestion, les spores ont une activité physiologique dans le tube digestif des larves. Cette activité est caractérisée par une augmentation de la taille des spores de l'apparition de vacuoles lipidiques mais également un début de formation de tube germinatif (Figs. 29 A, B, C et D).

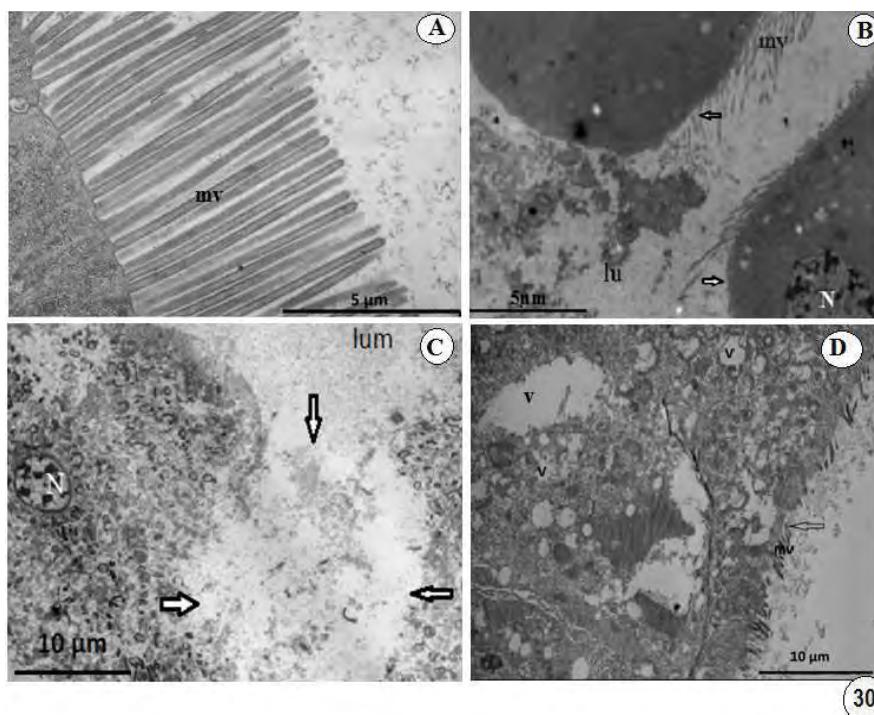
2- Au niveau du tube digestif

Parallèlement aux modifications observées sur les spores, les observations au MET révèlent des dommages histologiques de l'épithélium gastrique des larves de *Cx. quinquefasciatus*. En comparaison avec les larves non traitées (Fig. 30 A), nous avons noté un détachement des microvillosités 8h après traitement (Fig. 30 B). En 12h, une altération de la membrane suivie de la séparation des cellules sont observées (Fig. 30 C). La disparition progressive de certains organites cellulaires tels que les mitochondries sont accompagnées de l'apparition de vacuoles dans le cytoplasme comparé aux larves non traitées. En 24h, certaines cellules sont complètement détruites, présentant des zones de faiblesse (Fig. 30D).



29

Figure 29: Ultrastructures de spores d'*Aspergillus clavatus* dans le tube digestif des larves de *Culex quinquefasciatus* après 8h (A), 12h (B) et 24h (C) d'exposition. Gl= globule lipidique, tg= tube germinatif, m pl= membrane plasmique, mp= membrane périthrophiique, p= paroi.



30

Figure 30: Ultrastructure de l'épithélium intestinal d'une larve de *Culex quinquefasciatus* non traitée (A), et de larves traitées avec des spores d'*Aspergillus clavatus* 8h (B), 12h (C) et 24h (D) après. Lu= lumière, N= noyau, v= vacuole, mv= microvillosités

3- Au niveau des muscles

En comparaison avec le tissu musculaire des larves non traitées (Fig. 31 A), la MET a révélé une dégradation progressive des muscles des larves traitées (Fig. 31 B, C et D). Le réseau sarcoplasmique de ce tissu commence à être désorganisé 8 h après traitement. Cette désorganisation est accompagnée par une dispersion et disparition des filaments d'actine et de myosine entre 12h et 24h. En 24h, le tissu est complètement rempli de vacuoles.

4- Au niveau de l'épithélium cuticulaire

Comparé aux larves non traitées (Fig. 32 A), la MET révèle quelques vacuoles occupant le cytoplasme des cellules de l'épithélium cuticulaire (Fig. 32 B, C et D). Certains organites tels que les mitochondries et l'appareil de Golgi ont commencé à disparaître 8h après traitement. En 12h, l'épithélium commence à se détacher de la cuticule. En 24h, ces organites ont complètement disparu laissant sur place des vacuoles dans le cytoplasme. Les débris cellulaires sont rejettés vers l'extérieur du cytoplasme.

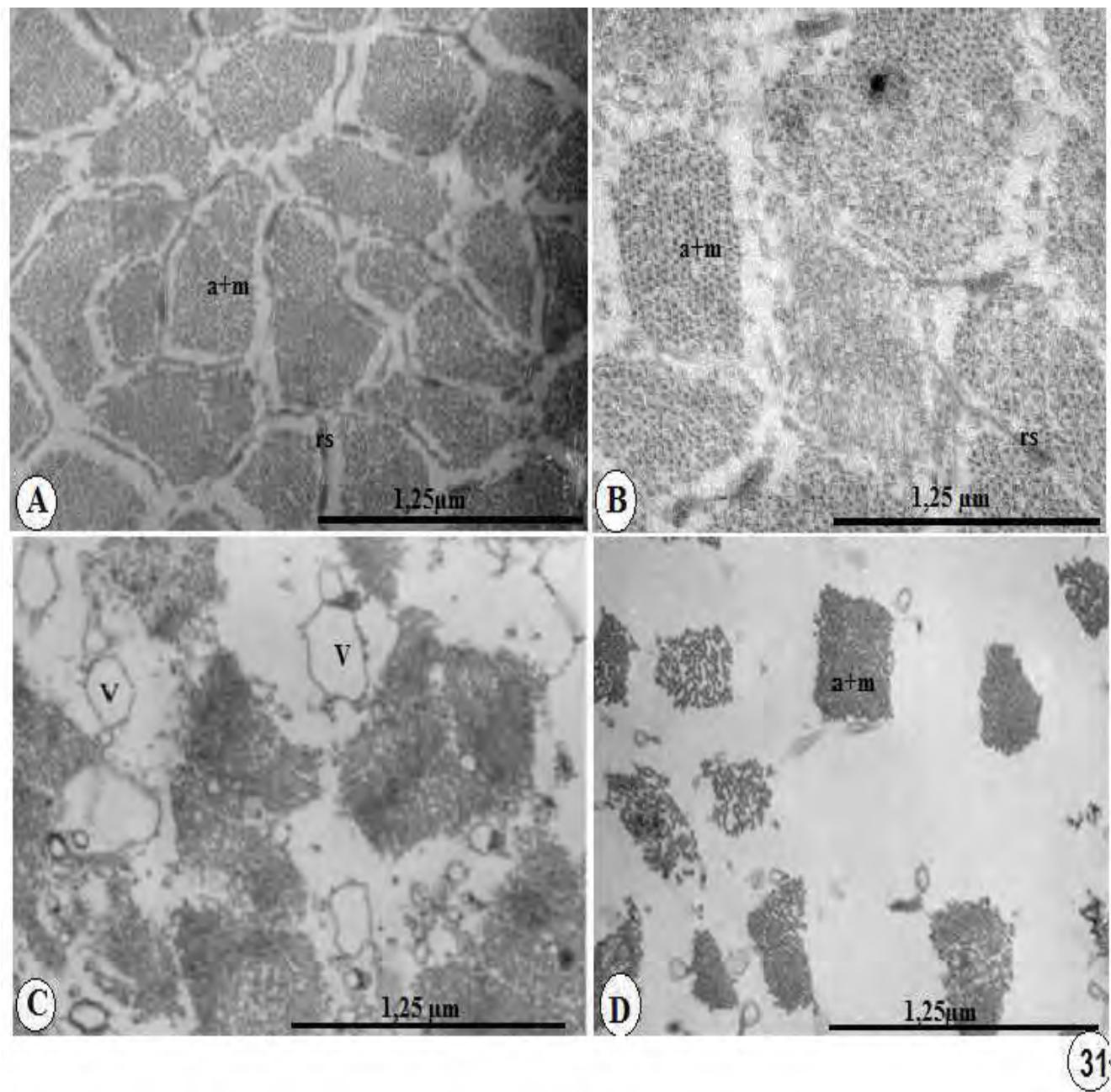


Figure 31: Ultrastructure du tissu musculaire d'une larve de *Culex quinquefasciatus* non traitée (A) et de larves traitées avec les spores d'*Aspergillus clavatus* 8h (B), 12h (C) et 24h (D) après. (a + m) = filaments d'actine et de myosine, sr= reticulum sarcoplasmique, v= vacuole

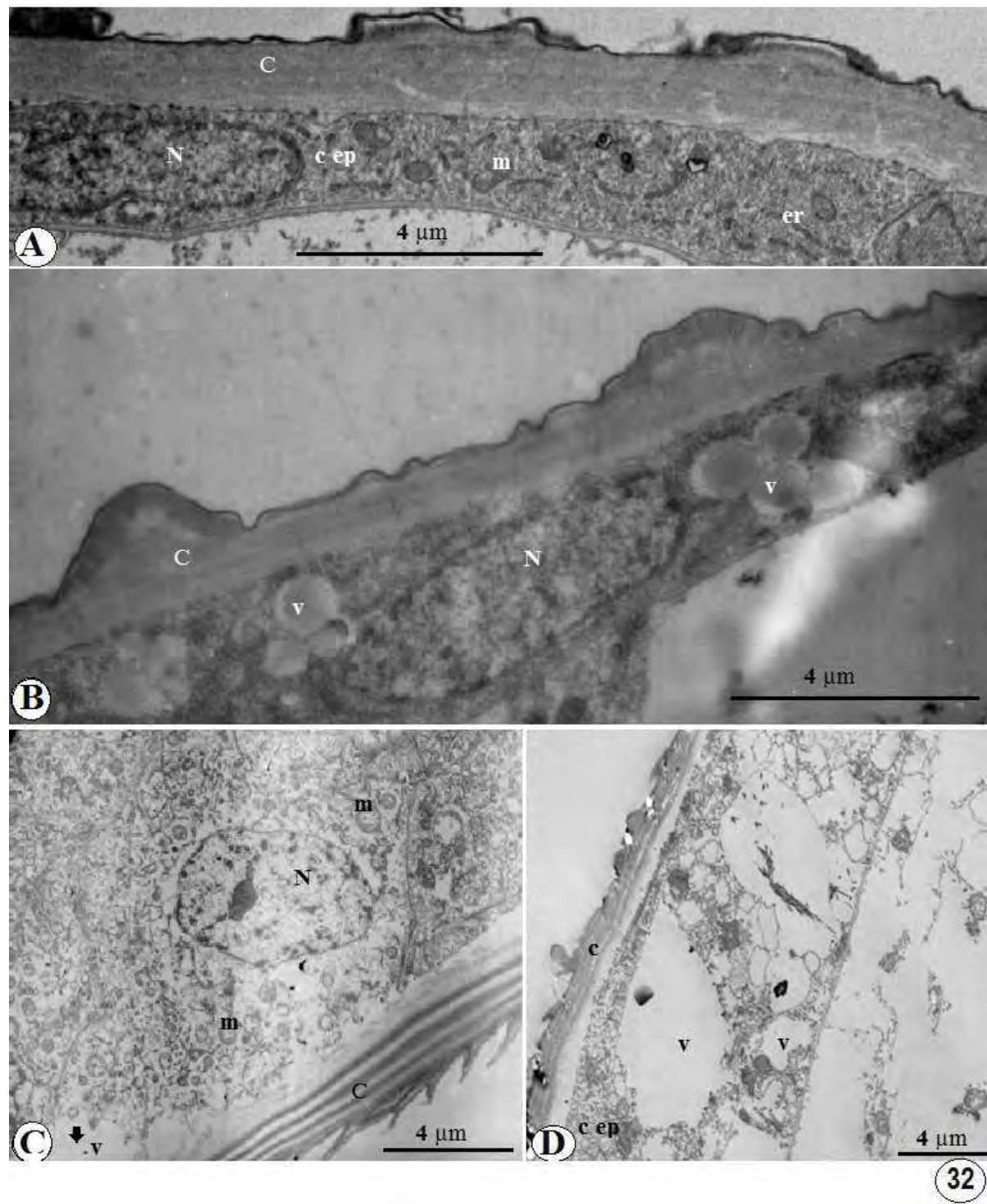


Figure 32: Ultrastructure de l'épithélium cuticulaire d'une larve de *Culex quinquefasciatus* non traitée (A) et de larves traitées avec les spores d'*Aspergillus clavatus* après 8h (B), 12h (C) et 24h (D) d'exposition. Cep= cellule épithéliale, C= Cuticule, N= noyau, m= mitochondrie, er= réticulum endoplasmique, v= vacuoles.

IV-DISCUSSION

Dans ce travail, nous avons fait une étude histopathologique montrant les effets pathogènes du champignon *Aspergillus clavatus* contre les larves de *Culex quinquefasciatus* confirmant ainsi nos travaux antérieurs (Seye *et al.*, 2009). Certaines espèces du genre *Aspergillus* sont certes pathogènes contre les organismes non cible dont l'Homme, mais certaines d'entre elles ont montré cependant leur utilité dans la lutte contre les moustiques vecteurs (*Aspergillus parasiticus* (Hati et Ghosh, 1965), *Aspergillus* spp, (de Moraes *et al.*, 2001), *Aspergillus flavus* et *A. parasiticus* (Govindarajian *et al.*, 2005)).

En faisant allusion aux toxines que sécrètent les spores en germination, nous avons montré des activités destructives au niveau tissulaire sur les larves. Dans le processus de la pathogénicité révélée dans cette étude, les principaux dégats au niveau du tube digestif sont la destruction des microvillosités, des mitochondries faisant apparaître des vacuoles dans le cytoplasme. Ces dommages sont similaires à ceux dus à *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (Bti) contre les larves de *Simulium pertinax* (Cavados *et al.*, 2004) et *Aedes albopictus* (Silva *et al.*, 2008). Etant donné que la membrane péritrophique semble non atteinte en 24h, cela suggère que ces dommages observés sont dus à une activité chimique et non mécanique des spores. Il convient donc d'admettre que les spores d'*A. clavatus* ont sécrété des substances enzymatiques ou protéolytiques détruisant ainsi les tissus. Par Similarité, des travaux ont montré que des métabolites de champignons tel que *Tolypocladium inflatum* (Deuteromycetes) pouvaient causer des dommages histologiques des larves de moustiques (Weiser *et al.*, 1992). Ces auteurs ont montré qu'avec des larves de *Culex pipiens* traitées avec des métabolites de *T. inflatum* (tolypin), les mitochondries ont été détruites et consécutivement remplacées par des vacuoles avec des cristaux dans les structures internes. Ce qui laisse supposer que les vacuoles observées dans les cellules épithéliales sont dues à une destruction des mitochondries par des mycotoxines ou autres substances secrétées par les spores. En effet, plusieurs études ont montré que la germination d'*A. clavatus* est accompagnée de sécrétion de toxines tels que clavatol (Bergel *et al.*, 1944), ascladiol (Suzuki *et al.*, 1971), tryptoquivalone et tryptoquivalin (Clardy *et al.*, 1975), glyantrypin (Penn *et al.*, 1992), cytochalasin E (Lopez et Flannigan, 1997), acide kojic et xanthocilin (Pitt, 2000), et la patuline (Sabater-Vilar *et al.*, 2004). Cependant certaines substances comme la Patuline ont été révélées toxiques contre certains mammifères.

Nous avons également montré les dégats au niveau des muscles comparés à ceux des larves non traitées et ceux décrits par Bernick *et al.* (2007) sur les larves d'*Aedes aegypti*. Ces

destructions portant sur les filaments d'actine, de myosine et le reticulum sarcoplasmique, pourraient expliquer la diminution progressive des mouvements des larves dans l'eau au cours du temps. Ne pouvant plus remonter à la surface, elles vont s'asphyxier avant de mourir dans les 24h. En plus, cytochalasin E produit par *A. clavatus* a un effet inhibiteur du transport du glucose, et de la polymérisation des filaments d'actine (Brenner et Korn, 1980). Díez-Sampedro *et al.*, (2000) ont montré que cytochalasin-E a aussi un effet d'inhibition du fonctionnement du cotransport Na⁺/sucre au niveau de l'intestin.

Au niveau de l'épithélium cuticulaire, nous avons observé une désorganisation des cellules. Nous avons noté également quelques vacuoles entre la cuticule et l'épithélium ainsi que dans le cytoplasme. Ce qui est similaire de l'action de l'hormone juvénile mimic pyriproxyfen sur les larves de *Culex pipiens* (El-Shazly et Refaie, 2002).

Suivant les niveaux d'infection des tissus, nous pouvons donc dire qu'après ingestion, les spores entrent dans une phase physiologique en sécrétant des substances (molécules) qui pénètrent l'épithélium intestinal, le tissu musculaire et l'épithélium cuticulaire tout en les désorganisant. L'extraction, la purification et l'identification des ses molécules sont donc nécessaires pour mieux les utiliser contre les moustiques.

CONCLUSIONS

Dans ce travail, la pathogénicité des spores d'*Aspergillus clavatus* a été révélée sur des larves de *Culex quinquefasciatus*. Les toxines ont causé des dégâts histologiques après ingestion des spores à travers le tube digestif. Il est donc nécessaire de purifier les molécules les plus bénéfiques afin de les utiliser comme biopesticides contre les moustiques vecteurs.

Il serait également intéressant de montrer son champ d'action sur d'autres types d'insectes vecteurs en comparaison avec d'autres champignons plus connus.

PARTIE 4

PATHOGENICITE DES CHAMPIGNONS SUR LES PUCERONS :
ACYRTHOSIPHON PISUM (HARRIS, 1776) (APHIDIDAE)

I- INTRODUCTION:

Acyrthosiphon pisum (Harris, 1776) est un insecte piqueur-suceur de 2,5 à 4,4 mm de long appartenant à l'ordre des homoptères et de la famille des aphididés. Il se reproduit par parthénogénèse (reproduction asexuée) mais aussi par la voie sexuée selon la période. Il est appelé aussi puceron du pois. C'est un ravageur de beaucoup de cultures ou de plantes sauvages. Il a été révélé comme vecteur de virus pathogènes contre certaines plantes (Emden et Harrington, 2007; Brault *et al.*, 2010). Pour lutter contre ces insectes, plusieurs stratégies ont été développées. Les méthodes les plus utilisées sont mécaniques, chimiques et plus récemment biologiques. Cette dernière comporte l'utilisation de plusieurs microorganismes tels que les parasitoïdes et d'autres agents pathogènes. Les champignons entomopathogènes sont très connus comme étant efficaces contre les insectes. Cependant, la pathogénicité dépend de l'espèce du champignon, de l'insecte et de la virulence des spores. Pour cette virulence, le substrat et les méthodes de culture ont un rôle primordial (Shah *et al.*, 2005). Parmi ces champignons, des souches de *Metarhizium* et d'*Aspergillus* ont montré leur pathogénicité contre les insectes. Plusieurs espèces de champignons telles que *Lecanicillium* sp. (Jung *et al.*, 2006), *Beauveria bassiana* (Sivasundaram *et al.*, 2007) et *Metarhizium anisopliae* (Dong *et al.*, 2007) ont montré leur efficacité dans le contrôle des pucerons, des larves de lépidoptères et autres insectes. Vu *et al.* (2007) ont démontré la pathogénicité de *M. anisopliae* contre les pucerons. Les applications sont généralement directes sur les insectes ou sur les feuilles infectées par les pucerons (Hall, 1979; 1980; Khan *et al.*, 1990). Cependant, avec la croissance et la reproduction des pucerons rapide, une bonne stratégie de lutte est nécessaire dans le cas de l'utilisation des champignons.

L'objectif de cette présente étude est de montrer la possibilité de contrôler la reproduction du puceron *A. pisum* par l'application de champignons entomopathogènes (*Metarhizium anisopliae*, *Metarhizium* sp et *Aspergillus clavatus*) sur les plantes infestées. Il consistait à :

- (1) évaluer chaque souche de champignon sur les adultes,
- (2) évaluer chaque souche sur la reproduction dans les conditions de laboratoire.

II- MATÉRIEL ET MÉTHODES

A- Les champignons

Chaque souche de champignon a été cultivée sur 5 g de son enrichis avec 20 ml d'une solution nutritive (1% peptone, 1% extrait de levure) dans un Erlenmeyer de 250 ml. Le tout a été stérilisé à 121 °C pendant 20 min. 7 jours après, les spores ont été récupérées par un rinçage avec 150 ml d'eau distillée contenant 0,05% de Tween 80. La solution a été filtrée et centrifugée à 8000 tr/mn pendant 15 min pour récupérer les spores. Ces dernières ont été formulées avec de l'eau distillée contenant 0,05% de Tween 80. Pour chaque souche, 6 concentrations ont été ajustées après plusieurs dilutions et déterminées avec une lame hématométrique pour avoir des solutions finales de 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 et 10^7 spores/ml.

B- Elevage des pucerons

Des plantules de pois (*Vicia faba*) ont été cultivées dans des pots contenant des vermiculites. Elles ont été ensuite infestées par des pucerons fournis par l'Unité d'Entomologie Fonctionnelle et Evolutive, Agro-Bio-Tech, de l'Université de Liège. Tous les pots ont été exposés dans une chambre avec les conditions contrôlées: photopériode 8h nuit/16h de jour à 25°C. Les plantes ont été régulièrement changées pour maintenir l'élevage des nouvelles générations au cours des expériences.

C- Tests de pathogénicité

Pour chaque concentration, 20 adultes déposés sur les plantes jeunes ont été directement traités. Les trois souches de champignons ont été appliquées avec trois pulvérisateurs régulièrement stérilisés. Pour chaque dose, un volume de 1,6 ml a été pulvérisé à une distance de 20 cm au dessus de chaque plante. Les pucerons du témoin ont été traités avec le même volume d'eau distillée contenant 0,05% de Tween 80. Chaque pot a été recouvert d'un tissu de gaz pour empêcher la fuite ou l'infestation d'autres pucerons. Ils ont été conservés dans une cage de dimensions 20 x 50 x 50 cm (Fig. 33 A) et exposés dans une chambre de photopériode de 8 h nuit/16 jour à 25°C. Chaque test a été répété quatre fois à différentes périodes pour chaque souche.

Après traitement, les pucerons ont été examinés tous les jours pour compter les mortalités (Fig. 33 C) afin de déterminer les doses létale (DL₅₀ et DL₉₀). Le nombre de nymphes produites par jour a été compté pour déterminer le taux de croissance de la population de pucerons.

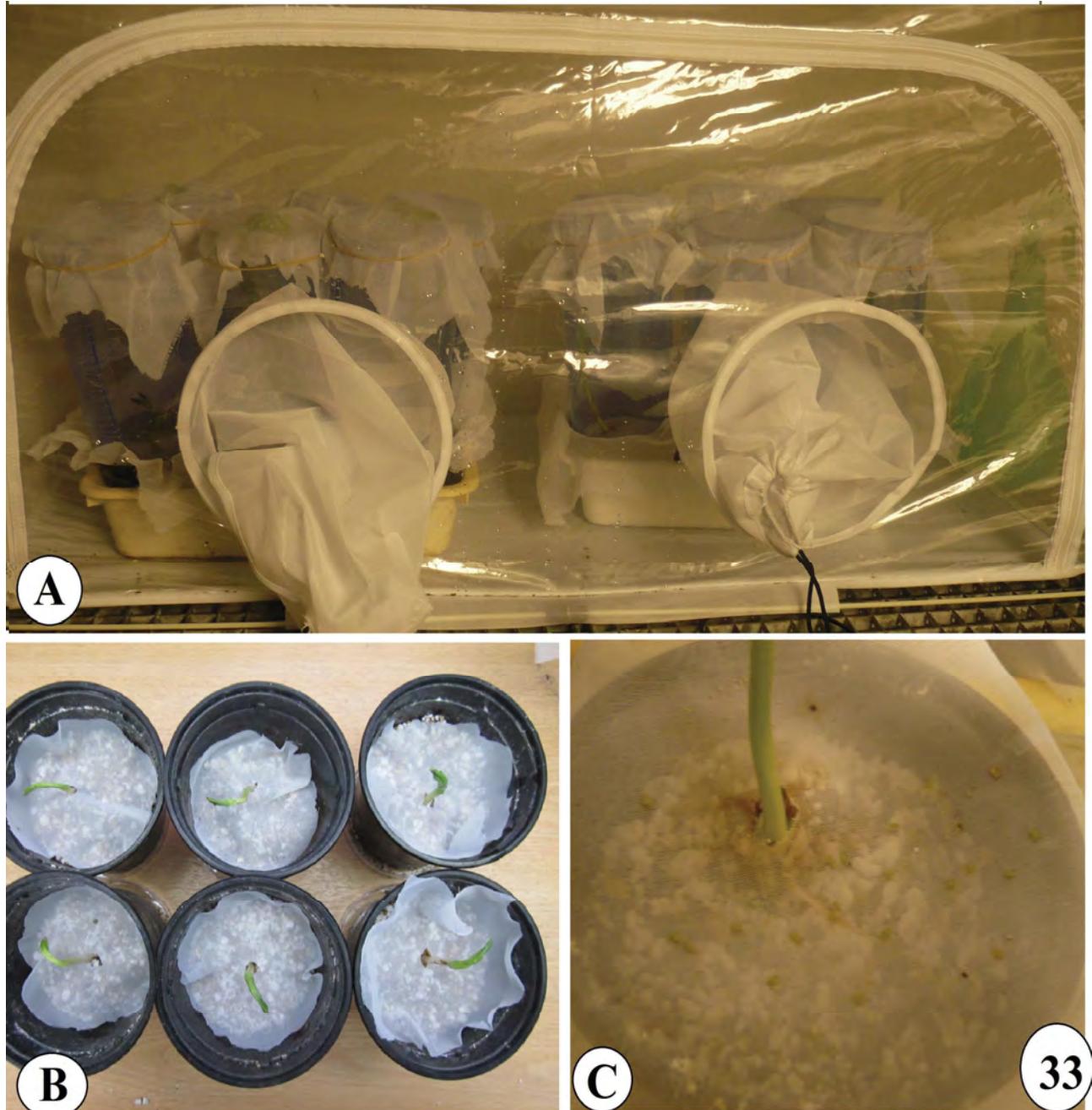


Figure 33 : Dispositif d'élevage (A) et de traitement (B et C) des pucerons

Les pucerons morts sont retirés et déposés sur des boîtes de Pétri afin de suivre l'émergence des champignons. Les nymphes produites ont été retirées et détruites.

D- Traitement des données

Les mortalités ont été corrigées avec la formule d'Abbott (Abbott, 1925). Les données ont été traitées par des tests ANOVA-1 et Kruskal-wallis pour calculer le taux intrinsèque de la croissance des pucerons.

III- RÉSULTATS ET DISCUSSION

A- Pathogénicité contre les pucerons adultes

Les mortalités des pucerons adultes ont été enregistrées pendant 5 jours. Les mortalités corrigées présentées dans le tableau 20 indiquent qu'elles augmentent avec les doses (de 10^3 à 10^7 spores/ml) entre le premier et le septième jour. Les mortalités ont été de 51,47 à 84,06%, de 49,90 à 90,90 % et de 30,37 à 78,05 % pour respectivement *Aspergillus clavatus*, *Metarhizium sp* et *Metarhizium anisopliae*. Les fortes mortalités ont été enregistrées avec la plus forte dose (10^7 spores/ml) et sont plus élevées pour *Metarhizium sp* suivie par *A. clavatus* et *M. anisopliae*.

En comparaison avec d'autres études, les souches utilisées agissent plus rapidement contre les pucerons *A. pisum* que celles utilisées par Saranya *et al.*, 2010 (*Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Verticillium lecanii*, *Hirsutella thompsonii* et *Cladosporium oxysporum*) contre les adultes d'*Aphis craccivora* pour la même durée. Ce qui n'est pas le cas pour les travaux de Yokomi et Gottwald (1988) qui ont reporté 100% de mortalités pour trois espèces de pucerons *Myzus persicae*, *Aphis gossypii* et *Aphis citricola* avec des doses comprises entre 10^6 et 10^7 pour *Verticillium lecanii* et *Hirsutella thompsonii* au 4^{ème} jour. C'est le même cas pour les travaux de Loureiro et Moino (2006) qui ont enregistré 100 % de mortalité de *Myzus persicae* traitée avec *Beauveria bassiana* et *M. anisopliae* aux doses de 10^6 et 10^7 spores /ml respectivement.

Dans tous les cas, il est clair qu'en se référant à nos résultats, il y a eu une diminution rapide des populations adultes de pucerons en 5 jours. Cependant, en regardant les doses létales (tableau 21), les trois souches n'ont pas eu la même pathogénicité. En effet, les doses létales sont obtenues dabord avec *Metarhizium sp* au jour 2 ($DL_{50} = 2,99 \cdot 10^6$, $p = 0,002$), avec *A. clavatus* au jour 3 ($DL_{50} = 5,65 \cdot 10^5$, $p=0,002$) et avec *Metarhizium anisopliae* au jour 4

($DL_{50} = 1,11 \times 10^5$ p=0,003). Pour cette dernière, la DL_{50} contre *A. pisum* est proche de celle obtenue par Saranya *et al.*, 2010 contre *Aphis craccivora* ($8,9 \times 10^5$ spores/ml) 7 jour après traitement. Cependant, elle est différente de celle obtenue par Chandler (1997) ($2,45 \times 10^6$ spores/ml) contre *Pemphigus bursarius*. Parmi les souches, *Metarhizium sp* a été plus virulente que les autres.

De manière générale, les différences de mortalité dépendent de la virulence du champignon, de l'espèce traitée et des méthodes de pulvérisation. En effet, nos tests préliminaires avaient montré que les pucerons étaient plus sensibles lorsque les spores ont été appliquées individuellement sur les pucerons ou dans une boîte de Pétri. La surface de contact avec les spores est primordiale pour faciliter l'infection. Ce qui nous laisse penser qu'après avoir pulvérisé les produits dans les pots, les pucerons déposés au fond ont été en contact avec les spores avant de se fixer sur les plantes. A partir de ce moment, les spores pourraient pénétrer la cuticule, se développer dans l'hémolymphe conduisant à la mort progressive des pucerons qui tomberont ensuite et arrêteront tout mouvement.

La figure 34 montre l'émergence des champignons à la surface des insectes 48 h après incubation. Parmi les souches, *Aspergillus clavatus* semble se développer plus vite que *Metarhizium anisopliae* et *Metarhizium sp*. Ce qui confirme le pouvoir pathogène de ce champignon comme d'autres espèces du genre *Aspergillus*. En effet, le mécanisme d'infection et de germination d'*Aspergillus flavus* sur la cuticule d'un insecte (*Bombyx mori*) a été montrée par Kumar *et al.*, 2004 en microscopie électronique à balayage. *A. clavatus* a été utilisé pour la première fois comme agent pathogène contre les moustiques par Seye *et al.* (2009). Sa pathogénicité vient d'être montrée pour la première fois contre *A. pisum*, contrairement à *M. anisopliae* qui est plus connu en tant que agent pathogène dans la lutte biologique contre les insectes (Zimmermann, 1993). Cependant, à forte dose (10^8 spore/ml), des études ont montré que *M. anisopliae* pourrait être pathogène contre des insectes bénéfiques comme les ennemis naturels des pucerons (Thungrabeab et Tongma, 2007). Ce qui pourrait être le même cas pour d'autres champignons y comprises les espèces d'*Aspergillus*.

Tableau 20: mortalités des pucerons adultes d'*Acyrthosiphon pisum* traités avec différentes doses de trois souches de champignons *Aspergillus clavatus*, *Metarhizium anisopliae* et *Metarhizium sp*

Souches	Doses (spore/ml)	Mortalités corrigées (%)				
		Jours				
		J1	J2	J3	J4	J5
<i>Aspergillus clavatus</i>	10^3	6,25	7,91	19,15	35,62	51,47
	10^4	6,38	17,18	26,10	35,84	64,21
	10^5	22,96	26,34	41,47	55,07	73,03
	10^6	23,69	21,07	48,76	61,36	82,92
	10^7	24,40	36,40	65,63	78,07	84,06
<i>Metarhizium sp</i>	10^3	15,67	23,61	34,23	40,80	49,90
	10^4	11,59	22,22	34,06	48,34	58,91
	10^5	22,97	44,44	52,85	63,60	74,17
	10^6	19,49	44,44	67,07	74,17	83,27
	10^7	31,22	54,16	83,11	79,96	90,90
<i>Metarhizium anisopliae</i>	10^3	5,13	7,63	15,88	20,48	30,37
	10^4	11,25	22,77	37,33	56,87	66,52
	10^5	13,75	16,45	32,20	46,96	73,64
	10^6	14,09	19,29	32,07	61,12	77,97
	10^7	18,53	35,68	44,83	64,45	78,05

Tableau 21: Doses léthales de trois souches de champignons (*Aspergillus clavatus*, *Metarhizium anisopliae* et *Metarhizium sp*) contre les adultes d'*Acyrthosiphon pisum*

Souches	Jours après traitement	Doses Létales (spores/ml)		R^2	P-valeurs
		DL ₅₀	DL ₉₀		
<i>Aspergillus clavatus</i>	D1	-	-	-	= 0,3381
	D2	-	-	-	= 0,1593
	D3	5,65 10⁵	6,59 10⁹	0,44	=0,0020
	D4	6,66 10 ⁴	9,18 10 ⁹	0,42	=0,0025
	D5	4,95 10 ²	5,65 10 ⁷	0,55	=0,0003
<i>Metarhizium anisopliae</i>					
	D1	-	-	0,06	0,3795
	D2	-	-	0,13	0,1461
	D3	-	-	0,19	0,0564
	D4	1,11 10⁵	7,07 10⁹	0,41	0,0026
<i>Metarhizium sp</i>					
	D1	-	-	0,32	0,0094
	D2	2,99 10 ⁶	1,74 10 ¹²	0,53	0,0003
	D3	6,63 10 ⁴	3,84 10 ⁹	0,66	< 0,0001
	D4	7,54 10 ³	8,83 10 ⁸	0,64	< 0,0001
	D5	1,23 10 ³	1,34 10 ⁷	0,78	< 0,0001

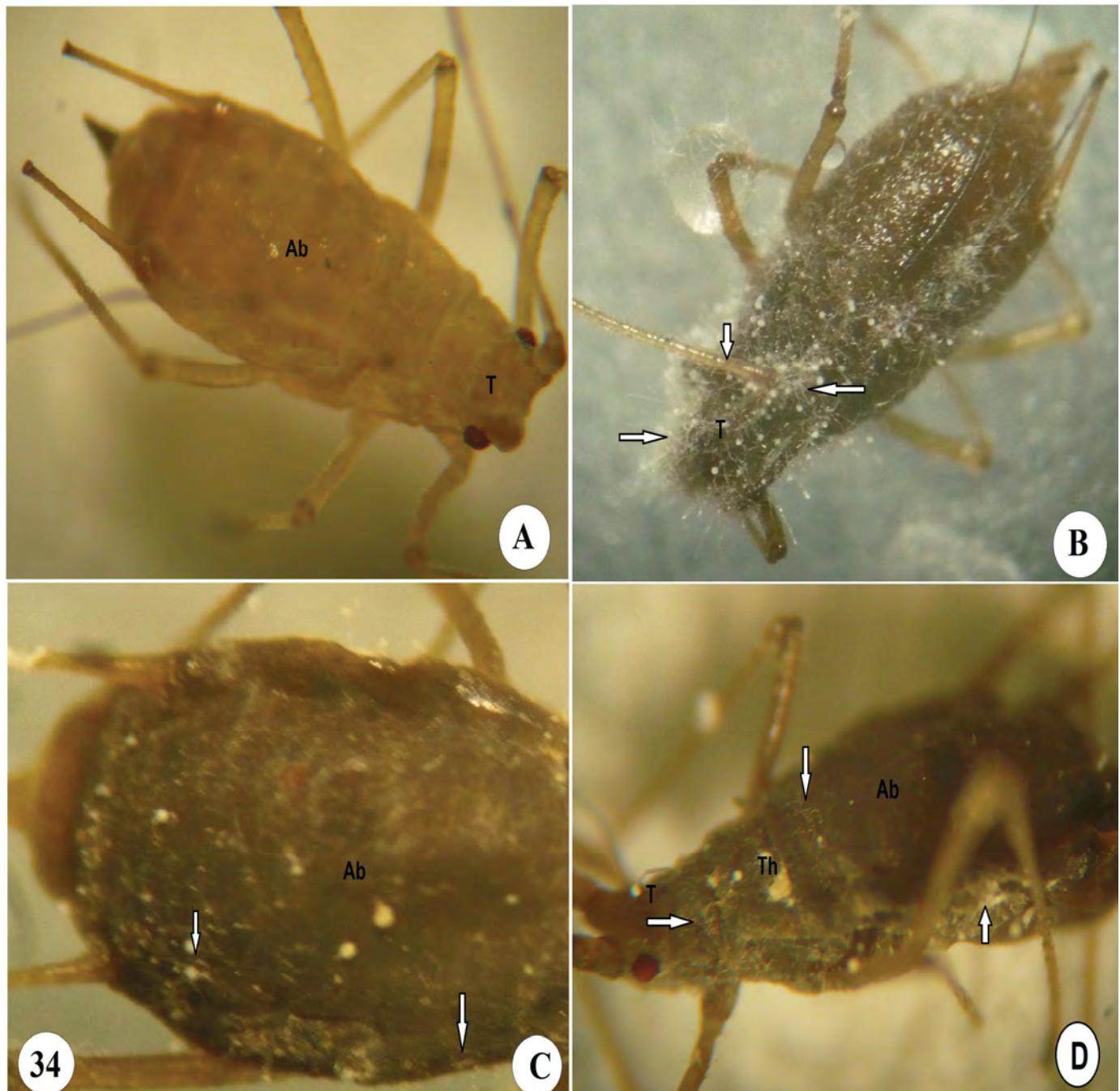


Figure 34: Adultes de puceron (*Acyrthosiphon pisum*) non traité (A) et traités avec *Aspergillus clavatus* (B), *Metarhizium anisopliae* (C) et *Metarhizium sp* (D) 48h après incubation. (T= tête, Th= thorax, ab= abdomen). Des filaments apparaissent sur la cuticule des insectes (flèches) comparés au témoin (A). Les adultes traités ont été infectés par les champignons *A. clavatus* (B) qui s'est plus développé que *M. anisopliae* (C) et *Metarhizium sp* (D).

B- Effets des champignons sur la reproduction

Les résultats ont révélé qu'avec les adultes non traités, le nombre de nymphes produites par jour est très élevé. Par contre avec les adultes traités aux différentes souches, le nombre de nymphes diminue suivant les doses utilisées et dans le temps. En comparaison avec le témoin et les autres souches, *Metarhizium sp* semble être plus efficace avec un taux de croissance de la population de pucerons négatif suivi par *A. clavatus* et *M. anisopliae* (Fig. 35).

Le test de Kruskal-Wallis montre un taux intrinsèque de la croissance qui varie entre les doses utilisées pour les jours 4 et 5 (*A. clavatus*), pour les jours 1 et 4 (*M. anisopliae*), contrairement à *Metarhizium sp* dont le taux ne varie pratiquement pas en dehors du 5^{ème} jour (Tableau 22).

Des études ont montré que les champignons entomopathogènes pouvaient affecter la fécondité des insectes (Castillo *et al.*, 2000; Mulock et Chandler, 2001; Quesada-Moraga *et al.*, 2004; Scholte *et al.*, 2006). Cependant, le taux de nymphes mortes était très négligeable par rapport à la mortalité des adultes. La baisse du taux de reproduction ne serait pas due à une diminution de production individuelle de nymphes mais à la mortalité des adultes par jours. Ce qui fait que le rapport diminue au cours du temps. Ceci confirme les travaux de Wang et Knudsen (1993) qui ont montré des résultats similaires avec *Beauveria bassiana* contre les pucerons du blé en Russie. Baverstock *et al.*, 2006 ont révélé aussi que l'infection de *Pandora neoaphidis* et de *Beauveria bassiana* n'ont pas d'effet direct sur la progéniture des insectes. Néanmoins, dans notre étude, les adultes morts ont présenté une émergence des champignons pouvant assurer leur rémanence dans le milieu. Avec la possibilité d'une autodissémination entre adultes et nymphes produites, ces dernières pourraient être infectées. Avec ce processus d'infection, les mortalités augmenteraient et pourraient faire diminuer la densité de pucerons au cours du temps.

Au terme de cette reflexion, il apparaît évident qu'une bonne stratégie consistant à pulvériser des doses létales avec une répétition d'intervalle de temps optimal devrait faciliter et rendre efficace la vulgarisation des champignons dans la lutte biologique contre les pucerons.

Tableau 22: Taux intrinsèque de la variation des doses de spores d'*Aspergillus clavatus*, *Metarhizium anisopliae* et *Metarhizium sp* sur la production de nymphes d'*Acyrthosiphon pisum*

Souches	Test	Jours après traitement				
		J1	J2	J3	J4	J5
<i>Aspergillus clavatus</i>	ANOVA-1	0,068	0,183	0,018	0,003	0,000
	Kruskal-Wallis	0,041	0,158	0,035	0,008	0,008
<i>Metarhizium anisopliae</i>	ANOVA-1	0,011	0,091	0,142	0,005	0,095
	Kruskal-Wallis	0,019	0,102	0,075	0,006	0,131
<i>Metarhizium sp</i>	ANOVA-1	0,099	0,382	0,632	0,121	0,015
	Kruskal-Wallis	0,091	0,246	0,656	0,205	0,063

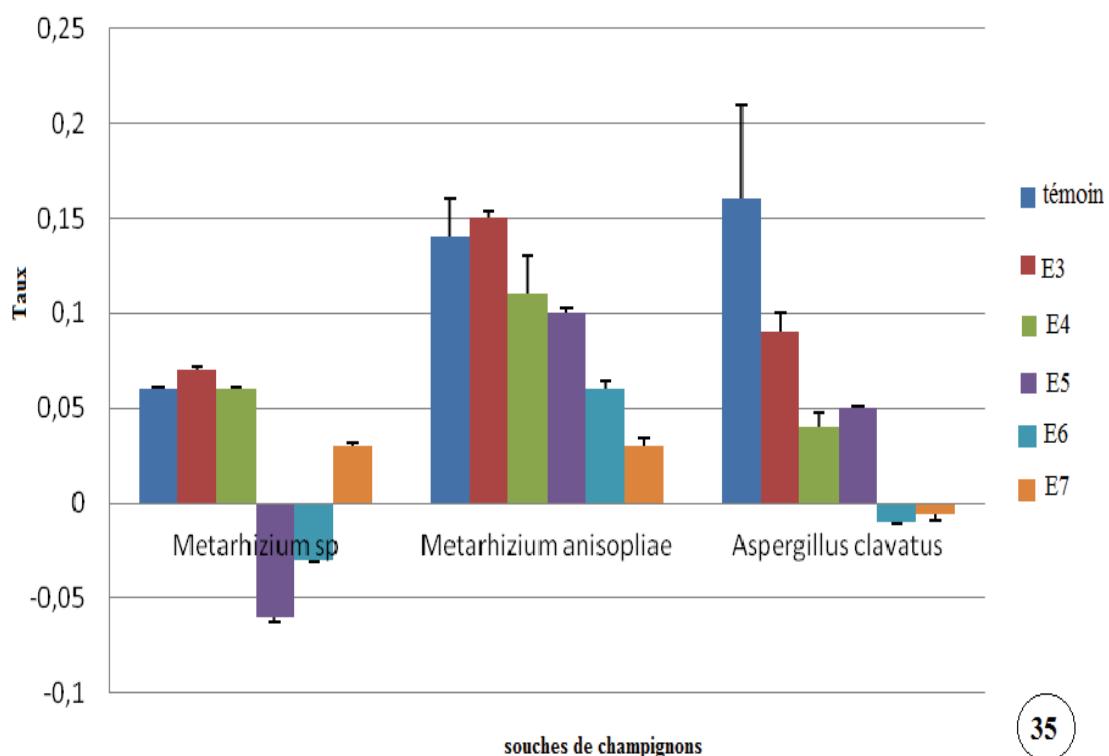


Figure 35: Effets des champignons *Aspergillus clavatus*, *Metarhizium anisopliae* et *Metarhizium sp* sur le taux intrinsèque de la formation de nouvelles générations du puceron *Acyrthosiphon pisum*

CONCLUSION:

Le puceron *Acyrthosiphon pisum* est sensible aux champignons entomopathogènes *Aspergillus clavatus*, *Metarhizium anisopliae* et *Metarhizium sp.* Les mortalités et le taux de reproduction diminuent avec l'augmentation des doses et dans le temps. La diminution du nombre de nymphes produites est fortement liée à la mortalité des adultes.

Pour une bonne utilisation de leur pouvoir pathogène, l'extraction et l'identification des toxines impliquées devraient être faites avant leur application à grande échelle contre les pucerons.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Dans cette étude, nous avons montré que les espèces *Culex quinquefasciatus*, *Culex tigripes* et *Anopheles gambiae* sl (*An. arabiensis* après identification génétique) ont été présentes suivant les périodes dans la banlieue de Dakar du mois d'avril 2009 au mois d'avril 2010. Leur présence était liée à un certains nombre de facteurs dont les plus déterminants sont la pluviométrie, la température et le pH. Cependant, *An. arabiensis* est présent durant toute l'année (avril 2009 à mars 2010) au quartier Sam-Sam 3.

Après avoir isolé trois souches de champignons (*Aspergillus clavatus*, *Metarhizium anisopliae* et *Metarhizium sp*), nous avons sélectionné le son comme un milieu de production en masse. Celui-ci a été plus productif que le riz décortiqué avec les différentes méthodes en milieux solide, liquide et semi-liquide dans les mini-fermenteurs (Erlenmeyers de 250 ml). Avec le système d'introduction de packing dans le milieu liquide, nous avons posé l'hypothèse d'une possibilité d'extrapoler un nouveau système de fermentation en milieu semi-liquide en bio-industrie avec des réacteurs de plus grand volume.

En bioindustrie, nous avons produit des spores et métabolites secondaires du cahmpignon *Aspergillus clavatus* en adoptant un substrat solide constitué de packing en métal et de son au bioréacteur généralement utilisé pour une fermentation liquide. Les produits testés (spores et métabolites) ont montré leur efficacité contre les larves et adultes de *Cx quinquefasciatus*.

Nous avons montré la possibilité de formuler les spores d'*Aspergillus clavatus* avec une huile de neem (Suneem) et son utilisation contre les adultes de *Cx quinquefasciatus*. Cette formulation a fait diminuer le taux de survie des adultes de manière significative en 5 jours.

Contre les larves, les spores d'*A. clavatus* ont montré une forte pathogénicité en agissant par :

- une destruction des microvillosités suivie d'une dégradation de l'épithélium intestinal,
- une dégradation du tissu musculaire par désorganisation du réticulum sarcoplasmique, des filaments d'actine et de myosine,
- une dégradation de l'épithélium cuticulaire

Tous ces dégâts ont été observés en 24h conduisant à la mort des larves.

Avec les spores de *M. anisopliae*, nous avons fait une autre formulation avec le Suneem. Cette formulation a été évaluée sur les adultes d'*An. gambiae* sl (*An. arabiensis*). Les pourcentages de survie ont fortement diminué en 4 jours contrairement à la formulation aqueuse.

En milieu semi-naturel, l'utilisation de la DL₉₀ de cette formulation a entraîné une forte inhibition de l'émergence des moustiques adultes d'*An. arabiensis* en périodes hivernale et post-hivernale.

Pour montrer le spectre d'action de ces champignons, nous avons évalué la pathogénicité des trois souches de champignons sur la reproduction du puceron *Acyrthosiphon pisum*.

A. Clavatus a été montré pour la première fois comme étant un champignon pathogène contre les pucerons. Les trois espèces ont montré une efficacité contre les adultes par une mortalité progressive dans le temps et suivant les doses. Cependant, ces mortalités ont une forte influence sur la production de nymphes qui diminue dans le temps.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abbott, W.S. (1925). A method of computing the effectiveness of an insecticide. J. Econ. Entomol., 18: 265-267.

Adeogun, A. O., Olojede, J. B., Oduola, A. O., and Awolola, T. S. (2012). Village-Scale Evaluation of PermaNet 3.0: an Enhanced Efficacy Combination Long-Lasting Insecticidal Net Against Resistant Populations of *Anopheles gambiae* s.s. M. C. C. E., 1, 9 pages

Akogbeto M., Yakoubou S. (1999). Resistance of malaria vectors to pyrethroids used for impregnated bednets, Benin, West Africa. Bull. Soci. pathol. Exot. 92, 2, pp. 123-130

Ali, A., Sauerman, D.M. et Nayar, J.K. (1984). Pathogenicity of industrial formulations of *Bacillus thuringiensis* serovar. *israelensis* to larvae of some Culicine mosquitoes in the laboratory. Fla. Entomol. 67(2): 193-197.

Alves, S.B., Alves, L.F.A., Lopes, R.B., Pereira, R.M., et Vieira, S.A. (2002). Potential of some *Metarhizium anisopliae* isolates for control of *Culex quinquefasciatus* (Dipt., Culicidae). J. Appl. Entomol., 126: 504-509.

Arzumanov, T., Jenkins, N., et Roussos, S. (2005). Effect of aeration and substrate moisture content on sporulation of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. Process Biochem. 40: 1037-1042.

Assamoi, A.A., Destain, J., et Thonart, P. (2009). Aspects microbiologiques de la production par fermentation solide des endo- β -1,4-xylanases de moisissures : le cas de *Penicillium canescens*. Biotechnol. Agron. Soc. Environ. 13: 281-294.

Bajan, C., Kmitowa K. and Nowak E. P. (1998). Reaction of various ecotypes of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* to the botanical preparation NEEMTM and pyrethroid Fastak. Arch. Phytopathol. PFL. 31: 369-375.

Bateman RP, Carey M, Moore D, Prior C (1993). The enhanced infectivity of *Metarhizium flavoviride* in oil formulations to desert locusts at low humidities. Ann. Appl. Biol., 122: 145-152.

Batta YA. (2003), Production and testing of novel formulations of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Metschinkoff) Sorokin (Deuteromycotina: Hyphomycetes). Crop Prot., 22: 415-422.

Baverstock J, Roy HE, Clark SJ, Alderson PG, Pell JK, (2006). Effect of fungal infection on the reproductive potential of aphids and their progeny, J. Invertebr. Pathol., 91(2):136-139

Bergel, F., Morrison, A.L., Moss, A.R., Rinderknecht, H. (1944). An antibacterial substance from *Aspergillus clavatus*. J. Chem. Soc. 1944: 415-421.

Bernick, E.P., Moffett, S.B., and Moffett, D.F., (2007). Organization, ultrastructure, and development of midgut visceral muscle in larval *Aedes aegypti*. Tissue Cell. 39 (4), 277-292.

Bilal, H., Hassan, S.A., and Khan, I.A. (2012). Isolation and efficacy of entomopathogenic fungus (*Metarhizium anisopliae*) for the control of *Aedes albopictus* Skuse larvae: suspected dengue vector in Pakistan. Asian Pac. J. Trop. Biomed. 2 (4): 298-300.

Blanford S., Chan B.H.K., Jenkins N., Sim D., Turner R.J., Read A.F., Thomas M.B. (2005) Fungal pathogen reduces potential for malaria transmission. Science 308:1638–1641

Boisvert, M., and Boisvert, J. (2000). Effects of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* on target and nontarget organisms: a review of laboratory and field experiments. Biocontrol. Sci. Technol. 10 (5): 517-561.

Bradley CA., Britton JH. (1995). Formulations of entomopathogenic fungi for use as biological insecticides. World International Property Organisation,. No wo//010597

Brault V, Uzest M, Monsion B, Jacquot E, Blanc S, (2010). Aphids as transport devices for plant viruses. *C. R. Biol.* 333(6-7), p: 524-38

Brenner, S.L. and Korn, E.D., (1980). The effect of cytochalasins on actin polymerization and actin ATPase provide insights into the mechanism of polymerization. *J. Biol. Chem.* 255, 841–844.

Bukhari, T., Willem, T., Koenraadt, C. J. M.. (2011). Development of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* formulations for control of malaria mosquito larvae, *Parasites & Vectors*, 4:23

Burges, A.D., and Hussey, N.W. (1981). *Microbial Control of Insect Pests and Mite*. Academic Press, London, pp. 161-167.

Butt, T.M., and Copping, L.G. (2000). Fungal biological control agents. *Pesticide Outlook* 11: 186-191.

Castillo, M.-A., P. Moya, E. Hernández, and E. Primo-Yúfera. (2000). Susceptibility of *Ceratitis capitata* Wiedemann (Diptera: Tephritidae) to entomopathogenic fungi and their extracts. *Biol. Control* 19:274-282.

Cavados, C.F.G, Majerowicz, S., Chaves, J.Q., Araújo-Coutinho, C.J.P.C., Rabinovitch, L., (2004). Histopathological and ultrastructural effects of δ-endotoxins of *Bacillus thuringiensis* Serovar *israelensis* in the midgut of *Simulium pertinax* larvae (Diptera, Simuliidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, 99 (5), 493-498.

Chandler, D. (1997). Selection of an isolate of the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* virulent to the lettuce root aphid, *Pemphigus bursarius*. *Biocontrol Sci. Techn.*, 7: 95-104

Charles, J-F., et Nielsen-LeRoux, C. (1996). Les bactéries entomopathogènes: mode d'action sur les larves de moustiques et phénomènes de résistance. Annales de l'institut Pasteur/ actualités 7(4) : 233-245.

Chauvet G, (1969). Répartition et écologie du complexe *Anopheles gambiae* à Madagascar. Cahiers ORSTOM, Ent. Méd. Parasitol., 7:235-278.

Clardy, J., Springer, J.P., Büchi, G., Matsuo, K., Wrightman, R. (1975). Tryptoquivaline and Tryptoquivalone, two new tremorgenic metabolites of *Aspergillus clavatus*, J. Am. Chem. Soc., 97: 663-665.

Clarkson, J. M., Charnley, A. K., (1996). New insights into the mechanism of fungal pathogenesis in insects. Trends Microbiol., 4:197-203.

Dagnelie, P. (1970). Théorie et méthodes statistiques. Vol. 2 : Les méthodes d'inférence statistique. Applications agronomiques. Les presses agronomiques de Gembloux, A.S.B.L., éditions J. Duculot, S.A.-Gembloux.

Daoust R. A., Ward M.G. and Roberts D. W. (1982). Effect of formulation on the virulence of *Metarhizium anisopliae* conidia against mosquito larvae. J. Inv. Pathol., 40, 2, Pages 228-236

Darriet F., N'guessan R., Koffi A. A., Konan L., Doannio J.M.C., Chandre F. and Carnevale P. (2000). Impact de la résistance aux pyréthrinoïdes sur l'efficacité des moustiquaires imprégnées dans la prévention du paludisme : résultats des essais en cases expérimentales avec la deltaméthrine SC. Bull. Soc. Pathol. Exot., 93 (2): 131-134

De Moraes, A.M., da Costa, G.L., Barcellos, M.Z., de Oliveira, R.L., and de Oliveira, P.C. (2001). The entomopathogenic potential of *Aspergillus* spp. in mosquitoes vectors of tropical diseases. J. Basic. Microb. 41(1): 45-49.

Depieri R. A., Martinez S. S. And Menezes J.R A. O.. (2005). Compatibility of the Fungus *Beauveria Bassiana* (Bals.) Vuill. (Deuteromycetes) with Extracts of Neem Seeds and Leaves and the Emulsible Oil. Neotropic. Entomol. 34 (4) :601-606

Diagne N., Fontenille D., Konaté L., Faye O. Lamizana M. T., Legros F., Molez J. F., et Trape J. F., (1994). Les anophèles du Sénégal, liste commentée et illustrée. Bull. Soc. Path. Ex. 87, : 267-277

Díez-Sampedro, A., Lostao, M.P. and Barber, A., (2000). Cytoskeleton involvement on intestinal absorption processes. J. Physiol. Biochem., 56 (1), 25-32.

Dong C, Zhang J, Chen W, Huang H and Hu Y, (2007). Characterization of a newly discovered China variety of *M. anisopliae* (*M. anisopliae* var. *dcjhyium*) for virulence to termites, isoenzyme and phylogenetic analysis. Microbiol. Res. 162 53-61.

Dorta B., Ertola R. & Arcas J. (1996). Characterisation of growth and sporulation of *Metarhizium anisopliae* in solid-substrate fermentation. Enzyme Microb. Technol. 19: 434-439.

El-Shazly, M.M. and Refaie, B.M, (2002). Larvicidal effect of the juvenile hormone Mimic Pyriproxyfen on *Culex pipiens*. J. Am. Mosq. Control. Assoc. 18 (4): 321-328.

El-Sheikh T.M.. (2009). Field evaluation of repellency effect of some plant extracts against mosquitoes in Egypt; J. Egypt. Soc. Parasitol. 39 (1) :59-72

Emden, V.H.F and R. Harrington, (2007). Aphids as Crop Pest. CABI Publishing, London, Nosworthy Way, Wallingford, Oxfordshire OX10 8DE, UK. pp. 717

Farenhorst M., Knols B. G. J., Thomas M. B., Howard A. F. V., Takken W., Rowland M., N'Guessan R. (2010). Synergy in Efficacy of Fungal Entomopathogens and Permethrin against West African Insecticide-Resistant *Anopheles gambiae* Mosquitoes. PLoS ONE 5 (8) :10

Farenhorst M., Knols B.G.J. (2010). A novel method for standardized application of fungal spore coatings for mosquito exposure bioassays. Malaria J., 9 (27) p : 13

- Farenhorst M., Anne Hilhorst, Matthew B. Thomas, and Bart G. J. Knols.** (2011). Development of Fungal Applications on Netting Substrates for Malaria Vector Control. *J. of Med. Entom.*, 48 (2) :305-313.
- Fargues, J., Smits, N., Vidal, C., Vey, A., Vega, F., Mercadier, G., and Quimby, P.** (2002). Effect of liquid culture media on morphology, growth, propagule production, and pathogenic activity of the Hyphomycete, *Metarhizium flavoviride*. *Mycopathologica* 154: 127-138.
- Fillinger, U., Knols, B.G.J., and Becker, N.** (2003). Efficacy and efficiency of new *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* and *Bacillus sphaericus* formulations against Afrotropical anophelines in Western Kenya. *Trop. Med. Int. Health.* 8 (1): 37-47.
- Finney D. J.** (1971). Probit analysis, 3rd edn. Cambridge University Press, Great Britain
Parasitol Res (2007) 101:385–390 389
- Fontenille D., Lochouarn L., Diagne N., Sokhna C., Lemasson J-J, Diatta M., Konate L., Faye F., Rogier C. and Trape J-F.** (1997). High Annual and Seasonal Variations in Malaria Transmission by Anophelines and Vector Species Composition in Dielmo, a Holoendemic Area in Senegal. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 56 (3) : 247-253
- Visalakshy G;, P. N., Krishnamoorthy, A., and Manoj Kumar, A.** (2006). Compatibility of plant oils and additives with *Paecilomyces farinosus*, a potential entomopathogenic fungus. *J. Food Agr. Environ.* 4 (1): 333–335.
- García-Munguía A.M., Garza-Hernández J.A., Rebollar-Tellez E.A., Rodríguez-Pérez M.A., Reyes-Villanueva F.** (2011) Transmission of Beauveria bassiana from male to female *Aedes aegypti* mosquitoes. *Parasit. Vectors.* 26 (4):24.
- Gavendra, S., and Soam, P.** (2011). Studies on Fungal Cultural Filtrates against Adult *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) a Vector of Filariasis. *J. Parasitol. Res.*, Article ID 147373, 5 pages.

Geetha I., Manonmani A.M., Prabakaran G.. (2011). *Bacillus amyloliquefaciens*: A mosquitocidal bacterium from mangrove forests of Andaman & Nicobar islands, India. *Acta Trop.*, 120 :155– 159

George S., Vincent S. 2005, Comparative efficacy of *Annona squamosa* Linn. and *Pongamia glabra* Vent. to *Azadirachta indica* A. Juss against mosquitoes. *J. Vect. Borne Dis.*, 42: 159–163.

Gillespie, A.T., Clayton, N.: 1989. The use of entomopathogenic fungi for pest control and the role of toxins in pathogenesis. *Pestic. Sci.*, 27:203-215

Glick J I, (1992). Illustrated key to the *Anopheles* of Southwestern Asia and Egypt (Diptera: Culicidae) Mosquito Systematics, 24, p: 125-153

Gomez, A., Seccacini, E., Zerba, E., and Licastro, S. (2011). Comparison of the insecticide susceptibilities of laboratory strains of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 106 (8): 993-996.

Govindarajan, M., Jebanesan, A. and Reetha, D., (2005) Larvicidal effect of extracellular secondary metabolites of different fungi against the mosquito, *Culex quinquefasciatus* Say. *Trop. Biomed.* 22, 1-3.

Hall, RA (1980). Control of aphid in glass house with fungus *Verticillium lecanii* (Zimm.): Effect of spore concentration. *Ento. Explt. Applic.* 27 (1): 1-5

Hall, RA (1979). Pathogenicity of *Verticillium lecanii* (Zimm.) conidia and blastospores against the aphid. *Entomophaga*, 24 (2): 191-198.

Hati, A.K. and Ghosh, S.M. 1965. *Aspergillus parasiticus* infection in adult mosquitoes. *Bull. Calcutta Sch. Trop. Med.* 13: 18-19.

Hernandez-Velazquez V. M., Berlanga-Padilla A. M. and Barrientos-Lozano L. (2000). Vegetable and mineral oil formulation of *Metarrhizium anisopliae* var. *acridum* to control the

central locust (*Schistocerca piceifrons* Walker) (Orthoptera: Acrididae). J. Orthopt. Res. 9: 223-227.

Hirose E., Neves P. M. O. J., Zequi J. A. C., Martins L. H., Peralta C. H. and Moino Jr. A. (2001). Effect of Biofertilizers and Neem Oil on the Entomopathogenic Fungi *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. and *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. Braz. Arch. Biol. Techn. 44: 419-423.

Holder D. J. and Keyhani N. O. 2005. Adhesion of the Entomopathogenic Fungus *Beauveria (Cordyceps) bassiana* to Substrata. Appl. Environ. Microbiol., 71 (9) : 5260–5266

Hopkins G. H. E, 1852. Clés des larves de Culicinae de la région Ethiopienne, 2^e édition, Office de la Recherche Scientifique et Technique Outre-mer 30 p.

Hornbostel V. L., Zhioua E., Benjamin M. A., Ginsberg H. S. and Ostfeld R. S.. (2005). Pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) and permethrin to *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) nymphs, Exp. Appl. Acarol. 35 (4): 301-316

Howard A FV , Koenraadt C JM, Farenhorst M, Knols B GJ and Takken Wi. (2010), Pyrethroid resistance in *Anopheles gambiae* leads to increased susceptibility to the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*. Malaria J. 9:168

Im, D.J., Aguda, R.M., and Rombach, M.C. (1988.) Effects of nutrients and pH on the growth and sporulation of four entomogenous hyphomycetes fungi (Deuteromycotina). Kor. J. Appl. Entomol. 27: 41–46.

Islam M. T, Olleka A. and Ren S. (2010). Influence of neem on susceptibility of *Beauveria bassiana* and investigation of their combined efficacy against sweetpotato whitefly, *Bemisia tabaci* on eggplant. Pestic. Biochem. Physiol. 98, (1): 45-49

James R. R. (2003). Combining Azadirachtin and *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) to Control *Bemisia argentifolii* (Homoptera: Aleyrodidae), J. Econ. Entomol. 96 (1): 25-30

Jung HS, Lee HB, Kim K and Lee EY (2006). Selection of *Lecanicillium* strains for aphid control. Korean J. Mycol. 34 : 112-118.

Kaaya GP., Hassan S. (2000) Entomogenous fungi as promising biopesticides for tick control. Exp. Appl. Acarol., 24: 913–926.

Kamp, A.M., and Bidochka, M.J. (2002). Protein analysis in a pleiomorphically deteriorated strain of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. Can. J. Microbiol. 48 (9): 787-792.

Kannan S. K, Murugan K., Kumar A. N., Ramasubramanian N. and Mathiyazhagan P. (2008). Adulicidal effect of fungal pathogen, *Metarhizium anisopliae* on malarial vector *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae) Afr. J. Biotech. 7 (6) : 838-841

Kanzok, S.M., and Jacobs-Lorena, M. (2006). Entomopathogenic fungi as biological insecticides to control malaria. Trends Parasitol. 22(2): 49-51.

Khan M, Khalil SK and Karimullah, (1990). Biological control of aphid with a entomopathogenic fungus. Pakistan J. Agric. Res. 11 (3) : 174-177

Kikankie C. K, Basil D Brooke, Bart GJ Knols, Lizette L Koekemoer, Marit Farenhorst, Richard H Hunt, Matthew B Thomas, Maureen Coetzee, (2010).The infectivity of the entomopathogenic fungus Beauveria bassiana to insecticide-resistant and susceptible *Anopheles arabiensis* mosquitoes at two different temperatures, Malar. J., 9:71

Kirschbaum, JB. (1985) Potential implication of genetic engineering and other biotechnologies to insect control. Annual Review of Entomology, 30: 51–70.

Koenraadt, C. J., Majambere, S., Hemerik, L., Takken, W.: (2004). The effects of food and space on the occurrence of cannibalism and predation among larvae of *Anopheles gambiae* s.l. Entomol. Exp. Appl., 112:125-134.

Kovendan, K., Murugan, K., Vincent, S., and Barnard, D.R. (2012). Efficacy of larvicidal and pupicidal properties of *Acalypha alnifolia* Klein ex Willd. (Euphorbiaceae) leaf extract and *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) against *Culex quinquefasciatus* Say. (Diptera: Culicidae). J Biopest 5: 170-176.

Kumar , V., Singh, G.P., Babu, A.M. (2004). Surface ultrastructural studies on the germination, penetration and conidial development of *Aspergillus flavus* Link : Fries infecting silkworm, *Bombyx mori* Linn. Mycopathologia 157: 127–135.

Kweka E. J., Nkya W. M. M., Mahande A. M., Assenga C., Mosha F. W., Lyatuu E. E., Massenga C. P., Nyale E. M., Mwakalinga S. B. and Lowassa A.. (2008) . Mosquito abundance, bed net coverage and other factors associated with variations in sporozoite infectivity rates in four villages of rural Tanzania. Malar. J., 7:59

Loke, S.R., Andy-Tan, W.A., Benjamin, S., Lee, H.L., and Sofian-Azirun, M. (2010). Susceptibility of field-collected *Aedes aegypti* (L.) (Diptera : Culicidae) to *Bacillus thuringiensis israelensis* and temephos. Trop. Biomed. 27 (3): 493-503.

Lopez-Diaz, T.M., Flannigan, B. (1997). Production of patulin and cytochalasin E by *Aspergillus clavatus* during malting of barley and wheat. Int. J. Food Microbiol. 35: 129-136.

Lord Jeffrey, C. and Fukuda, T., (1988). An ultrastructural study of the invasion of *Culex quinquefasciatus* larvae by *Leptolegnia chapmanii* (Oomycetes: Saprolegniales) Mycopathologia 104 : 67-73.

Loureiro, E. D. S. and Moino, J. A., (2006). Pathogenicity of hyphomycete fungi to aphids *Aphis gossypii* Glover and *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae). *Neotrop. Entomol.* 35(5): 660-665.

Lucantoni L., Giusti F., Cristofaro M., Pasqualini L., Esposito F., Lupetti P. (2006) Effects of a neem extract on blood feeding, oviposition and oocyte ultrastructure in *Anopheles stephensi* Liston (Diptera: Culicidae). *Tissue and cell*, 38: 361-71.

Machault V., Gadiaga L., Vignolles C., Jarjaval F., Bouzid S., Sokhna C., Lacaux J-P, Trape J-F, Rogier C., and Pagès F. (2009). Highly focused anopheline breeding sites and malaria transmission in Dakar. *Malar. J.* 8:138

Mahmoud, A. S., Hani, M.A.A. and Adel, A.B. S., (2000). Ultrastructural changes in the muscles, midgut, hemopoietic organ, imaginal discs and Malpighian tubules of the mosquito *Aedes aegypti* larvae infected by the fungus *Coelomomyces stegomyiae*. *Mycopathologia* 149, 99–106.

Mahmoud F. M.; (2009). Pathogenicity of three commercial products of entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana*, *Metarrhizium anisopilae* and *Lecanicillium lecanii* against adults of Olive Fly, *Bactrocera oleae* (Gmelin) (Diptera: Tephritidae) in the Laboratory. *Plant. Protect. Sci.* 45, 3: 98–102

Mahon RJ, Green CA, Hunt RH: 1976. Diagnostic allozymes for routine identification of adults of the *Anopheles gambiae* complex (Diptera, Culicidae). *Bull. Entomol. Res.*, 66 :25-31

Majori, G., Ali, A., and Sabatinelli, G. (1987). Laboratory and field efficacy of *Bacillus thuringiensis* serovar. *israelensis* and *Bacillus sphaericus* against *Anopheles gambiae* s.l. and *Culex quinquefasciatus* in Ouagadougou, Burkina Faso. *J. Am. Mosquito Cont.* 3: 20-25.

Margalit, J., and Dean, D. (1985). The story of *Bacillus thuringiensis israelensis* (B.t.i.). *J. Am. Mosquito Cont.* 1: 1–7.

Miles SJ: A biochemical key to adult members of the *Anopheles gambiae* group of species (Diptera:Culicidae). J. Med. Entomol. 1979, 15:297-299.

Mnyone L L, Kirby Matthew J, Lwetoijera Dickson W, Mpingwa M W, Knols B GJ, Takken W and Russell T L. (2009) a, Infection of the malaria mosquito, *Anopheles gambiae*, with two species of entomopathogenic fungi: effects of concentration, co-formulation, exposure time and persistence, Malar. J., 8:309

Mnyone L. L., Russell T. L., Lyimo I. N., Lwetoijera D. W., Kirby M. J. and Luz C. (2009) b, First report of *Metarhizium anisopliae* IP 46 pathogenicity in adult *Anopheles gambiae* s.s. and *An. arabiensis* (Diptera; Culicidae), Parasit. Vectors, 2: 59

Mnyone L. L., Kirby M. J., Mpingwa M. W., Lwetoijera D. W., Knols B. G. J., Takken W., Koenraadt C. J. M., Russell T. L.. (2011). Infection of *Anopheles gambiae* mosquitoes with entomopathogenic fungi: effect of host age and blood-feeding status. Parasitol. Res. 108:317–322

Mohanty, S.S., and Prakash, S. (2008). Effects of culture media on larvicidal property of secondary metabolites of mosquito pathogenic fungus *Chrysosporium lobatum* (Moniliales: Moniliaceae). Acta Trop. 109(1): 50–54

Mohanty S.S., Raghavendra K., Mittal P.K. & Dash A.P. (2008) a. Efficacy of culture filtrates of *Metarhizium anisopliae* against larvae of *Anopheles stephensi* and *Culex quinquefasciatus*. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 35: 1199-1202

Mohanty S. S., Raghavendra K. and Prasad D. A. (2008) b. Influence of growth medium on antifungal activity of neem oil (*Azadirachta indica*) against *Lagenidium giganteum* and *Metarhizium anisopliae*. (Short communication) Mycoscience 49,5, pp : 318-320

Mohanty S S, Prakash S, (2009). Effects of culture media on larvicidal property of secondary metabolites of mosquito pathogenic fungus *Chrysosporium lobatum* (Moniliales: Moniliaceae), *Acta Trop.*, 109 : 50–54

Mohanty, S.S., and Prakash, S. (2010). Comparative efficacy and pathogenicity of keratinophilic soil fungi against *Culex quinquefasciatus* larvae. *Indian J. Microbiol.* 50: 299-302.

Mulock Barbara S. and Chandler Laurence D.(2001). Effect of *Beauveria bassiana* on the Fecundity of Western Corn Rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera* (Coleoptera: Chrysomelidae), *Biol. Control* 22, 16–21

Murad, A.M., Laumann, R.A, Lima, T., Sarmento, R.B.C., Noronha, E.F., Rocha, T. L., Valadares-Inglis, M.C., Franco, O. L., (2006.) Screening of entomopathogenic *Metarhizium anisopliae* isolates and proteomic analysis of secretion synthesized in response to cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus*) exoskeleton Comp. Biochem. Phys. C, 142: 365–370.

Nazar S., Ravikumar S., Williams G. P, Ali M. S. and Suganthi P..(2009) Screening of Indian coastal plant extracts for larvicidal activity of *Culex quinquefasciatus* Indian J. Sci.Tecnol. 2 (3) : 24-27

Ndione RD., Seye F., Ndiaye M. (2005) Effets histopathologiques des produits de neem (*Azadirachta indica*, A. JUSS) sur les larves de *Culex quinquefasciatus* (Say, 1823) (Diptera : Culicidae), *Dakar Médical*, 51: 107-112.

Ndione R. D., Ndiaye M., Dieye A., Faye O., Afoutou J M. (2007). Toxic effects of neem products (*Azadirachta indica* A. Juss) on *Aedes aegypti* Linnaeus 1762 larvae, *Afr. J. Biotechnol.* 6: 2846-2854.

Nnakumusana, E.S. (1985). Laboratory infection of mosquito larvae by entomopathogenic fungi with particular reference to *Aspergillus parasiticus* and its effects on fecundity and longevity of mosquitoes exposed to sporal infections in larval stages. Curr. Sci. 54: 1221-1228.

Okumu FO., Knols BGJ., Fillinger U. (2007). Larvicidal effects of a neem (*Azadirachta indica*) oil formulation on the malaria vector *Anopheles gambiae*. Malar. J., 6: 63.

OMS. 2005. Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides. WHO/CDS/WHOPES/GCDPP/2005.13

Paaijmans KP, Takken W, Githcko AK, Jacobs AF, (2008). The effect of water turbidity on the near-surface water temperature of larval habitats of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. Intl. J. Biomet., 52(8):747–753

Pagès F., Texier G., Pradines B., Gadiaga L., Machault V., Jarjaval F., Penhoat K., Berger F., Trape J-F, Rogier C. and Sokhna C. (2008). Malaria transmission in Dakar: A two-year survey. Malar. J., 7:178

Paris, M., Tetreau, G., Laurent, F., Lelu, M., Despres, L., and David, J-P.. (2011). Persistence of *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) in the environment induces resistance to multiple Bti toxins in mosquitoes. Pest. Manag. Sci. 67: 122–128.

Paula A. R., Carolino A. T., Silva C. P., Samuels R .I. 2011, Susceptibility of adult female *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) to the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* is modified following blood feeding, Parasit. vectors; 4 (1) :91

Pelizza, S. A., Lopez Lastra, C.C., Becnel, J. J., Bisaro, V., Garcia, A. J. J: (2007).Biotic and Abiotic Factors Affecting *Leptolegnia chapmanii* Infection in *Aedes aegypti*. J. Am. Mosq. Control. Assoc., 23 (2):177-181

Penn, J., Mantle, P.G., Bilton J.N., Sheppard, R.N. (1992) Glyantrypine, a novel anthranilic acid-containing metabolite of *Aspergillus clavatus*. J. Chem. Soc., Perkin. Trans. 1: 1495-1496.

Pereira, C.R., de Paula, A.R., Gomes, S.A., Pedra, P.C.O., and Samuels, R.I. (2009) .The potential of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* isolates for the control of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae. Biocontrol Sci. Techn. 19(8): 881-886.

Pitt, J.I., (2000).Toxigenic fungi and mycotoxins, Brit. Med. Bull. 56: 184-192.

Powell, M.J. (1976). Ultrastructural changes in the cell surface of *Coelomomyces punctatus* infecting mosquito larvae, Can. J. Bot. 54 (13): 1419–1437.

Prakash G.V.S.B., Padmaja V. & Kiran R.R.S. (2008). Statistical optimization of process variables for the large-scale production of *Metarhizium anisopliae* conidiospores in solid-state fermentation. Bioresour. Technol. 99(6): 1530-1537

Prescott, L.M., Harley, J.P., Klein, D.A., Bacq-Calberg, C.M., et Dusart, J. (2003). Microbiologie. 2e édition française. De Boeck, 1137p.

Pushpalatha E., Muthukrishnan J.. (1999). Efficacy of two tropical plant extracts for the control of mosquitoes, J. Appl. Ent. 123, 6, pp. 369-373

Quesada-Moraga, E., R. Santos-Quirós, P. Valverde-García, and C. Santiago-Álvarez. (2004). Virulence, horizontal transmission, and sublethal reproductive effects of *Metarhizium anisopliae* (Anamorphic fungi) on the German cockroach (Blattodea: Blattellidae). J. Invertebr. Pathol. 87:51-58.

Ravindran J., Eapen A., Kar I. (2002). Evaluation of repellent action of neem oil against the filarial vector, *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). Indian J. Malariol., 39: 13-17.

Regnault-Roger, C. (2005). Enjeux phytosanitaires pour l'agriculture et l'environnement. 1^e édition. Tec & Doc – Lavoisier, 1014p.

Robert V., Awono-Ambene H. P., and Thioulouse J. (1998). Ecology of Larval Mosquitoes, with Special Reference to Anopheles arabiensis (Diptera: Culicidae) in Market-Garden Wells in Urban Dakar, Senegal, *J. Med. Entomol.* 35(6): 948-955

Robert V., Macintyre K., Keating J., Trape J-F, Duchemin J-B, Warren M, and Beier J C. (2006). Malaria transmission in urban sub-saharan Africa. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 68(2), 2003, pp. 169-176

Rodrígues-Lagunes D.A., Tejedo A.L., Diaz D.R., Maciel C.R., Mendoza J.V., Roman E.B., Colorado S.R. and Velasco E.P.. (1997). Compatibilidad de *Beauveria bassiana* y extractos acuosos de nim (*Azadirachta indica*) para el control de la broca del cafeto (*Hypothenemus hampei*). *Man. Integr. Plagas* 44: 14-19.

Russell, T.L., Brown, M.D., Purdie, D.M., Ryan, P.A., and Kay, B.H. (2003). Efficacy of VectoBac (*Bacillus thuringiensis* variety *israelensis*) Formulations for Mosquito Control in Australia. *J. Econ. Entomol.* 96(6): 1786-1791.

Sabater-Vilar, M., Maas, R.F.M., De Bosschere, H., Ducatelle, R. and Johanna, F.G. (2004). Patulin produced by an *Aspergillus clavatus* isolated from feed containing malting residues associated with a lethal neurotoxicosis in cattle. *Mycopathologia*, 158: 419-426.

Sahayaraj K. & Namasivayam S.K.R. (2008). Mass production of entomopathogenic fungi using agricultural products and by products. *Afr. J. Biotechnol.* Vol. 7 (12): 1907-1910.

Sahayaraj, K., Namasivayam, S. K. R. and Rathi, J. M. (2011), Compatibility of entomopathogenic fungi with extracts of plants and commercial botanicals. *Afr. J. Biotechnol.* 10 (6) : 933-938

Salem G., Legros F., Lefèvre-Zante E., Ndiaye G., Bouganali H., Ndiaye P., Badji A., Trape J.F., (1994). Espace urbain et risque anophélien à Pikine (Sénégal), *Cahiers Santé* 4,: 347-357.

Santa H S D, Santa O R D, Brand D, de Souza Vandenberghe L P and Soccol C R, (2005). Spore Production of Beauveria bassiana From Agro-Industrial Residues, Braz. Arch. Biol. Tech., 48 : 51-60,

Saranya S., R. Ushakumari, Sosamma Jacob and Babu M. Philip, (2010) .Efficacy of different entomopathogenic fungi against cowpea aphid, *Aphis craccivora* (Koch) Journal of Biopesticides 3 (1): 138 – 142

Scholte, E-J., Njiru, B.N., Smallegange, R.C., Takken, W., and Knols, B.G.J. (2003). Infection of malaria (*Anopheles gambiae s.s.*) and filariasis (*Culex quinquefasciatus*) vectors with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. Malar. J. 2(1): 29-36

Scholte, E.J., Knols, B.G.J., Samson, R.A., and Takken, W., (2004)a. Entomopathogenic fungi for mosquito control: A review. J. Insect. Sci., 4 (19) : 24.

Scholte, E-J, Knols, B.G.J. and Takken, W. (2004)b. Autodissemination of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* amongst adults of the malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. Malar. J., 3: 45

Scholte E. J., K. Ng'Habi, J. Kihonda et al., (2005). An entomopathogenic fungus for control of adult African malaria mosquitoes," Science, 308 : 1641–1642.

Scholte E-J ; Knols B .G. J., Takken W. (2006). Infection of the malaria mosquito *Anopheles gambiae* with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* reduces blood feeding and fecundity. J. invert. Pathol.. 91 (1) : 43-49

Scholte E-J., Takken W., Knols BGJ. (2007). Infection of adult *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* mosquitoes with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. Acta Tropica, 102: 151-158.

Scott JA, Brogdon W et Collins FH, (1993). Identification of single specimens of the *Anopheles gambiae* complex by the polymerase chain reaction, Am. J. Trop. Med. Hyg. 49 (4), p: 520-529

Scott M. et Kaushik NK. (2000). The toxicity of a neem insecticide to populations of culicidae and other aquatic invertebrates as assessed in situ microcosms. Arch. Environ. Con. Tox., 39: 329-336.

Seye F., Ndione RD., Ndiaye M (2006)a. Effets larvicides des produits de neem (huile de neem pure et Neemix) comparés à deux insecticides chimiques de synthèse (la Deltaméthrine et le Fénitrothion) sur les larves du moustique *Culex quinquefasciatus* (Diptera : Culicidae) ; J. Sci. Technol., 1 (4): 27-36.

Seye F., Ndione RD., Ndiaye M. (2006)b, Etude comparative de deux produits de neem (Huile et poudre) sur les stades préimaginaux du moustique *Culex quinquefasciatus* (Diptera : Culicidae). Afrique SCIENCE, 02, : 212-225.

Seye F. and Ndiaye M. (2008) – Compatibilité entre *Aspergillus clavatus* (Hyphomycetes et l'huile de neem (*Azadirachta indica*) contre le moustique vecteur de filarioses *Culex quinquefasciatus* (Say, 1823) (Diptera : Culicidae). Bacteriol., Virusol., Parasitol., Epidemiol., 53 (1): 43 - 48.

Seye F., Faye O., Ndiaye M., Njie I. and Afoutou J. M. (2009). Pathogenicity of the fungus, *Aspergillus clavatus*, isolated from the locust, *Oedaleus senegalensis*, against larvae of the mosquitoes *Aedes aegypti*, *Anopheles gambiae* s.l. and *Culex quinquefasciatus*. J. Insect. Sci., 7 (9):53.

Seye, F., Ndiaye, M., Faye, O. and Afoutou, J.M. (2012). Evaluation of Entomopathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae* Formulated with Suneem (Neem Oil) against *Anopheles gambiae* s.l. and *Culex quinquefasciatus* Adults. Malar. Chemo., Cont. Elimin.. 1, Article ID 235494, 6 p.

Shah, P.A., and Pell, J.K. (2003). Entomopathogenic fungi as biological control agents. Appl. Microbiol. Biot. 61: 413-423.

Shah, F.A., Wang, C.S. & Butt, T.M. (2005). Nutrition influences growth and virulence of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. FEMS Microbiol. Lett. 251: 259-266.

Sharma SK., Dua VK., Sharma VP. (1995) Field studies on the mosquito repellent action of neem oil. Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health. , 26: 180-2.

Shoulkamy, M. A., Abdelzaher H. M.A., Shahin, A. A.B. (2001). Ultrastructural changes in the muscles, midgut, hemopoietic organ, imaginal discs and Malpighian tubules of the mosquito *Aedes aegypti* larvae infected by the fungus *Coelomomyces stegomyiae*; Mycopathologia, 149, (2) : 99-106.

Sidhu, O.P., Kumar V. and Behl H.M.. (2004). Variability in triterpenoids (nimbin and salanin) composition of neem among different provenances of India. Industr. Crops Prod. 19: 65-75.

Silva, V.C., Pinheiro, N.L., Scherer, P.O., Falcão, S.S., Ribeiro, V.R., Mendes, R.M., Chagas, R., Cardozo-De-Almeida, M., Dos Santos-Mallet, J.R., (2008). Histology and ultrastructure of *Aedes albopictus* larval midgut infected with *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. Microsc. Res. Tech. 71 (9), 663 – 668.

Singh G. and Prakash S. (2011), Studies on Fungal Cultural Filtrates against Adult *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) a Vector of Filariasis, J Parasitol Res, Article ID 147373, 5 pages.

Sivasundaram V, Rajendran L, Muthumeena K, Suresh S, Raguchander T and Samiyappan R, (2007). Effect of talcformulated entomopathogenic fungus *Beauveria* against leaf folder (*Cnaphalocrosis medinalis*) in rice. World J. Microbiol. Biotechnol.. 24 1123-1132.

Soni N. and Prakash S. (2011). *Aspergillus Niger* Metabolites Efficacies Against the Mosquito Larval (*Culex Quinquefasciatus*, *Anopheles Stephensi* and *Aedes Aegypti*) Population after Column Chromatography, Am. J. Microbiol, 2 (1): 15-20.

- St. Leger, R.R., Lokesh, J., Bidochka, M.J., Rizzo, N.W., and Donald, W.R., (1996).** Characterization and Ultrastructural localization of chitinases from *Metarhizium anisopliae*, *M. flavoviride*, and *Beauveria bassiana* during Fungal Invasion of Host (*Manduca sexta*) cuticle. Appl. Environ. Microbiol., 62, 907–912.
- SU W. W. and HE B. J. (1997).** Secreted enzyme production by fungal pellets in a perfusion bioreactor, J. Biotechnol., 54, (1): 43-52.
- Su X., Zou F. Et al. (2001).** A report on a mosquito-killing fungus, *Pythium carolinianum*. Fungal Diversity, 7: 129-133.
- Sunahara T, Ishizaka K, Mogi M (2002).** Habitat size: a factor determining the opportunity for encounters between mosquito larvae and aquatic predators. J Vector Ecol, 27:8–20
- Suzuki, T., Takeda, M., Tanabe, H., (1971).** A new mycotoxin produced by *Aspergillus clavatus* Chem. Pharm. Bull. 19(9): 1786-1788.
- Talani P., Samba G., Moyen G. (2005).** Control of malaria disease with impregnated mosquito net: case of makelekele area in Brazzaville. Médecine d'Afrique noire, 52, (12): 687-690
- Thungrabeab M. and Tongma S., (2007).** Effect of entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* (BALSAM) and *Metarhizium anisopliae* (METSCH) on non target insects, KMITL Sci. Tech. J. Vol. 7 No. S1
- Tiago, P.V., Fungaro, M.H.P. and Furlaneto, M.C. (2002).** Cuticle-degrading proteases from the entomopathogen *Metarhizium flavoviride* and their distribution in secreted and intracellular fractions. Lett. Appl. Microbiol., 34, 91–94.
- Trape J-F, Lefebvre-Zante E., Legros F., Ndiaye G, Bouganali H., Pi D. and Salem G. (1992).** Vector Density Gradients and the Epidemiology of Urban Malaria in Dakar, Senegal. Am. J. Trop. Med. Hyg., 47(2), : 181-189

Umar, A. et Don-Pedro K.N. (2008). The effects of pH on the larvae of *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*, International Journal of Pure and Applied Sciences, 3 : 58-62

Van Breukelen F.R., Haemers S., Wijffels R. & Rinzema A. (2011). Bioreactor and substrate selection for solid-state cultivation of the malaria mosquito control agent *Metarhizium anisopliae*. Process Biochem. 46: 751-757.

Vatandoost, H. and Vaziri, V. M., (2004). Larvicidal activity of a neem tree extract (Neemarin) against mosquito larvae in the Islamic Republic of Iran , E M H J, 10, Nos 4/5

Vey, A., Quiot, J.M., (1989). EVect cytotoxique in vitro et chez l'insecte hôte des destruxines, toxines cyclodepsipeptidiques produites par le champignon entomopathogène *Metarhizium anisopliae*. Can. J. Microbiol. 35, 1000–1008.

Visalakshy P. N. G., Krishnamoorthy A. and Kumar M. A. (2005). Effects of plant oils and adhesive stickers on the mycelia growth and conidiation of *Verticillium lecanii*, a potential entomopathogen. Phytoparasitica 33, (4): 367-369

Visalakshy G. P. N. ; Krishnamoorthy A., kumar A. M. (2006). Compatibility of plant oils and additives with *Paecilomyces farinosus*, a potential entomopathogenic fungus. Internat. J. of food, agricul. and environ., 4, (1) : 333-335

Vu VH, Hong SI, Kim K. (2007). Selection of entomopathogenic fungi for aphid control. J. Biosci. Bioeng. 104 (6):498-505.

Vyas N, Dua KK, Prakash S , (2007). Efficacy of *Lagenidium giganteum* metabolites on mosquito larvae with reference to nontarget organisms, Parasitol Res, 101, :385–390

Wang, Z.G., and G.R. Knudsen. (1993). Effect of *Beauveria bassiana* (Fungi: Hyphomycetes) on fecundity of the Russian wheat aphid (Homoptera: Aphididae). Environ. Entomol. 22: 874-878.

Wei, W., Shao, D., Huang, X., Li, J., Chen, H., Zhang, Q., and Zhang, J., (2006). The pathogenicity of mosquito densovirus (c6/36dnv) and its interaction with dengue virus type II in *Aedes albopictus*. Am. J. Trop. Med. Hyg., 75 : 1118–1126.

Weill, M., Duron, O., Labbé P., Berthomieu A. et Raymond R. (2003). Molecular clues to the insecticide resistance of mosquitoes. M/S: Médecine Sciences 19, 12, p. 1190-1192

Weiser, J., Matha, V., Zizka, Z., Jegorov, A., (1992). Ultrastructural changes in *Culex pipiens* larvae treated with tolypin, the insecticidal metabolite of *Tolypocladium inflatum* gams (Deuteromycetes). Cytobios, 69 (278-279):179-86.

WHO (2005). Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides WHO/CDS/WHOPES/GCDPP/2005.13

Xue C P, Sinha J, Bae JT, Kim SW and Yun JW (2006). Optimization of physical parameters for exo-biopolymer production in submerged mycelial cultures of two entomopathogenic fungi *Paecilomyces japonica* and *Paecilomyces tenuipes*, Lett. Appl. Microbiol. 42: 501–506

Xue R-D, Ali A. and Barnard D. R. (2003). Laboratory evaluation of toxicity of 16 insect repellent in aerosol sprays to adult mosquitoes. J. Am. Mosq. Control Assoc., 19, 3 pp: 271-274

Yokomi, R. K. and Gottwald, T. R. (1988). Virulence of *Verticillium lecanii* isolates in aphids determined by bioassay. J. Invertebr. Pathol., 51: 250–258.

Zimmermann, G. (1993). The Entomopathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae* and Its Potential as a Biocontrol Agent, Pesticide Science, 37, 375-379.

Zimmermann, G: (2007). Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. Biocontrol Sci. Techn., 17:879-920.

Zurek L., Watson D. W., and Schal C. (2002). Synergism between *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycota: Hyphomycetes) and Boric Acid against the German Cockroach (Dictyoptera: Blattellidae) *Biological Control* 23, 296–302

ANNEXES

Etude comparative de deux produits de neem (huile et poudre) sur les stades préimaginaux du moustique *Culex quinquefasciatus* (Diptera : Culicidae)

Fawrou SEYE*, Raymond Demba NDIONE et Mady NDIAYE

Unité d'entomologie, rickettsiologie, bactériologie et virologie (UERBV), Laboratoire de biologie de la reproduction, Département de biologie animale, Faculté des sciences et techniques, Université Cheikh Anta Diop, BP 5005 Dakar-Fann (Sénégal).

(Reçu le 14 Décembre 2005, accepté le 17 Mai 2006)

* Correspondance, courriel : fawrou@yahoo.fr

Résumé

Des produits de neem (*Azadirachta indica*) (huile de neem formulée 1 % et poudre de neem 0,3 %) fabriqués par une industrie sénégalaise (SENCHIM), ont été appliqués sur des larves et nymphes du moustique (*Culex quinquefasciatus*). Les doses ont été de 0,02 à 0,038 % (v/v) et de 0,2 à 2 % (p/v) respectivement pour l'huile de neem formulée et la poudre de neem.

Les résultats dans les conditions du laboratoire ont montré que la poudre de neem était plus毒ique au stade larvaire (mortalités entre 86,1 et 100 %) qu'au stade nymphal (entre 14,5 et 95,9 % d'adultes envolés). Cependant, l'huile de neem formulée a été efficace aussi bien au stade larvaire (mortalité entre 52,1 et 80 %) qu'au stade nymphal (entre 0 et 14 % d'adultes envolés). L'étude histopathologique a montré que les produits agissent au niveau du système digestif des larves après ingestion alors qu'au niveau des nymphes seul l'effet contact est observé. L'huile de neem formulée 1 % apparaît plus efficace que la poudre de neem 0,3 % pour le contrôle des moustiques en milieu aquatique.

Mots-clés : neem, *Azadirachta indica*, stade préimaginal, *Culex quinquefasciatus*.

Abstract

Comparative study of two neem products (oil and powder) on preimaginal stages of *Culex quinquefasciatus* mosquito (Diptera: Culicidae)

Neem (*Azadirachta indica*) products (neem oil formulated 1 % and neem powder 0.3 %), manufactured by a Senegalese industry (SENCHIM), were applied to mosquito (*Culex quinquefasciatus*) larvae and nymphs. The doses products were from 0.02 to 0.038 %

(neem oil) and 0.2 to 2 % (powder). In laboratory conditions, results showed that neem powder was more toxic at larval stage (mortalities between 86.1 and 100 %) than nymphal stage (between 14.5 and 95.9 % adults flown away). Neem oil formulated was effective as well as larval stage (mortality between 52.1 and 80 %) than nymphal stage (between 0 and 14 % adults flown away). The histopathological study reveals that neem products act upon larval digestive system after ingestion, whereas for nymphs only contact effects are showed. Neem oil formulated 1 % appears more effective than neem powder 0.3 % for mosquitoes control in aquatic environment.

Keywords : *Neem, Azadirachta indica, preimaginal stage, Culex quinquefasciatus.*

1. Introduction

Malgré leur efficacité dans la lutte contre les insectes et plus particulièrement contre les moustiques, l'utilisation des insecticides chimiques de synthèse présente des inconvénients par l'apparition des effets indésirables [1-3]. L'utilisation des produits naturels devient alors une perspective de recherche et fait l'objet de plusieurs investigations. Dans le cadre de la recherche d'insecticides naturels, le neem figure parmi les plantes les plus utilisées. Le neem (*Azadirachta indica*) est un arbre d'origine Asiatique que l'on trouve souvent dans les régions arides et semi-arides. Au niveau de cette plante, la quantité d'huile et des principaux triterpenoïdes varient périodiquement au cours de l'année [4]. Les amandes de neem sont riches en triterpènes et en huile.

Différents produits sont formulés à partir de l'huile de neem (Neemix, Margosan-O, etc.) et utilisés contre les insectes. Son caractère insecticide a été étudié sur les larves de certains moustiques tels que *Culex* sp. [5], *Anopheles* sp [6], *Aedes aegypti* [7]. La principale matière active est l'azadirachtine. La teneur en matière active est plus élevée dans les graines que dans le reste de la plante [6]. Après pressage des amandes de neem, la totalité de la matière active reste dans les tourteaux alors que l'huile n'en possède qu'une faible teneur. La poudre est généralement utilisée par les jardiniers pour la protection des cultures. Le neem a des caractères antiappétant, répulsif et inhibiteur de la croissance des insectes. Des extraits aqueux de neem ont montré des effets néfastes sur la fertilité, la fécondité et le développement post-embryonnaire de certains diptères [8]. Les travaux de [9] ont montré que l'huile des amandes de neem est plus efficace contre l'oviposition et contre l'émergence des adultes de l'insecte *Callosobruchus maculatus* que la poudre de neem.

En milieu urbain et périurbain, la prolifération des moustiques en particulier celle du *Culex quinquefasciatus* est observée en période hivernale et post-hivernale. L'utilisation des produits de neem (huile et poudre) contre les larves de moustiques pourrait réduire

cette prolifération. Cependant, pour les stades préimaginaux des moustiques, la phase nymphale est plus courte que la phase larvaire. De ce fait, l'efficacité et l'action de ces deux produits peuvent différer selon le stade préimaginal. Il est donc nécessaire de faire une étude comparative de ces deux produits sur les stades préimaginaux des moustiques.

La présente étude consiste à :

- préciser le stade le plus sensible pour chaque produit,
- montrer à quel niveau agissent les deux produits pour chaque stade,
- proposer le produit le plus efficace pour lutter contre la prolifération des moustiques.

2. Matériel et méthodes

2-1. Matériel

2-1-a. Matériel animal

Des œufs du moustique *Culex quinquefasciatus* sont récoltés quotidiennement au niveau des bacs artificiels du département de Biologie Animale. Les œufs sont mis à éclosion dans des bacs contenant de l'eau du robinet. Après éclosion, les larves de première génération sont nourries avec de la poudre de pain en prenant le soin de changer régulièrement l'eau d'élevage. Ainsi, nous avons obtenu successivement des larves de stades L1, L2, L3, L4 et des nymphes.

2-1-b. Matériel végétal

Le matériel végétal nous a été fourni par la SENCHIM, une industrie chimique Sénégalaise.

2-2. Méthodes

2-2-a. Traitement avec l'huile de neem formulée

Pour chaque traitement, nous avons utilisé 11 bocaux de 10 cm de côté et 7 cm de hauteur contenant chacun 500 mL d'eau. Pour les larves, nous avons mis dans chaque bocal 100 larves dont 25 individus pour chaque stade larvaire et de la poudre de pain comme nourriture. Pour les nymphes, le même nombre d'individus est utilisé.

Le volume en huile de neem formulée varie de 0,02 % à 0,038 % avec des pas de 0,002 %.

Nous avons fait des constats de mortalité toutes les 24 h en faisant chaque jour le cumul des mortalités.

2-2-b. Traitement avec la poudre de neem

La quantité de poudre varie de 0,2 % à 2 % avec des pas de 0,2 %. Ces doses sont choisies suite à des tests antérieurs que nous avons effectués au laboratoire.

Le même nombre d'individus est utilisé aussi bien pour les larves que pour les nymphes. Nous avons fait des constats de mortalité toutes les 24 h en faisant chaque jour le cumul des mortalités.

Pour les traitements, la température moyenne pour les traitements était de $26^{\circ}\text{C} \pm 0,55$ et le taux d'humidité moyenne était de $88\% \pm 0,14$.

2-2-c. Analyse statistique

Nous avons effectué deux séries de traitements et les valeurs données représentent la moyenne des deux séries. Les mortalités corrigées sont calculées en appliquant la formule d'Abbott :

$$\% m = (NL M - NLMT) X 100 / (NTL - NLMT) \quad (1)$$

$\% m$ = pourcentage de mortalité

NLM = nombre de larves mortes

NLMT = nombre de larves mortes dans le témoin

NTL = nombre total de larves

Pour les nymphes, nous avons considéré en même temps la mortalité des nymphes et des adultes issus des nymphes traitées. Pour connaître le pourcentage d'adultes envolés, nous avons fait la différence entre le nombre de nymphes traitées et le nombre d'individus morts.

Le pourcentage d'adultes envolés est obtenu en faisant cette différence :

$$\% A.E. = 1 - \% (N.M. + A.M.) \quad (2)$$

$\% A.E.$ = Pourcentage d'adultes envolés

N.M. = Nymphes Mortes

A.M. = Adultes Mortes

Le logiciel Excel est utilisé pour le calcul des moyennes de mortalité pour chaque stade. Pour chaque produit, nous avons utilisé le test *Khi-deux* (X^2) pour voir si l'efficacité des produits entre les larves et les nymphes est significativement différente ou non.

2-2-d. Etude histologique

Après traitement, les larves et nymphes moribondes sont fixées au *carnoy2* pendant 72 h. Les larves sont ensuite soumises successivement à une déshydratation, imprégnation et inclusion. Après confection et la taille des blocs, les coupes de 7 μm d'épaisseur faites au

microtome sont colorées par la méthode du trichome de Masson. Les observations sont faites au microscope photonique Motic relié à un micro-ordinateur où les photos sont enregistrées sous format JPEG.

3. Résultats

3-1. Effets insecticides des produits de neem sur les larves de *C. quinquefasciatus*

3-1-a. Cas de l'huile de neem formulée

Tableau 1 : Pourcentages de mortalités des larves de *Culex quinquefasciatus* traitées avec l'huile de neem formulée 1 %

Jours	Pourcentages en huile de neem formulée (1 %)										Témoin
	0,02	0,022	0,024	0,026	0,028	0,03	0,032	0,034	0,036	0,038	
J1	24,5	27,5	24,5	22	25	16	22	24,5	25	41,5	2
J2	32	43	41	47	40	52	43,5	43	55,5	58,5	3
J3	37,5	51	52,5	60	51	58,5	56	54	67	62	8
J4	43	51,5	54	66,5	56,5	61,5	57,5	58	72	69	8
J5	48,5	54	58,5	74,5	60	67,5	59,5	60	74,5	70,5	9
J6	51	56	62,5	77,5	64,5	68,5	62	61,5	77	74	10
J7	52,5	62,5	67,5	82,5	68,5	71,5	63,5	63,5	80	77,5	11

Le **Tableau 1** montre une mortalité croissante des larves de *Culex quinquefasciatus* au cours du temps. Ce tableau montre des mortalités allant de 52,5 à 80 % sept jours après traitement par rapport au témoin (11 % de mortalité). Cependant, nous n'avons pas obtenu 100 % de mortalité. Une semaine après test, la moyenne des mortalités est de 68,95 %.

3-1-b. Cas de la poudre de neem

Tableau 2 : pourcentages de mortalités des larves de *Culex quinquefasciatus* traitées avec la poudre de neem 0,3 %

jour s	Pourcentages en poudre de neem (0,3 %)										Témoin
	0,2	0,4	0,6	0,8	1	1,2	1,4	1,6	1,8	2	
J1	1,5	4,5	4,5	4,5	8	13,5	13	11	10,5	16	0
J2	5,5	8	16	22,5	27,5	41,5	53	65,5	74,5	74	0
J3	12	30	39,5	51	50	69	69,5	77	86	79	0
J4	37,6	42,7	74,8	64,7	65,7	76,2	78,3	98,4	98,4	96,4	0,5
J5	62,9	68,5	83,7	82,7	94,8	95,4	93,3	100	100	100	1,5
J6	68,8	80	83,8	85,7	95,8	96,4	96,9	100	100	100	2
J7	86,1	87,1	95,8	90,2	96,8	96,8	98,9	100	100	100	2,5

Le **Tableau 2** montre une mortalité croissante des larves de *Culex quinquefasciatus* au cours du temps mais aussi avec les doses (0,2 à 2 %). Les doses létales 50 (1,4 %) et 100 (2,6 %) sont obtenues respectivement en 2 et 5 jours. Une semaine après, la moyenne des mortalités est de 95,17 %.

3-2. Effets insecticides des produits de neem sur les nymphes de *C. quinquefasciatus*

3-2-a. Cas de l'huile de neem formulée

Tableau 3 : pourcentages d'adultes envolés en fonction de la quantité d'huile de après traitement des nymphes de *Culex quinquefasciatus*

Jours	Pourcentages en huile de neem formulée (1 %)										Témoin
	0,02	0,022	0,024	0,026	0,028	0,03	0,032	0,034	0,036	0,038	
J2	0,6	2,2	7,9	14	12,9	8,1	0	0	0	0	84,5

Le **Tableau 3** montre une nette diminution des pourcentages de moustiques adultes envolés (entre 0 et 14 %) en fonction des doses en huile de neem par rapport au témoin (84,5 %). La moyenne des mortalités (m_1) est de 95,43 % par rapport au témoin

(13,5 %). A partir de la dose 0,032 %, aucun adulte ne s'est envolé. La majeure partie des individus traités est morte 2 jours après.

3-2-b. Cas de la poudre de neem

Tableau 4 : pourcentages d'adultes envolés en fonction de la quantité poudre de neem après traitement des nymphes de *Culex quinquefasciatus*

Jours	Pourcentages en poudre de neem (0,3 %)									Témoin	
	0,2	0,4	0,6	0,8	1	1,2	1,4	1,6	1,8		
J2	95,9	87,7	86,6	80,5	81,5	53,7	40,3	20,7	25,8	14,5	97

Le **Tableau 4** montre une diminution des pourcentages de moustiques adultes envolés (entre 14,5 et 95,5 %) en fonction de la teneur en poudre par rapport au témoin (97 %). Cependant cette diminution est plus faible par rapport à l'huile de neem formulée. La moyenne des mortalités (m_2) est de 41,28 % et donc la majeure partie des individus est passée en adulte et s'est envolée.

3-3. Comparaison de l'efficacité de chaque produit sur les deux stades préimaginaux

3-3-a. Avec l'huile de neem formulée

L'application du test *Khi-deux* montre que l'efficacité de l'huile de neem formulée sur les larves et les nymphes n'est pas significativement différente ($ddl = 9$; $\alpha = 5\%$; X^2 tabulé = 3,325 ; X^2 calculé = 1,133).

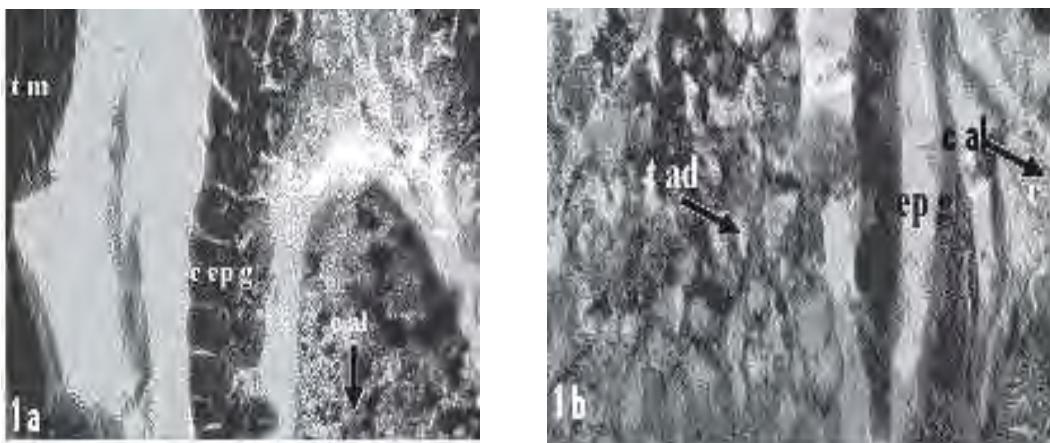
3-3-b. Avec la poudre de neem

L'application du test *Khi-deux* montre que l'efficacité de la poudre de neem sur les larves et les nymphes est significativement différente ($ddl = 9$; $\alpha = 5\%$; X^2 tabulé = 3,325 ; X^2 calculé = 8,59).

3-4. Etude histologique des larves et nymphes traitées aux produits de nem

3-4-a. Sur les larves

* Larves non traitées



Figures 1a & 1b : Coupes histologiques des larves de *Culex quinquefasciatus* non traitées (témoin) ($G= 400$)

La coupe longitudinale passant au niveau du thorax des larves de *Culex quinquefasciatus* non traitées montre la présence de tissus intacts (tissu adipeux (t ad), tissu musculaire (t m). La colonne alimentaire (c al) est présente et est entourée par les cellules épithéliales gastriques (c ep g).

* Larves traitées avec l'huile de neem formulée



Figure 1c : Coupe histologique d'une larve de *Culex quinquefasciatus* traitée à l'huile de neem formulée ($G= x 400$)

La coupe longitudinale au niveau antérieure des larves de *Culex quinquefasciatus* traitées à l'huile de neem formulée (1c) montre, des cellules épithéliales gastriques détruites (c ep g d) envahissant la lumière du caecum, une colonne alimentaire désorganisé (c al d) et un tissu adipeux absent par rapport au témoin (**Figures 1a et 1b**).

* Larves traitées avec la poudre de neem



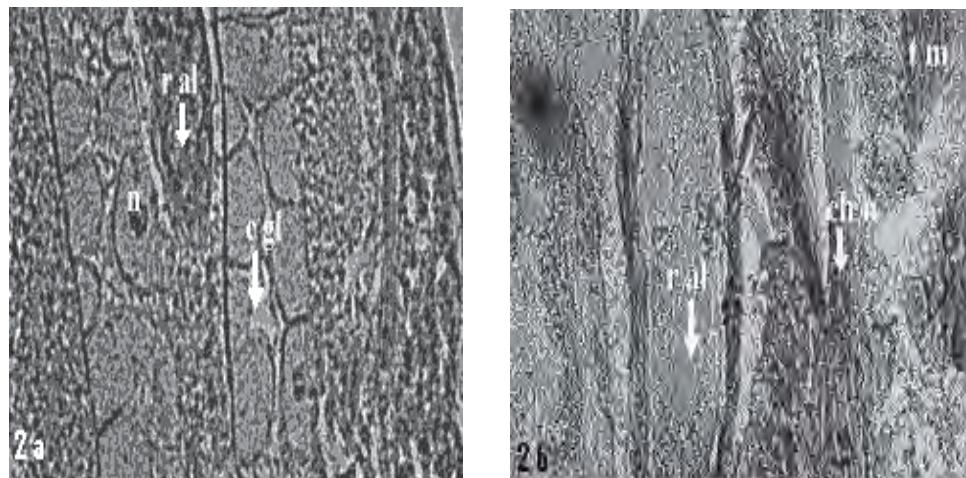
Figure 1d : Coupe histologique d'une larve de *Culex quinquefasciatus* traitée à la poudre de neem ($G = x 400$)

La coupe longitudinale au niveau antérieure des larves de *Culex quinquefasciatus* traitées à la poudre de neem montre une destruction des cellules épithéliales gastriques (c ep g) et une désorganisation de la colonne alimentaire (c al d). Cependant, la désorganisation des cellules gastriques est moins importante par rapport à celle des larves traitées à l'huile.

3-4-b. Sur les nymphes

* Nymphes non traitées (témoin)

Sur les **Figures 2a et 2b**, nous pouvons noter la présence des cellules glandulaires (c gl), de la chaîne nerveuse (ch n), du tissu musculaire (t m) et des réserves alimentaires (r al) en bon état.



Figures 2a et 2b : Coupes histologiques des nymphes de *Culex quinquefasciatus* non traitées (témoin) ($G = x 400$)

* Nymphes traitées avec l'huile de neem formulée



Figure 2c : Coupe histologique d'une nymphe de *Culex quinquefasciatus* traitée à l'huile de neem formulée ($G = x 400$).

Sur cette **Figure 2c**, nous pouvons noter que les organes observés à savoir les cellules glandulaires (c gl), la chaîne nerveuse (ch n), le tissu musculaire (t m), le tissu adipeux (t ad) et les réserves alimentaires (r al). Cependant, nous pouvons noter un début de dégradation des structures par rapport au témoin (**Figures 2a et 2b**).-

* Nymphes traitées avec la poudre de neem

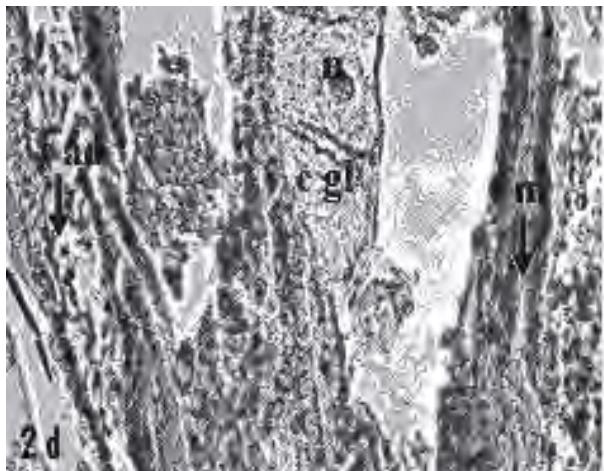


Figure 2d : Coupe histologique d'une nymphe de *Culex quinquefasciatus* traitée à la poudre de neem ($G=400$)

Sur la **Figure 2d**, nous pouvons noter la présence du tissu adipeux (t ad), des cellules glandulaires (c gl) avec leur noyau (n) et du tissu musculaire (t m). Cependant, nous pouvons noter un début de dégradation des structures par rapport au témoin (**Figures 2a et 2b**)

4. Discussion

De nombreux travaux ont montré l'efficacité de l'huile de neem sur les insectes [5-7,10]. Cependant, il faut noter qu'en plus de l'action de la matière active, l'huile de neem pure tue les larves de moustique par asphyxie en les empêchant de respirer à la surface de l'eau.

La formulation de l'huile de neem pure en y ajoutant des sulfactants lui permet d'être miscible avec l'eau. Les travaux de [11] ont montré une mortalité de 51,6 % des larves de *Culex quinquefasciatus* en un jour avec 5 % d'huile de neem émulsionnable. Avec l'huile de neem formulée 1 %, nous avons obtenu pour une dose de 0,03 % (soit 3 mg/L en azadirachtine) 50 % de mortalité en 2 jours (**Tableau 1**).

Selon [12], la moitié de la durée de vie de l'azadirachtine est de 282 h à 25°C et celle-ci décroît si la température augmente. Nous avons effectué nos travaux dans des conditions de température comprises entre 24 et 28,5°C durant 7 jours.

Les résultats montrent l'effet toxique des produits de neem sur le développement des

larves et nymphes de moustique. Cependant, l'huile et la poudre ne se comportent pas de la même manière. L'huile de neem formulée est aussi efficace contre les larves que contre les nymphes. Ce qui n'est pas le cas pour la poudre de neem. En effet, la matière active (azadirachtine) qui se trouve dans la poudre (solide) est libérée lentement dans l'eau alors que la formulation de l'huile facilite la libération et la diffusion de la matière active. Les fortes mortalités des larves observées (100 %) avec l'application de la poudre de neem (**Tableau 2**) sont dues au fait que les doses choisies sont plus fortes que celles de l'huile de neem formulées. Au bout de 2 jours, la majeure partie de la matière active est passée du solide (poudre) vers le liquide (eau). La durée des quatre stades larvaires (L1, L2, L3 et L4) étant plus longue, la matière active peut donc agir avant que les larves ne puissent passer en nymphes.

Les travaux de [13] ont montré que l'application de la poudre de neem à 500 kg/ha ou 50 g/m² a entraîné une mortalité des larves de *Culex quinquefasciatus* à 90 % dans des champs de riz. Considérant nos bocaux ayant une surface de 0,01 m² (10 X 10 cm), nous pouvons faire une correspondance de cette dose qui serait à 0,5 g pour 0,01 m². Dans nos travaux, cette dose correspond à celle ayant donné une mortalité située entre 87 et 95 % en 7 jours. Cette similitude montre bien l'efficacité de la poudre de neem sur les larves de moustiques aussi bien au laboratoire qu'en milieu ambiant.

Le stade nymphal des moustiques dure entre 2 et 3 jours, ce qui fait que les nymphes traitées avec la poudre de neem auront le temps de passer en adulte et de s'envoler avant que le produit n'agisse. Avec l'huile, la mortalité des individus (nymphes et adultes émergés) est plus importante ($m_1 = 95,43\%$) qu'avec la poudre de neem ($m_2 = 42,28\%$). En effet, lors de nos travaux, nous avons constaté que certaines nymphes traitées à l'huile de neem formulée sont mortes avant la nymphose, d'autres au moment de la nymphose (effet contact). Nous avons pu constater que certains adultes issus des nymphes traitées à l'huile de neem n'ont pas pu s'envoler. Ce qui serait du à la nature huileuse qui empêche les moustiques de s'envoler après émergence.

Avec la poudre de neem, la mortalité des nymphes est observée pratiquement au moment de la nymphose (effet contact du produit). Sur le plan physiologique, les nymphes ne se nourrissent pas mais utilisent des réserves nutritives du stade larvaire. Chez les larves, les produits appliqués agissent après ingestion (destruction des cellules gastriques) et par effet contact, alors que chez les nymphes, seul l'effet contact se manifeste. En effet, puisque les nymphes ne se nourrissent pas, les produits ne peuvent donc pas être ingérés. Contrairement aux larves qui en s'alimentant ingèrent en même temps le produit appliqué. Le mode d'action de ces produits sur les cellules gastriques est identique à celui décrit par [14]. L'application de la poudre de neem ne peut empêcher aux nymphes d'évoluer en adulte que si la dose est forte. L'utilisation de l'huile de neem formulée en milieu aquatique est donc plus sûre pour empêcher la

prolifération des moustiques. Néanmoins, la poudre reste toujours efficace contre les larves du moustique *Culex quinquefasciatus*. L'huile de neem formulée et la poudre de neem agissent de la même manière au niveau des larves (destruction des cellules gastriques) mais différemment au niveau des nymphes (effets contacts au moment et après la nymphose).

5. Conclusion

Les résultats de notre étude nous ont permis de dire que l'huile de neem formulée est aussi efficace sur les larves que sur les nymphes. La poudre par contre n'est efficace que sur les larves.

L'huile de neem formulée et la poudre de neem agissent par voie intestinale et par contact sur les larves, alors qu'elles n'agissent que par contact sur les nymphes.

A l'issue de cette étude, nous pouvons dire que l'huile de neem formulée est plus efficace que la poudre de neem sur les stades préimaginaux des moustiques.

Références

- [1] - M.D. FERRANDO., E. SANCHOA., E ANDREU-MOLINER, "Chronic toxicity of fenitrothion to an algae (*Nannochloris oculata*), a rotifer (*Brachionus calyciflorus*), and the cladoceran (*Daphnia magna*)". Ecotoxicology Environment Safety, 35 (2) (1996) 112-120
- [2] - F NUWAHA, "The challenge of chloroquine-resistant malaria in sub-Saharan Afric", Health policy and planning, 16 (1) (2001) 1-12
- [3] - Y.L KONAN., A.A KOFFI., J.M.C DOANNIO., et F. DARRIET, "Résistance de *Culex quinquefasciatus* (SAY, 1823) à la Deltaméthrine et l'utilisation de la moustiquaire imprégnée en milieu urbain de Bouaké", Bull. soc. pathol. Exot., 96 (2) (2003) 128-129
- [4] - S JOHNSON, E. D. MORGAN et N. P. COLIN, "Development of the major triterpenoids and oil in the fruit and seed of neem (*Azadirachta indica*)", Annals of Botany, 78 (1996) 383-388
- [5] - M. SCOTT, et N.K. KAUSHIK, "The toxicity of a neem insecticide to populations of culicidae and other aquatic invertebrates as assessed in situ microcosms", archives of environment Contamination and Toxicology, 39 (3) (2000) 329-336
- [6] - B.L. ALIERO, "Larvaecidal effects of aqueous extracts of *Azadirachta indica* (neem) on the larvae of *Anopheles* mosquito", African Journal of biotechnology, 2 (9) (2003) 325-327

- [7] - B. CAROLINA, WANDSCHEER, E. JONNY, DUQUE, M.A.N. DA SILVA, F YOSHIYAS., J. L. WOHLKE, J ADELMANN. and J. D FONTANA, "Larvaecidal action of ethanolic extract from fruit endocarps of *Melia azedarach* and *Azadirachta indica* against the dengue mosquito *Aedes aegypti*", *Toxicon*, 44 (8) (2004) 829-835
- [8] - S. SHIVENDRA., "Effects of aqueous extract of neem seed Kernel and azadirachtin on the fecundity, fertility and post-embryonic development of the melonfly, *Bactrocera cucurbitae* and the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae)", *Journal of Applicata. Entomology*, 127 (2003) p. 540
- [9] - N.E.S.A LALE, "Evaluation of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) seed oil obtained by different methods and neem powder for the management of *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae) in stored cowpea", *Journal of Stored Products Research*, 35 (2) (1999) 135-143
- [10] - B.S. ATTRI et G.R PRASAD, "Neem oil extractive and effective mosquito larvicide", *Indian Journal Entomology*, 42 (1980) 371-374
- [11] - C.P. BATRA, P.K MITTAL, T. ADAK., V.P SHARMA, "Efficacy of neem oil-water emulsion against mosquito immatures", *Indian Journal Malaria*, 35 (1) (1998) 15-21
- [12] - S.Y. SZETO et M.T WAN, "Hydrolysis of Azadirachtin in buffered and natural waters", *Journal Agriculture Food Chemistry*, 44 (1996) 1160-1163
- [13] - D.R RAO, R REUBEN, M.S VENUGOPAL, B.A NAGASAMPAGI, H. SCHMUTTERER "Evaluation of neem, *Azadirachta indica*, with and without water management, for the control of culicine mosquito larvae in rice-fields", *Med. Vet. Entomology*, 6 (4) (1992) 318-24
- [14] - HK Koua, SH Han, M.A. d'Almeida. "Histopathology of *Anopheles gambiae* s.l. Giles, 1902 (Diptera, Culicidae) subjected to the larvicidal activity of the aqueous extract of *Persea americana* Miller, 1768 (Lauraceae)". *Bull Soc Pathol. Exot.*; 91 (3) (1998) 252-256

STUDII DE PARAZITOLOGIE / ENTOMOLOGIE

Compatibilité entre *Aspergillus clavatus* (Hyphomycetes) et l'huile de neem (*Azadirachta indica*) contre le moustique vecteur de filarioses *Culex quinquefasciatus* (Say, 1823) (Diptera : Culicidae)

F. Seye, M. Ndiaye

Laboratoire de Biologie de la Reproduction, Département de Biologie Animale, Faculté des Sciences et Techniques, Université Cheikh Anta Diop de Dakar, Sénégal.

Résumé

Certaines espèces de champignon appartenant au genre *Aspergillus* ont montré leur effet larvicide sur les moustiques. Cependant, leur action sur les adultes n'a pas été montrée. Dans nos travaux, nous avons formulé des spores de *Aspergillus clavatus* (Hyphomycetes) par une huile de neem émulsionnable (Suneem 1%). Dans les conditions du laboratoire, l'application de la formulation Suneem + champignon (S+A) et du Suneem (S) a été effectuée avec une dose de 40 ml/m² sur des adultes de *Culex quinquefasciatus*. Les résultats ont montré que les mortalités cumulées ont été plus fortes avec la formulation qu'avec le Suneem ($p=0,06$) ou le témoin ($P=0,008$). Les mortalités moyennes en 5 jours ont été de $86 \pm 1,7\%$ et $29 \pm 1,14\%$ pour respectivement S+A et S comparées au témoin ($3 \pm 1,1\%$). Par ailleurs, les résultats ont montré que les mortalités sont plus fortes chez les mâles ($54 \pm 1,3\%$ et $19 \pm 1,1\%$) que chez les femelles ($32 \pm 1,1\%$ et $10 \pm 0,3\%$) pour respectivement S+A et S. L'infection des adultes traités avec la formulation S+A a été montrée par une forte germination du champignon. Nos travaux montrent donc que le Suneem facilite non seulement l'adhésion des spores sur les adultes de *Cx quinquefasciatus*, mais agit comme adulticide. Il apparait ainsi une possibilité de synergie entre le Suneem et le champignon *A. clavatus* contre les moustiques. L'effet synergique de ces deux produits sur des larves et des adultes de différentes espèces de moustiques mérite donc d'être étudier.

Mots clefs : *Aspergillus clavatus*, *Azadirachta indica*, *Culex quinquefasciatus*, lutte biologique

Introduction

En Afrique, certaines espèces de moustique appartenant aux genres *Anopheles*, *Aedes* et *Culex* sont responsables de la transmission de parasites responsables de maladies (malaria, fièvre jaune, filarioses etc.). Dans la lutte contre les moustiques vecteurs, des études ont montré l'efficacité de produits de neem (13, 15, 22, 23) et de champignons (9, 18, 19, 20, 24). Certaines espèces de champignons appartenant au genre *Aspergillus* sont connues pour leur effet pathogène contre les larves de moustiques (*Aspergillus parasiticus* (5), *A. flavus* et *A. parasiticus*, (9)). Cependant, l'application des spores de champignon contre les moustiques adultes nécessite une formulation pour permettre l'adhésion et la pénétration par la cuticule. Selon Bradley et Britton (1995), les spores de champignons tels que *Beauveria bassiana* et d'autres espèces entomopathogènes (*M. anisopliae* et *Beauveriae bassiana*) a été montrée (7). Par contre, la compatibilité entre l'huile de neem et certaines espèces appartenant au genre *Aspergillus* telle que *Aspergillus clavatus* n'a pas été montré.

d'applications des mycètes utilisant l'eau, les suspensions détersives, ou les poudres mouillables, emploient les argiles comme aides de suspension ou poudre sèche. Cependant, dans des suspensions en eau, les spores peuvent germer et perdre leur infectiosité après seulement vingt-quatre heures (4). Actuellement, seules certaines espèces de champignons telles que *Metarrizum anisopliae* (3, 6, 10) et *Beauveriae bassiana* (7) sont utilisées dans des formulations huileuses. La compatibilité entre l'huile de neem et certains champignons entomopathogènes (*M. anisopliae* et *Beauveriae bassiana*) a été montrée (7). Par contre, la compatibilité entre l'huile de neem et certaines espèces appartenant au genre *Aspergillus* telle que *Aspergillus clavatus* n'a pas été montré.

Notre étude consiste à montrer la compatibilité entre *A. clavatus* et une huile de neem émulsionnable (Suneem 1%) contre des adultes males et femelles de moustique vecteur de filariose *Culex quinquefasciatus*.

Matériel et méthodes

Huile de neem (Suneem 1%)

Le Suneem 1% est formulée par une industrie chimique Sénégalaise (SENCHIM). C'est une formulation émulsionnable obtenue à partir de l'huile de neem pure enrichie en matière active (m.a.) (Azadirachtine).

Le champignon

Des échantillons du champignon *A. clavatus* isolé à l'Université Cheikh Anta Diop de Dakar et identifié au laboratoire ont été conservés au réfrigérateur. Après culture sur farine de blé stérilisée à 120°C pendant 10 mn, les spores sont récupérées et conservées au froid. La teneur en spores (nombre de spores par gramme) a été effectuée sur lame hématométrique.

Les moustiques

Des larves de *Culex quinquefasciatus* ont été récoltées au niveau des bacs du Département de Biologie Animale (Université Cheikh Anta Diop de Dakar, Sénégal). Elles sont élevées dans des bocaux de dimension 10 x 10 x 7 cm à une humidité relative de 70 à 85% et une température moyenne de 26°C. Elles ont été nourries avec de la chapelure de pain. Après émergence des adultes dans des cages de dimension 50 x 50 cm, nous avons séparé les femelles des males dans deux cages. Tous les adultes ont été nourris avec une solution de sucre 6% pendant 48 h avant les tests.

Préparation du produit

Dans un Erlenmeyer de 250 ml contenant 100 ml de Suneem 1%, nous avons versé une quantité de 1 g de spores sèches ($79 \cdot 10^9$ spores). Le tout est placé sur un agitateur pendant 2h pour avoir un produit mixte S+A ($79 \cdot 10^7$ spores/ml et 10 mg m.a./ml).

Pour la solution de pulvérisation nous avons dilué 10 ml de cette solution S+A par 90 ml d'eau distillée dans un tube de 250 ml. La teneur de cette solution est donc $7,9 \cdot 10^7$ spores/ml + 1 mg de m.a./ml.

Test sur les moustiques:

Trois séries de traitements ont été faites pour la même dose. Pour chaque série, nous avons utilisé 3 cages cubiques (50 x 50 cm). Dans chaque cage, nous avons mis 50 males et 50 femelles de *Culex quinquefasciatus*. Nous avons

pulvérisé la formulation du champignon et l'huile de neem à une dose de 40 ml/m² respectivement dans les deux premières cages, la troisième ayant servi de témoin (pas de pulvérisation). Nous avons choisi cette dose en spores en nous référant sur la gamme de doses choisies par Scholte *et al.*, 2003 (18). Les tests avec l'huile de neem formulée (Suneem) sont réalisés pour voir son effet sur les adultes.

La pulvérisation a été faite à travers les mailles de la toile moustiquaire. Les moustiques seront donc infectés directement au moment de la pulvérisation ou au moment du repos sur la toile moustiquaire. Les constats de mortalité et du nombre de survie (mâle et femelle) sont effectués toutes les 24h (pendant 5 jours). Ces deux constats sont faits pour vérifier l'effectif total (50 males et 50 femelles). Pour vérifier l'infection des adultes par le champignon, les moustiques morts sont placés dans des boîtes de Pétri avec papier filtre imbiber d'eau distillée. Les observations ont été effectuées à la loupe 7 jours après incubation.

Analyse des données

Les pourcentages de survie male et femelle sont utilisées pour l'analyse de survie avec le logiciel Statview. Les mortalités sont corrigées avec la formule d'Abbott (1). Les mortalités cumulées des adultes traités avec la formulation S+A et S sont utilisées pour effectuer le test t de Student.

Résultats

Tout juste après pulvérisation des deux produits S+A et S sur les moustiques adultes, nous avons constaté une chute rapide d'environ 90% des adultes. Quelques minutes après (30 mn), presque 95% avaient repris leur vol et se trouvaient sur les parois de la cage. Vingt quatre heures après pulvérisation, nous avons commencé à constater les mortalités. Les résultats ont montré que les courbes de régression de survie des adultes traités aux deux produits sont plus basses chez les males que chez les femelles (Figure 1). Cependant, les mortalités cumulées (Figure 2) ont été plus importantes avec la formulation (S+A) qu'avec le Suneem seul (S) ($p=0,06$) ou le témoin ($P=0,008$). L'incubation des adultes morts pendant 7 jours sur papier filtre humide montre une forte germination (>95%) du champignon *A. clavatus* (Figure 3). Par contre, aucune germination n'a été observée sur les adultes non traités au champignon.

Tableau 1 - Pourcentage de mortalités cumulées des adultes males et femelles de *Culex quinquefasciatus* traités au S+A ou S (A= *Aspergillus clavatus*, S= Suneem, T= Témoin).

Jours	S+A			S			T
	Male	Femelle	Total	Male	Femelle	Total	
J1	15 ± 0,7	5 ± 0,4	20 ± 0,11	11 ± 0,1	6,5 ± 1,5	17,5 ± 1,6	0 ± 0,0
J2	25,5 ± 1,3	18 ± 0,01	43,5 ± 1,3	12 ± 0,5	6,5 ± 0,4	18,5 ± 0,9	1,5 ± 0,4
J3	39 ± 0,2	28,5 ± 0,1	67,5 ± 0,3	17 ± 0,4	8 ± 1,3	25 ± 1,7	2,5 ± 0,3
J4	46 ± 0,7	34 ± 0,6	80 ± 1,3	17 ± 0,4	8 ± 0,09	25 ± 0,5	2,5 ± 1,2
J5	54 ± 1,3	32 ± 0,4	86 ± 1,7	19 ± 1,1	10 ± 0,3	29 ± 1,14	3 ± 1,1

Figure 1 - Pourcentage de survie des adultes de *Culex quinquefasciatus* traités aux produits S+A ou S.

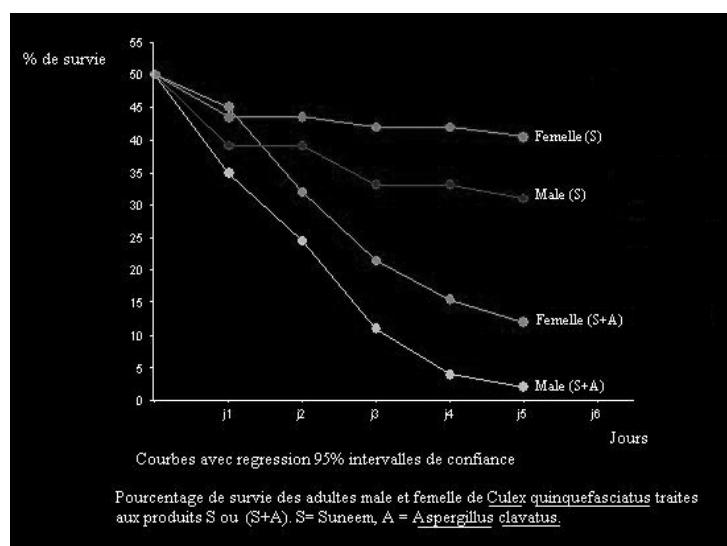


Figure 2 - Pourcentage de mortalités cumulées des adultes de *Culex quinquefasciatus* traités aux produits S+A ou S.

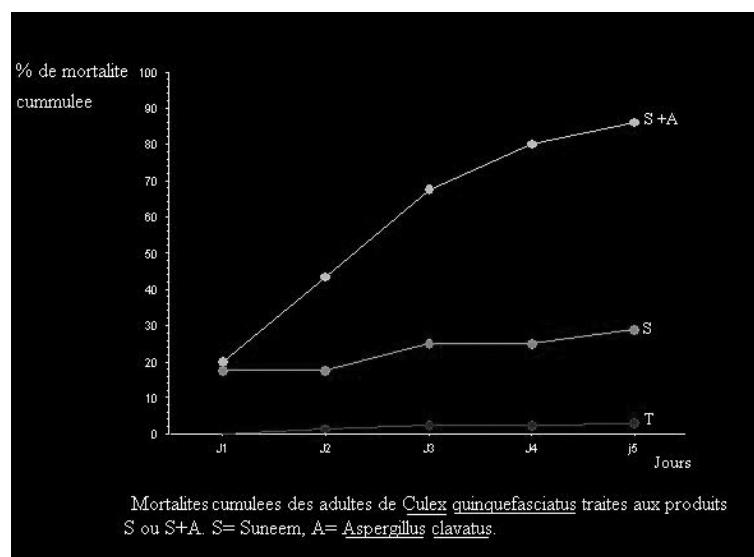


Figure 3 - *Culex quinquefasciatus* mâle non infecté et infecté par *Aspergillus clavatus* 7 jours après incubation. Ab. = Abdomen, Ai= Aile, An. = Antenne, T. = Tête, Th. = Thorax.



Discussion

Selon Kirschbaum (1985) (11), les champignons pathogènes aux insectes et leurs dérivés peuvent être une approche prometteuse pour la lutte biologique contre les moustiques. Plusieurs espèces de champignons appartenant au genre *Aspergillus* telles que *Aspergillus parasiticus*, *A. flavus* ont montré leur effet pathogène contre les larves de moustique. Cependant, l'effet pathogène d'une espèce de champignon appartenant au genre *Aspergillus* n'a pas été montré sur les moustiques adultes.

Dans nos travaux, l'utilisation de *Aspergillus clavatus* formulé avec une huile émulsionnable (Suneem) a montré un effet adulticide contre *Culex quinquefasciatus*. Cependant, les mortalités diffèrent selon le sexe du moustique adulte. Comparés aux travaux de Scholte *et al.* 2003 (18), *A. clavatus* a les mêmes effets que *Metarhizium anisopliae* contre les adultes de *Cx quinquefasciatus*. En effet, nos résultats ont montré que 5 jours après application de la formulation de *A. clavatus*, les mortalités observées chez les adultes mâles sont plus importantes ($54 \pm 1,3\%$) que celles observées chez les femelles ($32 \pm 1,1\%$). Cependant, Scholte *et al.* 2003 (18) ont obtenu avec *M. anisopliae* un TL₅₀ de 5 jours chez les adultes avec $1,6 \times 10^{10}$ spores/m² alors que nous avons obtenu avec *A. clavatus* une mortalité de $86,5 \pm 0,71\%$ pour une dose de $3,16 \times 10^9$ spores/m². Cette différence de mortalité pourrait être expliquée par la sensibilité de *Cx quinquefasciatus* par rapport aux deux espèces de champignon ou par l'huile de formulation du champignon. En effet, Scholte *et al.* 2003 (18) ont utilisé l'huile de tournesol, alors

que dans nos travaux nous avons utilisé le Suneem contre la même espèce de moustique. Par ailleurs, des travaux ont montré que le Suneem a un effet larvicide sur *Anopheles gambiae* (14). Des travaux ont montré que les produits de neem ont un effet de blocage sur l'oogenèse du moustique *Anopheles stephensi* (12) et un effet répulsif (16, 21). L'utilisation du Suneem expliquerait donc les fortes mortalités que nous avons obtenues en 5 jours ($86,5 \pm 0,71\%$) avec une dose de $3,16 \times 10^9$ spores/m². Néanmoins, cette mortalité obtenue sur *Cx quinquefasciatus* est proche de celle trouvée par Scholte *et al.*, 2007 (20) sur *Aedes aegypti* ($87,1 \pm 2,67\%$) et sur *Aedes albopictus* ($89,3 \pm 2,2\%$) avec l'utilisation du *M. anisopliae* mais à une dose plus forte que la notre ($1,6 \times 10^{10}$ spores/m²). Dans leurs travaux, ils ont aussi montré une différence de sensibilité entre les males et les femelles vis-à-vis du champignon.

Les fortes mortalités observées avec le champignon formulé pourraient donc être expliquées par un effet de synergie entre *A. clavatus* et l'azadirachtine contenue dans l'huile de neem. La germination du champignon sur les adultes montre la compatibilité entre le Suneem et *A. clavatus*. Des études ont montré des cas de synergisme entre différents biopesticides contre les moustiques (8). Cela montre donc la possibilité de combiner différents biopesticides compatibles pouvant agir en synergie. Cette nouvelle approche pourrait être une alternative à l'utilisation de certains insecticides chimiques pour une lutte efficace contre les moustiques vecteurs.

Nos travaux ont montré la compatibilité de l'huile de neem (Suneem) avec *A. clavatus*, leur action adulticide sur *Cx. quinquefasciatus* et une possibilité de synergisme. Cependant, l'azadirachtine contenue dans l'huile de neem est sensible aux

rayonnements ultraviolets et a une durée de vie déterminée (17). Selon Bradley et Britton (1995) (4), les spores sont mieux protégées par les formulations huileuses contre les rayons ultraviolets mais avec une durée de vie de 40 jours. Nos travaux n'ont pas montré la durée de la compatibilité entre *A. clavatus*

et le Suneem. Il est donc nécessaire d'étudier d'une part l'effet synergique et la durée de la compatibilité entre l'huile de neem formulée et *Aspergillus clavatus*; et d'autre part l'effet de cette formulation sur les larves et adultes d'autres espèces de moustique vecteurs de parasites.

Références bibliographiques

1. Abbott, WS. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.* 1925, **18**: 265-267.
2. Batta YA. Production and testing of novel formulations of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Metschinkoff) Sorokin (Deuteromycotina: Hyphomycetes). *Crop Protection*, 2003, **22**: 415-422.
3. Bateman RP., Carey M. et al. The enhanced infectivity of *Metarhizium flavoviride* in oil formulations to desert locusts at low humidities. *Annals of Applied Biology* 1993, **122**: 145-152.
4. Bradley CA., Britton JH. Formulations of entomopathogenic fungi for use as biological insecticides. World International Property Organisation, 1995. No wo//010597
5. Hati AK, Ghosh SM. *Aspergillus parasiticus* infection in adult mosquitoes. *Bulletin of the Calcutta School of Tropical Medicine*, 1965, **13**: 18-19.
6. Hernandez-Velazquez V. M., Berlanga-Padilla A. M. and Barrientos-Lozano L. (2000). Vegetable and mineral oil formulation of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* to control the central locust (*Schistocerca piceifrons* Walker) (Orthoptera: Acrididae). *Journal of Orthoptera Research*. **9**: 223-227.
7. Hirose E., Neves P. M. O. J., Zequi J. A. C., Martins L. H., Peralta C. H. and Moino Jr. A. (2001). Effect of Biofertilizers and Neem Oil on the Entomopathogenic Fungi *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. and *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. **44**: 419-423.
8. George S., Vincent S. Comparative efficacy of *Annona squamosa* Linn. and *Pongamia glabra* Vent. to *Azadirachta indica* A. Juss against mosquitoes. *J. Vect. Borne Dis.*, 2005, **42**: 159-163.
9. Govindarajan M., Jebanesan A., Reetha D. Larvicidal effect of extracellular secondary metabolites of different fungi against the mosquito, *Culex quinquefasciatus* Say. *Tropical Biomedicine*, 2005, **22**: 1-3.
10. Kaaya GP., Hassan S. Entomogenous fungi as promising biopesticides for tick control. *Experimental and Applied Acarology*, 2000, **24**: 913-926.
11. Kirschbaum, JB. Potential implication of genetic engineering and other biotechnologies to insect control. *Annual Review of Entomology*, 1985, **30**: 51-70.
12. Lucantoni L., Giusti F. et al. Effects of a neem extract on blood feeding, oviposition and oocyte ultrastructure in *Anopheles stephensi* Liston (Diptera: Culicidae). *Tissue and cell* 2006, **38**: 361-71.
13. Ndione RD., Seye F., Ndiaye M. Effets histopathologiques des produits de neem (*Azadirachta indica*, A. JUSS) sur les larves de *Culex quinquefasciatus* (Say, 1823) (Diptera : Culicidae), *Dakar Médical*, 2005, **51**: 107-112.
14. Ndione R. D., Faye O et al. Toxic effects of neem products (*Azadirachta indica* A. Juss) on *Aedes aegypti* Linnaeus 1762 larvae, *African Journal of Biotechnology*, 2007, **6**: 2846-2854.
15. Okumu FO., Knols BGJ., Fillinger U. Larvicidal effects of a neem (*Azadirachta indica*) oil formulation on the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Malaria Journal* 2007, **6**: 63.
16. Ravindran J., Eapen A., Kar I. Evaluation of repellent action of neem oil against the filarial vector, *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Indian J. Malariol*, 2002, **39**: 13-17.
17. Scott M. et Kaushik NK. The toxicity of a neem insecticide to populations of culicidae and other aquatic invertebrates as assessed in situ microcosms. *Archives of environment Contamination and Toxicol.*, 2000, **39**: 329-336.
18. Scholte E-J, Njiru BN., et al Infection of malaria (*Anopheles gambiae* s.s. and filariasis (*Culex quinquefasciatus*) vectors with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Malaria Journal*, 2003, **2**: 29.
19. Scholte E-J, Knols BGJ, Takken W. Autodissemination of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* amongst adults of the malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. *Malaria Journal*, 2004, **3**: 45.
20. Scholte E-J., Takken W., Knols BGJ. Infection of adult *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* mosquitoes with the entomopathogenic

- fungus *Metarhizium anisopliae*. *Acta Tropica*, 2007, **102**: 151-158.
21. **Sharma SK., Dua VK., Sharma VP.** Field studies on the mosquito repellent action of neem oil. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.*, 1995, **26**: 180-2.
22. **Seye F., Ndione RD., Ndiaye M.** Etude comparative de deux produits de neem (Huile et poudre) sur les stades préimaginaux du moustique *Culex quinquefasciatus* (Diptera : Culicidae). Afrique SCIENCE, 2006, 02 p : 212-225.
23. **Seye F., Ndione RD., Ndiaye M.** Effets larvicides des produits de neem (huile de neem pure et Neemix) comparés à deux insecticides chimiques de synthèse (la Deltaméthrine et le Fénitrothion) sur les larves du moustique *Culex quinquefasciatus* (Diptera : Culicidae) ; *Journal des Sciences et Technologies*, 2006, **1** (4): 27-36.
24. **Su X., Zou F. Et al.** A report on a mosquito-killing fungus, *Pythium carolinianum*. *Fungal Diversity*, 2001, **7**: 129-133.

Rezumat

Unele specii de ciuperci din genul *Aspergillus* și-au arătat efectul larvicid asupra țânțarilor. Totuși, acțiunea lor asupra adulților nu a fost demonstrată. În studiul nostru am folosit spori de *Aspergillus clavatus* (*Hymomycetes*) în ulei de neem emulsionabil (Suneem 1%). În laborator, aplicarea formulării Suneem + ciuperca (S+A) și Suneem (S) s-a făcut în doză de 40 ml/m² pe adulți de *Culex quinquefasciatus*. Rezultatele au arătat că mortalitățile cumulate au fost mai mari cu formularea combinată decât cu Suneem ($p=0,06$) sau martor ($P=0,008$). Mortalitățile medii după 5 zile au fost de $86 \pm 1,7\%$ și respectiv $29 \pm 1,14\%$ pentru S+A și respectiv S, comparate cu martorul ($3 \pm 1,1\%$). În plus, rezultatele au arătat că mortalitățile sunt mai ridicate în rândul masculilor ($54 \pm 1,3\%$ și $19 \pm 1,1\%$) decât al femeelor ($32 \pm 1,1\%$ și $10 \pm 0,3\%$) pentru S+A și respectiv S. Infecția adulților tratați cu formula S+A a fost demonstrată printr-o intensă germinare a ciupercii. Studiul nostru arată deci că Suneem nu facilitează doar adeziunea sporilor la adulții de *Cx quinquefasciatus*, ci acționează și ca adulticid. Există posibilitatea unei sinergii între Suneem și ciuperca *A. clavatus* în acțiunea împotriva țânțarilor. Efectul sinergic al acestor două produse asupra larvelor și a adulților din diferite specii de țânțari merită deci să fie studiat.

Cuvinte cheie: *Aspergillus clavatus*, *Azadirachta indica*, *Culex quinquefasciatus*, luptă biologică.



Pathogenicity of the fungus, *Aspergillus clavatus*, isolated from the locust, *Oedaleus senegalensis*, against larvae of the mosquitoes *Aedes aegypti*, *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus*

Fawrou Seye^{1,a}, Oumar Faye^{2,b}, Mady Ndiaye^{1,c}, Ebrima Njie^{3,d} and José Marie Afoutou^{2,e}

¹ U.E.R.B.V., Laboratory of Reproduction Biology, Animal Biology Department, Faculty of Sciences and Techniques, Cheikh Anta Diop University of Dakar, Senegal. P.O. Box: 5005, Dakar Fann, Senegal

² Laboratoire d'Histologie, Embryologie et Cytogénétique, Faculté de Médecine, Pharmacie et d'Odontostomatologie, Université Cheikh Anta Diop de Dakar

³ Department of Agriculture and Biological Sciences P.O. Box: 3530 Gambia, University of the Gambia

Abstract

The use of insect pathogenic fungi is a promising alternative to chemical control against mosquitoes. Among the Hyphomycetes isolated from insects for mosquito control, the genus *Aspergillus* remains the least studied. In September 2005, four fungi were isolated from the Senegalese locust, *Oedaleus senegalensis* Kraus (Orthoptera: Acrididae), collected in Dakar, Senegal. One of these fungi, identified as *Aspergillus clavatus*, Desmazières (Eurotiales: Trichocomaceae) was highly pathogenic against larvae of the mosquitoes *Aedes aegypti* L., *Anopheles gambiae* s.l. Giles and *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). An application of 1.2 mg/ml dry conidia yielded 100% mortality after 24 hours against both *Ae. aegypti* and *Cx. quinquefasciatus* while with *An. gambiae* it was 95%. With unidentified species in the genus *Aspergillus*, mortality after 24 h was <5% against all the larval species. Application of *A. clavatus* produced in a wheat powder medium using doses ranging between 4.3 to 21×10⁷ spores/ml, caused 11 to 68% mortality against *Cx. quinquefasciatus* at 24h, and 37 to 100% against *Ae. aegypti*. Microscopic observations showed fungal germination on both *Ae. aegypti* and *Cx. quinquefasciatus* larvae. Histological studies revealed that *A. clavatus* penetrated the cuticle, invaded the gut and disintegrated its cells. Some *Cx. quinquefasciatus* larvae, treated with *A. clavatus* reached the pupal stage and produced infected adults. However, the infection was mainly located on the extremity of their abdomen. These results suggest that *A. clavatus* could be an effective tool to manage mosquito proliferation.

Keywords: biological control, entomopathogenic fungi

Correspondence: ^afawrou@yahoo.fr, ^bofaye@ucad.sn, ^cmydy2001@yahoo.fr, ^debrimanjie@hotmail.com, ^ejmafoutou@hotmail.com

Received: 25 December 2007 | **Accepted:** 3 March 2008 | **Published:** 2009

Associate Editor: Fernando Vega was editor of this paper

Copyright: This is an open access paper. We use the Creative Commons Attribution 3.0 license that permits unrestricted use, provided that the paper is properly attributed.

ISSN: 1536-2442 | Volume 9, Number 42

Cite this paper as:

Seye F, Faye O, Ndiaye M, Njie E, Afoutou JM. 2009. Pathogenicity of the fungus, *Aspergillus clavatus*, isolated from the locust, *Oedaleus senegalensis*, against larvae of the mosquitoes *Aedes aegypti*, *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus*. 7pp. *Journal of Insect Science* 9:42, available online: insectscience.org/9.42

Introduction

Mosquito-borne diseases currently represent a great health threat in tropical and subtropical climates. As an alternative to chemical insecticides, natural products (Koua, 1998; Batra et al., 1998; Ravindra et al., 2002), predatory fish (Legner 1995; Karch and Coz 1983; Fillinger et al. 2003) and entomopathogenic fungi (Nnakumusana 1985; Su et al. 2001; Scholte et al. 2003) are frequently used in mosquito control. Fungi such as *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin (Moniliales) and *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Clavicipitaceae), commonly found on terrestrial insects can also kill mosquito larvae (Alves et al. 2002; Silva et al. 2004a). Studies have shown that mosquito larvae are susceptible to infections by fungi such as *Leptolegna chapmani* (Lord and Fukuda, 1988), *M. anisopliae* (Riba et al. 1986; Lacey et al. 1988; Alves et al. 2002; Silva et al. 2004a; Wright et al. 2005), *B. bassiana* (Alves et al. 2002), *Aspergillus parasiticus* (Hati and Ghosh 1965), *Aspergillus* spp. (de Moraes et al. 2001), *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *Penicillium falcicum*, *Fusarium vasinfectum* and *Trichoderma viride* (Govindarajan et al. 2005). Among the various *Aspergillus* species known to infect mosquitoes, *A. clavatus* Desmazières (Eurotiales: Trichocomaceae) has not been examined as a possible biological control agent. This study assessed the pathogenicity of an *A. clavatus* strain against larval stages of various species of mosquitoes.

Materials and Methods

Isolation

In September 2005, locusts of the species *Oedaleus senegalensis* Kraus (Orthoptera: Acrididae) were collected from plants growing near the department of Animal Biology (University CHEIKH A. DIOP, Dakar- Senegal). They were killed and placed for 24 hours on soil collected from the botanical garden to allow saprophytic fungi attack. Afterward, they were placed in Petri dishes containing 20 mg of wheat flour (locally purchased and sterilized in the autoclave for about 15 min at 120°C) mixed with 15 ml of sterile distilled water. One Petri dish containing the same medium only was used as a control. They were maintained at 26°C average temperature and in the range of 80– 85% ambient RH. Four days later, 4 fungal isolates appeared in the plates containing the insects, but not on the control. These fungi were separately cultivated in Petri dishes on the same medium. Dry conidia were harvested from the surface of the medium directly by scraping and conserved in Pyrex bottles sterilized at 120°C.

Fungi were identified according to Rapper and Fennel (1965), Samson (1979) and Guarro et al. (1999). The fungus *A. clavatus* was easily identified by his long phototrophic conidiophores (Yaguchi et al., 1993) on microscopic examination during germination.

Preliminary fungal tests on the mosquito larvae (Bioassay 1)

In September 2005, larvae of *Aedes aegypti* L., *Anopheles gambiae* s.l. Giles and *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae) were collected from various vats containing rainwater. For each fungal isolate, 1.2 mg/ml dry conidia were applied to 25 larvae (3rd and 4th instar) in 9 X 1.5 cm Petri dishes sterilized at 120°C and containing sterile 25 ml of tap water. There were four replicates for each treatment. Four non-treated Petri dishes served as control. The more virulent *A. clavatus* fungus was selected for production and application.

Microscopic observations

Larvae of *Ae. aegypti* and *An. gambiae* treated with *A. clavatus* were fixed after dying, sectioned, mounted, and then observed under light microscopy. The larvae of *Cx. quinquefasciatus* treated with *A. clavatus* at 1.2 mg/ml were used for cuticle observations under light microscopy. Larvae treated with three drops of the aqueous spore solution (1.2 mg/ml), were incubated on wheat powder medium (for *Ae. aegypti*) and on wet filter paper (for *Cx. quinquefasciatus*) at 85% R.H. and 26°C followed by observation of fungal germination.

Fungal production

A. clavatus was grown in Petri dishes containing 20 g of wheat powder (sterilized for 15 min at 120°C) and 15 ml of sterile distilled water. After four days incubation at 26°C, the substrate and dry conidia content were mixed to obtain a powder (conidia - wheat powder mixture). The number of conidia was determined using a haemocytometer.

Application of fungus (Bioassay 2)

Ae. aegypti and *Cx. quinquefasciatus* mosquito larvae were collected from vats containing rainwater in late November 2005. *An. gambiae* larvae were scarce at this time and were not used for the bioassay. Six plastic bottles (10 x 10 x 7 cm), each containing 500 ml of sterile tap water and 50 larvae (L3 and L4), were used for each mosquito species. Larvae were then treated with *A. clavatus* conidial mixture at 4, 8, 12, 16 and 20 g/l. The corresponding concentrations were 4.3; 8.5; 13; 17 and 21 x 10⁷ spores/ml respectively. Culture medium (wheat powder only) at 0.02 mg/ml served as control for each treatment. Total mortality was recorded for all replicates of each treatment at 24 hours post-inoculation. The surviving larvae were reared in plastic boxes (10 x 10 x 7 cm) containing 500 ml of tap water for 7 days. The emerging adults were incubated for 24 h at 26°C and fungal germination was observed after microscopic examination.

Data analysis

Data on mortality were corrected with Abbott's formula (Abbott, 1925). Student's t-test was used to compare mortality for *Ae. aegypti* and *Cx. quinquefasciatus*.

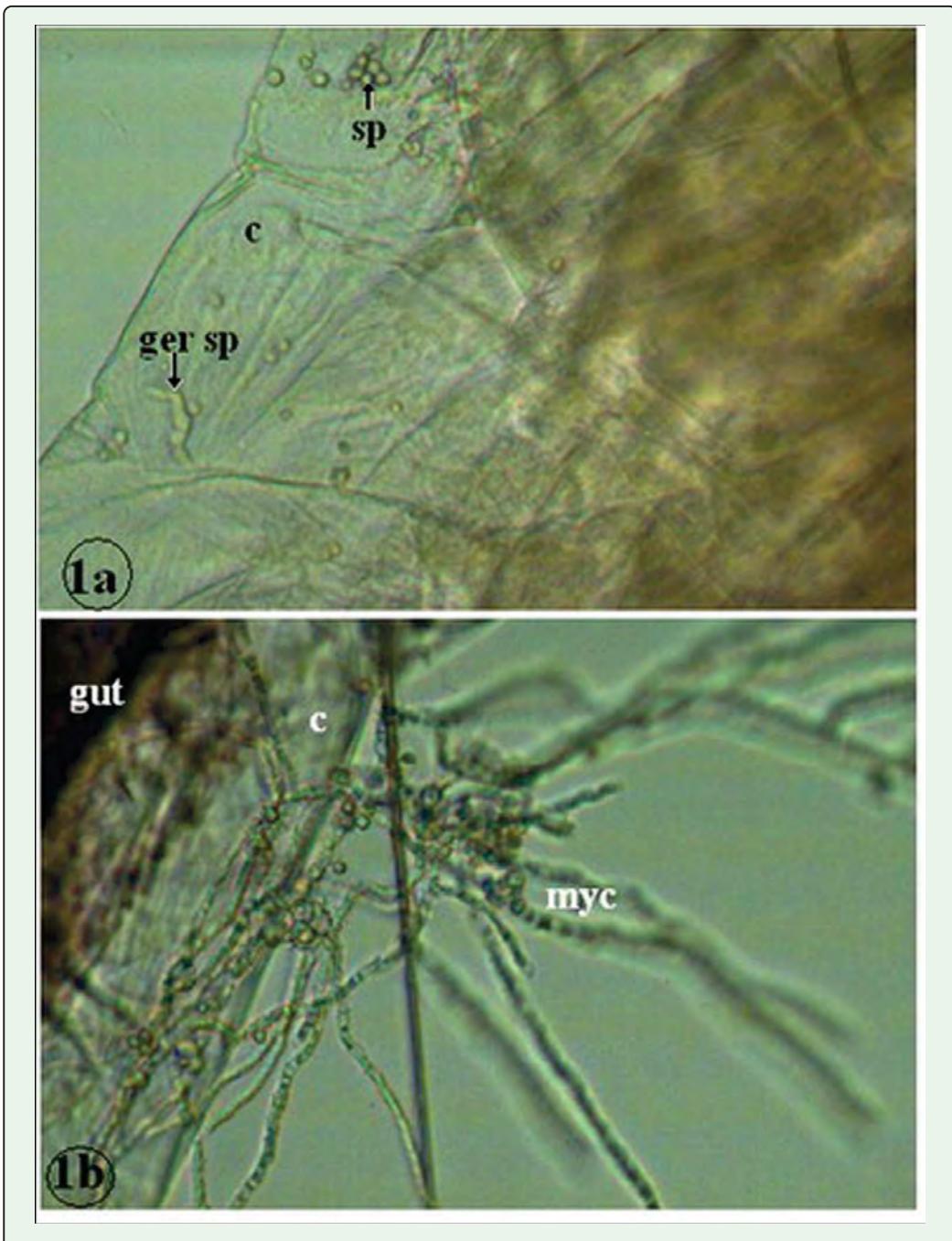


Figure 1. Larvae of *Culex quinquefasciatus* infected by *Aspergillus clavatus* via cuticle (1a and 1b). $\times 400$. c = cuticle, ger sp = germinating spore, myc = mycelium, sp = spore.

Results

Four *Aspergillus* species were isolated from the dead locusts. Preliminary tests (Bioassay 1) with conidia suspensions of each isolate revealed that *A. clavatus* was highly pathogenic against larvae of *Ae. aegypti*, *Cx. quinquefasciatus* and *An. gambiae*. Mortality rates were 100% against both *Ae. aegypti* and *Cx. quinquefasciatus*, while against *An. gambiae* it was 95%. All rates were in comparison to the control mortality (< 5%) after 24 hours (Table 1). With the other

isolates (S1, S2 and S4), also identified as species in the genus *Aspergillus*, infection against the larvae was less than 5%.

A. clavatus induced significant mortality against mosquito larvae (Table 2) when applied (Bioassay 2 in relative humidity ranging from 65 to 80%, and temperature ranging from 24 to 26°C.). The mortality varied from 10.6 to 68% for *Cx. quinquefasciatus* and 36.7 to 100% for *Ae. aegypti*. Larval mortality was significantly higher against

Ae. aegypti than *Cx. quinquefasciatus* ($P = 0.0001$) (Table 2). *A. clavatus* infection was observed under the microscope. On dead larvae, spores were found attached to the cuticle of *Cx. quinquefasciatus* (Figure 1a). Germinating spores (Figure 1a) and mycelia (Figure 1b) were found growing on *C. quinquefasciatus* larva.

Table 1. Larval mortality 24 h after fungal test on the mosquito larvae *Aedes aegypti*, *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* (average of four replicates).

Species	Fungal stocks				Control
	S1	S2	S3	S4	
<i>Aedes aegypti</i>	0	0	100	0	0
<i>Anopheles gambiae</i>	0	0	95	0	0
<i>Culex quinquefasciatus</i>	0	4	100	0	0

Histological studies revealed that the gastric caeca of some *An. gambiae* was invaded by *A. clavatus* spores (Figure 2a). Gut invasion by conidia and initial stages of germinating conidia were observed on *Ae. aegypti* larvae (Figure 2d). The fungus penetrated the cuticle of *Ae. aegypti* larvae. Conidial germination was also observed on *Cx. quinquefasciatus* larvae incubated on wet filter paper and larvae of *Ae. aegypti* incubated on sterile wheat flour. Fungal growth was observed on all treated and incubated larvae.

Occasionally, a low percentage of *Cx. quinquefasciatus* larvae treated with *A. clavatus* conidia were able to pupate and produce adults. Germinating conidia was observed on the tip of adult abdomen 24h after incubation.

Discussion

A. clavatus was more virulent to the mosquito larvae than the other three fungal isolates. Laboratory results showed that, *A. clavatus* was highly pathogenic against larvae of *Ae. aegypti*, *An. gambiae* and *Cx. quinquefasciatus*. However,

these mosquito larvae do not have the same susceptibility to the fungus. With the same dry conidial dose, (1.2 mg/ml), death rate was 100% against both *Ae. aegypti* and *Cx. quinquefasciatus* larvae and 95% against *A. gambiae* larvae. Referring to larval species susceptibility, the effect of this fungus is similar to that of *M. anisopliae* (Moniliales) and *Tolyphocladium cylindrosporum* (Hypocreales) against *An. stephensi*, *Cx. pipiens* and *Ae. aegypti* larvae (Riba et al., 1986).

When treated with *A. clavatus* spores, mortality was 68 % against *Cx. quinquefasciatus* and 100% against *Ae. aegypti* for 21×10^7 spores/ml. Bisht et al. (1996) found that the fungus *Leptotelia caudata* (Oomycetes) yielded a LD₁₀₀ of 7.10^3 spores/ml against *An. culicifacies* after 7 days. Riba et al. (1986) obtained a LD₁₀₀ in the order of 10^7 spores/ml with a stock of *M. anisopliae* against *Ae. aegypti* larvae within 26 hours. From our results the LD₁₀₀ against *Ae. aegypti* was closer to that of *M. anisopliae* against *Ae. aegypti*. Observations of larvae treated with *A. clavatus* revealed that just after adhesion of conidia on the cuticle, some germinated. The conidial proliferation on the cuticle became more obvious after 48 hours that is similar to previous studies on insects (Brett et al. 2004). Silva et al. (2004a) showed that larvae of mosquito treated with *M. anisopliae* had high amounts of conidia adhering to the colloid chitin with at least 90 % germination after 24 hrs incubation.

High levels of germination occurred on *A. clavatus* on dead *Ae. aegypti* larvae incubated on medium for 48 to 72 hours. Fungal germination was also observed on *Cx. quinquefasciatus* larvae in contact with aqueous solution of *A. clavatus* spores and incubated on wet filter paper, which is in agreement with Silva et al. (2004b).

However, the cuticle does not represent the only way for fungal infection. Other possible routes of invasion for *M. anisopliae* have been identified in mosquitoes via the respiratory siphon or the alimentary canal (Al-Aidroos and Roberts, 1978; Lacey et al., 1988; Silva et al., 2004b). Our histological results revealed a high gastric caeca

Table 2. Percent mortality rates for *Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti* larvae treated with mixture of *Aspergillus clavatus* (average of four replicates).

When grown in wheat flour, after conidial production by *A. clavatus* the concentration of the homogenous mixture was 10.7×10^9 spores/g.

Species	Dose (10^7 spores/ml)					control
	4.3	8.5	13	17	21	
<i>Culex quinquefasciatus</i>	10.6 ± 0.5	46.3 ± 0.8	42.4 ± 0.4	65 ± 0.2	68 ± 0.6	0.5 ± 0.0
<i>Aedes aegypti</i>	36.7 ± 0.9	75.5 ± 0.4	95.9 ± 0.1	100 ± 0.0	100 ± 0.1	1 ± 0.1

Each value represent mean of four replicates and ± SE.

Statistical analysis with t test shows that the difference in mortality between *Ae. aegypti* and *Cx. quinquefasciatus* larvae was highly significant ($p = 0.001$).

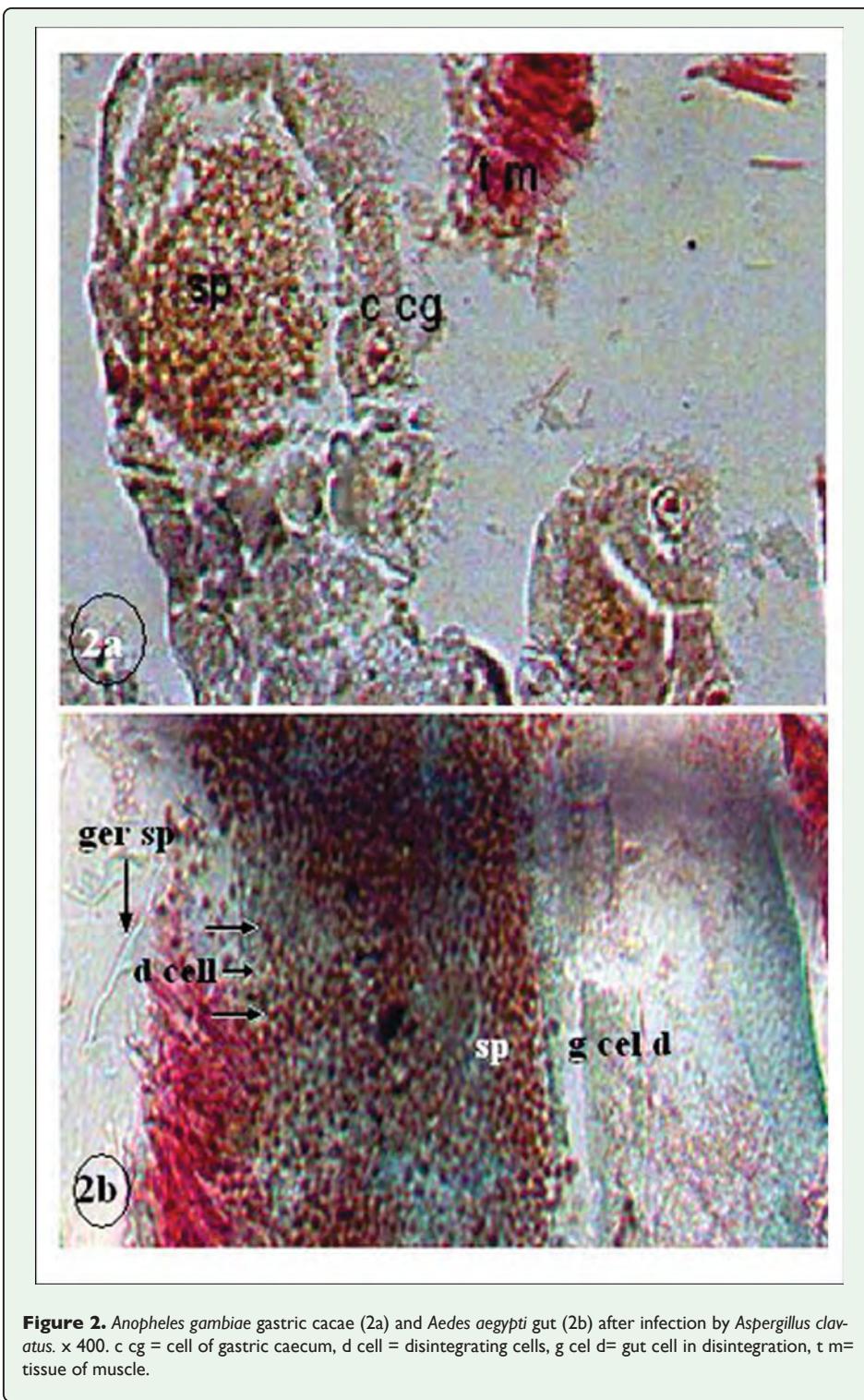


Figure 2. *Anopheles gambiae* gastric caecae (2a) and *Aedes aegypti* gut (2b) after infection by *Aspergillus clavatus*. $\times 400$. c cg = cell of gastric caecum, d cell = disintegrating cells, g cel d= gut cell in disintegration, t m= tissue of muscle.

invasion by *A. clavatus* spores in *An. gambiae* larvae. In the digestive tract for *Ae. aegypti* larvae, it was observed germinating conidia, rupture and disintegrating cells of gut. This has also been reported in previous histological studies (Lacey et al. 1988; Lord and Fukuda 1988; Silva et al. 2004b). According to Crisan (1971) and Lacey et al. (1988), a partial digestion of fungal conidia in the gut may induce a release of toxic substances. Silva et al.

(2004b) revealed that rupture and disintegration of cells in the gut on dead larva might be due to the chitinolytic enzymes or others substances produced by the spores. According to Hajek and St. Leger (1994), aggressiveness of entomopathogenic fungus is related to proteolytic, lipolytic and chitinolytic mechanisms that can act after conidial adhesion on the larval cuticle or after invasion of the gut (Crisan 1971; Lacey et al. 1988; Dommas and

Warner 1991; Silva et al. 2004b). *A. clavatus* produces a number of secondary metabolites as tryptoquivaline and tryptoquivalone (Clardy et al. 1975; Buchi et al. 1977); cytochalasin (Demain et al. 1976; Steyn et al. 1982; Lopez-Diaz and Flannigan 1997) and patulin (Varga et al. 2003). The pathological effects noted on the larvae treated with *A. clavatus* in our experiments might be due to these substances.

Light microscopy observations showed that *A. clavatus* conidia produce germ tubes on *Cx. quinquefasciatus* larval cuticle and germinate. Sweeney (1978) showed that with temperatures higher than 30°C, spores of *Culicinomyces* sp. could adhere to the cuticle and invade the gut of *An. amictus* or that of *Cx. fatigans* larvae. This would explain the speed of *A. clavatus* germination on larvae incubated at temperatures ranging between 24 and 26°C.

Cx. quinquefasciatus larvae treated with *A. clavatus* could pupate and produce adults. The resulting adults were collected seven days later and incubated and displayed fungal germination on their abdominal extremities. There was no fungal germination on adults that resulted from untreated larvae (control). This suggests that adult mosquitoes that result from treated larvae are likely contaminated at a pre-imaginal stage. Such an observation was also reported in previous studies on adult mosquitoes. Indeed *Ae. albopictus* larvae (Laird et al. 1992) and *Ae. aegypti* larvae in contact with fungus such as *Coelomomyces* could pupate and produce infected adults (Lucarotti and Shoukamy 2000). According to Laird et al. (1992), infection of adult *Ae. albopictus* by the fungus *Coelomomyces stegomyiae* var *stegomyiae* could be mortal.

However, in our study, no mortality was recorded for adults reared during 7 days. Lucarotti (1992) found that, on adult mosquitoes, infection by *C. stegomyiae* targets mainly the ovaries, which may explain the germination of *A. clavatus* on the tip of the abdomen.

The laboratory results show that *A. clavatus* isolated from *O. senegalensis*, is virulent against *Ae. aegypti*, *An. gambiae* and *Cx. quinquefasciatus* larvae and could be developed as a biological control agent against mosquitoes. However, further studies are needed for *A. clavatus* strain optimization, and development of better substrates for mass production and practical use. Characterization and application of toxins on mosquito larvae are needed to better understand their rapid killing effects.

References

- Abbott WS. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology* 18: 265-267.
- Al-Aidroos K, Roberts DW. 1978. Mutants of *Metarhizium anisopliae* with increased virulence toward mosquito larvae. *Canadian Journal of Genetics and Cytology* 20: 211-219.
- Alves SB, Alves LFA, Lopes RB, Pereira RM, Vieira SA. 2002. Potential of some *Metarhizium anisopliae* isolates for control of *Culex quinquefasciatus* (Dipt. Culicidae). *Journal of Applied Entomology* 126: 504-509.
- Batra CP, Mittal PK, Adak T, Sharma VP. 1998. Efficacy of neem oil-water emulsion against mosquito immatures. *Indian Journal of Malariaiology* 35: 15-21.
- Bisht GS, Joshi C, Khulbe RD. 1996. Watermolds: Potential biological control agents of malaria vector *Anopheles culicifacies*. *Current Science* 70: 393-395.
- Buchi G, Luk KC, Kobbe B, Townsend JM. 1977. Four new mycotoxins from *Aspergillus clavatus* related to tryptoquivaline. *Journal of Organic Chemistry* 42: 244-246.
- Clardy J, Springer JP, Buchi G, Matsuo K, Wrightman R. 1975. Tryptoquivaline and Tryptoquivalone, Two new tremorgenic metabolites of *Aspergillus clavatus*. *Journal of the American Chemical Society* 97: 663-665.
- Crisan AV. 1971. Mechanism responsible for release of toxin by *Metarhizium* spores in mosquito larvae. *Journal of Invertebrate Pathology* 17: 260-264.
- Demain AL, Hunt HA, Malik V, Kobbe B, Hawkins H, Matsuo K, Wogan GN. 1976. Improved procedure for production of cytochalasin E by *Aspergillus clavatus*. *Applied and Environmental Microbiology* 31: 138-140.
- Domnas AJ, Warner SA. 1991. Biochemical activities of entomophagous fungi. *Critical Reviews in Microbiology* 18: 1-13.
- Fillinger U, Knols BG, Becker N. 2003. Efficacy and efficiency of new *Bacillus thuringiensis* var. *Israelensis* and *Bacillus sphaericus* formulations against Afrotropical anophelines in Western Kenya. *Tropical Medicine And International Health* 8: 37- 47.
- Guarro J, Gene J, Schigeli AM. 1999. Developments in Fungal Taxonomy. *Clinical Microbiology Reviews* 12: 454-500.
- Govindarajan M, Jebanesan A, Reetha D. 2005. Larvicidal effect of extracellular secondary metabolites of different fungi against the mosquito, *Culex quinquefasciatus* Say. *Tropical Biomedicine* 22: 1-3.
- Hajek A, St Leger RJ. 1994. Interaction between fungal pathogens and insect hosts. *Annual Review of Entomology* 39: 293-322.
- Hati , Ghosh . 1965. *Aspergillus parasiticus* infection in adult mosquitoes. *Bulletin of the Calcutta School of Tropical Medicine* 13: 18-19.
- Karch S, Coz J. 1983. Histopathologie de *Culex pipiens* Linné (Diptera, Culicidae) soumis à l'activité larvicide de *Bacillus sphaericus* 1593-4. *Entomologie Médicale et Parasitologie* 21: 225-230.
- Koua HK, Han SH, d'Almeida MA. 1998. Histopathology of *Anopheles gambiae* s.l. Giles, 1902 (Diptera, Culicidae) subjected to the larvicidal activity of the aqueous extract of *Persea americana* Miller, 1768 (Lauraceae). *Bulletin of the Exotic Pathology Society* 91: 252-256.

- Lacey CM, Lacey LA, Roberts DR. 1988. Route of invasion and histopathology of *Metarhizium anisopliae* in *Culex quinquefasciatus*. *Journal of Invertebrate Pathology* 52: 108-118.
- Laird M, Mogi M, Sota T. 1992. Northernmost occurrences of the protistan pathogen, *Coelomomyces stegomyiae* var. *Stegomyiae*. *Journal of the American Mosquito Control Association* 8: 430-432.
- Legner EF. 1995. Biological control of Diptera of medical and veterinary importance. *Journal of Vector Ecology* 20: 59-120.
- Lord JC, Fukuda T. 1988. An ultrastructural study of the invasion of *Culex quinquefasciatus* larvae by *Leptolegna chapmani* (Oomycetes: Saprolegniales). *Mycopathologia* 104: 67-73.
- Lopez-Diaz TM, Flannigan B. 1997. Production of patulin and cytochalasin E by *Aspergillus clavatus* during malting of barley and wheat. *International Journal of Food Microbiology* 35: 129-136.
- Lucarotti CJ. 1992. Invasion of *Aedes aegypti* ovaries by *Coelomomyces stegomyiae*. *Journal of Invertebrate Pathology* 60: 176-184.
- Lucarotti CJ, Shoulkamy MA. 2000. *Coelomomyces stegomyiae* infection in adult female *Aedes aegypti* following the first, second and third host blood meals. *Journal of Invertebrate Pathology* 75: 292-295.
- de Moraes AML, Costa GL, Camargo Barcellos MZ, Oliveira RL, Oliveira PC. 2001. The entomopathogenic potential of *Aspergillus spp.* in mosquitoes vectors of tropical diseases. *Journal of Basic Microbiology* 41: 45-49.
- Nnakumusana ES. 1985. Laboratory infection of mosquito larvae by entomopathogenic fungi with particular reference to *Aspergillus parasiticus* and its effects on fecundity and longevity of mosquitoes exposed to sporadic infections in larval stages. *Current Science* 54: 1221-1228.
- Rapper , Fennel. 1965. *The genus Aspergillus*. Williams & Wilkins.
- Ravindra J, Eapen A, Kar I. 2002. Evaluation of repellent action of neem oil against the filarial vector, *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Indian Journal of Malariology* 39: 13-17.
- Riba G, Keita A, Soares GGJ, Ferron P. 1986. Comparative studies of *Metarhizium anisopliae* and *Tolyphocladium cylindrosporum* as pathogens of mosquito larvae. *Journal of American Mosquito Control Association* 2: 469-473.
- Samson R. 1979. A compilation of the aspergilli described since 1965. *Studies in Mycology* 18: 1-38.
- Scholte E-J, Njiru BN, Smallegange RC, Takken W, Knols GJ. 2003. Infection of malaria (*Anopheles gambiae* s.s.) and filariasis (*Culex quinquefasciatus*) vectors with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Malaria Journal* 2: 29
- Silva RO, Silva HHG, Luz C. 2004a. Effect of *Metarhizium anisopliae* isolates originating from soil samples of the Central Brazilian Cerrado against *Aedes aegypti* larvae under laboratory conditions. *Revista de Patología Tropical* 33: 207-216.
- Silva RO, Silva HHG, Ulhoa CJ, Luz C. 2004b. Is there a relationship between N-acetyl-d-glucosaminidase activity of *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokin (Hyphomycetes) isolates from peridomestic areas in Central Brasil and larvicidal effect on *Aedes aegypti* (L.) (Diptera, Culicidae)? *Journal of Applied Entomology* 129: 158-164.
- Steyn PS, Van Heerden FR, Rabie CJ. 1982. Cytochalasins E and K, toxic metabolites from *Aspergillus clavatus*. *Journal of the Chemical Society Perkin Transactions I* 1982, 541-544.
- Su X, Zou F, Guo Q, Huang J, Chen TX. 2001. A report on a mosquito-killing fungus, *Pythium carolinianum*. *Fungal Diversity* 7: 129-133.
- Sweeney AW. 1978. The effects of temperature on the mosquito pathogenic fungus *Culicinomyces*. *Australian Journal of Zoology* 26: 47-53.
- Varga J, Rigo K, Molnar J, Toth B, Szencz S, Teren J, Kozakiewicz Z. 2003. Mycotoxin production and evolutionary relationships among species of *Aspergillus* section *Clavati*. *Antonie van Leeuwenhoek* 83: 191-200.
- Wright MS, Raina AK, Lax AR. 2005. A strain of the fungus *Metarhizium anisopliae* for controlling subterranean termites. *Journal of Economic Entomology* 98: 1451-1458.
- Yaguchi T, Someya A, Miyadoh S, Udagawa S. 1993. *Aspergillus integratus*, a new species in *Aspergillus* section *Clavati*. *Transactions of the Mycological Society of Japan* 34: 305-310.

Research Article

Evaluation of Entomopathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae* Formulated with Suneem (Neem Oil) against *Anopheles gambiae* s.l. and *Culex quinquefasciatus* Adults

Fawrou Seye,¹ Mady Ndiaye,¹ Oumar Faye,² and José Marie Afoutou²

¹U.C.A.D., Laboratory of Reproductive Biology, Department of Animal Biology, Faculty of Science and Technology, University Cheikh Anta Diop of Dakar, PO Box 5005, Dakar Fann, Senegal

²Laboratory of Histology, Embryology and Cytogenetics, Faculty of Medicine, Pharmacy and Dentistry, University Cheikh Anta Diop of Dakar, PO Box 5005, Dakar Fann, Senegal

Address correspondence to Fawrou Seye, fawrou@yahoo.fr

Received 22 August 2011; Revised 16 March 2012; Accepted 4 April 2012

Abstract Biological control using pathogenic fungi is a promising alternative to chemical control. In this study, the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* formulated with neem oil (Suneem 1%) was evaluated against *Anopheles gambiae* s.l. and *Culex quinquefasciatus* adults. Under laboratory conditions, conidia were sprayed into 30 × 30 × 30 cm netting cages at 6 × 10⁷ spores/ml. With neem oil formulation, the percentages of surviving adults after 4 days were from 67 ± 3.4 to 5 ± 0.5% for *An. gambiae*, and from 51 ± 4.1 to 12 ± 1.1% for *Cx quinquefasciatus*. With the aqueous formulation, the survival rates were from 97 ± 3.2 to 58 ± 2.1% and 95 ± 2.5 to 70 ± 2.1% for *An. gambiae* and *Cx quinquefasciatus*. Very low mortality was observed in the water control. *M. anisopliae* in Suneem formulation could be developed for a spray technique, before being introduced in vector control.

Keywords *M. anisopliae*; neem oil; entomopathogenic fungi; *An. gambiae*, *Cx quinquefasciatus*; biological control

1 Introduction

Mosquitoes such as *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* are responsible for the transmission of several parasites that cause diseases such as malaria and filariasis. In Senegal, the high infection rates of malaria are mainly due to rapid urbanization [12,25,32,35,45]. Chemical and mechanical methods are the most common for mosquito control. One of the major strategies in malaria elimination is protection using insecticide-treated nets [24,44], and more recently, long lasting insecticidal nets (LLINs).

In mosquito vector control, many efforts have been made in developing countries using insecticides. However, the continued use of this method has resulted in the development of mosquito resistance [1,6,48]. For an alternative to chemical control, there is a resurgence of interest in the use of biopesticides. Therefore, biological

control is an important component of the integrated vector control strategy. Among various biocontrol agents, plant extracts [8,31,34,42], bacteria [14] and entomopathogenic fungi [13,23,29,33,38,39,40] belong to the most promising groups used for mosquito control. These agents are being used in many countries for insect control. Although, in Senegal, mosquito biological control is less used.

Many studies have showed the effectiveness of entomopathogenic fungi for mosquito control [23,29,33,38,39]. These fungi infect mosquitoes through direct contact with the cuticle. But, for these agents, there is a problem related to a correct formulation of fungal spores to facilitate spraying against mosquito adults. Studies have shown the possibility of combining fungal spores with plant extracts [40], with chemical insecticides [11,19,50], and also in the form of aggregates [5] against insects. Mahmoud [26] and Mnyone et al. [27] showed the possibility of combining species of entomopathogenic fungi against insects. Recently, oil formulations of entomopathogenic fungi produced satisfactory results in insect control [22] and control of mosquitoes [27,47]. Some authors, have found low efficacy from the combination of neem oil with fungi [2,7,16], although not all [36,47]. Among the neem oils, Suneem has not been evaluated for *M. anisopliae* formulation against mosquito adults.

The objective of this study is to demonstrate the possibility of formulating *Metarhizium anisopliae* with neem oil (Suneem) manufactured in Senegal against the adults of *Anopheles gambiae* s.l. and *Culex quinquefasciatus* mosquitoes.

2 Materials and methods

2.1 Sampling of mosquitoes

Larvae of *Anopheles gambiae* s.l. and *Culex quinquefasciatus* were collected from different areas in the suburbs of Dakar: Thiaroye sur mer (14°44'31"N and

17°23'53" W), Sam-Sam III (14°45'41" N and 17°21'25" W) Pikine rue 10 (14°45'32" N and 17°23'53" W) Pikine Niety Mbar (14°46'04" N and 17°22'32" W) and Guediawaye (14°46'55" N and 17°22'00" W). Sampling sites included various water bodies: streams, irrigation canals, drainage canals, and temporary water. Larvae were collected and transported in jars containing water from the breeding sites. At the Laboratory of Reproductive Biology (U.C.A.D.), larvae were separated and identified according to [15,18]. After emergence, adults were fed with sucrose solution at 10%. Identification is also made on the adult stage to confirm the identification at the larval stage of the various species.

2.2 Formulation of the fungus

The *Metarhizium anisopliae* is a local strain isolated on *Oedaleus senegalensis* Krauss, 1877 (Orthoptera: acrididae), at the Laboratory of Reproductive Biology, Department of Animal Biology, University Cheikh Anta Diop of Dakar in 2006. The fungus was replicated on rice grains medium in sterilized Petri dishes of dimensions 9 cm in diameter and 3 cm deep. Conidia were aseptically harvested 15 days later and kept in a Pyrex glass bottle sterilized at 110 °C. The sporulation rate was 90%. We used the Suneem 1% for the oil formulation, and distilled water for the aqueous formulation. The Suneem is emulsifiable neem oil formulated with a biodegradable solvent tetrahydrofurfuryl alcohol (THFA). It is obtained from a Senegalese chemical industry (SENCHIM). For oil formulation, 10 mL of Suneem 1% was mixed with 2 g of dry conidia in graduated tube and homogenized for 15 min. After determination of spore content, we diluted with 500 mL of sterile distilled water to obtain a final dose of 6×10^7 spores/mL. The spore content of this solution was determined with a hemacytometer counter (Thoma model) and a magnifying microscope (400 \times).

The aqueous formulation was prepared according to the same methodology with the same volume of sterile distilled water. The final content after dilution was 6×10^7 spores/mL.

For the oil formulation, preliminary tests showed that Suneem did not inhibit sporulation of the fungus.

2.3 Spraying adults

In each of four 30 × 30 × 30 cm bed net netting cages, were placed 50 males and 50 females (none blood fed). Mosquitoes were 5–7 days old. With a hand sprayer, we applied the product through the mesh of mosquito bed net into the cage to reach the mosquito adults. In each cage one of four treatments was applied: (1) 20 mL of the oil formulation with a dose of 6×10^7 spores/mL (1.3×10^{10} spores/m²); (2) for the Suneem oil control group, we applied 20mL of a solution of 20 mL Suneem diluted with distilled water to 500 mL; (3) 20 mL of aqueous formulation at 6 ×

10^7 spores/mL (1.3×10^{10} spores/m²); (4) aqueous control treated with 20 mL of distilled water only. The conditions were 25 ± 1 °C and 75 ± 2% relative humidity (RH).

The dead adults were removed from the cages and placed for incubation on Whatman paper imbibed with distilled water in glass Petri dish previously sterilized. The incubation is done in laboratory conditions (25 °C and 75% RH) for fungal growth. After fungal germination on the cadavers, we visualized sporulation with a magnifying microscope ($\times 40$) with Motic advanced software and connected to a computer.

Adults were fed with 10% sucrose solution during treatment. The mosquitoes were left in the same cages after treatment. The experiment was replicated three times on different days for each test. The results represent the arithmetic means.

2.4 Data recording and analysis

After spraying, we counted the survival of adults daily to calculate the percentage mortality rate. The results represent the average of the three replicates and were used for statistical processing with the Statview software. A paired T-test is also used to verify the sensitivity of both species for the two formulations.

3 Results

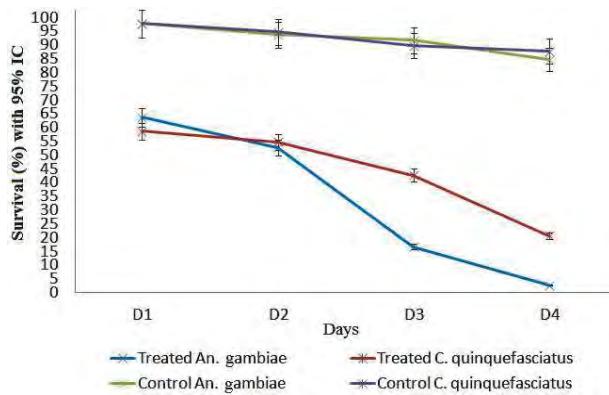
After application of *Metarhizium anisopliae* in Suneem oil formulation, or application of Suneem oil control, we found adult mosquito agitation followed by a rapid knockdown. This was not the case for the aqueous formulation or aqueous control application. After a short time (15 min), the mosquitoes recovered, flew and rested on the wall of mosquito nets. 24 hours later, the percentage adult survival among those treated with both formulations decreased (Figures 1 and 2). However, with the Suneem formulation, the survival days of the *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* adults were lower than Suneem oil control, the water formulation or the water control. For Suneem oil formulation, the percentages of survival adults during the 4 days were from 67 ± 3.4 to 5 ± 0.5% for *An. gambiae*, and from 51 ± 4.1 to 12 ± 1.1% for *Cx quinquefasciatus*. With Suneem oil control the survival of adults at the day 4 were 82 ± 2.5 for *An. gambiae* and 89 ± 1.3 for *Cx quinquefasciatus*. With the aqueous formulation, the survival rates were from 97 ± 3.2 to 58 ± 2.1% for *An. gambiae* and 95 ± 2.5 to 70 ± 2.1% for *Cx quinquefasciatus*. There was low mortality in the water control (< 3%). For both formulations, the paired T-test shows high significant difference in survival rates between treated adults and control for both the oil and the water formulations ($p < 0.0001$) (Tables 1 and 2). Furthermore, univariate T-test shows that the oil formulation is more effective against *Anopheles gambiae* ($p = 0,001$) and *Culex quinquefasciatus* adults ($p = 0,002$) than water formulation.

Table 1: Percentage survival of adults (mean \pm SE) of *Anopheles gambiae* s.l. sprayed with *Metarhizium anisopliae* in neem oil (Suneem) and water formulation at 1.3×10^{10} spores/m².

Days post application	Suneem oil formulation	Suneem oil control	p value	Water formulation	Water control	p value
Average percentage survival \pm SE				Average percentage survival \pm SE		
D1	67 \pm 3.4	100 \pm 0.0	< 0.0001	97 \pm 3.2	100 \pm 0.1	= 0.0678
D2	61 \pm 2.1	93 \pm 1.4	< 0.0001	94 \pm 2.4	99 \pm 1.8	= 0.0008
D3	14 \pm 1.5	86 \pm 2.1	< 0.0001	82 \pm 1.5	99 \pm 4.2	< 0.0001
D4	5 \pm 0.5	82 \pm 2.5	< 0.0001	58 \pm 2.1	98 \pm 2.1	< 0.0001

Table 2: Percentage survival of adults (mean \pm SE) of *Culex quinquefasciatus* sprayed with *Metarhizium anisopliae* in neem oil (Suneem) and water formulation at 1.3×10^{10} spores/m².

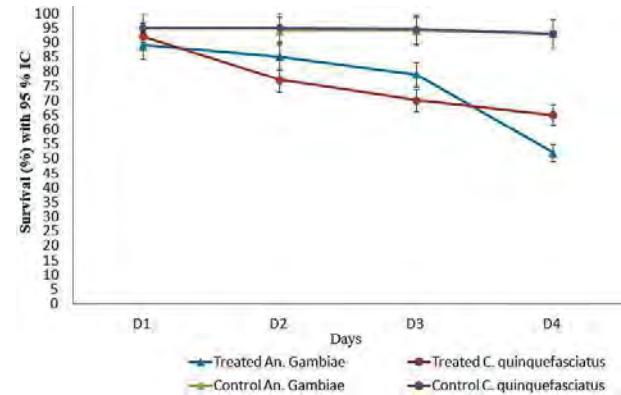
Days post application	Suneem oil formulation	Suneem oil control	p value	Water formulation	Water control	p value
Average percentage survival \pm SE				Average percentage survival \pm SE		
D1	65 \pm 4.1	100 \pm 0.0	< 0.0001	95 \pm 2.5	100 \pm 0.0	= 0.0008
D2	58 \pm 2.2	96 \pm 1.2	< 0.0001	84 \pm 1.8	98 \pm 0.2	< 0.0001
D3	48 \pm 2.0	95 \pm 2.1	< 0.0001	75 \pm 4.2	98 \pm 0.1	< 0.0001
D4	12 \pm 1.1	89 \pm 1.3	< 0.0001	70 \pm 2.1	97 \pm 0.0	< 0.0001

**Figure 1:** Effect of *Metarhizium anisopliae* in Suneem (neem oil) formulation on *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* survival. For the control, the mosquitoes are treated with Suneem.

After 7 days incubation on Whatman paper in glass Petri dish previously sterilized, we observed the germination of the fungus on all adult mosquitoes treated with conidia and incubated (Figures 3(a) and 3(b)). For both formulations, germination showed no difference in sporulation of the fungus on *An. gambiae* and *Cx quinquefasciatus*. This germination was observed on the head, thorax, and abdomen of adult mosquitoes. However, no germination was observed on either of the control groups (Figures 3(c) and 3(d)).

4 Discussion

In this study, the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* formulated with neem oil (Suneem) has been demonstrated against adult mosquitoes of *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus*. When formulation was sprayed on mosquitoes, their survival was significantly reduced. This supports previous laboratory trials that have demonstrated

**Figure 2:** Effect of *Metarhizium anisopliae* in water formulation on *Anopheles gambiae* s.l. and *Culex quinquefasciatus* survival. For the control, the mosquitoes are not treated with fungus.

the potential of *Metarhizium anisopliae* for adult mosquito control [37,38,39]. In our bioassays, the Suneem 1% showed no inhibitory effect on spore germination or reduction in spore pathogenicity to the treated mosquitoes. Instead, the results showed that the oil formulation is more effective against mosquitoes than the aqueous formulation or Suneem alone. That confirms our previous results in synergism effect between Suneem and entomopathogenic fungi (*Aspergillus clavatus*) at 79×10^7 spores/mL against adult of *Culex quinquefasciatus* [41]. Indeed, many studies have shown the possibility of combining neem oil with entomopathogenic fungi for insect control [21,30]. However, some oils are not very compatible for conidial formulation [7,16,36]. Therefore, the oil facilitates not only the spraying fungal spores [4], but it plays a role of synergism [7,41] and facilitates their adhesion to the insect cuticle [46,47]. This is a great advantage to the

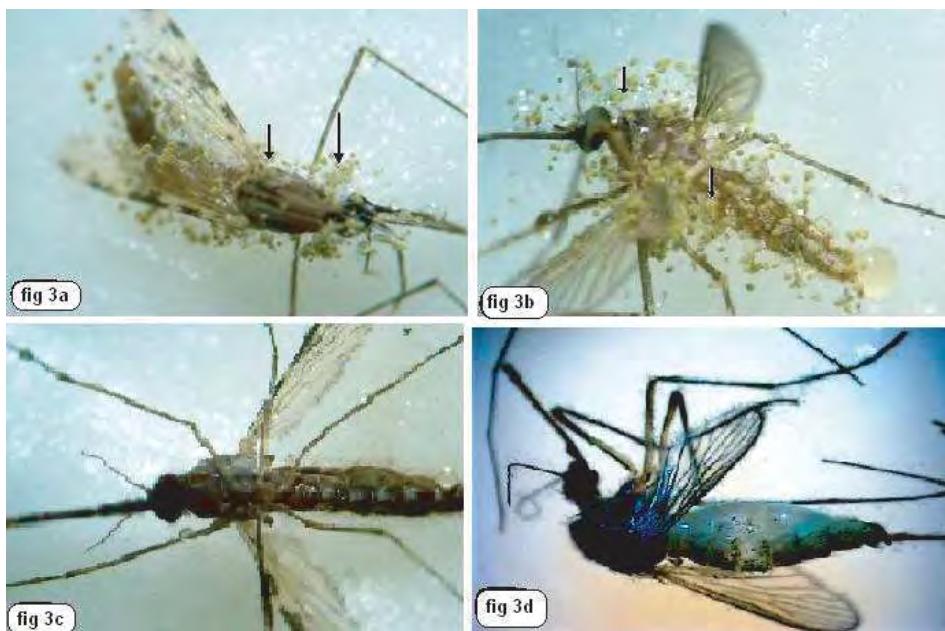


Figure 3: *Anopheles gambiae* (a) and *Culex quinquefasciatus* (b) mosquito adults infected by *Metarhizium anisopliae* and none infected (control) (c,d).

mix. The contribution of Suneem is also the beneficial effect as biopesticide, which was demonstrated on mosquito larvae [42]. But the Suneem, used in this study, was more diluted. That is why it has not been so pathogenic to the mosquito adults compared to other studies [9, 10].

On the other hand, the choice of the oil is therefore essential to increase the effectiveness of the fungus. Some oils can effectively inhibit the germination of spores, thus affecting their effectiveness [19]. So, the composition or origin of neem oil [43], used in the formulation is most important for conidial effectiveness.

In our bioassays, mosquito behavior observed immediately after spraying the oil formulation and Suneem alone, shows agitation and excito-repellency effects, as is previously reported [49], also in addition to a knockdown effect. However, in our study, this effect is ephemeral and could be due to the volatile solvent present in the Suneem (THFA) or the oil dilution with water.

After spraying, the conidia need to contact the mosquito adult, after which they attach, germinate, and penetrate the cuticle. The Suneem, which is an emulsifiable oil plays a facilitating role for the adhesion of spores on the cuticle of insects.

In this study, the dose used against *An. gambiae* and *Cx quinquefasciatus* was 6×10^7 spores/mL, which is lower than the dose used by Kannan et al. [23] against *Anopheles stephensi* (1×10^8 spores/mL of water or oil suspension), or *M. anisopliae* formulated with sunflower oil against the same mosquito species at 1.6×10^{10} spores/mL [39]. However, the mode of application is not the same.

Our formulation was sprayed directly on the mosquitoes but conidia were also attached in the bed net upon which mosquitoes rested. Mosquitoes were then continuously in contact during 4 days with bed net. This also shows that the application method influences the effectiveness of the product. Even if, for Farenhorst and Knols [10], the use of a standardized application method (on substrates), allows optimizations of spore dose and exposure time. In our study, we sprayed directly through bed net on mosquitoes, while the modes of application for regular laboratory tests often use paper filters [14, 38] or other substrates [10, 20, 28]. But we can explain also the higher mortality in our study, by the difference of the strain used against the same mosquitoes. The content of the entomopathogenic fungi formulation (strain, conidial dose, nature of neem oil) is important, but also the nature of the treated surface and contact areas of mosquitoes with spores (tarsus, head, thorax, abdomen, antennae) as is body size. Mnyone et al. [28] shows that older and non-blood fed mosquitoes are more susceptible than younger or blood fed. The mosquito adults used in our study were between 5 and 7 days old and not blood fed

Since the germination of fungal spores depends on the humidity and some factors [17], and the most vital parts of the body (head, thorax, and abdomen) showed more germination of conidia, contact with the tarsi or antennae would be less infectious. So that, if the application of a fungus is through substrate only [20], adult mosquitoes will be in contact by their legs or antennae, and rarely by the rest of the body. Then, the infection rate is not high during the first day and the lethal time will increase.

In the other hand, there are possibilities of fungal dissemination amongst the mosquito adults [37]. We used 50 males and 50 females in the same cage during 4 days. The infection may spread among the mosquitoes by bodily contact. Then, the number of mosquito adults male and female treated is also important due to activities as mating within mosquito population. If more conidia are adhered to the mosquito adult cuticle, the possibility to infect another by contact must be enhanced. Furthermore, fungal infections suppress the successful development of Plasmodium parasites in the vectors [3], which should be investigated in this location.

5 Conclusion

Metarhizium anisopliae strain used in our study is compatible with Suneem 1% and reduces survival of mosquito adults after spraying. The mosquito age and time of contact between adults and conidia must enhance the mosquito infection. The possibility exists to use entomopathogenic fungi formulated with Suneem against mosquito adults as malaria mosquito vector control in Senegal. Therefore, a technical spray similar to that described here should be developed for use in the field environment to target host-seeking or house entering mosquitoes.

Acknowledgments The authors thank Dr Toure for the *Metarhizium anisopliae* strains and Dr Ndione for mosquito sampling. This study was supported by the Ministry of Scientific Research of Senegal in the project program "FIRST" 2008.

References

- [1] M. Akogbeto and S. Yakoubou, *Resistance of malaria vectors to pyrethrins used for impregnating mosquito nets in Benin, West Africa*, Bull Soc Pathol Exot, 92 (1999), 123–130.
- [2] C. Bajan, K. Kmitowa, and E. Popowska-Nowak, *Reaction of various ecotypes of entomopathogenic fungus Beauveria bassiana to the botanical preparation Neem™ and pyrethroid Fastak*, Arch Phytopathol PFL, 31 (1998), 369–375.
- [3] S. Blanford, B. H. Chan, N. Jenkins, D. Sim, R. J. Turner, A. F. Read, et al., *Fungal pathogen reduces potential for malaria transmission*, Science, 308 (2005), 1638–1641.
- [4] T. Bukhari, W. Takken, and C. J. Koenraadt, *Development of Metarhizium anisopliae and Beauveria bassiana formulations for control of malaria mosquito larvae*, Parasit Vectors, 4 (2011), 23.
- [5] R. A. Daoust, M. G. Ward, and D. W. Roberts, *Effect of formulation on the virulence of Metarhizium anisopliae conidia against mosquito larvae*, J Invertebr Pathol, 40 (1982), 228–236.
- [6] F. Darriet, R. N'guessan, A. A. Koffi, L. Konan, J. M. Doannio, F. Chandre, et al., *Impact of pyrethrin resistance on the efficacy of impregnated mosquito nets in the prevention of malaria: results of tests in experimental cases with deltamethrin SC*, Bull Soc Pathol Exot, 93 (2000), 131–134.
- [7] R. A. Depieri, S. S. Martinez, and A. O. Menezes Jr., *Compatibility of the fungus Beauveria bassiana (Bals.) Vuill. (Deuteromycetes) with extracts of neem seeds and leaves and the emulsible oil*, Neotrop Entomol, 34 (2005), 601–606.
- [8] T. M. El-Sheikh, *Field evaluation of repellency effect of some plant extracts against mosquitoes in Egypt*, J Egypt Soc Parasitol, 39 (2009), 59–72.
- [9] M. Farenhorst, A. Hilhorst, M. B. Thomas, and B. G. Knols, *Development of fungal applications on netting substrates for malaria vector control*, J Med Entomol, 48 (2011), 305–313.
- [10] M. Farenhorst and B. G. Knols, *A novel method for standardized application of fungal spore coatings for mosquito exposure bioassays*, Malar J, 9 (2010), 27.
- [11] M. Farenhorst, B. G. Knols, M. B. Thomas, A. F. Howard, W. Takken, M. Rowland, et al., *Synergy in efficacy of fungal entomopathogens and permethrin against West African insecticide-resistant Anopheles gambiae mosquitoes*, PLoS One, 5 (2010), e12081.
- [12] D. Fontenille, L. Lochouarn, N. Diagne, C. Sokhna, J. J. Lemasson, M. Diatta, et al., *High annual and seasonal variations in malaria transmission by anophelines and vector species composition in Dielmo, a holoendemic area in Senegal*, Am J Trop Med Hyg, 56 (1997), 247–253.
- [13] A. M. García-Munguía, J. A. Garza-Hernández, E. A. Rebollar-Tellez, M. A. Rodríguez-Pérez, and F. Reyes-Villanueva, *Transmission of Beauveria bassiana from male to female Aedes aegypti mosquitoes*, Parasit Vectors, 4 (2011), 24.
- [14] I. Geetha, A. M. Manonmani, and G. Prabakaran, *Bacillus amyloliquefaciens: a mosquitocidal bacterium from mangrove forests of Andaman & Nicobar islands, India*, Acta Trop, 120 (2011), 155–159.
- [15] J. I. Glick, *Illustrated key to the female Anopheles of southwestern Asia and Egypt (Diptera: Culicidae)*, Mosq Syst, 24 (1992), 125–153.
- [16] E. Hirose, P. M. O. J. Neves, J. A. C. Zequi, L. H. Martins, C. H. Peralta, and A. Moino Jr., *Effect of biofertilizers and neem oil on the entomopathogenic fungi Beauveria bassiana (Bals.) Vuill. and Metarhizium anisopliae (Metsch.) Sorok*, Braz Arch Biol Techn, 44 (2001), 409–423.
- [17] D. J. Holder and N. O. Keyhani, *Adhesion of the entomopathogenic fungus Beauveria (Cordyceps) bassiana to substrata*, Appl Environ Microbiol, 71 (2005), 5260–5266.
- [18] G. H. E. Hopkins, *Clé des Culicinae de la Région Ethiopienne. I. Larves*, Office de la Recherche Scientifique et Technique Outre-Mer (ORSTOM), Paris, 2nd ed., 1952.
- [19] V. L. Hornbostel, E. Zhioua, M. A. Benjamin, H. S. Ginsberg, and R. S. Ostfeld, *Pathogenicity of Metarhizium anisopliae (Deuteromycetes) and permethrin to Ixodes scapularis (Acar: Ixodidae) nymphs*, Exp Appl Acarol, 35 (2005), 301–316.
- [20] A. F. Howard, C. J. Koenraadt, M. Farenhorst, B. G. Knols, and W. Takken, *Pyrethroid resistance in Anopheles gambiae leads to increased susceptibility to the entomopathogenic fungi Metarhizium anisopliae and Beauveria bassiana*, Malar J, 9 (2010), 168.
- [21] M. T. Islam, A. Olleka, and S. Ren, *Influence of neem on susceptibility of Beauveria bassiana and investigation of their combined efficacy against sweetpotato whitefly, Bemisia tabaci on eggplant*, Pestic Biochem Physiol, 98 (2010), 45–49.
- [22] R. R. James, *Combining azadirachtin and Paecilomyces fumosoroseus (Deuteromycotina: Hypocreales) to control Bemisia argentifolii (Homoptera: Aleyrodidae)*, J Econ Entomol, 96 (2003), 25–30.
- [23] S. K. Kannan, K. Murugan, A. N. Kumar, N. Ramasubramanian, and P. Mathiyazhagan, *Adulticidal effect of fungal pathogen, Metarhizium anisopliae on malarial vector Anopheles stephensi (Diptera: Culicidae)*, Afr J Biotech, 7 (2008), 838–841.
- [24] E. Kweka, W. Nkya, A. Mahande, C. Assenga, F. Mosha, E. Lyatuu, et al., *Mosquito abundance, bed net coverage and other factors associated with variations in sporozoite infectivity rates in four villages of rural Tanzania*, Malar J, 7 (2008), 59.
- [25] V. Machault, L. Gadiaga, C. Vignolles, F. Jarjaval, S. Bouzid, C. Sokhna, et al., *Highly focused anopheline breeding sites and malaria transmission in Dakar*, Malar J, 8 (2009), 138.

- [26] F. M. Mahmoud, *Pathogenicity of three commercial products of entomopathogenic fungi, Beauveria bassiana, Metarhizium anisopliae and Lecanicillium lecanii against adults of Olive Fly, Bactrocera oleae (Gmelin) (Diptera: Tephritidae) in the laboratory*, Plant Protect Sci, 45 (2009), 98–102.
- [27] L. L. Mnyone, M. J. Kirby, D. W. Lwetoijera, M. W. Mpingwa, B. G. Knols, W. Takken, et al., *Infection of the malaria mosquito, Anopheles gambiae, with two species of entomopathogenic fungi: effects of concentration, co-formulation, exposure time and persistence*, Malar J, 8 (2009), 309.
- [28] L. L. Mnyone, M. J. Kirby, M. W. Mpingwa, D. W. Lwetoijera, B. G. Knols, W. Takken, et al., *Infection of Anopheles gambiae mosquitoes with entomopathogenic fungi: effect of host age and blood-feeding status*, Parasitol Res, 108 (2011), 317–322.
- [29] L. L. Mnyone, T. L. Russell, I. N. Lyimo, D. W. Lwetoijera, M. J. Kirby, and C. Luz, *First report of Metarhizium anisopliae IP 46 pathogenicity in adult Anopheles gambiae s.s. and An. arabiensis (Diptera: Culicidae)*, Parasit Vectors, 2 (2009), 59.
- [30] S. S. Mohanty, K. Raghavendra, and A. P. Dash, *Influence of growth medium on antifungal activity of neem oil (Azadirachta indica) against Lagenidium giganteum and Metarhizium anisopliae*, Mycoscience, 49 (2008), 318–320.
- [31] S. Nazar, S. Ravikumar, G. Williams, M. Ali, and P. Suganthi, *Screening of Indian coastal plant extracts for larvicidal activity of Culex quinquefasciatus*, Indian J Sci Technol, 2 (2009), 24–27.
- [32] F. Pagès, G. Texier, B. Pradines, L. Gadiaga, V. Machault, F. Jarjaval, et al., *Malaria transmission in Dakar: a two-year survey*, Malar J, 7 (2008), 178.
- [33] A. R. Paula, A. T. Carolino, C. P. Silva, and R. I. Samuels, *Susceptibility of adult female Aedes aegypti (Diptera: Culicidae) to the entomopathogenic fungus Metarhizium anisopliae is modified following blood feeding*, Parasit Vectors, 4 (2011), 91.
- [34] E. Pushpalatha and J. Muthukrishnan, *Efficacy of two tropical plant extracts for the control of mosquitoes*, J Appl Ent, 123 (1999), 369–373.
- [35] V. Robert, K. Macintyre, J. Keating, J. F. Trape, J. B. Duchemin, M. Warren, et al., *Malaria transmission in urban sub-Saharan Africa*, Am J Trop Med Hyg, 68 (2003), 169–176.
- [36] D. A. Rodrígues-Lagunes, A. L. Tejedo, D. R. Diaz, C. R. Maciel, J. V. Mendoza, E. B. Roman, et al., *Compatibilidad de beauveria bassiana y extractos acuosos de nim (Azadirachta indica) para el control de la broca del cafeto (Hypothenemus hampei)*, Man Integr Plagas, 44 (1997), 14–19.
- [37] E. J. Scholte, B. G. Knols, and W. Takken, *Autodissemination of the entomopathogenic fungus Metarhizium anisopliae amongst adults of the malaria vector Anopheles gambiae s.s.*, Malar J, 3 (2004), 45.
- [38] E. J. Scholte, B. G. Knols, and W. Takken, *Infection of the malaria mosquito Anopheles gambiae with the entomopathogenic fungus Metarhizium anisopliae reduces blood feeding and fecundity*, J Invertebr Pathol, 91 (2006), 43–49.
- [39] E. J. Scholte, B. N. Njiru, R. C. Smallegange, W. Takken, and B. G. Knols, *Infection of malaria (Anopheles gambiae s.s.) and filariasis (Culex quinquefasciatus) vectors with the entomopathogenic fungus Metarhizium anisopliae*, Malar J, 2 (2003), 29.
- [40] F. Seye, O. Faye, M. Ndiaye, E. Njie, and J. Marie Afoutou, *Pathogenicity of the Fungus, Aspergillus clavatus, isolated from the locust, Oedaleus senegalensis, against larvae of the mosquitoes Aedes aegypti, Anopheles gambiae and Culex quinquefasciatus*, J Insect Sci, 9 (2009), 1–7.
- [41] F. Seye and M. Ndiaye, *Compatibility between Aspergillus clavatus (Hyphomycetes) and neem oil (Azadirachta indica) against the vector mosquito for filarial diseases culex quinquefasciatus (Say, 1823) (Diptera: Culicidae)*, Bacteriol Virusol Parazitol Epidemiol, 53 (2008), 43–48.
- [42] F. Seye, R. D. Ndione, and M. Ndiaye, *Étude comparative de deux produits de neem (huile et poudre) sur les stades préimaginaux du moustique Culex quinquefasciatus (Diptera : Culicidae)*, Afrique Science, 2 (2006), 212–225.
- [43] O. P. Sidhu, V. Kumar, and H. M. Behl, *Variability in triterpenoids (nimbin and salanin) composition of neem among different provenances of India*, Ind Crops Prod, 19 (2004), 69–75.
- [44] P. Talani, G. Samba, and G. Moyen, *Control of malaria disease with impregnated mosquito net : case of makelekele area in Brazzaville*, Med Afr Noire, 52 (2005), 687–690.
- [45] J. F. Trape, E. Lefebvre-Zante, F. Legros, G. Ndiaye, H. Bouganali, P. Druilhe, et al., *Vector density gradients and the epidemiology of urban malaria in Dakar, Senegal*, Am J Trop Med Hyg, 47 (1992), 181–189.
- [46] P. N. G. Visalakshy, A. Krishnamoorthy, and A. M. Kumar, *Effects of plant oils and adhesive stickers on the mycelia growth and conidiation of Verticillium lecanii, a potential entomopathogen*, Phytoparasitica, 33 (2005), 367–369.
- [47] P. N. G. Visalakshy, A. Krishnamoorthy, and A. M. Kumar, *Compatibility of plant oils and additives with Paecilomyces farinosus, a potential entomopathogenic fungus*, J Food Agric Environ, 4 (2006), 333–335.
- [48] M. Weill, O. Duron, P. Labbé, A. Berthomieu, and M. Raymond, *Insecticide resistance in the mosquito Culex pipiens*, Med Sci (Paris), 19 (2003), 1190–1192.
- [49] R. D. Xue, A. Ali, and D. R. Barnard, *Laboratory evaluation of toxicity of 16 insect repellents in aerosol sprays to adult mosquitoes*, J Am Mosq Control Assoc, 19 (2003), 271–274.
- [50] L. Zurek, D. W. Watson, and C. Schal, *Synergism between Metarhizium anisopliae (Deuteromycota: Hyphomycetes) and Boric Acid against the German Cockroach (Dictyoptera: Blattellidae)*, Biological Control, 23 (2002), 296–302.

Research Paper

Laboratory and semi-field environment tests for the control efficacy of *Metarhizium anisopliae* formulated with neem oil (suneem) against *Anopheles gambiae* s.l. adult emergence

Accepted 13 March, 2013

ABSTRACT

SEYE Fawrou^{1a,2a*}, NDIONE Raymond Demba^{1b}, TOURÉ Mamour^{1c}, NDIAYE Mady^{1d}, BOUKRAA Slimane^{2b}, BAWIN Thomas^{2c}, ZIMMER Jean-Yves^{2d} and FRANCIS Frédéric^{2e}

¹U.E.R.B.V, Laboratory of Reproductive Biology, Department of Animal Biology, Faculty of Science and Technology, University Cheikh Anta Diop of Dakar, P. O. Box-5005, Dakar Fann, Senegal

²Department of Functional and Evolutionary Entomology, Gembloux Agro-Bio Tech, University of Liege, Passage des Déportés 2, P. O. Box-5030 Gembloux, Belgium.

*Corresponding author. E-mail:
fawrou@yahoo.fr.

Metarhizium anisopliae was evaluated previously in Suneem formulation against malaria vector adults. However, their ability to control aquatic stages is not yet evaluated. In laboratory conditions: the lethal dose (LD_{90}) of the formulation was determined on *Anopheles gambiae* larvae collected from breeding sites and evaluated into artificial vats at dry and rainy seasons. In laboratory conditions, the LD_{90} was 5.3×10^6 spores/ml in 48 h. In semi-field environment, the formulation had a great emergence inhibition of mosquito adult ($P < 0.0001$). The emergences rate at day 8 were 2.25 ± 0.03 , 28.00 ± 1.07 and 97.25 ± 1.56 % in dry season for the oil formulation (OF), Suneem (S), and water control respectively. In rainy season, the emergences were 1.25 ± 0.15 , 30.25 ± 1.23 and 98 ± 0.76 % respectively. No significant difference was observed between dry and rainy seasons ($P=0.3$). Therefore, *M. anisopliae* formulated with Suneem may provide a more sustainable management strategy for malaria vectors control at larval stages.

Key words: *Metarhizium anisopliae*, *Anopheles gambiae* s.l., neem oil, biological control.

INTRODUCTION

In Senegal, the high infection rates of malaria are mainly due to rapid urbanization (Fontenille et al., 1997; Robert et al., 2006; Pagès et al., 2008). With significant rainfall recorded since 2005, some suburbs areas of Dakar are frequently flooded due to the shallow groundwater in the Niayes zone, this result in the development of anopheline mosquitoes during rainy and dry season (unpublished data).

Currently, many efforts have been made in malaria control by managing the mosquitoes using chemical insecticides. One of the major strategies in malaria elimination in Senegal is the personal protection using Long Lasting Insecticidal Nets (LLINs) (Talani et al., 2005; Kweka et al., 2008; Adeogun et al., 2012). However, the continuous use of chemical insecticides against mosquitoes has caused enormous problems like development of resistance

(Akogbeto and Yakouboou, 1999; Weill et al., 2003). Development of alternative methods as biological control using pathogenic agents such as bacteria and entomopathogenic fungi is in necessity.

Many studies have shown the potential of entomopathogenic fungi as next generation agents for the control of mosquitoes (Scholte et al., 2003; 2004; 2006; Kannan et al., 2008; Seye et al., 2009; Bilal et al., 2012; Seye et al., 2012). Among these fungi, *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* strains are the most used. However, the fungal spores are hydrophobic. When they are applied in aquatic environment, they clump together, reducing the area of contact with mosquito larvae. A formulation is then needed to facilitate the spraying and effectiveness. Many oils from plants have showed compatibility with entomopathogenic fungi (Visalakshy et al., 2006; Seye and

Ndiaye, 2008; Sahayaraj et al., 2011). The combination increases entomopathogens infectivity against the target pest by enhancing conidial adhesion and persistence. However, *M. anisopliae* are more commonly used in oil formulation against mosquito adults (Mnyone et al., 2011; Seye et al., 2012), than mosquito larvae (Bukhari et al., 2001). These authors showed that, the percentage of pupation for *Anopheles gambiae* s.l. was significantly reduced when *M. anisopliae* was used in Shell oil formulation in laboratory and field condition.

Neem oils were also used for entomopathogenic fungi formulation. However, some oils are less compatible with fungi and can inhibit their effect (Bajan et al., 1998; Hirose et al., 2001; Depieri et al., 2005). Suneem, an emulsionable neem oil manufactured in Senegal, was formulated with *M. anisopliae* against *A. gambiae* adults (Seye et al., 2012). However, the effectiveness of this formulation against larvae in aquatic medium was not investigated. It is therefore, worthwhile to evaluate *M. anisopliae* in emulsible Suneem formulation against *A. gambiae* larvae as potential application method for mosquito control in the field.

The aims of this study is to determine the LD₉₀ of *M. anisopliae* formulated with Suneem on *A. gambiae* larvae in laboratory conditions and to evaluate the efficiency of the LD₉₀ in semi-field area against mosquito adults emergence.

MATERIALS AND METHODS

Mosquito larvae

Larvae were sampled in different areas in the suburbs of Dakar: Thiaroye sur mer (14°44'31"N and 17°23'53"W), Sam-Sam III (14°45'41"N and 17°21'25"W), Pikine rue 10 (14°45'32"N and 17°23'53"W), Pikine Niety Mbar (14°46'04"N and 17°22'32"W) and Guediawaye (14°46'55"N and 17°22'00"W). For each sample, some larvae were separated and identified at the laboratory to confirm the species according to the methods of Hopkins (1852) and Glick (1992). In dry season, mosquitoes were sampled only at Sam-Sam III which presented more breeding sites of anopheline mosquitoes. Sampling sites included various water bodies: streams, irrigation canals, and temporary water. Larvae were collected and transported in jars containing water breeding site. At the laboratory, 3rd and 4th instars were identified and separated to the other. A temperature of 26 ± 2°C and relative humidity of 75 ± 4% was maintained. Larvae collected were used in laboratory and semi-field conditions to evaluate the inhibition of adult emergence.

Fungal formulation

Strain of *M. anisopliae* was isolated from *Oedaleus senegalensis* Krauss (Orthoptera: acrididae), at the Laboratory

of Reproductive Biology. The Neem oil formulation of the fungus used for this analysis has been presented by Seye et al. (2012). The "Suneem" is emulsifiable neem oil formulated with a biodegradable solvent, Tetrahydrofurfuryl Alcohol (THFA). After determination of spore content with a Haemocytometer counter (Thoma model) dilution with 500 ml of sterile distilled water to obtain a final dose of 6×10^7 spores / ml was done. The percent (v/v) of neem oil in formulation was 0.02%

Laboratory tests

100 larvae (50 for both 3rd and 4th instars) were placed in plastic bottle (7×7×10 cm) previously sterilized at 110°C and containing 500 ml distilled water. 5 bottles were used to determine the LD₅₀ and LD₉₀ with the formulation at 4, 6, 8, 10 and 12% (v/v). During bioassays, the larvae were fed with bread powder mixed with fish food "Tetra WaferMix". The dead larvae and possible pupae were removed every 24 h from the bottles. After rinsing three times with distilled water to eliminate non-attached conidia, they were observed individually under magnifying microscope ($\times 400$) to examine the fungal infection (adhesion of conidia or mycelial germination).

Semi-field treatment

The artificial breeding sites were located outside close to the laboratory of the Department of Animal Biology. Treatments were carried for two periods (rainy and dry seasons). Five trial pools with larger containers (50 x 50 x 30 cm) were selected for each treatment. 400 *A. gambiae* larvae were placed in each vat containing rain water (in rainy season) or tap water (in dry season). In dry season, leaf litters from the environmental tests are left in the vats to simulate the water conditions of breeding site which are removed just before placing larvae. Vats were covered with netting cage (50 x 50 x 20 cm) to avoid laying eggs from other mosquito species. Depth of water were conserved at 20 cm at the general breeding sites of *A. gambiae*. The pools were monitored for 24 h before field treatment to allow adaptation of larvae to the new environmental conditions.

With a hand sprayer, into the four vats containing 400 larvae (3rd and 4th instars) the selected dose (LD₉₀) and four others with 0.02% (v/v) of Suneem were applied. Two vats were not treated and served as water controls. Each vat was covered with mosquito netting to trap the adults who will eventually emerge. The cumulative emerged mosquito adults were recorded for 8 days after the treatment when no larvae and pupae are still alive in the vats. The four trials used for each product represent the replicate and the results are an average. The two treatments carried out on either rainy or dry season were done depending on the availability of *A. gambiae* larvae in breeding sites.

Table 1. LD₅₀ and LD₉₀ of *Metarhizium anisopliae* formulated with Suneem against *Anopheles gambiae* larvae in 24 and 48 h at laboratory conditions.

Times (h)	Lethal doses (spores/ml)		R ²	Equation line	P-value
	LD ₅₀	LD ₉₀			
24	4.4 × 10 ⁶	-	0.8337	Y=1.44 x + 0.10	< 0.0001
48	3.1 × 10 ⁶	5.3 × 10 ⁶	0.9757	Y=1.69 x + 1.79	< 0.0001

Data management and statistical analysis

The larval mortality (%) observed in laboratory condition was corrected with Abbott's formula (Abbott, 1925). The relationship between probit and log concentration was established using probit equations to determine the LD₅₀ and LD₉₀ including Statistica 9 software and the relation formular:

$\ln(p/1-p) = \beta_0 + \beta_1 \times \ln(\text{dose})$ (Dagnelie, 1970).
 β_0 and β_1 are the coefficients provided by the software.

For field trials, mean emergence (E) was calculated on the basis of the number of third and forth stage larvae treated. Percent emergence (E %) was calculated using the formula :

(%E = T x 100/C) regarding WHO (WHO, 2005). where T = emergence in treated trial and C = emergence in the control.

T-test was used to assess the efficiency between treated and none treated larvae and between two periods (rainy and dry seasons). Results were considered not statistically different at p > 0.05.

RESULTS

Laboratory tests

At 24 h post treatment with the formulation, LD₅₀ was only obtained at 4.4 × 10⁶ spores/ml. LD₅₀ at 48 h was lower (3.1 × 10⁶) while LD₉₀ was 5.3 × 10⁶ (Table 1). During the laboratory bioassays, few pupae emerged in lower doses but were not able to transform into adults and so die within 24 h.

Microscopic observations

Spores were found on the dead larvae (cuticle, abdomen and the antenna) 24 h after fungal treatment (arrows on Figures 1A and B). The hyphal development was more effective at 48 h (arrows on Figure 1C) and 72 h (Figure 1D) with apparition of germ tube and early hyphal sporulation. Conidial attack was observed on the pupae around the thorax and paddles (Figures 2A and B). This led to the dead of pupae by stopping the processes of adult emergency.

Field treatment

M. anisopliae oil formulation (OF) in semi-field area (Figures 3 and 4) inhibited the emergence of adults mosquitoes. The mosquito collected by emergence traps increased at the control vat for the two treatment periods. This inhibition was more effective with the *M. anisopliae* oil formulation (OF) than with suneem alone (S) or control. After spraying with LD₉₀ (5.3 × 10⁶ spores/ml), the emergence rate at day 8 in the rainy period were 1.25 ± 0.15, 30.25 ± 1.23 and 98 ± 0.76 % for the oil formulation (OF), Suneem (S), and control, respectively. The mean environmental temperatures for water was between 25 and 28°C.

In dry season, the cumulative emergence percent at day 8 were 2.25 ± 0.03, 28 ± 1.07 and 97.25 ± 1.56% for the oil formulation (OF), Suneem (S), and control respectively. Environmental and water temperatures were 27 and 24°C respectively. The percent of adult emergence were not statistically different between rainy and dry seasons (p=0.3). Nevertheless, suneem oil was also effective against adult emergence (Figures 3 and 4).

After treatment, it was found that some dead adults resting on the water surface had fungus germinating around them as well as on some dead larvae and pupae.

DISCUSSION

Currently, entomopathogenic fungus such as *M. anisopliae* against mosquitoes is one of the most promising method in mosquito vector control. The fundamental idea of using *M. anisopliae* in oil formulation against mosquito species, is the pathogenicity regarding infection of larvae or adults. We have recently shown that *M. anisopliae* formulated with suneem (emulsifian oil neem) was effective against *A. gambiae* adults (Seye et al., 2012). In this present study, it was showed that, this formulation is also effective against *A. gambiae* mosquito larvae in laboratory and semi-field conditions. This effectiveness, favored by suneem formulation has been manifested by the inhibition of mosquito emergence at dry and rainy seasons. Also, it was supposed that Suneem used for formulation, protects conidia from adverse environmental conditions and facilitates spray and adhesion to the insect cuticle. Also neem products have already revealed their effectiveness in larvicidal effect (Vatandoost et al. 2004) and pupal death (Seye et al., 2006) even if the percent of Suneem used in

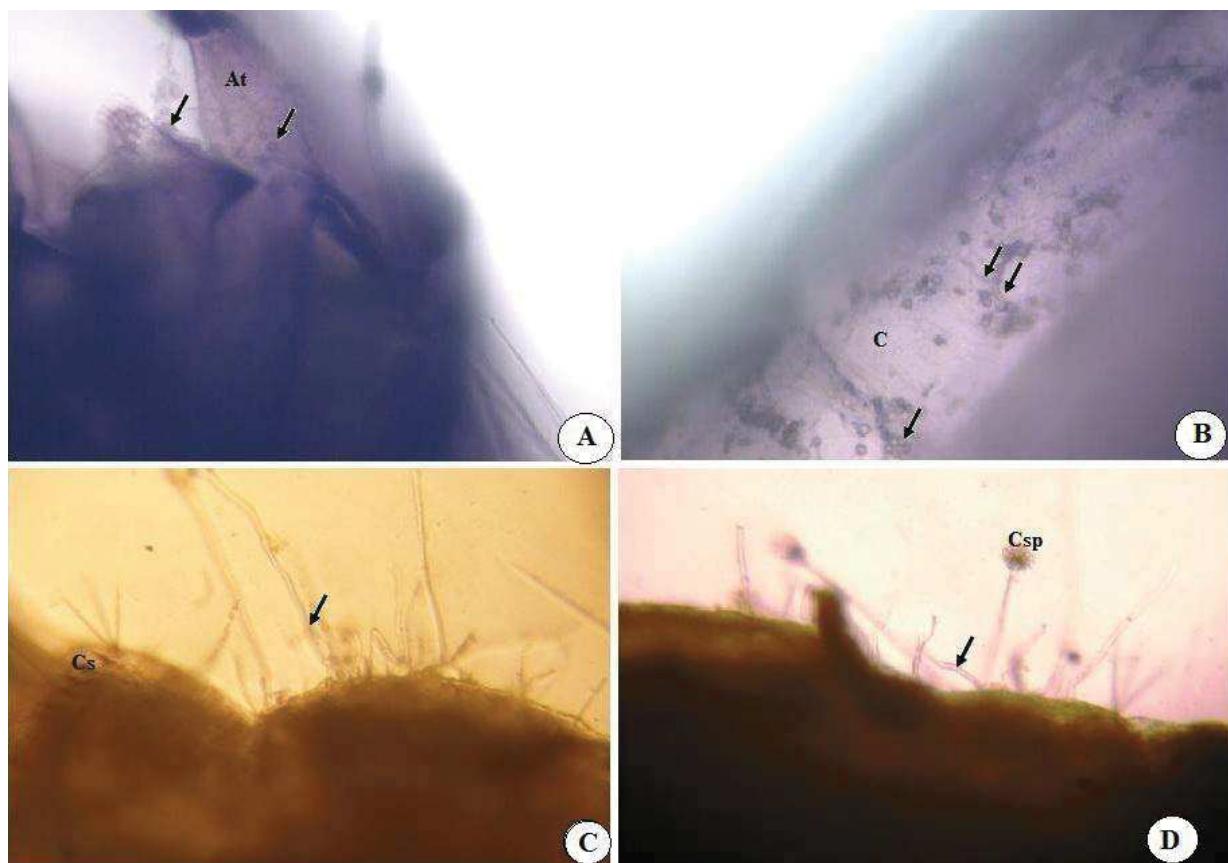


Figure 1. *Anopheles gambiae* larvae infected by *Metarhizium anisopliae* formulated with neem oil (Suneem) 24 h (A and B), 48 h (C) and 72 h (D) after treatment ($\times 400$). C= cuticle, At. = antenna, Csp= conidial spore, Cs= comb. Conidia were adhered (arrows) on the head (A) and abdomen (B) in 24 h. Mycelia germination was observed on the larval cuticle in 48 h and 72 h (arrows).

this present study was lower (0.02%) than emulsible oil above 0.5% used by Depieri et al. (2005). Some authors have found low efficacy from the combination of neem oils with fungi (Bajan et al., 1998; Hirose et al., 2001; Depieri et al., 2005), although not all (Visalakshy et al., 2006; Rodrigues-Lagunes et al., 1997; Seye et al., 2008). But with neem seed extract in concentrations above 2.5%, the fungitoxic effects could be observed (Rodrigues-Lagunes et al., 1997). Therefore, it is possible to formulate entomopathogenic fungi as *M. anisopliae* regarding the neem oil content for insect control. In this context, Sahayaraj et al. (2011) showed useful information on the compatibility between the fungal biological control agents with plant-based insecticides and plant extracts which are commonly used in pest management. Therefore, a combination of entomopathogenic fungi with plant based insecticides may provide also a more sustainable management strategy.

The fungal germination around immature mosquito is very effective against adult emergence. Our results revealed that, the percent of adult emergent was higher in untreated larvae than treated mosquitoes with *M. anisopliae*. Indeed,

the magnifying microscope reveals that, at 24 and 48 h after treatment, larvae were infected by *M. anisopliae* conidia via cuticle attack and mycelium development around the mosquito larvae. This infection was also observed on dead pupae. The 4th stage larvae were not transformed to pupae and were killed during their transformation into pupae or during adult emergence. In our previous study, it was showed that mosquito was infected by the fungi *Aspergillus clavatus* (Desmazières) through direct contacting with the cuticle or by ingestion (Seye et al., 2008). In general, the fungal conidia penetrate the insect cuticle and grow into the haemocoel where they produce a blend of organic compounds, causing internal mechanical damages, nutrient depletion (Gillespie and Clayton, 1989), resulting in mycosis and death (Clarkson and Charnley, 1996). But also, microscope observation revealed that pupal development was arrested resulting in decreased pupal transformation and death. This is consistent with other results (Bukhari et al., 2011).

Even if reduced exposure time can influence the control potential of fungus, the amount of nutrients in the breeding sites and larval density are known to have impact on larval

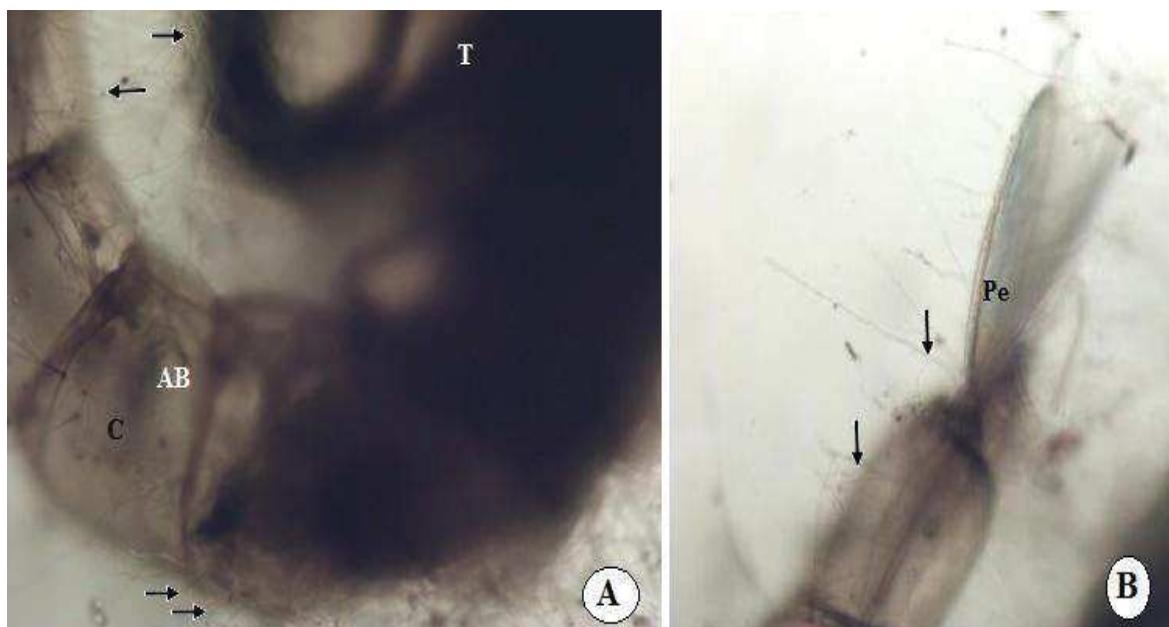


Figure 2. *Anopheles gambiae* pupae infected by *Metarhizium anisopliae* formulated with neem oil (Suneem) 48h after treatment (A and B) (x400). AB= abdomen, C= cuticle, Pe= paddles, T= thorax. Mycelia germination was observed on the pupae (arrows) at the thorax and abdomen.

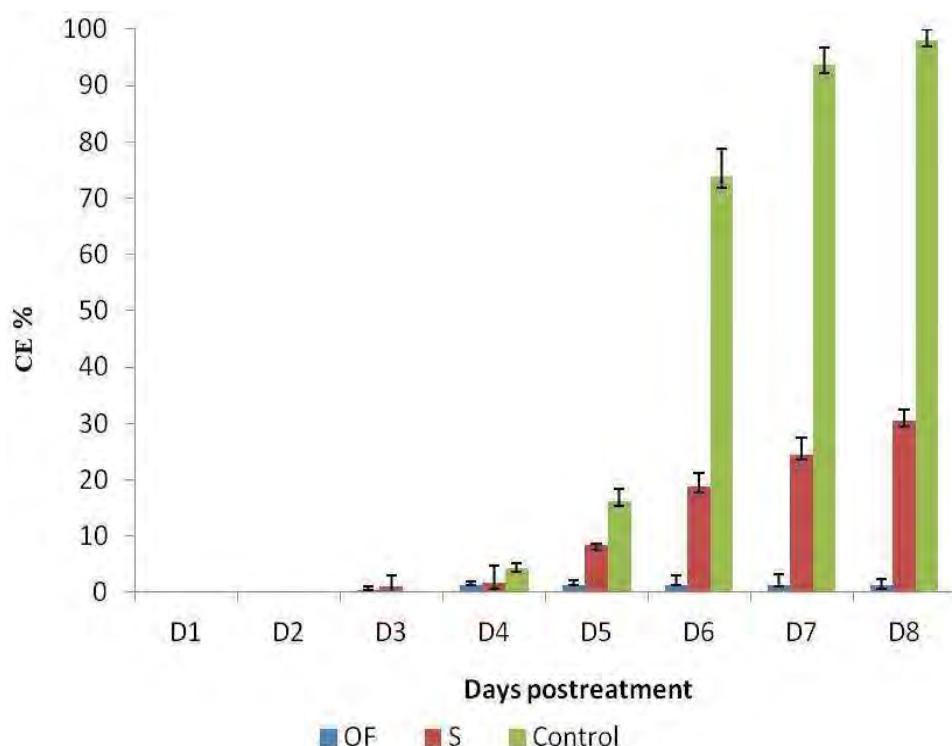


Figure 3. Percent of cumulative emergence of *Anopheles gambiae* s.l. adults treated with *Metarhizium anisopliae* oil formulation in rainy season. The environmental temperature mean was 28 °C and 25 °C for the water vats. Percent of emergence inhibition are more significant with oil formulation than suneem ($P= 0.02$) or control ($P<0.0001$). CE= cumulative emergence, OF= oil formulation, S= Suneem.

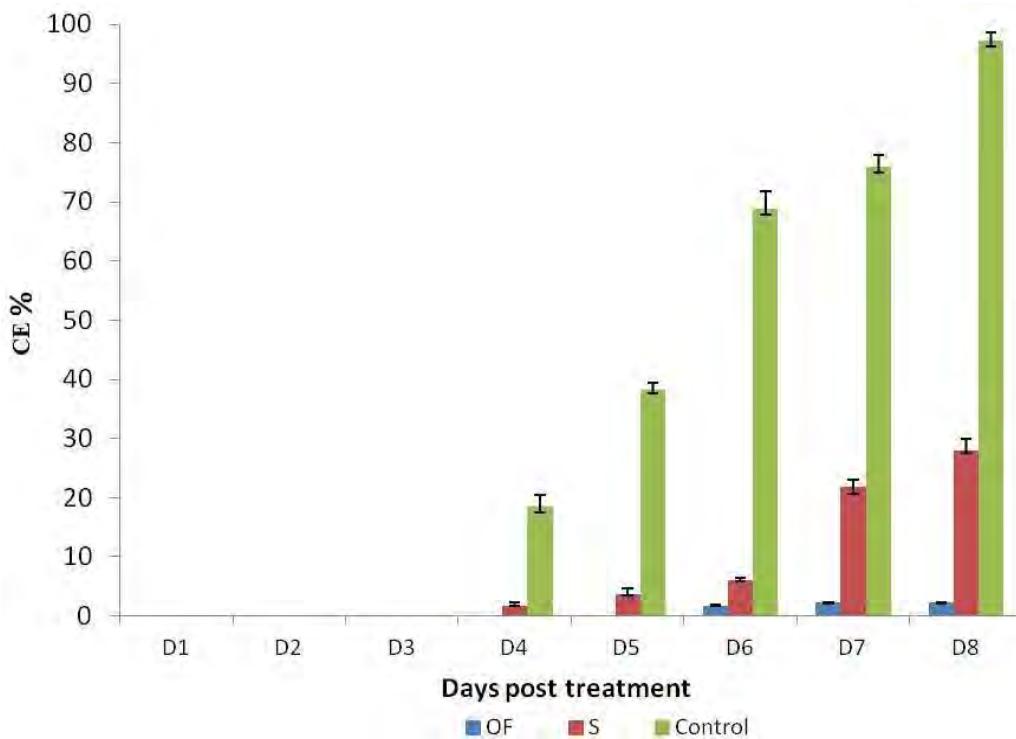


Figure 4. Percent of cumulative emergence of *Anopheles gambiae* s.l. adults treated with *Metarhizium anisopliae* oil formulation in dry season. The environmental temperature mean was 27°C and 24°C for the water vats. T-test reveal that Percent of emergence inhibition are more significant with oil formulation than Suneem ($P=0.04$) or control ($P<0.0001$), CE= cumulative emergence, OF= oil formulation, S=Suneem.

survival (Koenraadt et al., 2004; Bukhari et al., 2011). Pelizza et al. (2007) showed that larvae at higher density showed low mortality due to reduced spore-share per larvae. In our study, the larval density was 0.16 larvae /cm². The formulation with emulsible oil allowed the conidia to be in contact with larvae and to be ingested, it is not in this case that they are applied with the dry formulation, because they clump together in an aquatic environment, reducing the contact area with mosquito larvae at the water surface.

Without protection, fungal spores are sensitive to temperature, humidity and ultraviolet radiation. High relative humidity triggers germination of spores and is therefore likely play a negative role when spores are applied over the water surface (Zimmermann, 2007). But under field conditions, the environmental factors recorded in our study (temperature and relative humidity) were not apparently critical to the fungal pathogenicity. However, the influence of environmental factors needs to be evaluated for conidial tolerance in the formulation. Conidial resistance could be of benefit in field environment for the persistence of the conidia, favoring virulent spores but also along with mosquito adult exposition when female are in oviposition.

In our study, *M. anisopliae* formulated with suneem was effective against *A. gambiae* larvae for both periods (dry

and rainy seasons). The *M. anisopliae* strain used has practically the same effectiveness against *A. gambiae* emergence for both periods.

Thereby, this formulation could be used against mosquito adult and aquatic stages. This will be of benefit for more sustainable management strategy and reduced cost for mosquito vector control and malaria elimination.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by the Ministry of Scientific Research of Senegal in the project program "FIRST" 2008. We thank also the Islamic Development Bank (BID) for the training fellowship in Belgium.

REFERENCES

- Abbott WS (1925). A method of computing the effectiveness of an insecticide. J. Econ. Entomol. 18:265-267.
- Adeogun AO, Olojede JB, Oduola AO, Awolola TS (2012). Village-Scale Evaluation of PermaNet 3.0: an Enhanced Efficacy Combination Long-Lasting Insecticidal Net Against Resistant Populations of *Anopheles gambiae* s.s. Malaria Chemotherapy, Control & Elimination. 1:9.
- Akogbeto M, Yakouboou S (1999). Resistance of malaria vectors to pyrethroids used for impregnated bednets, Benin, West Africa. Bull. Soc.

- pathol. Exot. 92:123-130.
- Bajan C, Kmitowa K, Nowak EP (1998). Reaction of various ecotypes of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* to the botanical preparation NEEMTM and pyrethroid Fastak. Arch. Phytopathol. PFL. 31:369-375.
- Bilal H, Hassan SA, Khan IA (2012). Isolation and efficacy of entomopathogenic fungus (*Metarhizium anisopliae*) for the control of *Aedes albopictus* Skuse larvae: Suspected Dengue Vector in Pakistan, A. P. J.T pp. 1-3.
- Bukhari T, Willem T, Koenraadt CJM (2011). Development of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* formulations for control of malaria mosquito larvae, Parasit. Vectors 4:23.
- Clarkson JM, Charnley AK (1996). New insights into the mechanism of fungal pathogenesis in insects. Trends Microbiol. 4:197-203.
- Dagnelie P (1970). Théorie et méthodes statistiques. Les méthodes d'inférence statistique. Applications agronomiques. Les presses agronomiques de Gembloux, A.S.B.L., éditions J. Duculot, S.A.-Gembloux. Vol. 2.
- Depieri RA, Martinez SS, Menezes JRAO (2005). Compatibility of the Fungus *Beauveria Bassiana* (Bals.) Vuill. (Deuteromycetes) with Extracts of Neem Seeds and Leaves and the Emulsible Oil. Neotropic. Entomol. 34:601-606.
- Fontenille D, Lochouarn L, Diagne N, Sokhna C, Lemasson JJ, Diatta M, Konate L, Faye F, Rogier C, Trape JF (1997). High Annual and Seasonal Variations in Malaria Transmission by Anophelines and Vector Species Composition in Dielmo, a Holoendemic Area in Senegal. Am. J. Trop. Med. Hyg. 56:247-253.
- Gillespie AT, Clayton N (1989). The use of entomopathogenic fungi for pest control and the role of toxins in pathogenesis. Pestic. Sci. 27:203-215.
- Glick JI (1992). Illustrated key to the *Anopheles* of Southwestern Asia and Egypt (Diptera: Culicidae) Mosq. Syst. 24:125-153.
- Hirose E, Neves PMOJ, Zequi JAC, Martins LH, Peralta CH, Moino Jr A (2001). Effect of biofertilizers and neem oil on the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. and *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. Braz. Arch. Biol. Techn. 44:409-423.
- Hopkins GHE (1852). Clés des larves de Culicinae de la région Ethiopienne, 2e édition, Office de la Recherche Scientifique et Technique Outre-mer p. 30.
- Kannan SK, Murugan K, Kumar AN, Ramasubramanian N, Mathiyazhagan P (2008). Adulticidal effect of fungal pathogen, *Metarhizium anisopliae* on malarial vector *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae) Afr. J. Biotech. 7:838-841.
- Koenraadt CJ, Majambere S, Hemerik L, Takken W (2004). The effects of food and space on the occurrence of cannibalism and predation among larvae of *Anopheles gambiae* s.l. Entomol. Exp. Appl. 112:125-134.
- Kweka EJ, Nkya WMM, Mahande AM, Assenga C, Mosha FW, Lyatuu EE, Massenga CP, Nyale EM, Mwakalinga SB, Lowassa A. (2008). Mosquito abundance, bed net coverage and other factors associated with variations in sporozoite infectivity rates in four villages of rural Tanzania. Malaria J. 7:59.
- Mnyone LL, Kirby MJ, Mpwingwa MW, Lwetoijera DW, Knols BGJ, Takken W, Koenraadt CJM, Russell TL (2011). Infection of *Anopheles gambiae* mosquitoes with entomopathogenic fungi: effect of host age and blood-feeding status. Parasitol. Res. 108:317-322.
- Pagès F, Texier G, Pradines B, Gadiaga L, Machault V, Jarjalal F, Penhoat K, Berger F, Trape J-F, Rogier C, Sokhna C (2008). Malaria transmission in Dakar: A two-year survey. Malaria J. 7:178.
- Pelizza SA, Lopez Lastra CC, Becnel JJ, Bisaro V, Garcia AJ (2007). Biotic and Abiotic Factors Affecting *Leptolegnia chapmanii* Infection in *Aedes aegypti*. J. Am. Mosq. Control Assoc. 23:177-181.
- Robert V, Macintyre K, Keating J, Trape JF, Duchemin JB, Warren M, Beier JC (2006). Malaria transmission in urban sub-saharan Africa. Am. J. Trop. Med. Hyg. 68:169-176.
- Rodrigues-Lagunes DA, Tejedo AL, Diaz DR, Maciel CR, Mendoza JV, Roman EB, Colorado SR, Velasco EP (1997). Compatibilidad de *Beauveria bassiana* y extractos acuosos de nim (*Azadirachta indica*) para el control de la broca del cafeto (*Hypothenemus hampei*). Man. Integr. Plagas. 44: 14-19.
- Sahayaraj K, Namasivayam SKR, Rathi JM (2011). Compatibility of entomopathogenic fungi with extracts of plants and commercial botanicals. Afr. J. Biotechnol. 10:933-938.
- Scholte EJ, Knols BGJ, Takken W (2004). Autodissemination of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* amongst adults of the malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. Malaria J. 3:45.
- Scholte EJ, Njiru BN, Smallegange RC, Takken W, Knols BGJ (2003). Infection of malaria (*Anopheles gambiae* s.s.) and filariasis (*Culex quinquefasciatus*) vectors with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. Malaria J. 2:29.
- Scholte EJ, Knols BGJ, Takken W (2006). Infection of the malaria mosquito *Anopheles gambiae* with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* reduces blood feeding and fecundity. J. invert. Pathol. 91:43-49.
- Seye F, Faye O, Ndiaye M, Njie I, Afoutou JM (2009). Pathogenicity of the fungus, *Aspergillus clavatus*, isolated from the locust, *Oedaleus senegalensis*, against larvae of the mosquitoes *Aedes aegypti*, *Anopheles gambiae* s.l. and *Culex quinquefasciatus*. J. Insect. Sci. 9:7.
- Seye F, Ndiaye M, Faye O, Afoutou JM (2012). Evaluation of Entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* Formulated with Suneem (Neem Oil) against *Anopheles gambiae* s.l. and *Culex quinquefasciatus* Adults, Malaria Chemotherapy, Control & Elimination 1:6.
- Seye F, Ndiaye M (2008). Compatibilité entre *Aspergillus clavatus* (Hyphomycetes) et l'huile de neem (*Azadirachta indica*) contre le moustique vecteur de filarioses *Culex quinquefasciatus* (Say, 1823) (Diptera : Culicidae). Bacteriol., Virusol. Parasitol. Epidemiol. 53:43-48.
- Seye F, Ndione RD, Ndiaye M (2006) - Étude comparative de deux produits du neem (Huile et Poudre) sur les stades pré-imaginaires du moustique *Culex quinquefasciatus* (Diptera : Culicidae), Afrique Sci. 2:212-225.
- Talani P, Samba G, Moyen G (2005). Control of malaria disease with impregnated mosquito net: case of makelekele area in Brazzaville. Médecine d'Afrique noire 52:687-690.
- Vatandoost H, Vaziri VM (2004). Larvicidal activity of a neem tree extract (Neemarin) against mosquito larvae in the Islamic Republic of Iran, E M H J, 10:4-5.
- Visalakshy GPN, Krishnamoorthy A, Kumar AM (2006). Compatibility of plant oils and additives with *Paecilomyces farinosus*, a potential entomopathogenic fungus. Internat. J. food agric. environ. 4:333-335
- Weill M, Duron O, Labbé P, Berthomieu A, Raymond R (2003). Molecular clues to the insecticide resistance of mosquitoes. M/S: Méd. Sci. 19:1190-1192
- WHO (2005). Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides WHO/CDS/WHO/PES/GCDPP/2005.13
- Zimmermann G (2007). Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. Biocontrol Sci. Technol. 17:879-920.

Cite this article as:

Seye Fawrou, Ndione Raymond Demba, Touré Mamour, Ndiaye Mady, Boukraa Slimane, Bawin Thomas, Zimmer Jean-Yves and Francis Frédéric (2013). Effect of humic and application at different growth stages of kinnow mandarin (*Citrus reticulata blanco*) on the basis of physio-biochemical and reproductive responses. Acad. J. Biotechnol. 1(1): 046-052.

Submit your manuscript at
<http://www.academiapublishing.org/ajar>

Original Article

Pathogenicity of *Aspergillus clavatus* produced in a fungal biofilm bioreactor toward *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae)

Fawrou SEYE,^{1,2,†} Thomas BAWIN,^{2,*†} Slimane BOUKRAA,² Jean-Yves ZIMMER,²
Mady NDIAYE,¹ Frank DELVIGNE³ and Frédéric FRANCIS²

¹ Laboratory of Reproductive Biology, Department of Animal Biology, Faculty of Science and Technology, University Cheikh Anta Diop, P.O. Box-5005, Dakar Fann, Senegal

² Functional and Evolutionary Entomology, Gembloux Agro-Bio Tech, University of Liege, Passage des Déportés 2, P.O. Box-5030 Gembloux, Belgium

³ Bio-Industries/C.W.B.I., Gembloux Agro-Bio Tech, University of Liege, Passage des Déportés 2, P.O. Box B-5030 Gembloux, Belgium

(Received January 21, 2014; Accepted May 18, 2014)

Many entomopathogenic fungi have been demonstrated to be potential agents for efficiently controlling mosquito populations. In the present study, we investigated a bioreactor system to produce metabolites and conidia by combining technological advantages of submerged and solid-state fermentations. The efficiency of fungal products was tested toward mosquitoes. *Aspergillus clavatus* (Eurotiales: Trichocomaceae) was grown by semi-solid-state fermentation in a bioreactor for up to 7 days. Depending on conidial doses (2.5×10^7 , 5×10^7 , 7.5×10^7 , 10×10^7 and 12.5×10^7 conidia/mL), mortality ranged from 37.2 ± 15.0 to $86.3 \pm 5.0\%$ toward larvae and from 35.8 ± 2.0 to $85.2 \pm 1.5\%$ toward adults. The metabolites (10, 20, 40, 60, 80 and 100% v/v) yielded mortality from 23.7 ± 15.0 to $100.0 \pm 0.1\%$ toward larvae, and two sprayed volumes (5 and 10mL) reached 45.5 ± 1.4 and $75.6 \pm 2.6\%$ mortality, respectively, toward adults. © Pesticide Science Society of Japan

Keywords: biological control, entomopathogenic fungi, *Aspergillus clavatus*, biofilm bioreactor, solid-state fermentation, submerged fermentation.

Introduction

Mosquitoes (Diptera: Culicidae) are permanent blood sucking vectors of diseases such as dengue, filariasis, and malaria. Many mosquito species and strains are resistant to insecticides commonly used for their control. Biological agents have become increasingly attractive alternative for mosquito control. Among potential microorganisms, entomopathogenic fungi have been used and have provided most interesting results in several pest controls. Conidia are classically applied, but toxic metabolites have also been produced in liquid medium and used against mosquitoes.^{1,2)} *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* are promising alternatives to conventional insecticides for eliminating mosquito vectors.^{3,4)} Recently, many *Aspergillus* species have commonly been used against mosquitoes.^{5,6)} The larvicidal effect of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* metabolites for controlling *Culex quinquefasciatus* has been shown.⁷⁾ *Aspergillus clavatus* conidia have also been demonstrated to be

efficient against mosquitoes.^{8,9)} The possibility of using *Aspergillus niger* metabolites against *Cx. quinquefasciatus*, *Anopheles stephensi* and *Aedes aegypti* larvae has also been shown.¹⁰⁾

The development of a reliable and efficient fermentation system for large-scale production of insecticidal products is still needed. Classical submerged fermentation of filamentous microorganisms in aqueous suspensions may impair the production of conidia and metabolites of biotechnological interest.^{11–13)} By contrast, solid-state fermentation is a promising alternative since conidia and metabolites are generally produced in higher quantities when these microorganisms are produced on a solid substrate.^{11–16)} For example, *Aspergillus oryzae* has been reported to produce a 500-fold higher yield of recombinant chymosin in solid-state fermentation than in submerged fermentation.¹⁷⁾ In this context, efficient utilization of agro-industrial residues as carbon sources has been shown for the mass production of entomopathogenic fungi.^{18–21)} However, the absence of free water induces parameter variations (such as pH, temperature, moisture, dissolved oxygen or CO₂) that are difficult to control. A complementarity method between solid- and liquid-state fermentations has been attempted in sequential culture.²²⁾

A fungal biofilm reactor combining the technological advantages of submerged fermentation (i.e., free water facilitating the control of culture parameters) with the biological characteris-

† These authors contributed equally to this work.

* To whom correspondence should be addressed.

E-mail: entomologie.gembloux@ulg.ac.be

Published online August 14, 2014

© Pesticide Science Society of Japan

tics found in solid-state fermentation has been established in the present study. Insecticidal activity of conidia and metabolites secreted by an entomopathogenic *A. clavatus* strain in this culture system was shown against *Cx. quinquefasciatus* larvae and adults.

Materials and Methods

1. Fungal strain

An *A. clavatus* (Eurotiales: Trichocomaceae) strain isolated from the locust cricket *Oedaleus senegalensis* (Orthoptera: Acrididae) at the Laboratory of Reproductive Biology of the University Cheikh Anta Diop (Dakar, Senegal) and shown to be pathogenic against *Anopheles gambiae*, *Ae. aegypti* and *Cx. quinquefasciatus* larvae⁹ was used (accession number MUCL 55275, Belgian Coordinated Collections of Microorganisms, Mycothèque de l'Université Catholique de Louvain (Belgium)). This strain was cultivated on potato dextrose agar (PDA) in Petri dishes and stored at 4°C.

2. Inoculum

As a preculture, *A. clavatus* mycelia were produced in Erlenmeyer conical flasks (500 mL) containing 300 mL of distilled water, 1% peptone, 1% yeast extract and 2% glucose sterilized at 120°C for 20 min. These cultures were incubated after inoculation for 48 hr on a rotary shaker at 140 rpm and 30°C to produce fungal pellets.

3. Metal structured packing for fungal sporulation

To facilitate pellets fixation and fungal sporulation in a bioreactor, a metal packing was molded. Packing is a cylinder composed of several stainless steel corrugated sheets independent of each other, as previously described.²³ For packing, 28 metal rectangular plates (16×16 to 2×16 cm) with a 2-mm mesh were cut for assembly. The plates were superimposed symmetrically in pairs following the decreasing width of the rectangle in order to form a cylinder approximately 16 cm in diameter. All were then surrounded by a broad plate to form a block of cylindrical packages 16 cm in height and 16 cm in diameter. One of the bases was covered by a circular metal to prevent solid substrates from falling into the liquid medium.

4. Bioreactor system

The fermentation run was carried out in a 20-L bioreactor with 6-L working volume. Wheat bran (200 g) was introduced as a carbon source in the cylinder between the metal plates of the packing, which was suspended in the Biolafitte bioreactor (Fig. 1). Peptone and yeast extract (60 g each) were previously introduced in the total working volume of the reactor containing 6 L of distilled water and 0.05 g/L chloramphenicol as a bacteriostatic agent. The preparation was autoclaved at 120°C. The preculture was aseptically injected into the bioreactor using a syringe. With a peristaltic pump (120 rpm), the culture medium was continuously stirred (connections made with silicone tubing with an internal diameter of 5 mm) and injected on the packing

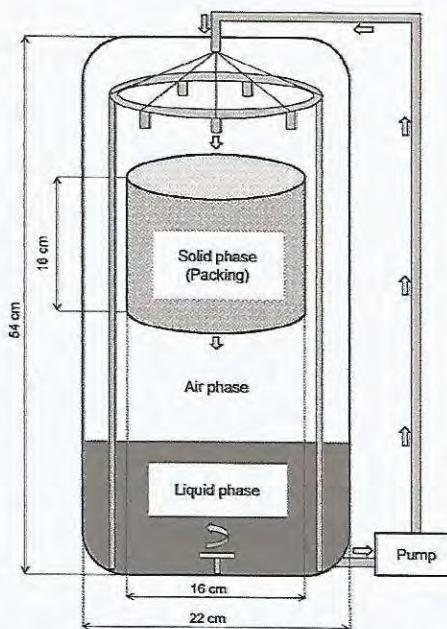


Fig. 1. Schematic diagram of a 20-L bioreactor system with metal packing. The packed structure (16 cm height×16 cm diameter) consisted of a stainless steel cylinder composed of several independent rectangular plates surrounded by a broad plate. The cylinder was closed at the bottom by a circular plate. Uniform liquid media were ensured by mixing. The pump drew the liquid containing the fungal pellets provided from a preculture, and injected them into the packing containing wheat bran as a solid substrate. Biomass immobilization was ensured to avoid liquid viscosity.

containing wheat bran. The mycelial pellets were then carried out with the liquid medium and fixed to the molded system. The temperature was maintained at 30°C by circulating temperature-controlled water. Air was continuously supplied to the bioreactor at 3 L/min. The pH was allowed to vary freely and was recorded continuously. Cultivation was carried out for 7 days.

5. Conidia recovery

After incubation, the packing that contained fungal conidia and biomass was removed, and the liquid medium was stored at -80°C. The packing was washed with an aqueous solution containing 0.05% Tween 80 (0.05% Tween 80 solution) to detach the conidia. The washing solution was then filtered to discard impurities and centrifuged (4°C, 3,000 g, 5 min). The conidia were finally suspended in a 0.05% Tween 80 solution and the dose was adjusted to 10⁹ conidia per mL using a hemocytometer (Thoma®).

6. Filtration of metabolites

Liquid medium from the bioreactor was centrifuged (4°C, 7,500 g, 30 min) to eliminate impurities. Medium was then filtered with ultrafiltration membranes (Prep/Scale-TFF-1 Cartridge (Millipore) 5.8 cm in diameter and 15.2 cm long with polyethersulfone membrane filtration (column 1 ft² cartridge))

to remove unconsumed nutrients from the culture medium. Final concentrated metabolites (800 mL) with high molecular weight products ($MW > 100,000$) were obtained and stored at -80°C .

7. Mosquito rearing

Cx. quinquefasciatus (S-Lab) adults were reared in 50- \times 50- \times 50-cm cages and fed with a 10% sucrose solution. Blood meal was made using the Hemotek feeding system. Larvae were maintained in distilled water (25- \times 15- \times 5-cm containers) in laboratory conditions ($25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, $70 \pm 5\%$ relative humidity, and 16:8 hr (Light:Dark) photoperiod) and fed with fish food (TetraMin®) and natural brewer's yeast tablets (Biover®).

8. Bioassays

8.1 Larval treatment

First, groups of 20 third-instar larvae were exposed to conidial doses of 2.5×10^7 , 5×10^7 , 7.5×10^7 , 10×10^7 and 12.5×10^7 conidia/mL in separate bottles for 3 days. Control larvae were maintained in 0.05% Tween 80 solution. Second, larvae were exposed to serial dilutions (10, 20, 40, 60, 80, and 100% (v/v)) of concentrated metabolites with distilled water for 3 days. Control larvae were maintained in distilled water. All larvae were fed with the same food as used for rearing.

8.2 Adult treatment

Conidia were formulated with 5% sunflower oil (v/v) in 0.05% Tween 80 solution. The same conidial suspension series used against larvae were directly sprayed on a total of 20 three- and five-day-old sugar-fed adults that were transferred in 25- \times 25- \times 25-cm mosquito netting cages and kept for 3 days. For control, a 0.05% Tween 80 solution containing 5% sunflower oil (v/v)

was sprayed on the adults. In parallel, 5 and 10 mL of concentrated metabolites were sprayed directly on the groups of 20 adults previously introduced into separate cages and kept for 3 days. For control, distilled water was sprayed on the adults.

8.3 Statistical analysis

Four replicates were performed for each treatment for different durations with new independent fermentation products. Mortality was recorded daily for three days and corrected using Abbott's formula.²⁴ Dead larvae were removed, rinsed with sterile distilled water to eliminate non-attached conidia, and examined under a microscope for fungal infection. Dead larvae and adults were incubated in Petri dishes containing wet filter paper to monitor the conidial germination. All experiments were done in laboratory conditions with $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ temperature and a 16-hr light photoperiod.

Results

1. Pathogenicity of conidia on *Culex quinquefasciatus*

Conidia were effective against *Cx. quinquefasciatus* larvae and adults. The percentage of larval mortality increased with increasing conidial concentration and ranged from 37.2 ± 15.0 to $86.3 \pm 5.0\%$ for 72 hr of treatment (Table 1). Adult mortality ranged from 35.8 ± 2.0 to $85.3 \pm 1.5\%$ after 72 hr post-inoculation (Table 2). Conidial adhesion to the larval cuticle was not observed. Nevertheless, conidia ingested by larvae during bioassays invaded the larval gut, germinated, and emerged thereafter from dead larvae (Fig. 2A–C). By contrast, the conidia penetrated the adult mosquito's cuticle before emerging (Fig. 2D).

2. Toxicity of metabolites on *Culex quinquefasciatus*

Metabolites produced by *A. clavatus* in a bioreactor showed tox-

Table 1. Mortality of *Culex quinquefasciatus* larvae treated with *Aspergillus clavatus* conidia produced in bioreactor*

Treatment time	Conidial concentration (10^7 conidia/mL)				
	2.5	5	7.5	10	12.5
Cumulative mortality (%) \pm SD					
24 hr	15.8 \pm 14.0	17.1 \pm 17.0	30.3 \pm 20.0	38.2 \pm 15.0	60.5 \pm 15.0
48 hr	25.0 \pm 6.0	35.5 \pm 22.0	42.1 \pm 30.0	47.4 \pm 9.0	77.6 \pm 13.0
72 hr	37.2 \pm 15.0	55.3 \pm 5.0	65.8 \pm 9.0	73.8 \pm 6.0	86.3 \pm 5.0

* Values are average corrected mortality (%) \pm standard deviation (SD).

Table 2. Mortality of *Culex quinquefasciatus* adults treated with *Aspergillus clavatus* conidia produced in bioreactor*

Time after inoculation	Conidial concentration (10^7 conidia/mL)				
	2.5	5	7.5	10	12.5
Cumulative mortality (%) \pm SD					
24 hr	20.0 \pm 3.0	20.0 \pm 4.0	24.8 \pm 2.0	28.3 \pm 8.0	37.5 \pm 1.0
48 hr	25.8 \pm 5.0	55.7 \pm 2.0	50.0 \pm 0.2	60.0 \pm 3.1	75.7 \pm 0.8
72 hr	35.8 \pm 2.0	56.5 \pm 0.9	65.5 \pm 0.7	75.0 \pm 14.0	85.3 \pm 1.5

* Values are average corrected mortality (%) \pm standard deviation (SD).

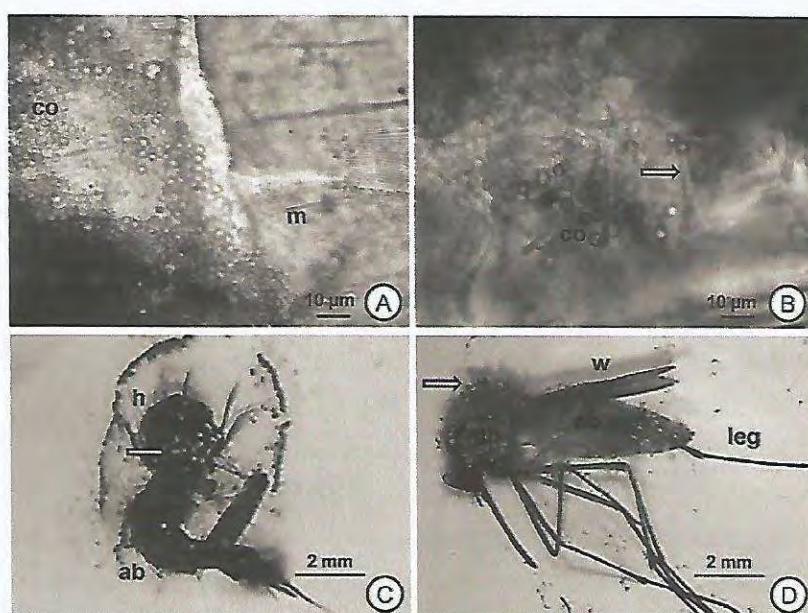


Fig. 2. *Culex quinquefasciatus* larvae and adults infected with *Aspergillus clavatus* cultivated in the bioreactor system. Conidia (A) were observed within the larval gut after 24 hr of treatment. Germ tube (arrow) and filaments within the larval gut (B), and conidial heads (arrow) on the larval cadavers (C) were observed 72 hr after treatment. Conidial formation was observed on the thorax (arrow), legs, and wings of the adults 72 hr post-inoculation (D). co: conidia, m: muscle, h: head, ab: abdomen, th: thorax and: wing.

Table 3. Effect of *Aspergillus clavatus* metabolites on *Culex quinquefasciatus* larvae*

Treatment time	Concentration of metabolites (%)					
	10	20	40	60	80	100
Cumulative mortality (%)\pmSD						
24 hr	2.6 \pm 3.0	22.4 \pm 16.0	27.6 \pm 10.0	67.1 \pm 8.0	76.3 \pm 6.0	93.4 \pm 5.0
48 hr	11.8 \pm 13.0	26.3 \pm 15.0	38.2 \pm 15.0	73.7 \pm 4.0	78.9 \pm 4.0	97.4 \pm 3.0
72 hr	23.7 \pm 15.0	39.5 \pm 27.0	55.3 \pm 5.0	76.3 \pm 6.0	82.9 \pm 2.0	100.0 \pm 0.1

* Values are average corrected mortality (%) \pm standard deviation (SD).

Table 4. Effect of *Aspergillus clavatus* metabolites on *Culex quinquefasciatus* adults*

Time after treatment	Sprayed doses of metabolites (mL)	
	5	10
Cumulative mortality (%)\pmSD		
24 hr	7.7 \pm 0.1	18.5 \pm 0.2
48 hr	40.1 \pm 2.0	65.3 \pm 3.6
72 hr	45.5 \pm 1.4	75.6 \pm 2.6

* Values are average corrected mortality (%) \pm standard deviation (SD).

icity against *Cx. quinquefasciatus* larvae and adults. The mortality increased with increasing metabolite concentration and ranged from 23.7 \pm 15.0 to 100.0 \pm 0.1% for larvae after 72 hr post-treatment (Table 3) and 45.5 \pm 1.4 to 75.6 \pm 2.6% for adults after 72 hr of treatment (Table 4).

Discussion

The system developed in this work shows the possibility to produce simultaneously, with controlled parameters, two kinds of *A. clavatus* products: conidia and metabolites in a bioreactor. The substrate contained in the metal packing allowed for efficient growth of the fungal biomass, which sporulated. The liquid media allowed for easy recovery of metabolites secreted by the fungal biomass. Moreover, the biomass remained confined on the substrate and did not increase the viscosity of the liquid medium. The present process highlights the possibility to control the parameters of metabolites and conidia production for further study. Homogenization of the physical traits in the packed structure (pH, oxygen, temperature), as well as their impact on conidia and metabolites production, must be investigated. Other entomopathogenic fungi, such as *M. anisopliae* and *B. bassiana*, could also be cultivated in this bioreactor system for industrial

production.

Conidia and metabolites were both found to be effective for controlling *Cx. quinquefasciatus* larvae and adults. Unexpectedly, conidia cultivated on wheat bran were not strongly pathogenic toward *Cx. quinquefasciatus* larvae as compared with approximately the same dose of conidia cultivated on wheat powder.⁹ Less virulence may be related to the kind of substrate used for fungal production as previously discussed.²⁵ However, the pathogenicity of the conidia toward adult mosquitoes was not decreased as compared with previous results, where $86.0 \pm 1.7\%$ mortality at day 5 was obtained with 7.9×10^7 conidia/mL.⁸ The sunflower oil used for the fungal formulation facilitated the conidial adhesion on the adult cuticle as Neem oil against *Cx. quinquefasciatus*.⁹ The observation of dead adults and larvae confirmed that the mosquito mortality was due to the conidia that, respectively, adhered to and penetrated the cuticle or invaded the larval gut. In the latter case, larval death may be due to toxins secreted during germination in the gut of larvae, as the digestive tract was previously reported to be a significant infection site.^{26,27}

Our results are similar to those of other studies that showed the toxicity of fungal metabolites against mosquitoes.^{2,28,29} *A. clavatus* metabolites were found to be toxic toward adults and larvae with significant mortality rates after 72 hr. Regarding the application approach, metabolites could act by contact with adults and also by ingestion by larvae. Another study revealed that metabolites of fungi, such as *Tolyphocladium inflatum* (Hypocreales: Ophiocordycipitaceae), could attack mosquito larvae and be the main cause of histopathological damages.³⁰ *A. clavatus* germination was associated with the secretion of some toxins.^{31–33} These suggest that metabolites produced by the fungus act on mosquito tissues including the midgut of larvae.^{9,30,34} These metabolites must be purified and their chemical structure identified. Moreover, the mechanism of the action of these metabolites must be defined on non-target organisms before their use for general biocontrol in the field.

Conclusion

The present study shows the high potential utility of fungal production in a liquid phase continuously recirculated on a metal structured packing in a bioreactor. This new system was developed for fungal growth and metabolite production, combining the technological advantages of submerged and solid-state fermentations. The process allowed facility in recuperation and purification of conidia (confined on the solid substrate) and metabolites (contained in the liquid medium). *A. clavatus* conidia and metabolites were virulent and could be a promising alternative to chemical control of mosquito larvae and adults. Therefore, it is necessary to isolate and show the effect on non-target organisms before use. These results also highlight the possibility to control the culture parameters for further studies. The homogenization of these physical traits in the packed structure, as well as their impact on conidia and metabolites production, must now be investigated.

Acknowledgements

The authors thank the Islamic Development Bank who supported this work via a post-doctoral fellowship to Fawrou Seye for High Technology in Gembloux Agro-Bio Tech (University of Liege).

References

- S. S. Mohanty, K. Raghavendra, P. K. Mittal and A. P. Dash: *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **35**, 1199–1202 (2008).
- G. Singh and S. Prakash: *J. Parasitol. Res.* **2011**, 147373 (2011).
- E. J. Scholte, K. Ng'habi, J. Kihonda, W. Takken, K. Paaijmans, S. Abdulla, G. F. Killeen and B. G. Knols: *Science* **308**, 1641–1642 (2005).
- C. K. Kikankie, B. D. Brooke, B. G. Knols, L. L. Koekemoer, M. Far-enhorst, R. H. Hunt, M. B. Thomas and M. Coetzee: *Malar. J.* **9**, 71 (2010).
- A. M. de Moraes, G. L. da Costa, M. Z. Barcellos, R. L. de Oliveira and P. C. de Oliveira: *J. Basic Microbiol.* **41**, 45–49 (2001).
- N. Abutaha, F. A. Al-Mekhlafi, A. Semlali, A. Baabbar and M. A. Wadaan: *Res. J. Biotechnol.* **9**, 84–89 (2014).
- M. Govindarajan, A. Jebanesan and D. Reetha: *Trop. Biomed.* **22**, 1–3 (2005).
- F. Seye and M. Ndiaye: *Bacteriol. Virusol. Parazitol. Epidemiol.* **53**, 43–48 (2008).
- F. Seye, O. Faye, M. Ndiaye, E. Njie and J. M. Afoutou: *J. Insect. Sci.* **9**, 1–7 (2009).
- N. Soni and S. Prakash: *Am. J. Microbiol.* **2**, 15–20 (2011).
- M. Raimbault: *Electron. J. Biotechnol.* **1**, 114–140 (1998).
- U. Höller, M. Höfer and J. Lenz: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **64**, 175–186 (2004).
- J. Barrios-Gonzales: *Process Biochem.* **47**, 175–185 (2012).
- B. Dorta, R. J. Ertola and J. Arcas: *Enzyme Microb. Technol.* **19**, 434–439 (1996).
- T. Arzumanov, N. Jenkins and S. Roussos: *Process Biochem.* **40**, 1037–1042 (2005).
- G. V. S. B. Prakash, V. Padmaja and R. R. S. Kiran: *Bioresour. Technol.* **99**, 1530–1537 (2008).
- K. Tsuchiya, T. Nagashima, Y. Yamamoto, K. Gomi, K. Kitamoto, C. Kumagai and G. Tamura: *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **58**, 895–899 (1994).
- H. S. D. Santa, O. R. D. Santa, D. Brand, L. P. D. S. Vandenberghe and C. R. Soccol: *Braz. Arch. Biol. Techn.* **48**(spe), 51–60 (2005).
- K. Sahayaraj and S. K. R. Namasisavayam: *Afr. J. Biotechnol.* **7**, 1907–1910 (2008).
- A. A. Assamoi, J. Destain and P. Thonart: *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **13**, 281–294 (2009).
- F. R. van Breukelen, S. Haemers, R. Wijffels and A. Rinzema: *Process Biochem.* **46**, 751–757 (2011).
- A. D. Burges and N. W. Hussey (eds.): "Microbial Control of Insect Pests and Mite," Academic Press, London, 1981.
- Q. Zune, D. Soyeurt, D. Toye, M. Ongena, P. Thonart and F. Delvigne: *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **89**, 382–390 (2014).
- W. S. Abbott: *J. Econ. Entomol.* **18**, 265–267 (1925).
- F. A. Shah, C. S. Wang and T. M. Butt: *FEMS Microbiol. Lett.* **251**, 259–266 (2005).
- C. M. Lacey, L. A. Lacey and D. R. Roberts: *J. Invertebr. Pathol.* **52**, 108–118 (1988).
- G. S. Miranpuri and G. G. Khachatourians: *Entomol. Exp. Appl.* **59**, 19–27 (1991).
- N. Vyas, K. K. Dua and S. Prakash: *Parasitol. Res.* **101**, 385–390 (2004).

- (2007).
- 29) G. Singh and S. Prakash: *Scientific World Journal*. doi: 10.1100/2012/603984 (2012).
- 30) J. Weiser, V. Matha, Z. Zizka and A. Jegorov: *Cytobios* **69**, 179–186 (1992).
- 31) F. Bergel, A. L. Morrison, A. R. Moss and H. Rinderknecht: *J. Chem. Soc.*, 415–421 (1944).
- 32) T. M. Lopez-Diaz and B. Flannigan: *Int. J. Food Microbiol.* **35**, 129–136 (1997).
- 33) M. Sabater-Vilar, R. F. M. Maas, H. De Bosschere, R. Ducatelle and J. Fink-Gremmels: *Mycopathologia* **158**, 419–426 (2004).
- 34) A. Vey and J. M. Quiot: *Can. J. Microbiol.* **35**, 1000–1008 (1989).

Effect of entomopathogenic *Aspergillus* strains against the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum* (Hemiptera: Aphididae)

Fawrou Seye · Thomas Bawin · Slimane Boukraa ·
Jean-Yves Zimmer · Mady Ndiaye ·
Frank Delvigne · Frédéric Francis

Received: 27 December 2013 / Accepted: 11 May 2014 / Published online: 6 June 2014
© The Japanese Society of Applied Entomology and Zoology 2014

Abstract Aphids (Homoptera: Aphididae) are sap-sucking insect pests that feed on several plants of agronomical importance. Entomopathogenic fungi are valuable tools for potential aphid control. As part of a selection process, laboratory bioassays were carried with five different concentrations of *Aspergillus clavatus* (Desmazières), *Aspergillus flavus* (Link) and *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin spores against the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum* (Harris). *Aspergillus* isolates induced higher mortalities than *M. anisopliae*, which is a well-known entomopathogen in the literature. Lethal

concentrations (LC_{50} and LC_{90}) were 1.23×10^3 and 1.34×10^7 spores/ml for *A. flavus*, 4.95×10^2 and 5.65×10^7 spores/ml for *A. clavatus*, and 3.67×10^3 and 9.71×10^7 spores/ml for *M. anisopliae* 5 days after treatment. Mycelia development and sporulation on adult cadavers were observed 48 h after incubation. The intrinsic growth rate of *A. pisum* decreased with increased spore concentration for all fungal strains, suggesting an increase in pathogen fitness related to a consumption of host resources. In conclusion, *Aspergillus* species could be useful in aphid control as pest control agents despite their saprophytic lifestyle. This is also to our knowledge the first report of *A. clavatus* and *A. flavus* strains pathogenic to aphids.

F. Seye and T. Bawin contributed equally to the manuscript.

F. Seye · T. Bawin (✉) · S. Boukraa · J.-Y. Zimmer
Functional and Evolutionary Entomology, Gembloux Agro-Bio Tech, University of Liege, Passage des Déportés 2, 5030 Gembloux, Belgium
e-mail: entomologie.gembloux@ulg.ac.be

F. Seye
e-mail: fawrou@yahoo.fr

S. Boukraa
e-mail: s.boukraa@doct.ulg.ac.be

J.-Y. Zimmer
e-mail: jean-yves.zimmer@ulg.ac.be

F. Seye · M. Ndiaye · F. Francis
Reproductive Biology, Science and Technology Faculty, University Cheikh Anta Diop, 5005 Fann, Dakar, Senegal
e-mail: mydya2001@yahoo.fr

F. Francis
e-mail: frederic.francis@ulg.ac.be

F. Delvigne
Bio-Industries/CWBI, Gembloux Agro-Bio Tech, University of Liege, Passage des Déportés 2, 5030 Gembloux, Belgium
e-mail: f.delvigne@ulg.ac.be

Keywords Aphid · *Aspergillus* · *Metarhizium* · Entomopathogenic fungi · Biological control

Introduction

The *Acyrtosiphon pisum* (Harris) aphid (Homoptera: Aphididae), also called pea aphid, is a pest of many cultivated and wild plants such as the worldwide crop *Vicia faba* (L.), limiting their growth. These aphids have also been reported to be a vector of some viral diseases (Brault et al. 2010; Emden and Harrington 2007). Different strategies have been employed to control these pests. The most widely used methods are physical, chemical and more recently an integrated approach that includes biological control using many kinds of organisms as parasitoids and pathogens. Entomopathogenic fungi are well known to be effective against insects. Their pathogenicity depends on the fungal species and strain virulence. In the latter case, substrate and culture methods are of primary

importance for spore effectiveness by increasing or decreasing the secretion of insecticidal compounds recognized as virulence factors (Shah et al. 2005). In this context, agricultural by-products could be used as inexpensive media with high spore yield production (Sahayaraj and Namasivayam 2008). Various entomopathogenic fungi such as *Lecanicillium lecanii* (Zare and Gams) (Jung et al. 2006), *Beauveria bassiana* ((Balsamo) Vuillemin) (Sivasundaram et al. 2007) and *Metarrhizium anisopliae* ((Metschnikoff) Sorokin) (Dong et al. 2007) have been effectively used to control aphids, lepidopteran larvae and other pests. Vu et al. (2007) also demonstrated the pathogenicity of many entomopathogenic fungi such as *M. anisopliae* against aphids. Many other studies have shown the pathogenicity of fungi against aphids (Hall 1979, 1980; Khan et al. 1990), but by direct application on the cuticle or by leaf treatment. However, because of the high growth rates of aphid populations, it is unlikely that they can be fully controlled in all cases. Due to emerging insecticide resistances, the research into biological control of aphids still continues. In this present work, we showed the effectiveness of three fungal isolates, *M. anisopliae*, *Aspergillus flavus* (Link) and *A. clavatus* (Desmazières), regarding the adult mortality and population growth rate by directly treating *V. faba* plants infected with *A. pisum* aphids in laboratory conditions.

Materials and methods

Fungal cultures

All the fungal strains were identified by the Mycothèque de l'Université catholique de Louvain (MUCL, Belgium). *M. anisopliae* (Seye et al. 2012, 2013) and *A. clavatus* (Seye and Ndiaye 2008; Seye et al. 2009; accession no. MUCL 55275) were recently isolated from *Oedaleus senegalensis* (Krauss) (Orthoptera: Acrididae). *A. flavus* (accession no. MUCL 55276) was isolated from *Agriotes lineatus* (L.) larvae (Coleoptera: Elateridae). All these isolates were cultured in 250-ml Erlenmeyer flasks on a solid-state substrate constituted by 5 g wheat bran supplemented with 20 ml of a nutrient solution (1 % peptone, 1 % yeast extract, 0.005 % chloramphenicol) and previously sterilized at 121 °C for 20 min. Seven days after, fungal masses produced on the media were washed with 150 ml distilled water containing 0.05 % Tween 80 on a rotary shaker (150 rpm) for 2 h. These solutions were then filtered and centrifuged (8000 rpm, 15 min) to remove the conidia. For each strain, the conidia were diluted in sterilized water containing 0.05 % Tween 80, and final suspensions were adjusted to 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 and 10^7 spores per ml using a hemocytometer (Thoma®).

Aphid rearing

A. pisum aphids were isolated on *Phaeolus vulgaris* L. (France, 2011) and reared in laboratory conditions on ordinary broad bean (*V. faba*) plants growing in perlite/vermiculite mix pots. Rearing conditions were a 16L:8D photoperiod, 75 % relative humidity and 25 ± 2 °C temperature.

Bioassays

For each conidial suspension, 20 adult female aphids were dropped on a young plant in a pot (10 cm diameter) surrounded by a transparent plastic sleeve closed at the ends with muslin and directly treated. Each fungal strain was applied (1.6 ml of conidial suspension) with a dedicated sprayer (Di Martino spa—Conico 1000) to 20 cm with the top of the plant. This volume was sufficient to cover the entire system without impacting aphid viability. The control aphids were treated only with distilled water containing 0.05 % Tween 80. Bioassay conditions were a 16L:8D photoperiod, 75 % relative humidity and 25 ± 2 °C temperature. Aphid mortality and nymphs produced were recorded daily for 5 days after inoculation. All newborn nymphs and dead adults were removed. The cadavers were transferred to plates with moist filter paper in order to allow fungal filament emergence and placed in room conditions as previously described. Each treatment was made in four replicates of 20 adult female aphids with a new conidial suspension in different time periods.

Statistical analysis

The lethal concentrations (LC_{50} and LC_{90}) were calculated by regression analysis. Aphid mortalities were corrected using Abbott's formula (Abbott 1925), and corrected mortality proportions were linearized using logit transformation (Dagnelie 1970): $\text{log it}(P) = \ln(P/(1 - P))$. A single linear regression was used for modeling the relationship between logit-transformed mortality and logarithm-transformed values of fungal concentrations as explanatory variable: $\text{log it}(P) = \text{slope} \times \ln(\text{concentration}) + \text{intercept}$. The relationship between aphid mortality and spore concentrations was assessed considering Snedecor-F distribution and p values. Reliability of the regression coefficients was assessed using Student's t test.

The lethal times (LT_{50}) were calculated by Kaplan-Meier analysis, and the log-rank test (providing the chi-square and p value) was carried out to check for significant differences between treated and control aphids.

The number of nymphs produced daily per female aphid was expressed as intrinsic growth rate (Wyatt and White 1977) and subjected to the ANOVA-1 test to check for

significant differences between treated and untreated aphids for each time interval.

All analyses were performed with Statistica 9 software. In all the cases, results were considered statistically significant when the *p* value of the analysis was lower than 5% (*p* < 0.05).

Results and discussion

Aphid mortality was monitored daily up to 5 days (four replicates). Control mortalities ranged from 3.75 (day 1) to 17.50 % (day 5) for *A. flavus*, from 2.5 to 12.5 % for *A. clavatus* and from 3.75 to 10.00 % for *M. anisopliae*. Corrected percent mortality increased with time interval (day 1 to day 5) and spore concentration (10^3 to 10^7 spores/ml). At day 5, mortality of aphids ranged between 49.90–90.90 % for *A. flavus*, 51.47–84.06 % for *A. clavatus* and 30.37–78.05 % for *M. anisopliae* depending on the spore concentration (Fig. 1). Corresponding lethal concentrations (LC_{50} and LC_{90}) were, respectively, 1.23×10^3 and 1.34×10^7 ($F_{(1,17)} = 59.17$; *p* < 0.001), 4.95×10^2 and 5.65×10^7 ($F_{(1,17)} = 20.44$; *p* < 0.001) and 3.67×10^3 and 9.71×10^7 ($F_{(1,18)} = 26.92$; *p* < 0.001)

spores/ml (Table 1). At the highest concentration of 10^7 spores/ml, lethal times (LT_{50}) were reached, respectively, with *A. flavus* at day 2.50 ($\chi^2_{(0.95,1)} = 99.68$; *p* < 0.001), with *A. clavatus* at day 2.85 ($\chi^2_{(0.95,1)} = 92.70$; *p* < 0.001) and with *M. anisopliae* at day 3.26 ($\chi^2_{(0.95,1)} = 80.34$; *p* < 0.001). It was demonstrated that there were rapid declines in aphid populations for 5 days. Regarding the lethal times and concentrations, fungal strains would not have the same pathogenicity. *Aspergillus* isolates induced higher mortalities than *M. anisopliae*, which is a well-known entomopathogen in the literature. These variations might be due to the differences in the virulence of the fungal isolates, the host species or the method used for fungal application. For example, differences in the virulence of four *M. anisopliae* isolates was shown against *Aphis craccivora* (Koch) with LC_{50} ranging from 3.1×10^5 to 7.4×10^6 spores/ml (Ekesi et al. 2000). Similarly, Loureiro and Moino (2006) showed susceptibility differences in *Myzus persicae* (Sulzer) and *Aphis gossypii* (Glover) treated with 10^6 spores/ml of the same *M. anisopliae* isolate with LT_{50} of 2.91 and 3.9 days after treatment. Regarding other studies, our results are similar to those of Saranya et al. (2010) against *A. craccivora*

Fig. 1 *Acyrthosiphon pisum* adult female mortality after 5 days of exposure to *Aspergillus flavus*, *Aspergillus clavatus*, and *Metarhizium anisopliae* spores depending on tested concentrations. Values are mean corrected percent mortality of four replicates with standard error (SE)

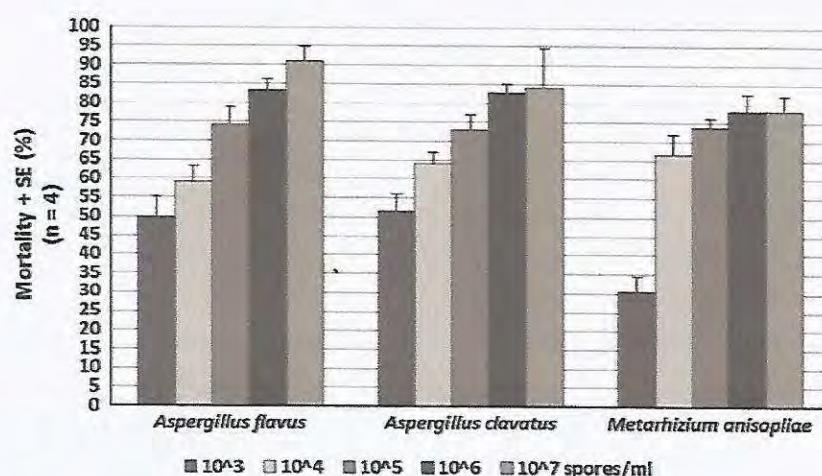


Table 1 Lethal concentrations (LC_{50} and LC_{90} expressed as spores/ml) of *Aspergillus flavus*, *Aspergillus clavatus*, and *Metarhizium anisopliae* against *Acyrthosiphon pisum* adult females after 5 days of spore exposure

Fungal strain	LC_{50}	LC_{90}	Coefficient	Standard error	T test (df)	<i>p</i> value
<i>Aspergillus flavus</i>	1.23×10^3	1.34×10^7				
Slope			-1.68	0.36	-4.67 (17)	<0.001
Intercept			0.24	0.03	7.69 (17)	<0.001
<i>Aspergillus clavatus</i>	4.95×10^2	5.65×10^7				
Slope			-1.77	0.50	-3.56 (18)	0.002
Intercept			0.22	0.04	5.19 (18)	<0.001
<i>Metarhizium anisopliae</i>	3.67×10^3	9.71×10^7				
Slope			-1.17	0.49	-2.40 (17)	0.028
Intercept			0.19	0.04	4.52 (17)	<0.001

adults for the same treatment time. This was not the case for Yokomi and Gottwald (1988) who reported 100 % mortality of three aphid species [*M. persicae*, *A. gossypii* and *Aphis citricola* (Van Der Goot)] with 10^6 – 10^7 concentrations of five isolates of *L. lecanii* and *Hirsutella thompsonii* (Fisher) after 4-day treatment.

Postmortem observations revealed mycelia development (corresponding to the inoculated strain) around the dead treated aphids 48 h after incubation in petri dishes for each fungal isolate (Fig. 2). No mycelia appeared from dead control aphids. This suggested that conidia adhered to aphid's cuticle when sprayed and led to their death. Even though *Aspergillus* species such as *A. clavatus* and *A. flavus* are saprophytic fungi, the isolates used in this study might have completed an infectious cycle on aphids as previously reported for other insects. Previously, microscopic observations revealed that *A. clavatus* adhered to and penetrated the cuticle of mosquito larvae (Diptera: Culicidae). Surviving *Culex quinquefasciatus* (Say) larvae that reached the pupal stage produced infected adults (Seye et al. 2009). Similarly, surface-inoculated *A. flavus* completed its life cycle on *Bombyx mori* (L.) larvae in 6 to 7 days including hemocoel invasion (Kumar et al. 2004). Moreover, mycelia development and sporulation observed on dead adults could promote fungal persistence in the environment. Aphid reproduction is very fast, and densities could increase rapidly. The autodissemination of spores

between adults and their nymphs could be raised as an objective study since the high densities of aphids could increase the contact possibilities among them and consequently horizontal transmission.

Untreated adults produced more nymphs than treated adults. The production of *A. pisum* nymphs decreased with increased conidial concentration for all fungal strains (Fig. 3). The ANOVA-1 test showed that the intrinsic growth rates varied significantly from untreated adults on day 5 ($p = 0.016$) for *A. flavus*, on days 4 ($p = 0.003$) and 5 ($p < 0.001$) for *A. clavatus* and on days 4 ($p = 0.005$) and 5 ($p = 0.011$) for *M. anisopliae*. Many studies showed that entomopathogenic fungi could affect the fecundity of insect species (Castillo et al. 2000; Mulock and Chandler 2001; Quesada-Moraga et al. 2004; Scholte et al. 2006). Our results are consistent with Baverstock et al. (2006), which also revealed that *Pandora neoaphidis* [(Remaudière and Hennebert) Humber] and *B. bassiana* infection appears to have direct effects on adult *A. pisum* reproduction, but no indirect effects on the fitness of their progeny. By contrast, Wang and Knudsen (1993) did not find similar effects with *B. bassiana* against the Russian wheat aphid [*Diuraphis noxia* (Kurdumov)]. Our results are consistent with the hypothesis that a reduction in aphid fecundity may be related to an increase in pathogen fitness as aphid resources are used for mycelia development and conidia production (Baverstock et al. 2006).

Fig. 2 Non-treated *Acyrthosiphon pisum* (a) and treated with *Aspergillus clavatus* (b), *Metarhizium anisopliae* (c) and *Aspergillus flavus* (d) 48 h after incubation on wet paper. Filaments (arrows) appeared around the aphid cuticle. Compared to the control (a), the treated adults were attacked by fungi. The fungal development was more effective with *A. clavatus* (b) than *M. anisopliae* (c) and less with *A. flavus* (d). *h* head, *th* thorax, *ab* abdomen

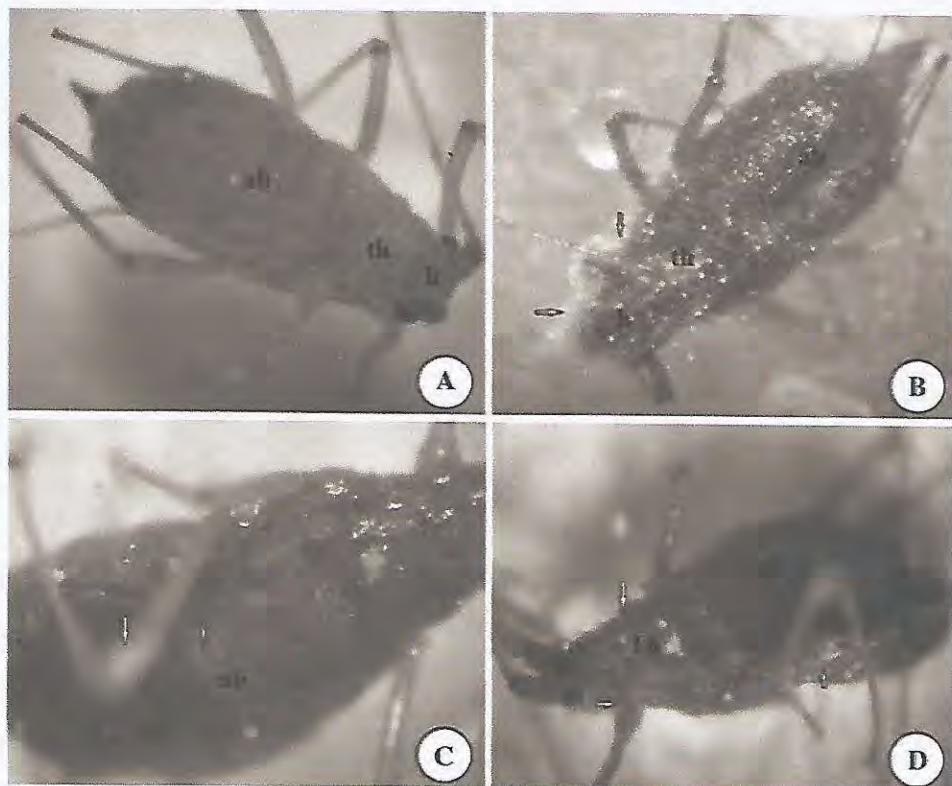
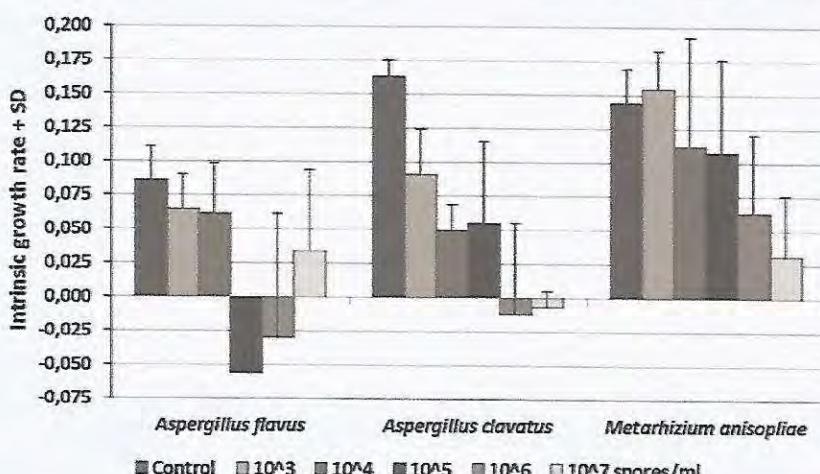


Fig. 3 Intrinsic growth rate [with standard deviation (SD)] in *Acyrtosiphon pisum* adult female populations 5 days after application of different spore concentrations of *Aspergillus flavus*, *Aspergillus clavatus* and *Metarhizium anisopliae*



Aspergillus species display a wide diversity of lifestyles including in clinical, industrial and agricultural environments; some of them may be opportunistic pathogens of a wide range of organisms including agricultural pests (Gibbons and Rokas 2012). To our knowledge, *A. clavatus* and *A. flavus* were reported here for the first time to be pathogenic against aphids. Toxicity tests and postmortem observations suggested that *Aspergillus* species could be useful in aphid control as pest control agents. However, these saprophytic fungi not target only insects, but can also affect immunodepressed humans, mammals and birds (Tell 2005). Non-aflatoxin-producing and non-toxigenic *A. flavus* strains are currently studied in biological control to reduce preharvest contamination of crops with aflatoxin (Ehrlich 2014). Their effects on non-targeted organisms including human health should be investigated.

In conclusion, the adult *A. pisum* aphid was susceptible to the entomopathogenic fungi *A. clavatus*, *A. flavus* and *M. anisopliae*. Adult mortality increased with time interval and concentration. The reproductive potential of these aphids also decreased with increased concentration. *A. clavatus* and *A. flavus* were here reported for the first time to be pathogenic against aphids. These results suggest that these fungi may be candidates for aphid control. However, toxin extraction, identification and investigation on non-targeted organisms should be performed before use in biological control.

Acknowledgments The authors thank the Islamic Development Bank for the financial support of a Post-Doctoral scholarship on high technologies to Fawrou Seye.

References

- Abbott WS (1925) A method of computing effectiveness of insecticides. J Econ Entomol 18:265–267
- Baverstock J, Roy HE, Clark SJ, Alderson PG, Pell JK (2006) Effect of fungal infection on the reproductive potential of aphids and their progeny. J Invertebr Pathol 91:136–139
- Brault V, Uzest M, Monsion B, Jacquot E, Blanc S (2010) Aphids as transport devices for plant viruses. C R Biol 333:524–538
- Castillo MA, Moya P, Hernández E, Primo-Yúfera E (2000) Susceptibility of *Ceratitis capitata* Wiedemann (Diptera: Tephritidae) to entomopathogenic fungi and their extracts. Biol Control 19:274–282
- Dagnelie P (1970) Théorie et méthodes statistiques: applications agronomiques. Les méthodes d'inférence statistique, vol 2. Duculot, Gembloux
- Dong C, Zhang J, Chen W, Huang H, Hu Y (2007) Characterization of a newly discovered China variety of *M. anisopliae* (*M. anisopliae* var. *dcjhyium*) for virulence to termites, isoenzyme and phylogenetic analysis. Microbiol Res 162:53–61
- Ehrlich KC (2014) Non-aflatoxigenic *Aspergillus flavus* to prevent aflatoxin contamination in crops: advantages and limitations. Front Microbiol 5:50. doi:10.3389/fmicb.2014.00050
- Ekesi S, Akpa AD, Onu I, Ogunlana O (2000) Entomopathogenicity of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* to the cowpea aphid, *Aphis craccivora* Koch (Homoptera: Aphididae). Arch Phytopath Pflanz 33:171–180
- Emden VHF, Harrington R (2007) Aphids as crop pest. CABI Publishing, London
- Gibbons JG, Rokas A (2012) The function and evolution of the *Aspergillus* genome. Trends Microbiol 21:1. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2012.09.005>
- Hall RA (1979) Pathogenicity of *Verticillium lecanii* (Zimm.) conidia and blastospores against the aphid. Entomophaga 24:191–198
- Hall RA (1980) Control of aphid in glass house with fungus *Verticillium lecanii* (Zimm.): effect of spore concentration. Entomol Exp Appl 27:1–5
- Jung HS, Lee HB, Kim K, Lee EY (2006) Selection of *Lecanicillium* strains for aphid control. Korean J Mycol 34:112–118
- Khan M, Khalil SK, Karimullah (1990) Biological control of aphid with a entomopathogenic fungus. Pak J Agric Res 11:174–177
- Kumar V, Singh GP, Babu AM (2004) Surface ultrastructural studies on the germination, penetration and conidial development of *Aspergillus flavus* Link:Fries infecting silkworm, *Bombyx mori* Linn. Mycopathologia 157:127–135
- Loureiro EDS, Moino JA (2006) Pathogenicity of hyphomycete fungi to aphids *Aphis gossypii* Glover and *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae). Neotrop Entomol 35:660–665

- Mulock BS, Chandler LD (2001) Effect of *Beauveria bassiana* on the fecundity of Western Corn Rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera* (Coleoptera: Chrysomelidae). Biol Control 22:16–21
- Quesada-Moraga E, Santos-Quirós R, Valverde-García P, Santiago-Álvarez C (2004) Virulence, horizontal transmission, and sublethal reproductive effects of *Metarhizium anisopliae* (Anamorphic fungi) on the German cockroach (Blattodea: Blattellidae). J Invertebr Pathol 87:51–58
- Sahayarak K, Namasivayam SKR (2008) Mass production of entomopathogenic fungi using agricultural products and by products. Afr J Biotechnol 7:1907–1910
- Saranya S, Ushakumari R, Sosamma J, Babu MP (2010) Efficacy of different entomopathogenic fungi against cowpea aphid, *Aphis craccivora* (Koch). J Biopest 3:138–142
- Scholte E-J, Knols B, Takken W (2006) Infection of the malaria mosquito *Anopheles gambiae* with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* reduces blood feeding and fecundity. J Invertebr Pathol 91:43–49
- Seye F, Ndiaye M (2008) Compatibilité entre *Aspergillus clavatus* (Hymenomycetes) et l'huile de neem (*Azadirachta indica*) contre le moustique vecteur de filarioses *Culex quinquefasciatus* (Say, 1823) (Diptera: Culicidae). Bacteriol Virusol Parazitol Epidemiol 53(1):43–48
- Seye F, Faye O, Ndiaye M, Njie E, Afoutou JM (2009) Pathogenicity of the fungus, *Aspergillus clavatus*, isolated from the locust, *Oedaleus senegalensis*, against larvae of the mosquitoes *Aedes aegypti*, *Anopheles gambiae* s.l. and *Culex quinquefasciatus*. J Insect Sci 9:1–7
- Seye F, Ndiaye M, Faye O, Afoutou JM (2012) Evaluation of entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* formulated with suneem (neem oil) against *Anopheles gambiae* s.l. and *Culex quinquefasciatus* adults. Malar Chemo Contr Elim 1:6. doi:10.4303/mcce/235494
- Seye F, Ndione RD, Touré M, Ndiaye M, Boukraa S, Bawin T, Zimmer J-Y, Francis F (2013) Laboratory and semi-field environment tests for the control efficacy of *Metarhizium anisopliae* formulated with neem oil (suneem) against *Anopheles gambiae* s.l. adult emergence. Acad. J Biotechnol 1(1):46–52
- Shah FA, Wang CS, Butt TM (2005) Nutrition influences growth and virulence of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. FEMS Microbiol Lett 251:259–266
- Sivasundaram V, Rajendran L, Muthumeena K, Suresh S, Raguchander T, Samiyappan R (2007) Effect of talc-formulated entomopathogenic fungus *Beauveria* against leaf folder (*Cnaphalocrosis medinalis*) in rice. World J Microbiol Biotechnol 24:1123–1132
- Tell LA (2005) Aspergillosis in mammals and birds: impact on veterinary medicine. Med Mycol 43:S71–S73
- Vu VH, Hong SI, Kim K (2007) Selection of entomopathogenic fungi for aphid control. J Biosci Bioeng 104:498–505
- Wang ZG, Knudsen GR (1993) Effect of *Beauveria bassiana* (Fungi: Hymenomycetes) on fecundity of the Russian wheat aphid (Homoptera: Aphididae). Environ Entomol 22:874–878
- Wyatt IJ, White PF (1977) Simple estimation of intrinsic rates from aphids and tetranychid mites. J Appl Ecol 14:757–766
- Yokomi RK, Gottwald TR (1988) Virulence of *Verticillium lecanii* isolates in aphids determined by bioassay. J Invertebr Pathol 51:250–258

Titre de la Thèse : Contrôle du développement des moustiques vecteurs (*Anopheles gambiae* sl, *Culex quinquefasciatus*) et pucerons par l'utilisation de biopesticides (Produits de neem et champignons)

Nom du candidat : Fawrou SEYE

Président : M. Ousmane FAYE, Professeur, FST, UCAD

Membres : M. Cheikh Tidiane BA, Professeur, FST, UCAD

M. Karamoko DIARRA, Professeur, FST, UCAD

M. Oumar FAYE Professeur, FMPOS, UCAD

M. Mady NDIAYE, Professeur, FST, UCAD (Directeur de Thèse)

Soutenue le 28 décembre 2013 à la Faculté des Sciences et Techniques (UCAD)

RÉSUMÉ :

Dans la banlieue de Dakar, les fortes pluviométries ont occasionné une augmentation des gîtes larvaires de moustiques. Dans la lutte antivectorielle, plusieurs méthodes sont appliquées. Cependant, celle utilisant des biopesticides est moins connue au Sénégal.

Dans ce travail, nous avons suivi l'évolution de certains facteurs écologiques favorisant le développement des moustiques dans la banlieue de Dakar. Trois souches de champignons ont été isolées pour lutter contre ces insectes. En utilisant le son de blé, nous avons mis au point en bioindustrie un nouveau système de production de spores et de métabolites pathogènes contre les moustiques. Des spores de champignons ont été formulées avec l'huile de neem contre *Anopheles gambiae* et *Culex quinquefasciatus*. Les champignons ont été testés également sur le puceron vert (*Acyrthosiphon pisum*) pour voir leur spectre d'action.

Nos études ont montré que, du mois d'avril 2009 au mois de mars 2010, *Culex quinquefasciatus* était plus abondant en période post-hivernale contrairement à *Anopheles gambiae* qui en dehors du quartier Sam-Sam 3 n'était présent qu'en période hivernale. Les larves d'*An. gambiae* (*An. arabiensis*) préfèrent les eaux à pH>8 alors que celles de *Cx quinquefasciatus* préfèrent les gîtes où le pH varie entre 7,1 et 8,27.

Les champignons *Metarrhizium anisopliae*, *Aspergillus clavatus* et *Metarrhizium* sp ont été isolés et multipliés sur le son de blé. Les doses létales déterminées contre les larves de *Cx quinquefasciatus* sont : $DL_{50} = 1,7 \times 10^8$ spores/ml et $DL_{90} = 7,2 \times 10^8$ spores/ml pour *A. clavatus*; $DL_{50} = 1,6 \times 10^8$ spores/ml et $DL_{90} = 6,5 \times 10^8$ spores/ml pour *M. anisopliae* et $DL_{50} = 1,75 \times 10^8$ spores/ml et $DL_{90} = 9,9 \times 10^8$ spores/ml pour *M. sp*. Nous avons produit en bioindustrie des spores et métabolites de taille ≤ 10 kD. Ces deux produits ont montré une forte pathogénicité contre *Cx quinquefasciatus*. La formulation des spores d'*A. clavatus* a causé des mortalités d'adultes de *Cx quinquefasciatus* allant de 20 à 86 % en 5 jours. Avec celle de *M. anisopliae*, les pourcentages de survie des adultes ont été de 67 à 5 % contre *An. gambiae*, et de 51 à 12 % contre *Cx quinquefasciatus*. Cette formulation a montré son efficacité contre l'émergence des adultes d'*An. gambiae* en milieu semi-naturel (2,25 % en période hivernale et 1,25 % en période post-hivernale). L'étude en microscopie électronique a montré que les spores d'*A. clavatus* agissent sur les larves de moustiques par une dégradation de l'épithélium intestinal, du tissu musculaire et de l'épithélium cuticulaire en 24 h.

Avec les pucerons, les mortalités ont été de 90,9 % pour *Metarrhizium* sp., 84,06 % pour *A. clavatus* et 78,05 % pour *M. anisopliae* en 5 jours.

Des études devraient être faites sur la purification des métabolites, afin d'isoler les molécules pour pouvoir les utiliser dans la lutte biologique contre les insectes.

Mots clés : Inondation, moustiques, biopesticides, champignons, pucerons, neem