

UNIVERSITÉ CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR

☆☆☆☆☆



ECOLE DOCTORALE

SCIENCES DE LA VIE, DE LA SANTE ET DE L'ENVIRONNEMENT

☆☆☆☆☆

FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES

Année : 2018

N° d'ordre : 201869

THESE DE DOCTORAT

Spécialité :

ENTOMOLOGIE

TITRE:

EFFETS SYNERGIQUES DE DEUX BIOPESTICIDES (SUNEEM 1% ET *METARHIZIUM ANISOPLIAE*) SUR LES LARVES DE MOUSTIQUE (GENRES : *CULEX*, *AEDES*, *ANOPHELES*) EN MILIEUX SEMI-NATUREL ET NATUREL AU SENEGAL.

Présentée par :

Thierno Seydou BDIANE

Soutenue le 08 février 2019 devant le jury composé de :

<u>Président</u> :	Ousmane FAYE	Professeur Titulaire	(FST ; UCAD)
<u>Rapporteurs</u> :	Malick DIOUF	Professeur Titulaire	(FST ; UCAD)
	Abdallah BAÏLA NDIAYE	Maître de Conférences	(IFAN)
	Saliou NDIAYE	Maître de Conférences	UFR THIES
<u>Examineurs</u> :	Ngor FAYE	Maître de Conférences	(FST ; UCAD)
<u>Encadrant</u> :	Raymond Demba NDIONE	Assistant	(FST ; UCAD)
<u>Directeur de thèse</u> :	Mady NDIAYE	Professeur Titulaire	(FST ; UCAD)

DEDICACES

Je dédie ce modeste travail :

A ma mère Ndeye Diale CISSE

Femme rurale, femme des champs, femme de ménage, femme du marché de Kaffrine. Maman, il n'y a pas de mot pour vraiment exprimer votre place tant immense. Vous avez été toujours là pour nous, même quand ce n'était pas nécessaire. Une fois de plus les mots me manquent pour montrer mes sentiments envers vous. Vous avez partagé avec moi les souffrances, Allah seul est capable de vous rembourser cette dette inestimable. Sachez que vous êtes la meilleure et soyez simplement heureuse, vous le méritez après tant de sacrifices. Reçez à travers ce modeste travail le témoignage de toute mon affection et de mon profond respect. Que DIEU le Tout Puissant te garde encore très longtemps auprès de nous. Amen !

Je t'aime maman !

REMERCIEMENTS

A Dieu le tout puissant, le Miséricordieux, le Maître des destins de m'avoir guidé et surtout assisté tout au long de mes études jusqu'à l'aboutissement de ce document. Qu'il raffermisse d'avantage mes pas pour le reste de mon existence. Amen !

Il me tient à cœur de remercier très sincèrement toutes les personnes de bonne volonté qui de près ou de loin ont contribué tant soit peu à la réalisation de ce travail. Cependant je ne saurais jamais énumérer de façon exhaustive les parents, les amis, les collaborateurs et les maîtres qui m'ont apporté leurs soutiens moraux, matériels et scientifiques tout au long de cette thèse. Qu'ils trouvent ici l'expression de ma profonde gratitude !

A mon père Mamadou BDIANE

En souvenir des moments passés à tes côtés et de ton souci de faire de nous des hommes préparés pour la vie. Tu as toujours été soucieux de l'avenir de toute la famille. Ce travail est un modeste témoignage de tous les sacrifices que tu as consentis. Que Dieu le tout puissant puisse te garder encore longtemps parmi nous. Je ne vous rendrai jamais assez l'affection que vous me donnez si gracieusement. Merci pour vos bénédictions. Les mots me manquent pour vous témoigner mon amour et ma reconnaissance. Ce travail est entièrement le vôtre.

A ma mère Ndeye Dialé CISSE

Très chère mère, je ne cesserai jamais de vous remercier pour votre sagesse, votre honnêteté et votre grande générosité. Vous avez été un évier pour moi, merci pour tous les sacrifices consentis à mon éducation et pour avoir fait de moi ce que je suis aujourd'hui. Que DIEU vous prête une longue vie pour que vous puissiez partager avec moi le fruit de ce travail. J'ai beaucoup bénéficié de votre générosité, de vos conseils. J'ai admiré en vous votre patience. Vous avez fait de moi un homme averti et j'en suis fier. Que ce travail soit pour moi l'occasion de vous faire part de ma profonde reconnaissance et mon souhait ardent de renforcer ces liens ainsi tissés. Qu'Allah vous apporte la santé, le bonheur et la longévité. Merci pour votre amour et tous les sacrifices consentis pour moi depuis mon enfance.

A mes frères et soeurs de la famille BADIANE

Samba BADIANE, Amath BADIANE, Amidou BADIANE, Ousseynou Diale BADIANE, Ndeye Charlotte BADIANE, Coumba BADIANE , Seynabou BADIANE, Fatou BADIANE. Soyez courageux, écoutez les conseils et trouvez ici l'expression de toute ma reconnaissance. Qu'ALLAH renforce la cohésion au sein de la famille et nous guide dans nos choix. Que ce travail soit pour nous une source de consolidation du lien de sang qui nous unit. Que ce travail soit une source intarissable de nos liens fraternels et familiaux. Que Dieu vous accorde une longue vie et une bonne santé et que ce modeste travail puisse être pour vous un exemple. Que Dieu le tout puissant vous accorde une longue vie avec beaucoup de chance.

A ma Femme, Dr Fatou Binta DIAGNE

Ce travail n'aura sûrement pas abouti sans ton aide. Tu as toujours été là pour moi. J'ai trouvé en toi une femme et une amie en qui je peux avoir entièrement confiance. Encore une fois merci.

Aux Dr Raymond Demba NDIONE, Dr Mamour TOURE, Dr Modou MBAYE, Dr Fawrou SEYE.

Vos sages conseils, vos soutiens moraux et pédagogiques ne m'ont pas fait défaut. Ce travail est également le vôtre. Votre sincérité et votre disponibilité ne m'ont jamais fait défaut. L'apprentissage avec vous aura toujours été instructif et atrayant, chacun a toujours mis ses qualités au service du groupe faisant ainsi de la pression notre ami. Ce fut un plaisir de travailler avec vous et grâce à Dieu, je sais qu'on sera toujours ensemble. Toute ma reconnaissance pour l'estime et le respect que vous avez manifesté à mon égard. Merci pour votre confiance et votre soutien.

A mes camarades de promotion

Je vous dis encore merci pour votre courage et votre persévérance et surtout pour vos soutiens dans les peines partagées. Le parcours n'a pas été facile.

A mes amis :

Assane MANGANE, Ousseynou MANGANE, Patrick DIOP, Insa FAYE, Amadou DIOUF, Djibril THIAO, Aissatou Seydou TALL. Vous avez été des guides et des éclaireurs pour moi, vous avez toujours répondu à mes attentes. Je ne saurai vous remercier assez et j'implore le tout puissant qu'il exauce nos vœux de bonheurs et renforce d'avantage nos liens d'amitié.

A tout le personnel du Laboratoire de Biologie de la Reproduction

Professeur Mady NDIAYE: Merci du plus profond de mon cœur pour l'aide inestimable que vous m'avez apportée dans tous les domaines et sans restriction. Ton amour pour le travail bien fait et ordonné ont indéniablement facilité ce travail qui s'est déroulé dans de bonne ambiance qui règne toujours autour de toi. Que Dieu te donne une longue vie remplie de bonheur. Vos conseils et vos suggestions ont été d'un apport considérable pour la réalisation de ce travail.

A mon collègue thésard du Laboratoire de Biologie de la Reproduction M. Amadou FALL. Ce travail est le fruit de nos efforts conjugués. Je saisis cette opportunité pour vous faire part de ma profonde reconnaissance. Merci de votre soutien et de votre participation à la réalisation de ce travail.

A tous mes enseignants

Depuis le primaire jusqu'à la faculté, je vous remercie très sincèrement chers maîtres de m'avoir légué vos savoirs.

A tous les enseignants du Département de Biologie Animale pour la qualité de l'enseignement dispensé mais aussi au personnel administratif, technique et de service (PATS) en particulier M Daouda DIOUF et M Mbengue pour leur aide inestimable dans la mise en œuvre des protocoles expérimentaux. Je remercie surtout Mme Rockhaya DIOUF SENGHOR la secrétaire pour services rendus.

Au personnel du décanat de la Faculté des Sciences et Techniques.

A tous les étudiants de la FST.

A tout le personnel de la bibliothèque de l'UCAD.

A tous ceux qui se reconnaîtront dans ce travail :

A NOS MAITRES ET JUGES

Ce travail a été réalisé à l'unité d'Entomologie, de Rickettsiologie, de Bactériologie et de Virologie (UERBV) du Laboratoire de Biologie de la Reproduction sous la direction de Monsieur Mady NDIAYE, Professeur titulaire des universités. Nos sincères remerciements :

- ❖ **Au Professeur Mady NDIAYE**, responsable de l'unité d'Entomologie, de Rickettsiologie, de Bactériologie et de Virologie (UERBV) et du Laboratoire de Biologie de la Reproduction (LBR), directeur de ce mémoire. Vous nous avez acceptés dans votre laboratoire, vous avez guidé nos premiers pas depuis le DEA dans la recherche et mis à notre disposition tous les moyens matériels et techniques nécessaires. Vous avez dirigé ce travail qui est le vôtre jusqu'à son terme. Vos qualités humaines et surtout votre sens élevé de la responsabilité et de la rigueur dans le travail font de vous un maître respectable et admiré. Veuillez agréer cher maître l'expression de notre profonde gratitude et reconnaissance. Nous prions le Bon Dieu pour qu'il vous donne une longue vie et une santé de fer pour pouvoir continuer à faire germer l'esprit et la culture scientifique dans beaucoup de générations d'étudiants.

- ❖ **Au Professeur Ousmane FAYE**, malgré vos responsabilités vous avez accepté de présider le jury et de juger notre modeste travail. Nous vous sommes très reconnaissants pour cette marque d'estime à notre égard.

- ❖ **Au Professeur Malick DIOUF**, vous avez énormément participé à notre formation à l'UCAD depuis la licence. Vous nous avez toujours fascinés par votre rigueur scientifique et la clarté de vos enseignements. Vos qualités humaines ne sont plus à démontrer. Nous vous remercions énormément d'avoir accepté de participer à ce jury mais aussi d'évaluer ce modeste travail malgré votre calendrier très chargé en qualité de Directeur de l'Institut de Pêche et d'Aquaculture.

- ❖ **Au professeur Abdallah BAÏLA NDIAYE**, pour avoir accepté d'examiner ce travail. Votre engagement, votre rigueur scientifique, votre disponibilité nous ont beaucoup inspiré. Nous sommes très heureux de vous compter aujourd'hui parmi les membres de ce jury. Trouvez ici toute notre reconnaissance.

- ❖ **Au Docteur Saliou NDIAYE** Maître de Conférences à l'ENSA pour avoir accepté de rapporter cette thèse. Malgré vos responsabilités et votre calendrier très chargé, vous avez accepté de juger notre modeste travail et de siéger dans le jury. Trouvez ici l'expression de notre profonde gratitude.
- ❖ **Au Professeur Ngor FAYE**, pour avoir accepté d'examiner ce travail malgré votre agenda très chargé en qualité de Chef de Département de Biologie Animale et d'enseignant chercheur à la FST. Votre engagement, votre rigueur scientifique, votre disponibilité nous ont beaucoup inspiré. Trouvez ici l'expression notre très grande reconnaissance. Vos critiques et vos suggestions seront d'un apport inestimable pour l'amélioration de ce document. Nous vous remercions énormément des connaissances que vous avez bien voulu nous donner en Licence. Votre sens du partage, votre courage, votre disponibilité constante et vos qualités humaines et sociales ont fait de vous un maître respectable et admiré par toutes les générations et aussi par vos pairs.

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Formules de l'azadirachtine A et ses dérivés	11
Figure 2: Développement de la teneur en azadirachtine au moment de la fructification de la graine en fonction du temps des arbres A à F. (Faye, 2010).....	14
Figure 3: Schéma du procédé d'extraction de l'azadirachtine de neem pour sa caractérisation analytique	21
Figure 4: Schéma du procédé de production de l'azadirachtine et de l'huile de graines de neem	22
Figure 5: Photo (A) Electronographies des conidiophores et des hyphes de <i>Metarhizium anisopliae</i> ; photo (B) Culture de <i>M. anisopliae</i> sur Sauboraud dextrose agar (SDA) à 25 °C ; photo (C) Aspect microscopique des Conidies de <i>M. flavoviride</i> (X100) ; photo (D) Culture de <i>M. flavoviride</i> sur Sauboraud dextrose agar (SDA) à 25°C.....	27
Figure 6: Aspect morphologique de <i>Metarhizium anisopliae</i> A et B (Ihara et al.2001).....	28
Figure 7: Aspect microscopique de <i>Metarhizium anisopliae</i> , a. x1600; b. x2800; c. x7000 (Bischoff et al., 2009).....	28
Figure 8: (A) Conidies de <i>Metarhizium anisopliae var anisopliae</i> , (B) Conidies de <i>Metarhizium anisopliae var majus</i> (Tulloch, 1976).....	29
Figure 9: Schéma du cycle biologique des champignons entomopathogènes (Ferron et al., 1993).....	30
Figure 10: Mode de pénétration des champignons entomopathogènes dans la cuticule des insectes	32
Figure 11: Larve infectée par <i>Metarhizium anisopliae</i> (Badiane, 2017)	34
Figure 12: Insectes infectés par <i>Metarhizium anisopliae</i> A et B (Muscardine verte) (Boucias et Pendland, 1998).....	34
Figure 13: Les compartiments des écosystèmes terrestres tempérés où <i>B. bassiana</i> et <i>M. anisopliae</i> se produisent naturellement (Meyling et Eilenberg, 2007).....	38
Figure 14: Classification des <i>Culicidae</i> ou moustiques (Anopheles Group, 2012)	42
Figure 15: Cycle biologique des moustiques (Berchi, 2000).....	43
Figure 16: Aspect des OEufs de <i>Culex quinquefasciatus</i> (Berchi, 2000).....	46
Figure 17: Morphologie générale d'une larve de IV ème de Culicinae (<i>Culex quinquefasciatus</i>) (Kettle,1995).	47
Figure 18: Aspect général d'une nymphe de Culicinae (<i>C. quinquefasciatus</i>) (Berchi,2000) ..	48

Figure 19: Morphologie du moustique adulte vu de profil (Brunhes et al, 1999).....	49
Figure 20: OEufs de <i>Culex quinquefasciatus</i> (Moulinier, 2003).....	50
Figure 21: Larves de <i>Culex quinquefasciatus</i> (Moulinier, 2003)	50
Figure 22: Nymphe de <i>Culex quinquefasciatus</i> A et B (Moulinier, 2003).....	51
Figure 23: <i>Culex</i> adulte ou imago (Moulinier, 2003).....	53
Figure 24: Dispositif pour l'élevage des larves dans des bacs couverts de cages avec tuile moustiquaire	60
Figure 25:Larve de moustique du genre <i>Culex</i>	61
Figure 26: Le Suneem1%.....	62
Figure 27: <i>Metarhizium anisopliae</i> culture(A) et dans le sachet(B)	63
Figure 28: Photo illustrant la phase de récolte des larves de moustiques	64
Figure 29:Traitement des moustiques avec le Suneem 1%.....	65
Figure 30: Bac traité avec le Suneem.....	66
Figure 31: Bac traité avec le M. anisopliae	67
Figure 32: Bacs de traitement avec le mélange.....	68
Figure 33: Bac traité avec le mélange	68
Figure 34: Milieu contrôlé de traitement.....	69
Figure 35: Evolution des taux de mortalité en fonction des concentrations du Suneem1%. ...	71
Figure 36: Evolution de la mortalité en fonction des doses du <i>Metarhizium anisopliae</i>	73
Figure 37:Suivi de la germination du <i>Metarhizium anisopliae</i>	73
Figure 38: Evolution de la mortalité en fonction de la concentration du mélange	75
Figure 39:Adhésion de spores de <i>Metarhizium anisopliae</i> sur la cuticule de larves de <i>Culex quinquefasciatus</i> (cas du mélange).....	77
Figure 40: Localisation des sites d'étude	90
Figure 41: Gîtes de bassin Keur Mbaye Fall avec végétation (A) et sans végétation (B).....	91
Figure 42: Gîtes de bassin Mbao Baobab avec végétation (A) sans végétation(B)	93
Figure 43: Gîtes de bassin Keur Massar U 3 avec végétation (A) et sans végétation(B)	94
Figure 44: Gîtes bassin Sante Yalla 2 avec végétation(A) et sans végétation(B).....	96
Figure 45: Gîtes bassin Keur Massar Marché avec végétation(A) et sans végétation(B).....	98
Figure 46: Gîtes bassin Keur Massar lycée avec végétation(A) et sans végétation(B).....	99
Figure 47: Gîtes de bassin Guinaw rail sans végétation(B) et avec végétation(A).....	101
Figure 48: Gîtes de bassin Pikine Rue 10 sans végétation(B) et avec végétation(A)	103
Figure 49: Gîtes de Djida Thiaroye Kao sans végétation(B) et avec végétation(A).....	104

Figure 50: Gîtes de Thiaroye Darou Salam sans végétation(B) et avec végétation(A)	106
Figure 51: Gîtes de bassin Yeumbeul Sud sans végétation (B) et végétation (A)	107
Figure 52: Gîtes bassin Kaffrine Sud sans végétation(B) et avec végétation(A).....	109
Figure 53: Gîtes kaffrine 2 Nord sans végétation(B) et avec végétation(A).....	110
Figure 54: Gîtes bassin Goudiry sans végétation (B) et avec végétation (A)	112
Figure 55: Evaluation des densités larvaires avant traitement	115
Figure 56: Densités larvaires comparatives des trois biopesticides utilisés (Suneem1%, <i>Metarhizium anisopliae</i> et le mélange (Suneem1% et <i>Metarhizium anisopliae</i>).....	123
Figure 57: Distribution des taux de mortalité des différents larvicides à Keur Mbaye FALL .	124
Figure 58: Distribution des taux de mortalité en fonction des différents larvicides au niveau du bassin de Mbaob Baobab.....	125
Figure 59: Taux de mortalité en fonction des larvicides pour le site de Keur Massar U3	126
Figure 60: Distribution des taux de mortalité en fonction des larvicides pour le site de Sante Yallah	127
Figure 61: Distribution des taux de mortalité en fonction des larvicides pour le site de Keur Massar Marche	128
Figure 62: Distribution des taux de mortalité en fonction des larvicides pour le site de Keur Massar Lycée.....	129
Figure 63: Statistique de distribution des taux de mortalité des larvicides, site Guinaw Rail Nord.....	130
Figure 64: Distribution des taux de mortalité en fonction des larvicides pour le site de Darou Salam.	131
Figure 65: Distribution des taux de mortalité en fonction des larvicides pour le site de Pikine Rue 10	132
Figure 66: Distribution des taux de mortalité en fonction des larvicides pour le site de Djida Thiaroye Kao.....	133
Figure 67: Statistique de distribution des taux de mortalité des larvicides, site de Yeumbeul Sud.....	134
Figure 68: Distributions des taux de mortalité en fonction des larvicides pour le Site de Kaffrine Sud.	135
Figure 69: Distributions des taux de mortalité en fonction des larvicides pour le site de Kaffrine Nord.	136

Figure 70: Distributions des taux de mortalite en fonction des larvicides pour le site de Goudiry.....	137
Figure 71: Comparaison des Pourcentages de mortalité des larves de moustique pour les deux biopesticides utilisés (Suneem1%, <i>Metarhizium anisopliae</i>) et leur mélange dans les differents sites.....	140
Figure 72: l'analyse statistique des Bayes entre les larvicides le <i>Metarhizium anisopliae</i> et le Melange.....	142
Figure 73: l'analyse statistique de Bayes entre les larvicides du Suneem 1% et le melange .	143
Figure 74: Analyse statistique de Bayes entre le Suneem 1% et <i>Metarhizium anisopliae</i>	144
Figure 75: Comparaison des Pourcentages de mortalité des larves de moustique pour les deux biopesticides utilisés (Suneem1%, <i>Metarhizium anisopliae</i>) et leur mélange dans les differents sites.....	147
Figure 76: Comparaison des Pourcentages de mortalité des larves de moustique pour les deux biopesticides utilisés (Suneem1%, <i>Metarhizium anisopliae</i>) et leur mélange dans les differents sites (Djiddah Thiaroye Kaw, Thiaroye Darou Salam, Yeumbeul Sud).	149
Figure 77: Comparaison des Pourcentages de mortalité des larves de moustique pour les deux biopesticides utilisés (Suneem1%, <i>Metarhizium anisopliae</i>) et leur mélange dans les differents sites (Kaffrine 2 Nord et Goudiry).	150

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I: Méthodes de dosage de l'azadirachtine dans les formulations et les extraits de neem	11
Tableau II: Teneur en azadirachtine A et B selon plusieurs zones géographique d'Inde	12
Tableau III: Quelques espèces sensibles à l'action de l'azadirachtine et à ses composés	15
Tableau IV: Quelques formulations à base d'azadirachtine	17
Tableau V: Teneur en huile de la graine, de l'amande et du fruit selon différentes origines ..	18
Tableau VI: Répartition des acides gras majoritaires de l'huile de neem et de quelques autres huiles végétales	19
Tableau VII: Composition des phytostérols de l'huile de neem	20
Tableau VIII: Position systématique de la famille des <i>Culicidae</i> Meigen, 1818 moustique ...	41
Tableau IX: Mortalité des larves moustiques en fonction des concentrations du Suneem 1% exprimées en (ml).....	71
Tableau X: Mortalité des larves de moustiques en fonction des concentrations du <i>Metarhizium anisopliae</i>	72
Tableau XI: Pourcentage (%) de mortalité des larves de moustiques en fonction des concentrations du mélange Suneem1% et <i>Metarhizium anisopliae</i> exprimées en (2ml+X.10 ⁸ spores)	75
Tableau XII: Densités larvaires avant et après traitement avec les produits	76
Tableau XIII: Pourcentages de mortalité des larves de <i>Culex</i> traitées avec les produits	76
Tableau XIV: Paramètres physico-chimiques des gîtes de Keur Mbaye Fall.....	92
Tableau XV: Paramètres géographiques des gîtes de Keur MBAYE FALL	92
Tableau XVI: Paramètres physico-chimiques des gîtes de Mbao Baobab.....	93
Tableau XVII: Paramètres géographiques des gîtes de Mbao Baobab	94
Tableau XVIII: Paramètres physico-chimiques des gîtes de Keur Massar U3.....	94
Tableau XIX: Paramètres géographiques des gîtes de Keur Massar U3.....	95
Tableau XX: Paramètres physico-chimiques des gîtes de Sante Yalla 2.....	96
Tableau XXI: Paramètres géographiques des gîtes de Sante Yalla 2 KM.....	97
Tableau XXII: Paramètres physico-chimiques des gîtes de Keur Massar Marché	98
Tableau XXIII: Paramètres géographiques des gîtes de Keur Massar Marché.....	99
Tableau XXIV: Paramètres physico-chimiques des gîtes de Keur Massar Lycée.....	100
Tableau XXV: Paramètres géographiques des gîtes de Keur Massar Lycée	100

Tableau XXVI: Paramètres physico-chimiques des gîtes de Guinaw Rail Nord.....	102
Tableau XXVII: Paramètres géographiques des gîtes de Guinaw Rail Nord	102
Tableau XXVIII: Paramètres physico-chimiques des gîtes de Pikine Rue 10.....	103
Tableau XXIX: Paramètres géographiques des gîtes de Pikine Rue 10.....	104
Tableau XXX: Paramètres physico-chimiques des gîtes de Djiddah Thiaroye Kao.....	105
Tableau XXXI: Paramètres géographiques des gîtes de Djiddah Thiaroye Kao	105
Tableau XXXII: Paramètres géographiques des gîtes de Thiaroye Darou SALAM	107
Tableau XXXIII: Paramètres physico-chimiques des gîtes de Yeumbeul Sud.....	108
Tableau XXXIV: Paramètres géographiques des gîtes de Yeumbeul Sud.	108
Tableau XXXV: Paramètres physico-chimiques des gîtes de Kaffrine 2 Sud.....	109
Tableau XXXVI: Paramètres géographiques des gîtes de Kaffrine 2 Sud	110
Tableau XXXVII: Paramètres physico-chimiques des gîtes de Kaffrine 2 Nord	111
Tableau XXXVIII: Paramètres géographiques des gîtes de Kaffrine 2 Nord.....	111
Tableau XXXIX: Paramètres physico-chimiques des gîtes de Goudiry	112
Tableau XL: Paramètres géographiques des gîtes de Goudiry.....	113
Tableau XLI: Densités larvaires avant et après traitement avec le Suneem 1%	120
Tableau XLII: Densités larvaires avant et après traitement avec le <i>Metarhizium anisopliae</i> .121	
Tableau XLIII: Densités larvaires avant et après traitement avec le mélange (Suneem 1% et <i>Metarhizium anisopliae</i>	121
Tableau XLIV: Densités larvaires avant et après traitement avec le mélange.....	122
Tableau XLV: Pourcentage de mortalité des larves de moustique traitées avec le melange. 138	
Tableau XLVI: Pourcentage de mortalité des larves de moustique traitées par <i>Metarhizium anisopliae</i> après 4 jours.....	145
Tableau XLVII: Pourcentage de mortalité des larves de moustique traitées avec le Suneem 1%.....	148

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION GENERALE	3
CHAPITRE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	7
I.1 LE NEEM ET SES PRINCIPALES CARACTÉRISTIQUES	8
I.1.1 Nomenclature et classification	8
I.1.1.1 Classification botanique	8
I.1.1.2 Nomenclature	9
I.1.2 Origine du neem	9
I.1.3 Propriétés insecticides du neem	9
I.1.4 L'azadirachtine : principe actif du neem	10
I.1.4.1 Structure et caractérisation de l'azadirachtine	10
I.1.4.2 Dosage de l'azadirachtine dans le neem	11
I.1.4.3 Activité insecticide de l'azadirachtine	14
I.2. Le champignon entomopathogène <i>Metarhizium anisopliae</i>	24
I.2.1 Généralités sur les champignons	24
I.2.2. Les champignons entomopathogènes	24
I.2.2. 1. <i>Metarhizium anisopliae</i>	25
I.2.2. 1.1. Taxonomie et Classification	25
I.2.2.1.2. Morphologie.....	27
I.2.2.1.3. Mode d'infection.....	29
I.2.2.1.4. Production des toxines	33
I.2.2.1.5. Réponse immunitaire à l'infection microbienne chez l'insecte	34
I.2.2.1.6. Facteurs affectant l'efficacité des champignons entomopathogènes	35
I.2.2.1.6.1. Facteurs liés aux pathogènes	35
I.2.2.1.6.2. Facteurs dépendant de l'hôte	35
I.2.2.1.6.3. Facteurs liés à l'environnement.....	36
I.2.2.1.6.3.1 Rayonnement solaire	36
I.2.2.1.6.3.2. Température	36
I.2.2.1.6.3.3. Humidité	37
I.2.2.1.6.3.4 Effet du sol.....	37
I.2.2.1.7. Avantages de l'utilisation de <i>Metarhizium anisopliae</i>	38
I.2.2.1.8. Production de <i>Metarhizium anisopliae</i>	39
I.2.2.1.9. Formulation à base de champignons entomopathogènes	40

I.2.2.1.10. Les essais biologiques et l'évaluation de l'infection	40
I.3. Les Moustiques	41
I.3.1. Généralités sur les moustiques	41
I.3.1. 1. Position systématique	41
I.3.1.2 Bio écologie des moustiques.....	42
I.3.1.3. Cycle de vie.....	42
I.3.1.4. Comportement trophique	44
I.3.1.5. Intérêts dans l'écosystème	44
I.3.1.6. Nuisance et intérêt médical	45
I.3.1.7. Le complexe <i>Culex quinquefasciatus</i>	45
I.3.1.7.1 Caractères morphologiques	45
I.3.1.7.2 Les oeufs	45
I.3.1.7.3. La larve	46
I.3.1.7.4. La nymphe	47
I.3.1.7.5. L'adulte	48
I.3.1.7.6. Bio écologie du <i>Culex quinquefasciatus</i>	49
I.3.1.7.6.1. L'oeuf	49
I.3.1.7.6.2. La larve	50
I.3.1.7.6.3. La nymphe	51
I.3.1.7.6.4. L'adulte	51
I.3.1.7.7. Les principales nuisances causées par le genre <i>Culex</i>	53
I.3.1.7.7.1. Les Piqûres	53
I.3.1.7.7.2. Transmission de maladies	54
I.3.1.7.8. Aperçu général sur les moyens de lutte contre les moustiques	55
I.3.1.7.8.1. La lutte mécanique.....	55
I.3.1.7.8.2. La lutte chimique	55
I.3.1.7.8.3. La lutte biologique	56
CHAPITRE II : TRAITEMENT DES LARVES EN MILIEU SEMI- NATUREL	58
II.1 MATERIEL ET METHODES	60
II.1.1. Matériel.....	60
II.1.1.1. Matériel expérimental.....	60
II.1.1.2. Matériel biologique	60
II.1.1.3. Matériel de traitement des moustiques	62

1. Le Suneem 1%	62
2. <i>Metarhizium anisopliae</i>	62
II.1.1.4. Petit matériel de laboratoire nécessaire au traitement	63
II.1.2. Méthodes	64
II.1.2. 1. Recoltes et identification des larves	64
II.1.2.2. Etude de la compatibilité entre le Suneem 1% et le <i>Metarhizium anisopliae</i>	64
II.1.2.3. Traitement des larves de moustiques.....	65
II.1.2.3.1. Traitement avec le Suneem1%	65
II.1.2.3.2. Multiplication des spores de <i>Metarhizium anisopliae</i> et Traitement des moustiques avec le même biopesticide	66
II.1.2.3.3. Traitement avec le mélange	67
II.1.2.3.4. Traitement simultané avec les biopesticides	69
II.1.3. Méthodologie d'analyse résultats	69
II.1.4. Résultats de traitement avec Suneem 1%	70
II.1.5. Résultats de traitement avec <i>Metarhizium anisopliae</i>	72
II.1.6. Résultats de traitement avec le mélange.....	74
II.1.7. Résultats du traitement sumilatif.....	75
II.1.8. – DISCUSSION.....	78
II.1.9. - Conclusion et perspectives	83
II.1.9. 1. Conclusion	83
II.1.9. 2. Perspectives	84
CHAPITRE III: TRAITEMENT DES LARVES EN MILIEU NATUREL	85
III.1 Présentation du milieu d'étude	114
III.1.1. Situation géographique	114
III.1.2. Description des sites et des gîtes d'échantillonnage	114
III.1.3. Les différents sites de traitement (gîtes larvaires) et leurs paramètres géographiques	114
III.1.4. Les conditions physico-chimiques des différents sites de traitement	114
III.2. Matériel et Méthodes.....	115
III.2.1. Matériel	88
III.2. 1.1. Matériel biologique	88
III.2.1.3. Matériel de traitement.....	89

III.2. 2. Méthodes	90
III.2.2.1 Evaluation des densités larvaires avant traitement.....	90
III.2.2.2. Etude de la compatibilité entre le Suneem 1% et le <i>Metarhizium anisopliae</i>	115
III.2.2.3. Methode de traitement des larves de moustiques aux biopesticides	115
III.2.2.3.1. Protocole expérimental commun pour Sunneem 1%, <i>Metharizium anisopliae</i> et Mélange des deux	115
III.2.2.3.2. Traitement des larves avec Suneem1%	116
III.2.2.3.3. Traitement des larves avec <i>Metarhizium anisopliae</i>	116
III.2.2.3.4. Traitement des larves avec le mélange <i>Metarhizium anisopliae</i> et Suneem 1%	117
III.2.2.4. Calcul de mortalité corrigée	118
III.2.2.5. Calcul de la DL50	118
III.2.2.6. Calcul des TL50	118
III.2.2.7. Calcul de la DL90	119
III.2.2.8. Calcul des TL90	119
III.2.2.9. Analyse statistique	119
III.2.2.9.1. Analyse de BAYES	119
III.2.2.9.2. Analyses des données.....	119
III.3. Résultats	120
III.3.1. Densités larvaires avec le Suneem 1%	120
III.3. 2. Densités larvaires avec le <i>Metarhizium anisopliae</i>	120
III.3.3. Densités larvaires avec le mélange (Suneem 1% et <i>Metarhizium anisopliae</i>)	121
III.3. 4. Analyse des résultats des différents sites	123
III.3. 5. Pourcentage de mortalité des larves de moustique traitées avec le melange	138
III.3.6. Analyse statistique de Bayes des résultats	141
III.3. 7. Pourcentage de mortalité des larves de moustique traitées avec <i>Metarhizium anisopliae</i>	145
III.3. 8. Pourcentage de mortalité des larves de moustique traitées avec le Suneem 1%.	147
III.4. Discussion	151
III.5. Conclusion	156
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	158
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	162

Abréviations et siggles

An.gambiae s.l : *Anopheles gambiae sensus lato*

A.Aegypti : *Aedes aegypti*

Cx quinquefasciatus : *Culex quinquefasciatus*

B. sphaericus : *Bacillus sphaericus*

A. indica : *Azadirachta indica*

UCAD : Université Cheikh Anta DIOP

FST : Faculté des Sciences et Techniques

DBA : Département de Biologie Animale

KFM : « Keur Mbaye Fall »,

MB : « Mbao Baobab »,

PKR10 : « Pikine Rue 10 »,

KM U3 : « Keur Massar U3 »,

PGR : « Pikine Guinaw Rail »,

DTK : « Djiddah Thiaroye Kaw »,

TDS : « Thiaroye Darou Salam »,

YS : « Yembeul Sud »,

KF : « Kaffrine »,

KF2S : « Kaffrine2 sud »,

KF2N : « Kaffrine2 nord »,

G : « Goudiry »,

DLAvT : Densités larvaires avant traitement,

DLApT : Densités larvaires après traitement,

TM : Taux de mortalités

Sun : « Suneem1% » ;

Meta : « *Metarhizium anisopliae* » ;

Sun Meta : « Suneem+*Metarhizium anisopliae* »

+

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION

Au Sénégal, les insectes en général et les moustiques en particulier ont toujours causé des nuisances (bourdonnement et piqûres) et des maladies telles que la fièvre-jaune, la dengue, le paludisme entre autres aux populations. Ces maladies sont dues à des agents pathogènes portés par les moustiques qui les transmettent à l'homme (Maire et Aubin, 1980 ; Belloncik *et al.*, 1982 ; Belloncik *et al.*, 1983; Wood, 1985). Les genres *Culex*, *Aedes* et *Anopheles* contiennent des espèces connues dans la transmission des maladies à l'homme.

Pour lutter contre ces moustiques, les chercheurs se sont très tôt orientés vers les insecticides chimiques, avec la découverte des propriétés du DDT (dichlorodiphényltrichloroéthane) de la famille des organochlorés par Paul Hermann Müller en 1939. Cet insecticide de première génération a joué un rôle important dans la lutte contre les moustiques en générale et contre le paludisme en particulier dans certains pays. Des succès importants étaient observés dans la lutte antipaludique : 300 millions de cas en 1946 ont été réduits à 120 millions de cas en 1976 (Brown *et al.*, 1976). Par la suite, des avancées de l'industrie chimique et l'essor de l'agriculture intensive ont permis le développement d'une deuxième génération d'insecticides représentée par trois grandes familles : les organophosphorés (téméphos, malathion), les carbamates (carbaryl, propoxur) et les pyréthriinoïdes de synthèse (perméthrine, deltaméthrine). Ces insecticides chimiques agissent pour la plupart au niveau du système nerveux des insectes, soit en bloquant l'acétylcholinestérase (organophosphorés et carbamates), soit en perturbant le fonctionnement des canaux sodium voltage dépendant (organochlorés et pyréthriinoïdes). Cependant, certains insecticides chimiques de synthèse commencent à être moins efficaces avec l'apparition de gènes de résistance notamment dans de nombreuses populations Culicidiennes vectrices du paludisme, de la filariose de Bancroft et de certaines arboviroses (Chauvet, 1978).

Selon le comité d'experts des insecticides de l'OMS (1970), chez les Culicidae, 19 espèces sont devenues résistantes dont 16 au DDT, 12 à la dièldrine et 9 aux composés organophosphorés (y compris *Culex pipiens* et *Aedes aegypti*). Parmi les 38 espèces d'anophèles devenues résistantes à un ou plusieurs insecticides, 36 le sont à la dièldrine et 15 au DDT.

Cependant, du fait de la résistance aux insecticides chimiques (Hamon *et al.*, 1972) et au manque de spécificité de ces dernières, il est nécessaire d'utiliser des insecticides biologiques pour lutter contre les insectes nuisibles.

Les recherches les plus intéressantes en matière de lutte contre les insectes piqueurs portent sur la production et l'emploi de parasites (protozoaires, nématodes) et d'agents pathogènes (virus, bactéries, champignons tels que *Metarhizium anisopliae* (Robert, 1984). La bactérie *Bacillus thuringiensis israelensis* entraîne une désintégration de l'épithélium intestinal par gonflement, distorsion puis éclatement des cellules d'*Aedes aegypti* (Barjac, 1978).

Le choix de ces organismes est intéressant parce qu'ils attaquent exclusivement les diptères piqueurs (spécificité) et qu'ils ne se trouvent pas dans la chaîne alimentaire car leur cycle de vie est court (Wood, 1985). L'organisme provoque la mort de l'insecte par contact ou par des métabolites fabriqués et introduits dans le milieu fréquenté par l'espèce cible. Contrairement aux insecticides chimiques, ces organismes pathogènes possèdent généralement une haute spécificité et ne persistent que peu de temps dans l'environnement.

De tous ces biopesticides, le neem (Suneem1%), le champignon entomopathogène (*Metarhizium anisopliae*) et leur mélange suscitent beaucoup d'intérêt dans le cadre de la lutte biologique (Lacey et Undeen, 1986). Ils contribuent considérablement à la régulation des populations d'insectes (Roberts, 1973 ; Ferron, 1975). L'un des plus intéressants appartient à la classe des Ascomycètes : il s'agit de *Metarhizium anisopliae* connu comme agent pathogène sur plus de 8 ordres d'insectes (Veen, 1968 ; Samuels *et al.*, 1989). En effet, lors de l'invasion de l'insecte par les hyphes du champignon, des métabolites toxiques sont émis par le pathogène. Ces métabolites accélèrent la mort de l'hôte (Vey *et al.*, 1986 ; Ignoffo, 1988; Ravallec *et al.*, 1989). La pathogénicité de *Metarhizium anisopliae* sur les larves de moustiques a été mise en évidence par plusieurs auteurs dans le monde (Ramoska, 1981 ; Daoust et Roberts, 1982 ; Scholte *et al.*, 2004 ; Seye *et al.*, 2012).

Toutefois, de nombreux travaux portaient sur l'étude des différents moyens de lutte contre les moustiques, citons ceux entrepris par Soltani *et al.*, (1999) sur l'utilisation de deux insecticides chimiques, à savoir l'Alsystine et le Triflumuron. Quant aux études visant l'activité larvicide des microorganismes, rappelons celle de Mansouri *et al.*, (2013) consacrée à l'utilisation de *Bacillus thuringiensis* sur les larves de *Culex pipiens*, celle de Seye *et al.*, 2012. Cependant, d'après la bibliographie aucun travail de terrain portant sur l'effet synergique larvicide des deux biopesticides (Suneem 1% et *Metarhizium anisopliae*) contre les larves de moustique (Diptera, Culicidae) (Say, 1823) n'a été publié à ce jour.

Aujourd'hui, notre recherche porte sur les effets synergiques du champignon (*Metarhizium anisopliae*) et du neem (Suneem 1%) sur les larves de moustique. Les moustiques présentent

un intérêt au Sénégal, en raison de leur large répartition géographique, leur abondance et leur nuisance réelle, surtout dans les zones ciblées.

Pour résoudre cette problématique nous nous sommes fixé comme objectif général d'étudier l'effet synergique et larvicide entre le neem (*Azadirachta indica*) et le champignon entomopathogène (*Metarhizium anisopliae*) contre les larves de moustique des genres *Culex*, *Aedes*, *Anopheles*. Et pour atteindre cet objectif plusieurs objectifs spécifiques sont déclinés :

- ✓ Montrer les effets larvicides du neem (Suneem 1%) sur les larves des genres *Culex*, *aedes*, *anopheles*.
- ✓ Caractériser les effets larvicides du *M. anisopliae* sur les larves des genres *Culex*, *Aedes*, *Anopheles*.
- ✓ Montrer la compatibilité entre le neem (*Suneem 1%*) et le champignon *Metarhizium anisopliae*.
- ✓ Déterminer les effets synergiques entre le neem (*Suneem 1%*) et *Metarhizium anisopliae* sur les larves des genres *Culex*, *Aedes*, *Anopheles*.

Notre travail est consacré d'abord à la synthèse des données bibliographiques relatives au neem (suneem1%), à l'entomopathogène *Metarhizium anisopliae* et aux moustiques.

Et ensuite au travail expérimental qui est structuré en trois chapitres composés chacun d'une partie illustrant les différentes techniques utilisées et d'une autre partie exposant, comparant et discutant les résultats obtenus.

- Le chapitre 1 concerne les conditions physicochimiques des sites de traitement des larves de *Culex*, *Aedes*, *Anopheles*.
- Dans le chapitre 2, nous nous intéressons à la mise en évidence de l'activité larvicide des différents produits à savoir le neem (Suneem1%), le *Metarhizium anisopliae* et leur mélange sur les larves de *Culex*, *Aedes*, *Anopheles*.
- Le dernier chapitre traite de l'étude de l'effet histopatologique des biopesticides sur les larves de *Culex*, *Aedes*, *Anopheles*.

Enfin, ce travail est clôturé par une discussion, une conclusion générale et la mise en évidence des perspectives de recherche.

CHAPITRE I :
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

La synthèse bibliographique porte sur le neem (*Azadirachta indica*, A. Juss, 1830), sur *Metarhizium anisopliae* et sur les moustiques des genres *Culex*, *Aedes* et *Anopheles*.

I.1 LE NEEM ET SES PRINCIPALES CARACTÉRISTIQUES

Aujourd'hui connu sous le nom botanique d'*Azadirachta indica* A. Juss, 1830, le neem est un arbre qui appartient à la famille des méliacées. Il a fait l'objet d'intenses activités de recherches depuis l'isolement en passant par la caractérisation de l'azadirachtine comme insecticide naturel à partir des graines (Butterworth et Morgan, 1968). Cet arbre est originaire du sous-continent indien où ses propriétés médicinales sont connues depuis des millénaires. Au début du XX^{ème} siècle, l'arbre est introduit dans plusieurs pays en voie de développement particulièrement en Afrique tropicale. Il a fait l'objet d'intenses campagnes de plantations au cours des dernières années, particulièrement au Sénégal où on le trouve aussi bien en campagne qu'en ville.

I.1.1 Classification et Nomenclature

I.1.1.1 Classification botanique

Le neem peut être classé comme suit (Schmutterer, 1995 ; PURI, 1999):

Embranchement : Angiospermes (plantes à fleurs)

Sous-embranchement : Magnoliophyta

Classe : Magnoliopsida

Sous classe : Rosidae

Super ordre : Rosanae

Ordre : Sapindales

Sous ordre : Rutineae

Famille : Meliaceae

Sous famille : Melioideae

Genre : *Azadirachta*

Espèce : *indica*

Nom binomial : *A. indica* A. Juss, 1830

I.1.1.2 Nomenclature

Azadirachta indica, appelé « neem » en wolof (langue nationale sénégalaise), possède plusieurs noms vernaculaires selon les régions géographiques.

Autres noms vernaculaires :

Français : Acacia d’Egypte, margousier, arbre à chapelets, Lilas des Indes (à ne pas confondre avec le *Lagestroemia*). Anglais: neem tree, Indian lilac, Margosa tree, Persian lilac, China berry.

I.1.2 Origine du neem

Plusieurs sources bibliographiques évoquent l’origine géographique du neem, mais la majorité des auteurs s’accorde à dire que l’arbre est originaire de l’Inde. Ainsi selon plusieurs auteurs (Oo, 1989 ; Gamble, 1902 ; Troup, 1921 ; Vartak et Ghate, 1990), le neem est originaire soit de la forêt de Karnaba au sud de l’Inde, soit de l’intérieur de la forêt de Buma Myanmar. Mais pour d’autres, cet arbre proviendrait de la forêt de Chivalik (Puri, 1999).

Cependant, d’autres situent son origine dans les forêts sud et sud-est de l’Asie, y compris le Pakistan, le Sri Lanka, la Thaïlande, la Malaisie et l’Indonésie (National Research Council, 1992).

I.1.3 Propriétés insecticides du neem

Ce sont les propriétés insecticides des extraits de neem qui ont été les plus étudiées. Et bien que cette activité soit mentionnée dans les récits médicaux sanskrits il y a de cela des milliers d’années, les énormes potentialités du neem pour le contrôle et la lutte contre les insectes ravageurs ne sont devenues claires que récemment, en particulier en réponse au problème posé par la bioaccumulation et la toxicité des pesticides de synthèse utilisés pour l’agriculture depuis plus de 60 ans. La capacité du neem à repousser les insectes a été signalée pour la première fois dans la littérature scientifique en 1928 et 1929 par deux chercheurs indiens (Chopra, R.N. et Husain, M.A.), qui ont utilisé 0,001% d’une suspension aqueuse de graines de neem pour repousser du sol des criquets pèlerins (Schmutterer, 1995). En 1962, à New Delhi, Pradhan constate que les criquets refusent de manger les cultures traitées par pulvérisation d’un extrait aqueux de graines de neem, et ce jusqu’à trois semaines après le traitement (Schmutterer, 1995). Dix ans plus tard, des essais réalisés à la station de recherche sur le café en Haute Kiambu (Kenya) ont montré que les extraits méthanoliques de feuilles de

neem contrôlaient la croissance du bogue du café (*Antestiopus orbitalis bechuana*) (Schmutterer, 1995). La plupart des groupes d'insectes traités avec cet extrait perdait la vie au cours des mues et les rares survivants présentaient des malformations au niveau des ailes et du thorax à l'âge adulte. De même les extraits méthanoliques d'amande de neem se sont avérés efficaces pour la réduction de la fécondité de coléoptères du haricot mexicain (*Epilachna varivestis*) et de la patate du Colorado (*Leptinotarsa decemlineata*). Certaines femelles avaient presque cessé de pondre et d'autres étaient devenues stériles (Schmutterer, 1995). Ces activités insecticides des extraits de neem sont attribuées à la présence dans différentes parties de la plante de plusieurs composés de la famille des terpénoïdes. Parmi les nombreux dérivés de la sous famille des limonoïdes qui ont été identifiés et dont l'activité biologique a été étudiée, c'est l'azadirachtine et ses dérivés qui ont fait l'objet du plus grand nombre.

I.1.4 L'azadirachtine : principe actif du neem

I.1.4.1 Structure et caractérisation de l'azadirachtine

Butterworth et Morgan (1968) ont isolé pour la première fois l'azadirachtine sous sa forme cristalline à partir d'extraits méthanoliques de graines de neem. Bien que sa présence ait aussi été signalée dans un autre arbre *Melia Azedarach*. L. (Morgan et Thornton, 1973) qui pousse dans les mêmes régions, cette molécule apparaît spécifique au neem. En réalité, depuis la première proposition de structure (Butterworth *et al.*, 1972), modifiée par Kraus *et al.*, (1985 a,b ; 1986 ; 1987 c) et Pöhl (1985) plusieurs molécules de structure analogue ont aussi été isolées à partir du neem et peuvent être classées en trois groupes : les azadirachtoles, les azadirachtines et les méliacarpines (Schmutterer, 1995). Par mesure de simplification, ces dérivés qui présentent le même squelette carboné mais diffèrent par la position ou la nature des substituants, ont été désignés sous le nom générique d'azadirachtine, affecté d'une lettre A, B, C etc. (Figure I-3, Remboldt *et al.*, 1987 a,b ; Remboldt, 1989 a ; Yamasaki et Klock, 1987). C'est l'azadirachtine A qui est considérée comme le motif structural de référence.

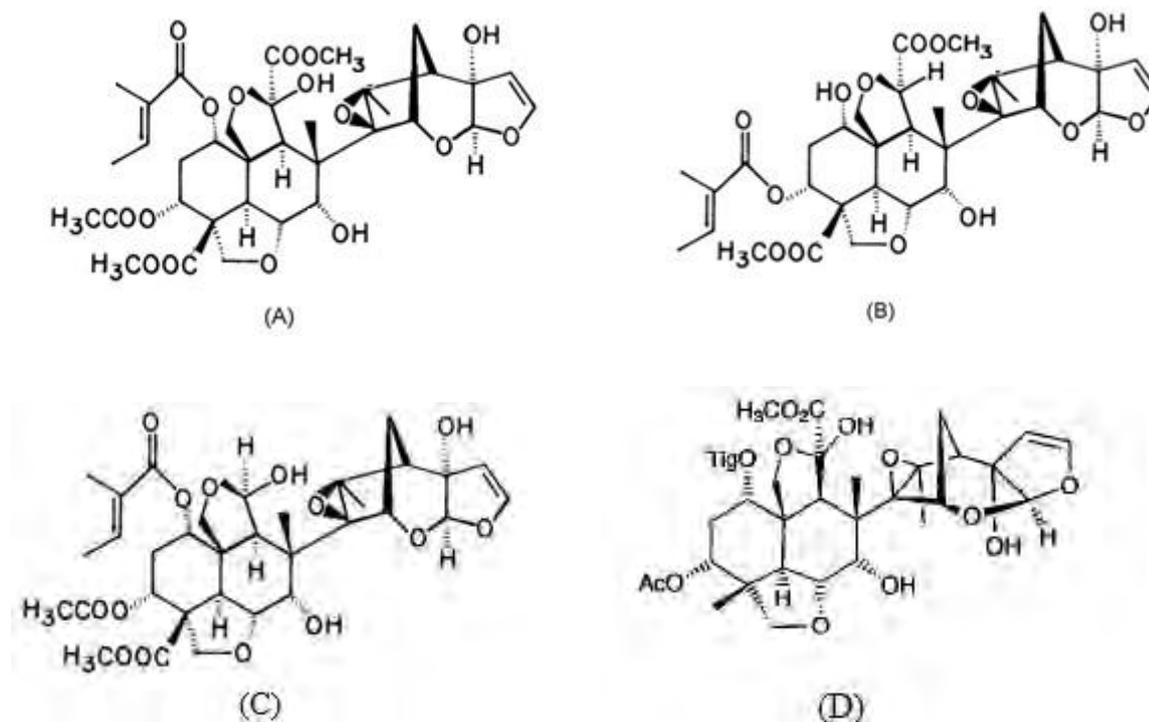


Figure 1: Formules de l'azadirachtine A et ses dérivés

I.1.4.2 Dosage de l'azadirachtine dans le neem

Les méthodes de dosage de l'azadirachtine dans les extraits de neem ont fait l'objet de nombreux travaux (Tableau I).

Tableau I : Méthodes de dosage de l'azadirachtine dans les formulations et les extraits de neem

Méthode	Phase mobile	Longueur d'onde du détecteur UV (nm)	Références
Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP)	Ethanol-eau		WARTEN <i>et al.</i> , 1984
Chromatographie Flash puis HPLC	Acétonitrile-eau (30- 70)	254	YAMASAKI <i>et al.</i> , 1986
Chromatographie Liquide Haute Performance.	Acétonitrile-eau (60- 40)	214	KAUSHIK, 2002
Chromatographie Liquide Haute Performance.	Méthanol-eau (65- 35)	214	RENGASAMY <i>et al.</i> , 1993
Chromatographie Liquide Haute Performance.	Méthanol-eau (60- 40)	215	GOVINDACHARI <i>et al.</i> , 1990
Chromatographie Liquide Haute Performance.	Méthanol-eau (70- 30)	214	KUMAR et PAMAR, 1996
Chromatographie Liquide Haute Performance.	Acétonitrile-eau (Gradient)	217	JOHNSON et MORGAN <i>et al.</i> , 1997
Chromatographie Liquide Haute Performance.	Acétonitrile-eau (Gradient)	210	THEJAVATHI <i>et al.</i> , 1995

Outre la caractérisation des différentes structures des dérivés de l'azadirachtine, ces méthodes ont permis d'étudier les variations de sa teneur dans les graines de neem (Ermel *et al.*, 1984 ; Ermel *et al.*, 1987 ; Ketkar and Ketkar, 1993 ; Rengasamy *et al.*, 1993). En particulier, l'étude menée par Ermel *et al.*, (1984, 1987) révèle que la teneur moyenne en azadirachtine des amandes de graines de neem (Tableau 1) peut varier de 2,05 à 6,10 g.kg⁻¹ d'amande. Les valeurs extrêmes rencontrées sont de 2,05 g.kg⁻¹ pour la plus faible au Mali, et de 6,10 g.kg⁻¹ pour la plus forte, mais la valeur moyenne pour les 256 échantillons provenant de 22 pays est de 3,60 g.kg⁻¹. Au Sénégal, elle est de 3,30 g.kg⁻¹. La forme A de l'azadirachtine est toujours nettement majoritaire par rapport à la forme B (près de 10 à 30 fois plus, à quelques exceptions près : Tableau 2). Par comparaison avec le dosage des triterpénoïdes, nimbine et salannine rapporté par ces mêmes auteurs (Sidhu *et al.*, 2004) dans le cas de graines de neem provenant de six états d'Asie, l'azadirachtine est le limonoïde majoritaire, bien que la teneur en salannine puisse atteindre des valeurs équivalentes dans certains cas (1 000 à 1 800 mg.kg⁻¹ d'amande).

Tableau II : Teneur en azadirachtine A et B selon plusieurs zones géographique d'Inde

Provenance	Aire de l'amande	Azadirachtine A (mg.kg ⁻¹)	Azadirachtine B (mg.kg ⁻¹)	Azadirachtine (A+B) (mg.kg ⁻¹)	Ratio (A/B)
Oraia	83,5	556,9	225,7	782,6	2,47
Chaprab	98,1	678,6	111,5	790,2	6,13
Auraiyaa	83,7	804,2	68,1	872,3	33,07
Kanyakumaric	88,9	829,9	379,4	1209,3	2,95
Bijnora	73,4	834,8	177,1	1011,9	4,71
Kannauja	102,1	880,2	312,3	1192,5	3,32
Rampura	72,3	929,7	88,9	1018,7	10,48
Gazipura	98,8	942,6	66,2	1008,9	14,31
Ajmerd	86,3	955,5	316,2	1271,7	3,02
Bhagalpurb	100,3	980,6	101,9	1082,5	9,62
Baraunib	90,9	982,7	147,4	1130,1	7,25
Darbhanga	89,9	1002,5	119,7	1122,1	8,42
Jodhpurd	68,8	1003,1	103,2	1106,3	9,71
Moradabada	101,3	1013,3	214,7	1228,1	6,41
Farrukhabada	112,3	1022,5	94	1116,5	10,7
Mathuraa	90,5	1071,8	58,7	1130,5	31,41
Kheria	91,6	1082,6	173,2	1255,7	5,88
Jaisalmerd	75,2	1092,2	426,2	1518,4	2,56
Hathrasa	82,4	1126,9	134,4	1261,2	8,4
Ranchig	92,5	1159,8	190,1	1349,9	6,09
Muzzafarpurb	90,1	1169,4	141,5	1310,9	8,26

Bulandshahara	97		1205,1	139,4	1344,5	9,79
Haridware	83,3		1231	182,8	1413,8	7,17
Hazipurb	101,1		1254,4	96,6	1351	13,04
Patnab	86,2		1272,6	228,3	1500,9	5,58
Lucknowa	105,2		1334,2	139,4	1473,6	9,66
Badauna	97,8		1388,1	143,9	1532	9,64
Dehradune	89,3		1459,7	326,6	1786,3	4,72
JP Nagara	74,9		1505,2	590,6	2095,9	6,03
Varanasia	104,8		1531,7	69,7	1601,5	24,54
Muzzafarnagara	88,8		1534,5	149,7	1684,2	10,27
Meeruta	101,2		1573,8	105,2	1679	22,63
Agraa	76,2		1576,2	261,9	1838	8,16
Siwanb	81,1		1629	96	1725	17
Kanpura	80,5		1671,4	68,9	1740,4	23,14
Pratapgarha	78,9		1705,9	100,8	1806,7	17,12
Jaipurd	92,6		1706,4	251,5	1957,9	6,78
Samastipurb	84,5		1916,5	95	2011,5	20,19
Fatehpura	97		1941,2	43,1	1984,3	98,15
Rohtakf	86,6		2032,9	243,9	2276,8	8,33
Maua	92,6		2058,2	100,3	2158,5	20,53
Sri Ganganagard	89	2400	172,3	2572,3	13,92	
Shahjahanpura	110,9	3030,8	134,1	3165	24,32	

L'évolution de la teneur en azadirachtine a également été étudiée aux différents stades de floraison et de fructification de l'arbre (Rangaswamy et Parmar, 1994). Non détectable jusqu'à 40 jours après l'anthèse, l'azadirachtine apparaît à l'âge de neuf semaines du fruit vert (Yakkundi *et al.*, 1995), et s'accumule pour atteindre son maximum après 19 semaines, lorsque le fruit commence à changer de couleur en virant du vert au jaune. JOHNSON *et al.*, (1996) ont étudié le développement des terpénoïdes majeurs du neem (azadirachtine, nimbine, salanine, déacétylnimbine, déacétylsalanine) de six arbres du village de Dambulla au Centre Nord du Sri Lanka.

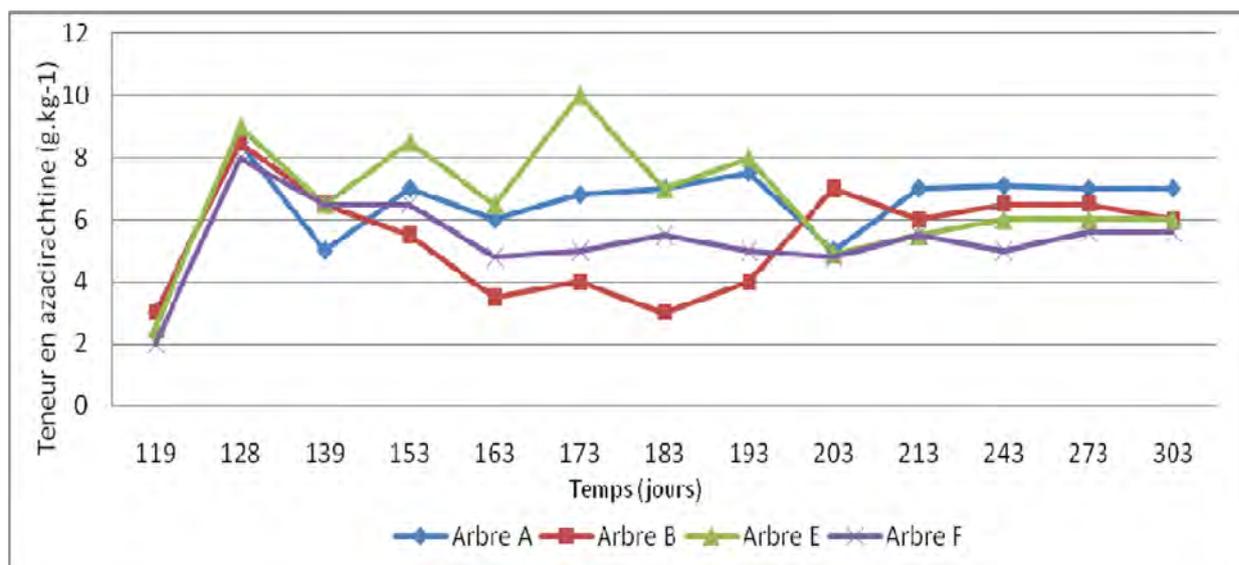


Figure 2: Développement de la teneur en azadirachtine au moment de la fructification de la graine en fonction du temps des arbres A à F. (Faye, 2010)

I.2.3.3 Activité insecticide de l'azadirachtine

Depuis la mise en évidence des propriétés de régulation de la croissance d'insectes (Insect growth Regulating) en 1972 (Schmutterer, 1995), l'azadirachtine, considéré comme principal composé actif du neem, a fait l'objet de nombreux travaux et publications (Lavie et al., 1971 ; Connolly, 1983 ; Kraus, 1983 ; Kraus et al., 1985, 1987 ; Mogan et Mandava, 1987 ; Siddiqui et al., 1988 ; Balandrin et al., 1988), y compris dans le cadre de congrès internationaux organisés sur le neem (Schmutterer et al., 1981 ; Schmutterer et Ascher, 1984). D'autres propriétés insecticides de l'azadirachtine et d'extraits de neem ont ainsi été mises en évidence : effet anti-nutritif ou répulsif, et de réduction de la fécondité (Tableau 3).

Tableau III : Quelques espèces (bactéries, champignons, insectes, protozoaires et nématodes) sensibles à l'action de l'azadirachtine et à ses composés

Composés	organismes sensibles	Activités biologiques		Références
Azadirachtine A				BUTTERWORTH et al., 1968 KRAUS et al., 1985b, 1987c BUTTERWORTH et al., 1968 KRAUS et al., 1985b, 1987c
	<i>Acricotopus lucidus</i>	G	100% à 1µg.mL ⁻¹	STAIBER, 1992
	<i>Epilachna varivestis</i>	A	EC50=13ppm	SCHWINGER, 1985 SCHWINGER, et al., 1984 KRAUS et al., 1991, 1993a
		G	LC50=1,66ppm	REMBOLD, 1989a,b
		G	69% à 1,00ppm	SCHWINGER, 1985
		G	60% à 0,01µg.g ⁻¹	BAUMANN, 1985 KRAUS et al., 1991, 1993a
	<i>Helicoverpa zea</i>	G	EC50=0,7ppm	KUBO and KLOCKE, 1982
	<i>Heliothis virescens</i>	G	EC50=0,7ppm	KUBO and KLOCKE, 1982
		G	EC50=0,07ppm	YAMASAKI et al., 1987
		L	LC50=0,8ppm	YAMASAKI et al., 1987
	<i>Melanoplus sanguinipes</i>	G	ED50=10,8ppm	CHAMPAGNE et al., 1989, 1992
	<i>Oncopeltus fasciatus</i>	G	ED50=3,5ppm	ISMAN et al., 1990
		G	ED50=5ppm	CHAMPAGNE et al., 1989, 1992
	<i>Pectinophora gossypiella</i>	G	EC50=0,4ppm	KUBO and KLOCKE, 1982 KUBO et al., 1986
	<i>Peridroma saucia</i>	A	EC50=8,0g/cm ²	ISMAN et al., 1990
		G	EC50=0,26ppm	ISMAN et al., 1990
		G	EC50=0,4mol.g ⁻¹	CHAMPAGNE et al., 1989, 1992
		G	100% à 2µg.g ⁻¹	KOUL et al., 1990
	<i>Popillia japonica</i>	A	EC50=2ppm	SCHWINGER, 1985
	<i>Schistocerca gregaria</i>	A	100% à 0,07ppm	BUTTERWORTH et al., 1968
	<i>Spodoptera frugiperda</i>	G	EC50=0,4ppm	KUBO et al., 1986 KUBO and KLOCKE, 1982
		G	EC50=0,08ppm	LEE et al., 1991
		L	LC50=1ppm	LEE et al., 1991
	<i>Spodoptera littoralis</i>	A	EC50=0,07ppm	KLINGELE, 1985
		A	98,8% à 1ppm	LEY et al., 1993
		G	20-30% à 10ppm	BAUMANN, 1985
		G	100% à 10µg.g ⁻¹	BAUMANN, 1985
<i>Tenebrio molitor</i>	G	100% à 1µg.g ⁻¹	PASCUAL et al., 1990	

	<i>Trypanosoma cruzi</i>	G	ED50=0,25µg.g ⁻¹ GONZALES et al., 1992	A=ac tivité anti- appét ant, G=in hibite ur de la croiss ance, L=act ivité anti- larvai re,
Décétylazadirachtine			REMBOLD, 1989a,b THIELE, 1991 KRAUS et al., 1991, 1993a	
	<i>Epilachna varivestis</i>	G	EC50=0,38ppm REMBOLD, 1989a,b	
	<i>Heliothis virescens</i>	G	EC50=0,09ppm YAMASAKI et al., 1987	
		L	LC50=0,37ppm YAMASAKI et al., 1987	
Tigloylazadirachtol			KLENK, 1985	
(Azadirachtine B)			KLENK <i>et al.</i> , 1986	
			REMBOLD, 1987a,b	
			BILTON <i>et al.</i> , 1988	
	<i>Epilachna varivestis</i>		70% à 0,01µg.g ⁻¹ SCHWINGER, 1985	
			85% à 2ppm SCHWINGER, 1985	
			KRAUS et al., 1991, 1993a	
			ED50=1,3ppm REMBOLD, 1987b, 1989a,b	
	<i>Heliothis virescens</i>		ED50=0,17ppm KUBO et al., 1986	
			LC50=0,8ppm KUBO et al., 1986	
			65% à 5ppm KLINGELE, 1985	
			LEY et al., 1993	
1-Detigloylazadirachtin			EC50=0,15ppm GARCIA et al., 1984	
	<i>Epilachna varivestis</i>		REMBOLD, 1989a,b EC50=0,57ppm REMBOLD, 1989a,b	

EC50=Concentration Effective 50 : dose qui induit 50% d'effet, ED50=Dose Effective 50, LC50, Concentration Létale 50

Ainsi, l'azadirachtine provoquerait plus de 90% des effets de la plupart des insecticides conventionnels. Ce principe actif naturel ne tue pas les insectes, du moins pas immédiatement, mais agit comme répulsif, et perturbe leur croissance ainsi que leur reproduction. Les recherches effectuées au cours des dernières années ont montré qu'il est l'un des plus puissants régulateurs de croissance et de dissuasion de l'alimentation jamais découvert vis-à-vis de plusieurs espèces d'insectes ravageurs, ainsi que de certains nématodes. C'est une substance si puissante que la présence d'une faible trace peut empêcher certains insectes de toucher aux plantes. D'après Schmutterer *et al* (1995), la structure de l'azadirachtine est similaire à celle de l'hormone des insectes appelée « ecdysone », qui contrôle le processus de méthamorphose des insectes qui passent du stade de larve à pupe, et à l'âge adulte. Elle affecte le *corpus cardiacum*, qui contrôle la sécrétion des hormones. Le changement métamorphique requiert une synchronisation aiguë de nombreuses hormones et d'autres changements physiologiques pour aboutir. L'azadirachtine semblerait bloquer l'ecdysone, la sécrétion de ces hormones vitales et la croissance des insectes. Les insectes ne peuvent pas muer, et c'est

ce qui freine leur cycle de vie. Ces remarquables propriétés insecticides de l'azadirachtine, active contre une très large gamme d'insectes à des doses inférieures à 0,1 ppm, la placent comme l'une des plus prometteuses parmi les substances naturelles actives extraites des familles de plantes actuellement étudiées. Susceptibles de contrôler efficacement les populations d'insectes nuisibles, ces insecticides naturels, contre lesquels les insectes auront de la difficulté à mobiliser leur système de détoxification, garantie de la durabilité de leur effet, auront l'avantage de ne pas provoquer d'effet d'accumulation de produits neurotoxiques pour l'homme. Ainsi, les formulations artisanales à base d'extraits de neem sont utilisées depuis fort longtemps (Eppler, 1993a ; Eppler, 1993b ; Feuerhake et schmutterer, 1982 ; Ahmed, 1988 ; Kaushik *et al.*, 2002). Actuellement, plusieurs formulations à base d'azadirachtine (extraite du neem) sont commercialisées dans plusieurs pays sous des noms variés (Econeem plus, neemix, etc. ; Tableau IV).

Cependant, comme dans le cas de nombreuses substances naturelles, le développement de l'utilisation de cet insecticide naturel est dépendant de la disponibilité de sa production

Tableau IV: Quelques formulations à base d'azadirachtine (Faye, 2010)

Nom commercial	Teneur en Azadirachtine	Fabriquant	Pays	Références
Nimbecidine®	(0,03%)	T. Stanes and Company Ltd.	Inde	KUMAR et al., 2003
Econeem Plus®	(1%)	Margo Bio-control Pvt. Ltd.	Inde	KUMAR et al., 2003
Solunecm®	(6,5%)	Vittal Mallya Research Foundation	Inde	KUMAR et al., 2003
Limonoool®	(0,03%)	Bio Multi-tech (Pvt) Ltd.	Inde	KUMAR et al., 2003
Neemgold®	(0,15%)	SPIC Biotechnology Division	Inde	KUMAR et al., 2003
Econeem Plus®	(1%)	Margo Bio-control Pvt. Ltd.	Inde	KUMAR et al., 2003
Fortune Aza®	(3%)	Fortune Bio tech Lab, Hyderabad	Inde	KUMAR et al., 2003
NeemAzal TM-F	(5%)	EID Parry (India) Ltd.	Inde	KUMAR et al., 2003
Neemix 4.5®	(4,5%)	-	Canada	Agence de Réglementation de la Lutte antiparasitaire
Margocide-OK ^Z	-	Monofix Agroproducts Ltd.	Inde	PARMAR et KETKAR, 1993
Neemark	-	west Coast Herbochem Pvt. Ltd.	Inde	PARMAR et KETKAR, 1993
Neem Oil Emulsion	-	Sio Agro Research Laboratories	Inde	PARMAR et KETKAR, 1993
Neem Plus	-	B.D.Keathen and Co.	Inde	PARMAR et KETKAR, 1993
Neemrich	-	National Chemical Laboratories	Inde	PARMAR et KETKAR, 1993
Neemosan	-	Agro Links	Inde	PARMAR et KETKAR, 1993
Neemta 2100	-	A.J. chemicals	Inde	PARMAR et KETKAR, 1993
Nimlin	-	Sunline Agro Chemicals	Inde	PARMAR et KETKAR, 1993
Neem Azal T/S	(1%)	Trifolio-M	Allemagne	BIOFIL, 2008
Margosan-o	(0,3%)	Grace Sierra Co.	USA	BIOFIL, 2008
Bioneem	(1%)	Ringer Corporation	USA	BIOFIL, 2008
Suneem	(1%)	SENCHEM	Sénégal	-

En effet, les analyses de la teneur en huile de la graine et de l'amande de neem relevées dans la littérature (Tableau V) montrent que les lipides constituent la fraction majoritaire (30 à 50% de la masse de matière sèche des amandes).

Tableau V: Teneur en huile de la graine, de l'amande et du fruit selon différentes origines (Faye, 2010)

Teneur en huile (%)	Matières	Lieu de croissance Références	
20 à 32,62	Graine	Inde	KAURA <i>et al.</i> , 1998
32,9 à 51,6	Amande	Inde	SIDHU <i>et al.</i> , 2003
30 à 50	Amande	Inde	KAUSHIK <i>et al.</i> , 2002
30 à 50	Amande	Inde	KAUSHIK et VIR, 2000
32, 9 à 45,5	Amande	Inde	SIDHU <i>et al.</i> , 2004
18,7 à 24,5	Fruit	Mexique	MUNOZ-VALENZUELA <i>et al.</i> , 2007
30	Graine	Cote d'Ivoire	GOSSE <i>et al.</i> , 2005
43	Amande	Brésil	MOMCHILOVA <i>et al.</i> , 2007

L'huile obtenue par extraction des graines, de couleur jaune pâle à noirâtre, possède une odeur alliacée et une saveur très amère (Ndiaye, 2002). Ses caractéristiques sont les suivantes (Djenontin, 2006 ; Ndiaye, 2002).

Poids spécifique à 25°C : 0,914 - 0,923 Indice de saponification : 185 à 197

Indice d'iode : 69 à 73 (méthode de Wijs)

Indice de réfraction : 1,466

Point de fusion : 25°C

Point de solidification : 9°C

Sa composition en acides gras, caractérisée par les quatre majoritaires : oléique, palmitique, stéarique et linoléique, la distingue des principales huiles exotiques (Jatropha, Chanvre, etc.) et alimentaires (Tournesol, Arachide, etc.) produites industriellement (Tableau VI).

Tableau VI : Répartition des acides gras majoritaires de l'huile de neem et de quelques autres huiles végétales (%)

Graines	Palmitique	Stéarique	Oléique	Linoléique	Références
Neem	17,87 – 22,67	9,09 - 18,79	39,92 - 49,12	17,28 - 24,34	KAUSHIK et al., 2002
Neem	17,3 - 34,3	6,6 - 24	25,4 - 54,2	6,2 - 16,7	KAUSHIK et VIR, 2000
Neem			45,50		MUNOZ-VALENZUELA et al., 2007
Neem	19,4	16,4	43,1	17,6	GOSSE et al., 2005
Neem	17,8	17,4	43,5	18,7	DJENONTIN, 2006
Jatropha	13 -15	6,5 - 7,8	32 - 45	15 - 32	KPOVIESSI et al., 2004
Chanvre	7,9	2,7	20,3	51,3	STAMBOULI et al., 2006
Canarium	3,8	3,2	89,4	0,7	KPOVIESSI et al., 2004
Soja	8,0 - 12,0	2 - 4,5	20 - 25	51 -58	PERRIN, 1999
Tournesol	6,1	3,5	29,4	56,9	EVON, 2008
Arachide	0 - 13	3,0 - 4	48-66	14-28	PERRIN, 1999
Olive	8,5-14	3,0 - 5	61-80	3,0 -15	PERRIN, 1999
Palme	41-46	4,0 - 7	36-42	8,0 - 12	PERRIN, 1999

La proportion de matières insaponifiables (colorants, stérols, tocophérols, cires, vitamines liposolubles, hydrocarbures, etc.) contenue dans un corps gras dépend bien évidemment de son origine biologique, des traitements qu'il a pu subir (raffinage), ainsi que de la nature du solvant d'extraction. Les phytostérols et les tocophérols constituent la partie la plus importante de cette fraction. Leur composition dépend du type d'huile mais le β -sitostérol, le campestérol et le stigmastérol sont, dans l'ordre, les plus importants en termes de quantité. La composition en phytostérols de l'huile de neem, qui peuvent représenter jusqu'à 2% (Momchilova *et al.*, 2007), n'est pas bien rapportée dans la littérature. Cependant nous pouvons souligner les travaux effectués par Gosse *et al.*, (2005) en Cote d'Ivoire, Djenontin, (2006) au Bénin et Momchilova *et al.*, (2007) au Brésil (Tableau VII).

Tableau VII : Composition des phytostérols de l'huile de neem

Teneur (%)	<u>GOSSE et al., 2005</u>	<u>DJENONTIN, 2006</u>	<u>MOMCHILOVA et al., 2007</u>
Δ^5 -Campestérol	0,3	5,5	8,3
Δ^7 -Stigmastérol	19,2	11,1	16,8
β -Sitostérol	62,9	77,7	70,1
Δ^7 -Avenastérol	15,6	4,0	
Cholestérol	0,8	0,9	
Fucostérol			4,1
4-méthylcholestérol	1,2		
Non identifié		0,9	0,7

Impropre à la consommation humaine, du fait des nombreux produits actifs qu'elle contient et de son amertume, l'huile de neem est traditionnellement utilisée pour produire du savon. Elle est aussi utilisée pour des applications cosmétiques (shampoings anti-pelliculaires ou contre les poux, pâtes à dentifrices, huiles corporelles et de protection solaire, savons dermatologiques, lotions antiseptiques et pour lutter contre l'acné, l'eczéma, le psoriasis, ...) Enfin elle entre dans la formulation des pesticides à base d'azadirachtine extrait du neem (Neemix, Econeem Plus, etc.). L'extraction de l'huile des graines de neem laisse un tourteau qui est caractérisé par une forte teneur en azote et donc en protéines, une proportion moyenne de matière minérale et une faible proportion en cellulose. Ceci expliquerait son utilisation traditionnelle comme aliment de bétail. Riche en azote, phosphore et potassium, elle est également utilisée comme matière fertilisante dans les champs mais aussi comme insecticide du fait de sa teneur en matières bioactives (azadirachtine, nimbine, salannine, etc.). Les procédés d'extraction et caractérisation analytique sont rapportés dans la Figure 3, et la Figure 4 (les procédés de production).

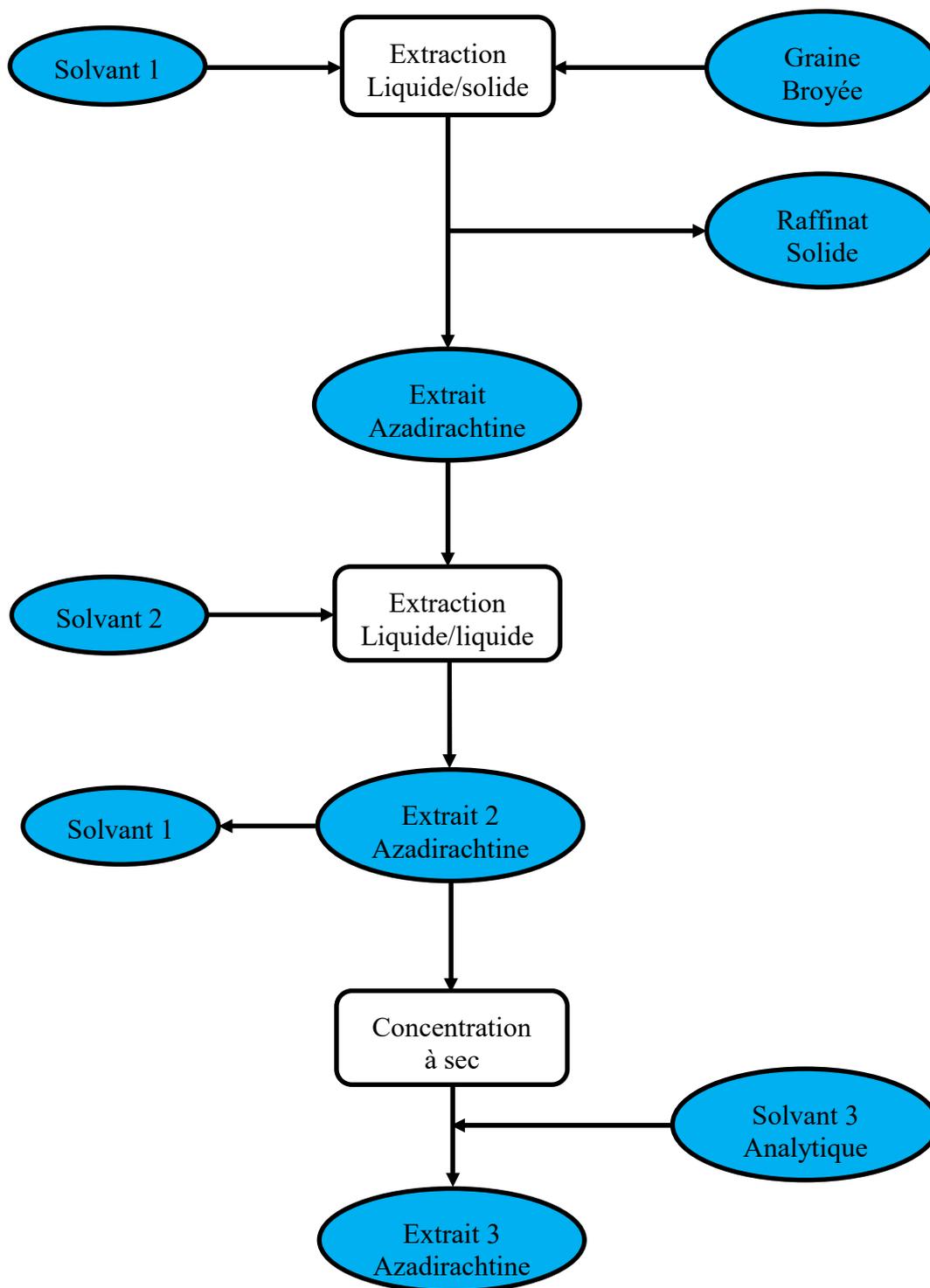


Figure 3: Schéma du procédé d'extraction de l'azadirachtine de neem pour sa caractérisation analytique

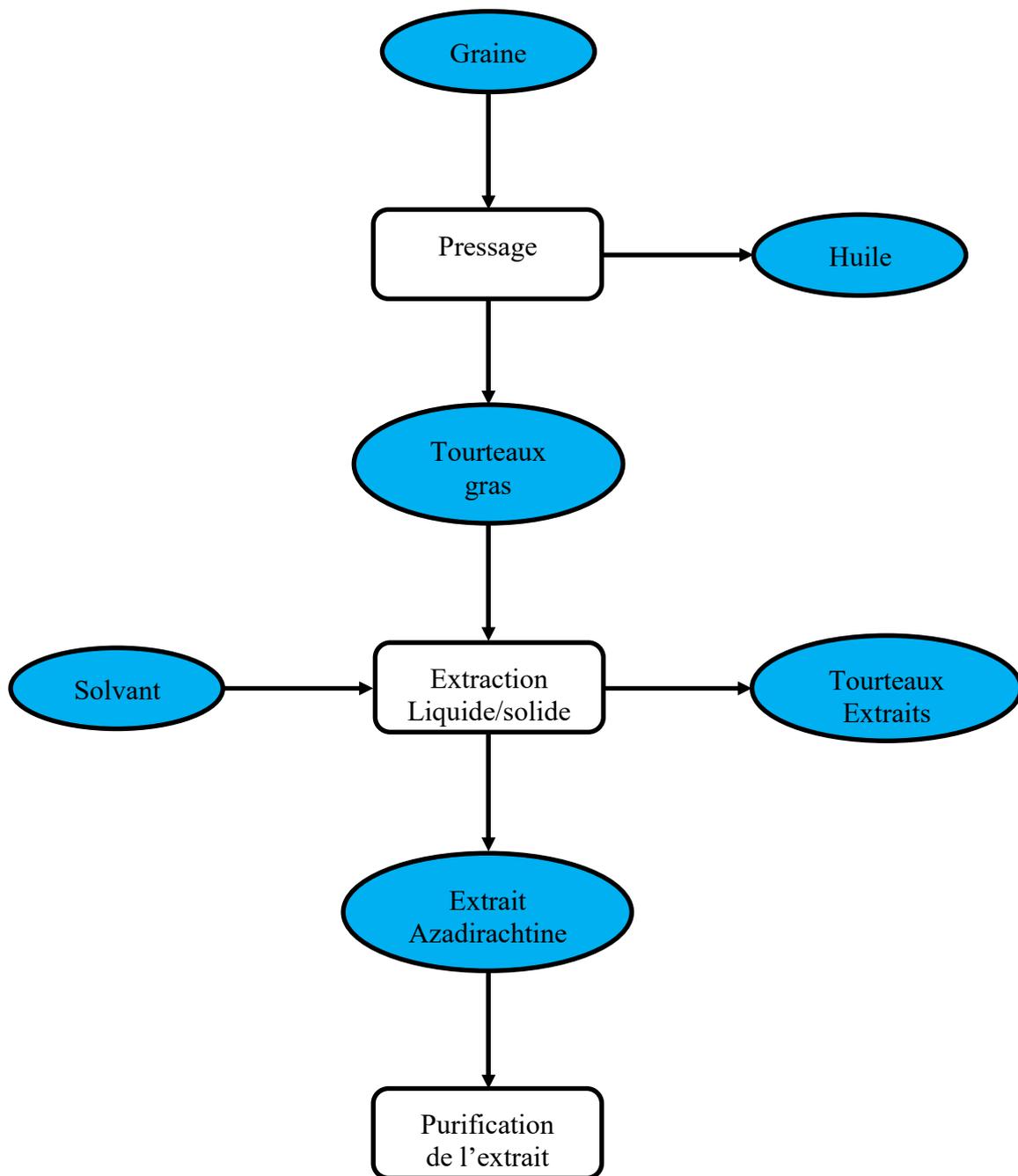


Figure 4: Schéma du procédé de production de l'azadirachtine et de l'huile de graines de neem

Origine

Le neem est d'origine indo-malaisienne.

Répartition géographique

Le neem est indigène de l'Inde, de la Birmanie, de Java et des Petites îles de la Sonde. Il pousse dans les régions tropicales et subtropicales et a été introduit en Australie, en Afrique, aux Antilles, en Amérique tropicale. Dans le sud des USA et de l'Europe, on a pu acclimater des variétés provenant du Nord de l'Inde et résistant mieux aux gelées.

Morphologie

C'est un arbre qui peut atteindre 30 m et vivre 2 siècles, mais qui est en général plus petit (5 à 10 m), son feuillage persistant est imparipenné (5 à 8 paires de folioles falciformes à base très inégale), les fleurs en panicules sont blanches ou jaunâtres, le fruit est une drupe de 1 à 2 cm, jaune à maturité. Conditions de culture : Arbre de zone USDA 10 (supporte 4°C minimum). Il se plaît sur des terres pauvres avec 300 à 500 mm de pluie annuelle (sol sec).

Teneurs en éléments chimiques

Les feuilles contiennent entre autres les composés suivants : nimbine, nimbinène, nimbandial, nimbolide, quercétine. L'écorce de l'arbre et des racines, ainsi que le jeune bois contient des tanins médicinaux (astringents) mais aussi des triterpénoïdes. Dès le mois de mai, le neem fait apparaître des fleurs violettes en forme d'étoile, odorantes et disposées en grappes descendantes. Les fruits se transforment ensuite en petits fruits jaunes comestibles (qui ressemblent à de petits abricots) que l'on récolte au moment de la mousson. L'amande du fruit contient 40 à 48% d'huile dont la composition en acide gras est la suivante : acide myristique : 2 à 3% acide palmitique : 13 à 15% acide stéarique : 15 à 19% acide oléique : 50 à 62% acide linoléique : 8 à 16% L'huile renferme aussi des terpénoïdes potentiellement actifs et en grande quantité : l'azadirachtine, la nimbine, la nimbidine, l'azadirone, mais aussi des méliacines. L'azadirachtine : le composé le plus actif contre les insectes (400 espèces d'arthropodes nuisibles). Il agit à la fois sur la croissance et le développement de l'insecte (croissance larvaire, mue), et comme facteur antinutritif. D'autres composés présents dans le neem (les feuilles, le bois ou l'huile) ont aussi un pouvoir insecticide principalement de type "hormonal" ou antinutritif. Une étude en signale 24, ce qui pour ses auteurs réduit le risque de développement d'une résistance ou d'une accoutumance de la part des insectes. Les composés les plus actifs sont l'azadirachtine déjà citée, la salannine, le meliantriol, et la nimbine.

I.2. Le champignon entomopathogène *Metarhizium anisopliae*

I.2.1 Généralités sur les champignons

Les champignons (fungi ou mycètes) constituent un groupe d'organismes hétérotrophes ubiquistes, riche de quelques 120000 espèces, présentant des structures et des caractéristiques biologiques extrêmement diversifiées, adaptées au mode de vie saprophyte, parasitaire ou symbiotique (Senal *et al.*, 1993 ; Anonyme a, 2000 ; Anonyme b, 2000 ; Kirk *et al.*, 2001).

Les champignons sont des microorganismes eucaryotes filamenteux, aérobies strictes et rarement anaérobies (Mathew, 1995 ; Tortora *et al.*, 2003), ayant un métabolisme hétérotrophe car ils tirent leur énergie de la respiration et de la fermentation des matières organiques solubles disponibles dans leur environnement (Leveau et Bouix, 1993 ; Nicklin *et al.*, 1999). Sur le plan morphologique, le champignon est constitué d'un thalle qui forme son appareil végétatif (Hawksworth *et al.*, 1994). L'appareil végétatif se compose d'éléments de base appelé hyphes qui forme un réseau de filaments ramifiés ; le mycélium (Mathew, 1995). Chez la plupart des champignons les hyphes sont divisés par des cloisons, ou septa (septum au singulier) formant des unités qui ressemblent à des cellules distinctes avec un seul noyau, on les appelle alors hyphes segmentés ou septés. Dans quelques classes de mycètes, les hyphes ne contiennent pas des cloisons et ont l'aspect de longues cellules continues à noyau multiples ils sont appelés cénocytes (Tortora *et al.*, 2003). Les hyphes, segmentés ou non, sont en fait de petits tubules transparents s'entourent d'une paroi cellulaire rigide formée de polymère de chitine et des polymères de la cellulose, éléments chimiques qui lui confèrent une grande rigidité, une longévité et une grande capacité de résistance à la chaleur et à des pressions osmotiques élevées. De ces faits, les champignons sont donc capables de vivre dans un environnement rude (Tortora *et al.*, 2003). En effet, les

Champignons se développent à pH légèrement acide (3 et 7) et à une température optimale comprise entre 20°C et 30°C, cependant certaines espèces sont psychrophiles, se développant à des températures très basses <15°C ou même parfois à <0°C (Botton *et al.*, 1990 ; Guiraud, 1998 ; Tortora *et al.*, 2003).

I.2.2. Les champignons entomopathogènes

Les agents pathogènes sont des organismes vivants pouvant engendrer une maladie à leur hôte. Les pathogènes des insectes appelés entomopathogènes comprennent : les bactéries (ex : *Bacillus thuringiensis*, *B. sphaericus*), les protozoaires (ex : Amoebidea), les virus (ex : *Entomopox virus*) et les champignons qui font l'objet de notre étude. Parmi les micro-

organismes utilisés en lutte biologique, plus de 700 espèces de micro-champignons sont entomopathogènes (Starnes *et al.*, 1993) et jouent un rôle important dans la régulation naturelle des populations d'insectes (Ferron, 1978 ; Wraight et Roberts, 1987). Ils appartiennent au sous-taxon des Mastigiomycotina, Zygomycotina, Ascomycotina et Deuteuromycotina. Le plus grand nombre de pathogènes se trouvent dans la classe des Zygomycètes, mais les plus utilisées en lutte biologique proviennent des Deuteromycètes (*Fungi imperfecti*). Ces derniers appartiennent aux champignons à hyphes septés, se multipliant de façon non sexuée. Les espèces des genres *Beauveria*, *Metharizium*, sont les plus utilisées en lutte biologique (Wraight et Roberts, 1987 ; Goettel, 1992) et ont un intérêt agronomique considérable dans la lutte biologique contre les ravageurs de cultures et sont donc l'objet d'études de plus en plus poussées.

I.2.2. 1. *Metarhizium anisopliae*

Metarhizium anisopliae était le premier pathogène utilisé délibérément pour le contrôle des insectes ravageurs par le Russe Eli Metchinnicoff (le père de la lutte microbiologique) dans les années 80. Il a été isolé et identifié sur la paille de céréale près d'Odessa en Ukraine sous le nom *Anisopliae austria* ou il l'a nommé *Entomophthora anisopliae*. En 1883 Sorokin assigna ce champignon à la muscardine verte au genre *Metarhizium*. Depuis il est connu sous le nom de *Metarhizium anisopliae*.

I.2.2. 1.1. Taxonomie et Classification

La classification de *Metarhizium anisopliae* a été sujette à plusieurs révisions au cours des dernières années. Par le passé, l'espèce a été classée principalement sous la division des Deutéromycètes, dans la classe des Hyphomycètes. Les membres de cette sous-division ayant comme spécificité le fait de ne jamais produire, ou très rarement, des spores sexuées.

Cette classe est en fait caractérisée par la présence de formes mycéliennes portant des spores asexuées, appelées conidies, engendrées sur des cellules conidiogènes spécialisées. Par contre, à l'heure actuelle, la plupart des mycologistes n'acceptent plus les Deuteromycota et ses sous-classes comme formant un assemblage taxonomique. Plusieurs espèces de champignons ont été associées avec des membres de la division des Ascomycota sur une base d'homologie d'ADN, dont l'espèce *M. anisopliae* (Inglis *et al.*, 2001). Cette espèce fait dès lors partie du règne des Mycota, de la division des Ascomycota et de l'ordre des Hypocreales. La classification de ce genre a été basée sur des caractères morphologiques des cellules et des

conidies, et comme ces caractéristiques sont assez limitées elles ont compliqué la taxonomie. (Bidochka et Small, 2005).

Règne : Fungi
Embranchement : Dikarya
Sous-embranchement : Ascomycota
Classe : Pezizomycotina
Ordre : Hypocreales
Famille : Clavicipitaceae
Genre : *Metarhizium*
Espèce : *Metarhizium anisopliae*

La première révision de ce genre a été faite par Tulloch (1976), où il a utilisé les caractéristiques morphologiques des conidies pour distinguer entre deux formes de *Metarhizium* ; à savoir *Metarhizium flavoviridae* et *Metarhizium anisopliae* (Figure 5). Ce dernier a été subdivisé en deux variétés ; *Metarhizium anisopliae var anisopliae* et *Metarhizium anisopliae var majus*

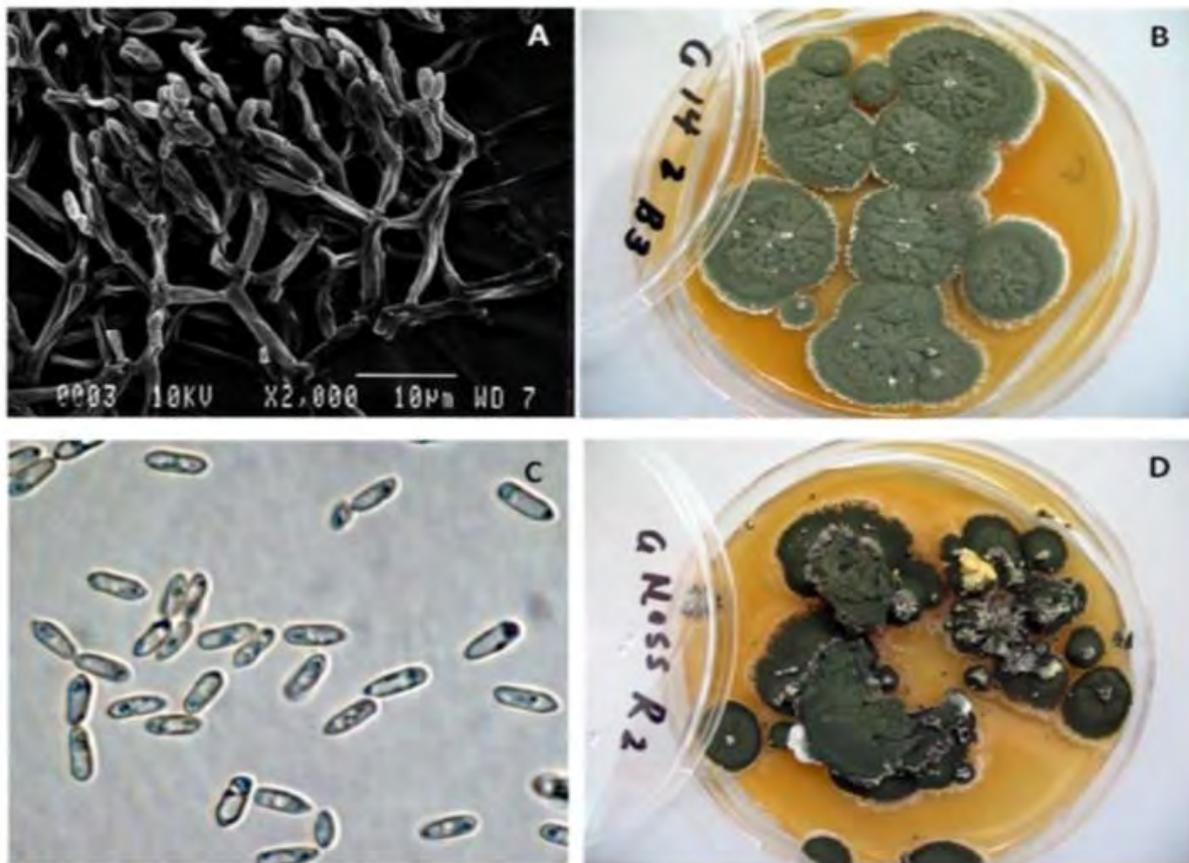


Figure 5: Photo (A) Electronographies des conidiophores et des hyphes de *Metarhizium anisopliae* ; photo (B) Culture de *M. anisopliae* sur Sauboraud dextrose agar (SDA) à 25 °C ; photo (C) Aspect microscopique des Conidies de *M. flavoviride* (X100) ; photo (D) Culture de *M. flavoviride* sur Sauboraud dextrose agar (SDA) à 25°C.

Source : BENSERRADJ Ouafa (2014)

II.3. Morphologie

Les caractéristiques taxonomiques dominantes sont les traits morphologiques des structures de sporulation. Le genre *Metarhizium* est défini par l'agencement des chaînes porteuses de phialides, des colonies de conidies cylindriques ou légèrement ovotides, sèches et généralement de couleur verte. Les colonies sont formées d'une agrégation de ces chaînes conidiennes (Zimmerman, 2007). *Metarhizium anisopliae* apparaît blanc lorsqu'il est jeune et il devient vert foncé après la maturation des spores (Figure 6).

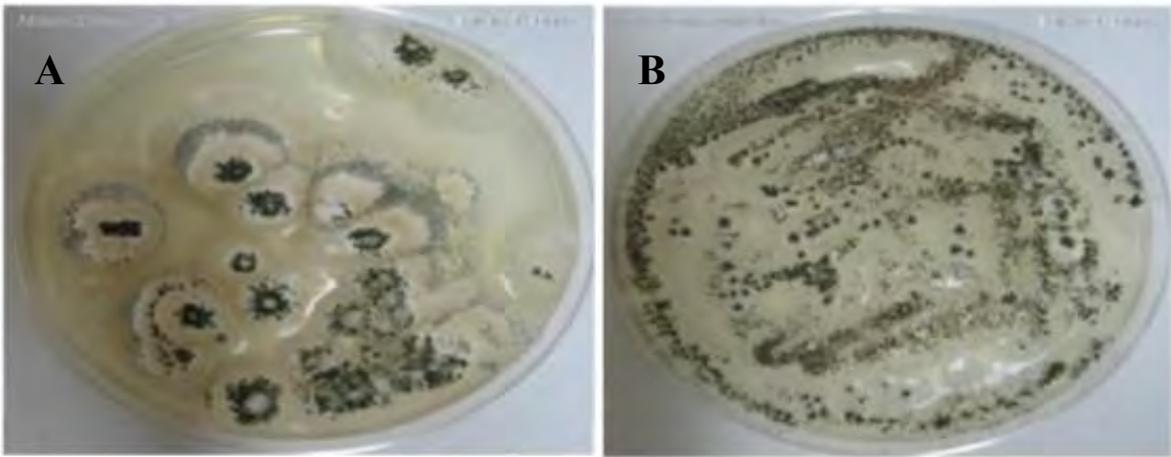


Figure 6: Aspect morphologique de *Metarhizium anisopliae* A et B (Ihara et al.2001)

Cette espèce est caractérisée par des conidiophores de longueur variable, sont relativement courts, irrégulièrement ramifiés ou non et arrangés en groupes compacts formant une masse de spores (Figure7), les spores étant allongées avec des côtés parallèles (Bischoff *et al.*, 2009).

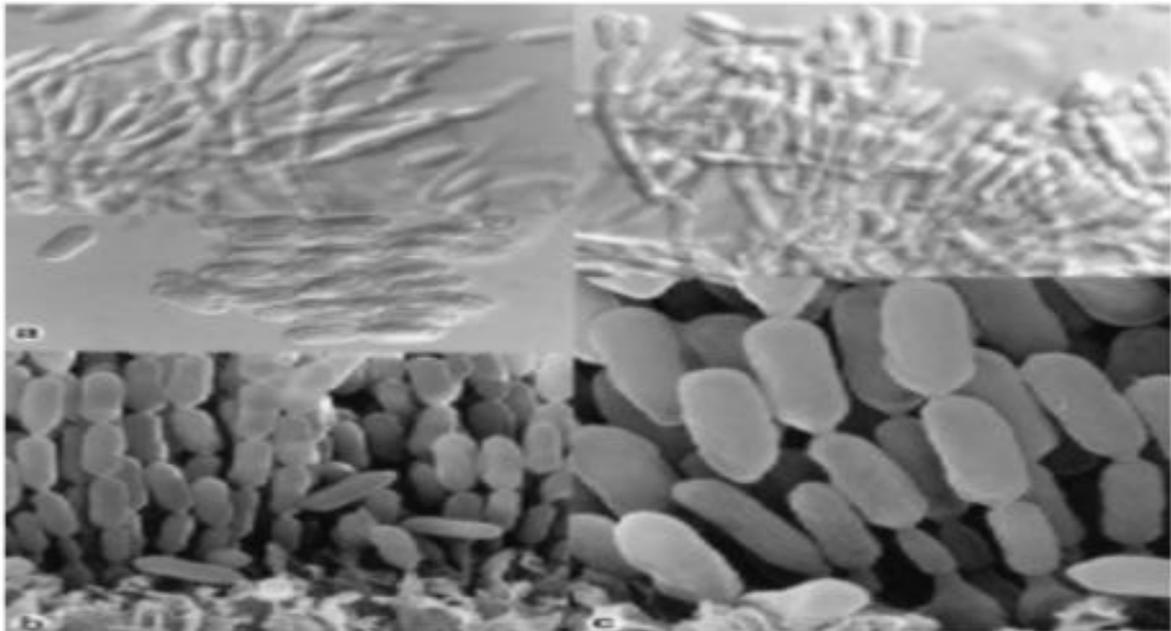


Figure 7: Aspect microscopique de *Metarhizium anisopliae*, a. x1600; b. x2800; c. x7000 (Bischoff et al., 2009)

Il existe deux formes de *Metarhizium anisopliae* dont la différence se base sur la taille des conidies : (1) la forme *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* à spores courtes, dont les

conidies mesurent de 5 à 8 μm de longueur et (2) la forme *Metarhizium anisopliae* var. *majus* à spores longues, dont les conidies mesurent de 10 à 14 μm de longueur (Figure 8).

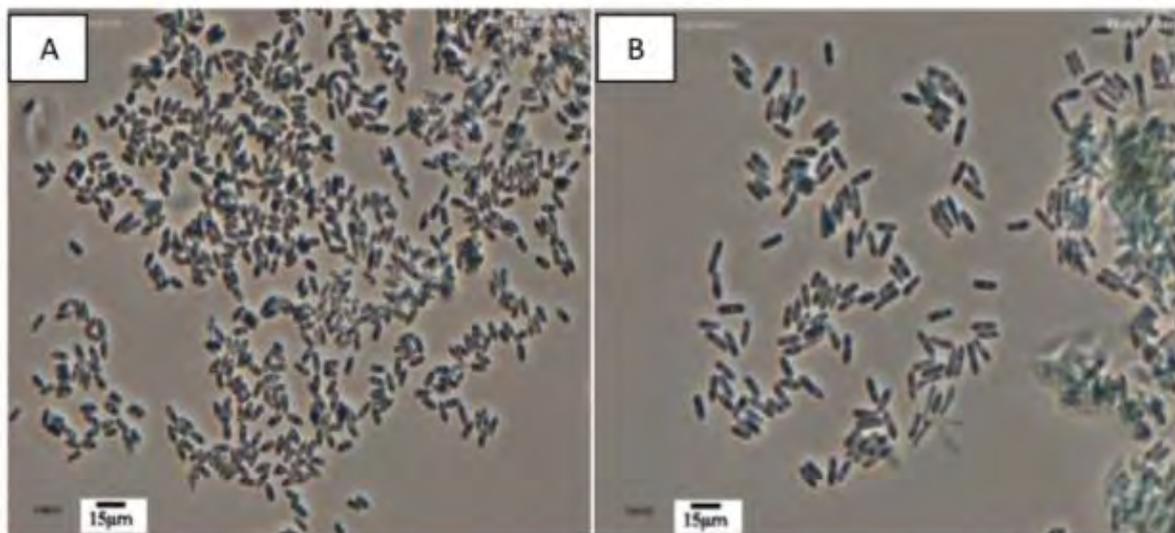


Figure 8: (A) Conidies de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*, (B) Conidies de *Metarhizium anisopliae* var. *majus* (Tulloch, 1976)

II.4. Mode d'infection

Généralement, les champignons entomopathogènes tuent ou réduisent la vigueur des hôtes qu'ils infectent. Ces ennemis naturels sont plus efficaces lorsque l'insecte ciblé est préalablement affaibli par un autre facteur comme un stress nutritif, compte tenu de leur mode de transmission et de leurs besoins abiotiques. Aussi, ils sont généralement très efficaces lorsque la densité des populations d'insectes ciblés est très élevée. Quoi qu'il en soit, le système immunitaire des insectes peut fortement influencer la pathogénicité de ces ennemis naturels. La cuticule de l'insecte est une barrière structurellement et chimiquement complexe pour la pénétration du champignon. L'épicuticule contient une protéine stable au phénol et est couverte d'une couche cireuse contenant des acides gras, des lipides et des stérols (Andersen, 1979). La procuticule contient de nombreuses fibrilles de chitine enfouies dans une matrice protéinique. Celle-ci peut représenter jusqu'à 70 % du poids sec de la cuticule. Contrairement aux autres microorganismes (virus, bactéries, nématodes, protozoaires) où l'infection de l'hôte découle de leur ingestion obligatoire, les champignons peuvent infecter les insectes par pénétration directe à travers la cuticule (Clarkson et Charnley 1996). Au contact de la cuticule de l'insecte, la spore, l'unité infectieuse du champignon, germe et pénètre au travers du tégument en combinant des pressions mécaniques et enzymatiques (St Leger, 1993). Le

champignon croît rapidement dans l'hémocoel. Les insectes susceptibles au champignon meurent généralement dans un délai de 3 à 10 jours. Quand l'insecte meurt, le champignon entre dans un stade hyphal, colonise les organes internes puis sporule à la surface de l'insecte. Le cycle infectieux est généralement le même pour tous les champignons entomopathogènes. Le processus de pénétration est l'étape la plus importante de la pathogénèse (Ferron *et al.*, 1993). Le mode d'infection des champignons entomopathogènes se divise en quatre étapes distinctes: l'adhésion, la germination, la pénétration et la dissémination (Figure 9).

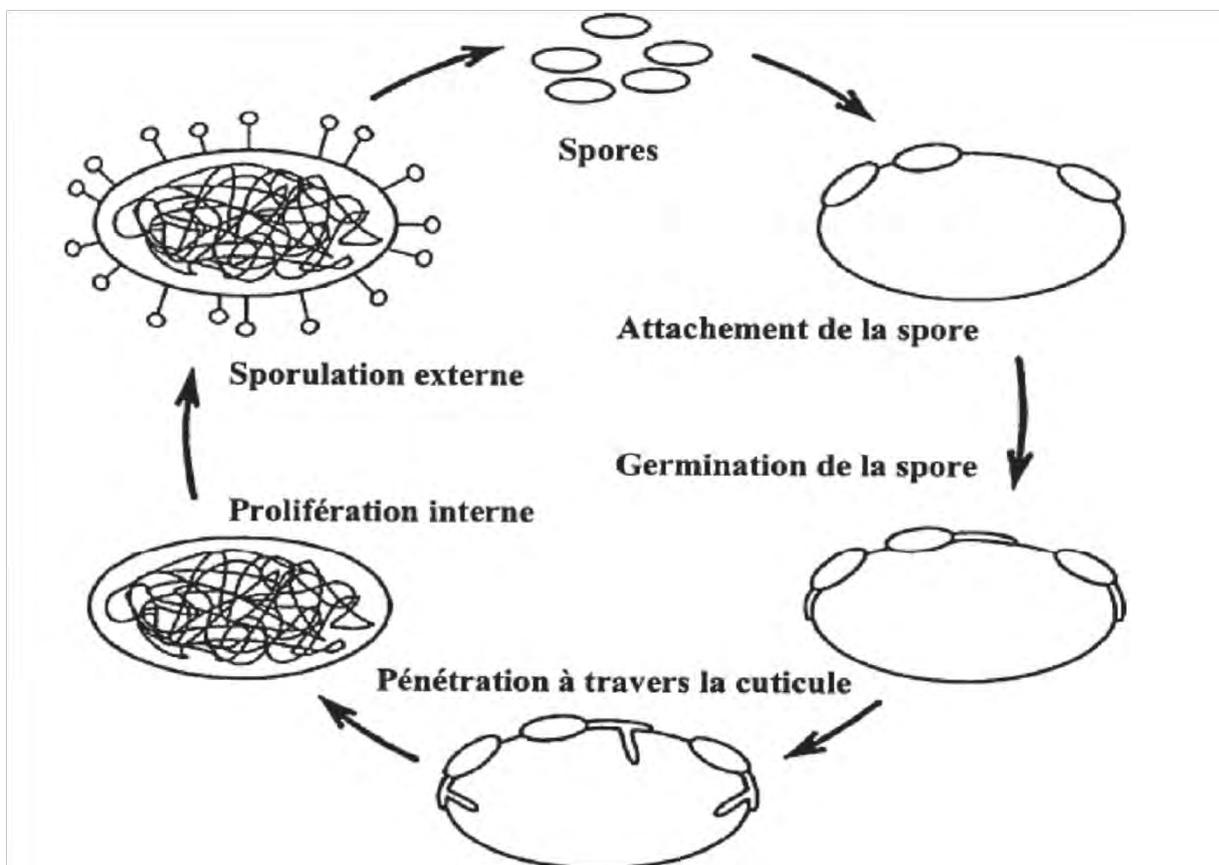


Figure 9: Schéma du cycle biologique des champignons entomopathogènes (Ferron et al., 1993)

Phase d'adhésion

L'adhésion est la première étape du processus d'infection. Les spores entrent en contact passivement avec les insectes à l'aide des agents naturels tels que le vent et l'eau. L'adhésion est déclenchée par un mécanisme de reconnaissance et de compatibilité des spores avec le tégument de l'insecte.

L'infection est initiée à travers le tégument de l'insecte-hôte (Khachatourians, 1991; Tanada et Kaya, 1993), mais les spores peuvent aussi entrer par le système respiratoire (Clark *et al.*, 1968), le tube alimentaire (Miranpuri et Khachatourians, 1991) et la cavité buccale (Siebeneicher *et al.*, 1992). L'attachement des spores à la cuticule est donc assujéti aux forces hydrophobiques non spécifiques et aux charges électrostatiques (Boucias *et al.*, 1988 ; Butt, 1990). Cependant, des systèmes de reconnaissance spécifiques, dont des polysaccharides fongiques extracellulaires, des lectines et des enzymes extracellulaires, ont été identifiées sur la surface de la spore et peuvent être impliqués dans l'attachement de celle-ci (Boucias *et al.*, 1991; Napolitano et Juárez, 1997). Par exemple, Grula *et al.*, (1984) ont démontré que les hémagglutinines de la surface des spores sont inhibées par différents sucres haptènes (ex. glucose, glucosamine et N-acétylglucosamine). Ainsi, l'incubation des spores avec ces sucres réduit leur affinité à l'insecte. Une fois en contact avec la cuticule, la spore produit activement un mucilage hygroscopique qui permet la modification de l'épicuticule de l'insecte facilitant la germination des spores et peut aussi créer un environnement favorable aux enzymes extracellulaires libérées par ces dernières (Boucias *et al.*, 1991).

Phase de germination

La seconde phase d'infection est la germination. Celle-ci dépend de l'état physiologique de l'hôte et aussi des conditions environnementales, notamment la température et l'humidité (Butt et Becket, 1994 ; Butt *et al.*, 1994). La germination aboutit à la production d'appressoria, structures terminales servant à l'ancrage de la cuticule et favorisant la pénétration. La valeur nutritive de la cuticule joue un rôle important pour la production d'appressoria. Cependant, des études ont démontré qu'une cuticule nutritive favorise la croissance mycélienne plutôt que la pénétration (Magelhaes *et al.*, 1981 ; Ferron *et al.*, 1993).

La germination *in vitro* se produit en réponse aux sources de carbone (ex. glucose, glucosamine, chitine et amidon) et/ou d'azote (St Leger *et al.*, 1986a, 1986b). Cependant, les acides gras et les lipides situés au niveau de l'épicuticule peuvent aussi influencer la germination de spores (Lecuona *et al.*, 1997). La germination dépend de la tolérance aux composants potentiellement toxiques au niveau de l'épicuticule (ex. acides gras à chaîne

courte, phénols) (St Leger *et al.*, 1990) et de l'antagonisme de la fore saprophyte sur la cuticule de l'insecte (Charnley, 1989).

Phase de pénétration

La pénétration de *Metarhizium anisopliae* dans l'hôte s'effectue généralement à travers les orifices naturels, la cuticule ou bien par l'ingestion. En présence d'un niveau élevé d'azote et de carbone, le tube germinatif continue de s'allonger et forme un hyphe (St Leger *et al.*, 1992). Comme plusieurs autres champignons filamenteux, la dureté de la surface, l'hydrophobicité, la topographie et les nutriments disponibles influencent la différenciation d'une structure infectieuse ou appressorium. Le développement de l'appressorium implique l'activation de l'AMPc et la libération de Ca² comme signaux moléculaires intracellulaires (St Leger *et al.*, 1990). La pénétration est réalisée par pression mécanique et hydrolyse enzymatique (Goettel *et al.*, 1989) (Figure 10).

Précisément, l'hyphe fongique sécrète des enzymes extracellulaires telles que les protéases, les lipases et les chitinases, qui attaquent et dissolvent la cuticule, permettant aux spores de pénétrer a travers la cuticule et de se développer dans le corps de l'insecte (Hajek et St Leger, 1994). Ces enzymes correspondent aux différents polymères de la cuticule, des protéines, des chitines et des lipides de l'insecte (Charnley et St Leger, 1991). Les protéases sont les plus importantes enzymes extracellulaires et jouent un rôle primordial dans la pénétration (Campos *et al.*, 2005).

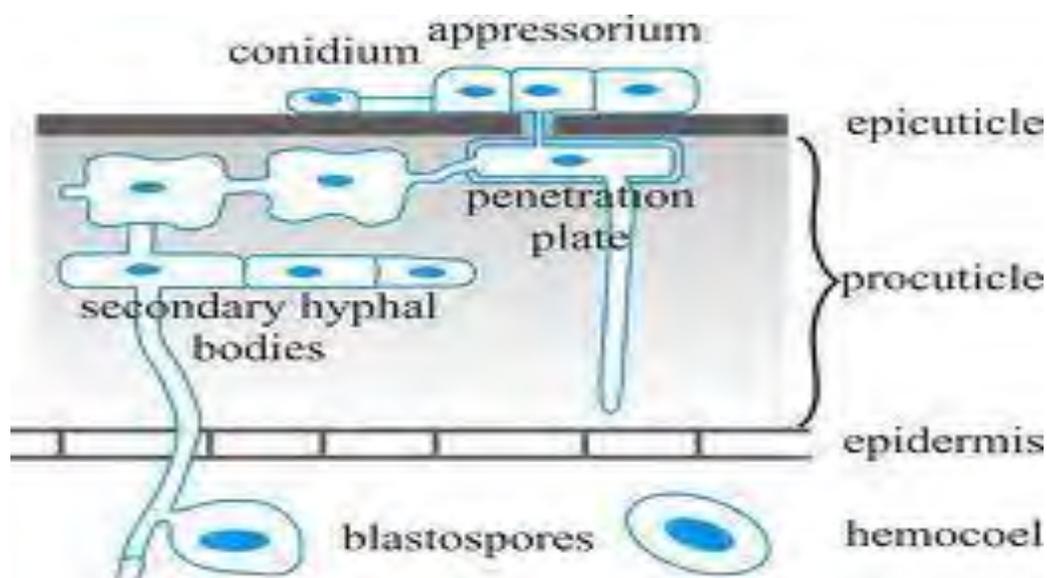


Figure 10: Mode de pénétration des champignons entomopathogènes dans la cuticule des insectes

(Clarkson and Charnley, 1996) ; Légende : conidium : conidie ; appressorium : appressorium ; penetration plate : plaque de pénétration ; secondary hyphal bodies : corps des hyphes secondaires ; epicuticle : épicuticule procuticle : procuticule ; épidermis : épiderme ; hemocoel : hémocoele ; blastospores : blastospores

Phase de dissémination

Une fois que le champignon a franchi avec succès la cuticule et a percé l'épiderme adjacent de la cuticule, il entre dans le système circulatoire ouvert de l'insecte, l'hémocoele. Le champignon se multiplie par la suite à l'intérieur de tous les organes de l'insectehôte et il s'accroît sous forme de blastospores. Ceci peut faciliter la dispersion et la colonisation de l'hémocoele et optimise l'assimilation rapide des nutriments. Il semble qu'une utilisation efficace des sucres sanguins est nécessaire pour une croissance optimale du pathogène. Bien que le glucose joue un rôle central dans le métabolisme de l'insecte, il est généralement présent avec de très faibles concentrations.

II.5 Production des toxines

Une fois que le champignon atteint l'hémocoele, il entame la production d'hyphes qui circuleront à travers l'hémolymphe pour ce faire le champignon doit surmonter les mécanismes immunitaires de l'hôte. L'espèce *Metarhizium anisopliae* produit des composés toxiques non enzymatiques tels que les Destruxines (DTX) et les cytochalasmes qui lui permettent de surmonter les mécanismes de défense de l'hôte et de proliférer (Inglis *et al.*, 2001). Les toxines ont des effets divers sur différents tissus d'insectes. Les DTX dépolarisent la membrane du muscle de l'insecte en activant les canaux calcium. En outre la fonction des hémocytes d'insectes peut être empêchée par les DTX (Bradfish ,1990). Sous les conditions optimales la mort de l'insecte survient normalement entre 3 à 5 jours à partir du moment de l'infection. Une fois l'insecte mort, l'espèce produit un antibiotique : l'oosporine qui lui permet de surmonter la compétition des bactéries saprophages dans le tube intestinal de l'insecte (Inglis *etal.*, 2001). Le champignon entame alors une phase saprophytique. Les spores sont produites par les conidiophores qui émergent du cadavre, préférentiellement au niveau inter segmentaire si lesconditions environnementales sont adéquates. Le cadavre est alors couvert par un feutrage mycélien vert nommé Muscardine constitué d'hyphes et de conidiophores portant des conidies (Figures 11 et 12). La phase saprophytique ne dépend pas de l'humidité relative par contre elle est influencée par la température (Ferron, 1977).

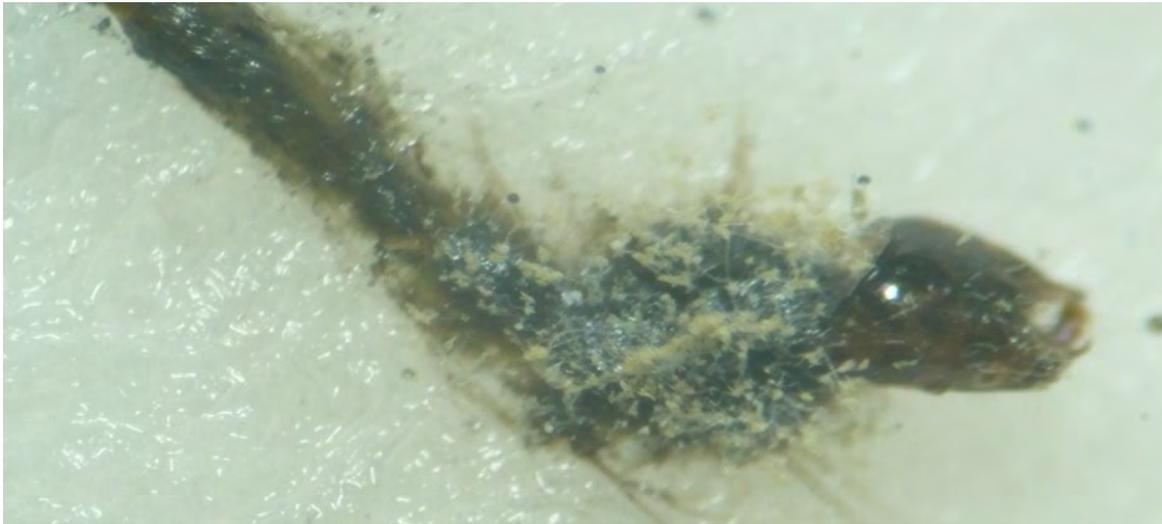


Figure 11: Larve infectée par *Metarhizium anisopliae* (Badiane, 2017)



Figure 12: Insectes infectés par *Metarhizium anisopliae* A et B (Muscardine verte) (Boucias et Pendland, 1998)

II.3. Réponse immunitaire à l'infection microbienne chez l'insecte

Les insectes fournissent un exemple particulier d'une immunité naturelle, dite non spécifique, qui n'implique pas les lymphocytes et les anticorps comme chez les mammifères (Fugita, 2002 ; Hoffmann et Reichhart, 2002). Afin d'empêcher l'invasion par les agents pathogènes, les insectes ont développé, au cours de leur évolution, différents mécanismes de défense. D'ailleurs, la colonisation de l'hémocoel est strictement dépendante de l'aptitude de l'agent

infectieux à surmonter les mécanismes immunitaires de défense de l'insecte (Ferron *et al.*, 1993). L'arsenal défensif des insectes est constitué de barrières structurelles passives comme la cuticule. Le tégument chitineux de l'insecte constitue donc une barrière primaire efficace contre l'invasion par la majorité des micro-organismes. En absence de blessure, La principale voie d'infection des insectes par les bactéries, les virus et les parasites, est le tube alimentaire. Cependant, comme marqué précédemment, les champignons entomopathogènes ont l'habilité de pénétrer à travers la cuticule pour établir l'infection.

En plus des barrières passives, il existe une cascade de réponses actives lorsque les pathogènes ont atteint l'hémocoel de l'insecte (Hoffmann et Reichhart, 2002). Ces réponses actives incluent la mélanisation, les réactions cellulaires (ex. phagocytose, encapsulation), les réactions humorales (ex. phénoloxidase, lectines) et la production des inhibiteurs de protéases (Gillespie *et al.*, 2000). Les antigènes microbiens sont reconnus par le système immunitaire naturel de l'insecte grâce à des unités répétitives constituées de polysaccharides trouvés dans les glycoprotéines de la surface microbienne.

II.4. Facteurs affectant l'efficacité des champignons entomopathogènes

Le potentiel infectieux des champignons entomopathogènes comme agent de lutte biologique dépend de leurs propriétés physiologiques de la population de l'hôte et des conditions du milieu (Ferron *et al.*, 1991).

II.4.1 Facteurs liés aux pathogènes

La virulence et la spécificité de l'hôte sont deux éléments essentiels dans le choix d'un bon candidat à la lutte biologique. Il a été démontré que les insectes d'une même population révèlent une sensibilité qui diffère selon les isolats de *M. anisopliae* (Todorova *et al.*, 1994). À une échelle industrielle, les épreuves biologiques standardisées de laboratoire sont essentielles afin de vérifier le potentiel insecticide des préparations produites et de suivre leur stabilité de Conservation (Ferron *et al.*, 1991).

II.4.2 Facteurs dépendant de l'hôte

Il est maintenant reconnu que tous les stades de développement de l'insecte, de l'œuf jusqu'à l'adulte, peuvent être sensibles à l'infection fongique. Par exemple *P. fumosoroseus* est trouvé à l'état naturel sur une large gamme d'hôtes (plus de 40 espèces d'insectes appartenant à 8 ordres) dont les Homoptères et parmi eux les aleurodes.

L'épizootie fongique survient généralement à de fortes densités de la population hôte favorisant ainsi la probabilité de contact entre le pathogène et l'hôte, de même qu'entre les insectes infectés et non infectés (Ferron *et al.*, 1991).

II.5 Facteurs liés à l'environnement

L'efficacité des champignons entomopathogènes contre les insectes est souvent influencée par des conditions environnementales.

II.5.1. Rayonnement solaire

L'effet des radiations solaires est l'un des paramètres environnementaux les plus importants pour la persistance des spores fongiques entomopathogènes. L'exposition à la lumière du soleil même pour quelques heures en particulier la partie d'UVB du spectre (285-315nm) peut complètement inactiver les conidies de *Metarhizium anisopliae* (Braga *et al.*, 2001). Il y a des différences significatives dans la sensibilité aux radiations, les micro habitats jouent un rôle important en augmentant la persistance des conidies fongiques en fournissant l'ombre des arbres (Inglis *et al.*, 2001). Malgré son effet nocif sur la persistance des conidies, la lumière peut stimuler certaines étapes du cycle évolutif des champignons entomopathogènes cultivés *in vitro* ou *in vivo* (Silvy et Riba, 1989). De plus, afin d'assurer une protection contre ces rayons, les coelomycètes, tels que le genre *Aschersonia*, produisent des cellules conidiogènes dans des pycnides fortement pigmentés (McCoy *et al.*, 1990).

II.5.2. Température

La température est un autre facteur important qui peut affecter le taux de germination, la croissance, la sporulation et la survie des champignons entomopathogènes. Hastuti et ses collaborateurs (1999) ont démontré que 100 % des larves de *Paropsis charybdis* (Coleoptera: Chrysomelidae) sont tuées par *B. bassiana* après une incubation de 21 jours à 35°C, alors que 93 % des larves sont mortes à une température d'incubation de 15°C. La température optimale qui assure la survie d'un champignon diffère selon les taxa. Ainsi, les spores des entomophthorales semblent être plus sensibles que les spores de la plupart des entomopathogènes. Généralement, les températures au-dessus de 35°C empêchent la croissance et le développement des champignons entomopathogènes.

Les variations de températures (élevées et basses) affectent la vitesse de l'infection des insectes par l'inhibition de la germination des spores, ce qui affecte à son tour la formation du

tube germinatif et la pénétration à travers la cuticule de l'insecte. (Ekesi *et al.*, 1999 ; Fargues et Luz., 2000 ; Soza-Gomez et Alves, 2000 ; Mitsuaki, 2004). Les conidies de *B. bassiana* et de *M anisopliae* ne peuvent pas survivre plus que 15 minutes à 40°C (McCoy *et al.*,1990).

II.5.3. Humidité

L'humidité environnementale est un paramètre très important pour la germination des conidies dans la nature. Elle affecte aussi la persistance et la survie des champignons entomopathogènes. La plupart de ces champignons exigent au moins 95 % de l'humidité relative à la surface de l'insecte afin de germer (Hallsworth et Magan, 1999). Un certain nombre d'études a indiqué que les conditions sèches juste après l'application des champignons entomopathogènes sont moins pathogènes car les souches de *Metarhizium* et *Beauveria* peuvent germer et infecter efficacement les insectes à une basse humidité à condition qu'il y ait suffisamment d'humidité dans les microhabitats (Inglis *et al.*, 2001).

L'humidité relativement élevée dans les endroits abrités fournit un micro-environnement favorable pour le développement des spores (Liu *et al.*, 2003). Les effets de la température et de l'humidité sont intimement reliés d'où la tolérance de quelques champignons à des températures extrêmes lorsqu'il y a plus d'humidité ou lorsque la condensation se produit aisément et la perte d'eau est réduite au minimum. Le vent peut aussi modifier de manière significative l'humidité microclimatique et considérablement influencer le comportement fongique (McCoy *et al.*, 1990).

II.5.4 Effet du sol

Le sol constitue un réservoir naturel pour les insectes infectés par des mycètes fongiques sur le feuillage qui plus tard tombent sur le sol (Keller et Zimmermann, 1989). En effet, les champignons dans le sol sont protégés contre la dessiccation, le rayonnement ultraviolet et les températures extrêmes (McCoy *et al.*,1990). En général, la simple présence des microflore dans le sol peut influencer l'efficacité des entomopathogènes (Groden et Lockwood, 1991). Comprendre l'écologie des champignons entomopathogènes dans l'environnement, en particulier le sol est une chose importante, nécessaire pour l'application correcte de ces champignons dans le champ. Meyling et Eilenberg (2007) fournissent un diagramme schématique (Figure13) qui détermine l'écologie de *Beauveria* et de *Metarhizium* dans le sol et comment ces espèces sont dispersées ainsi que leur cycle dans l'environnement.

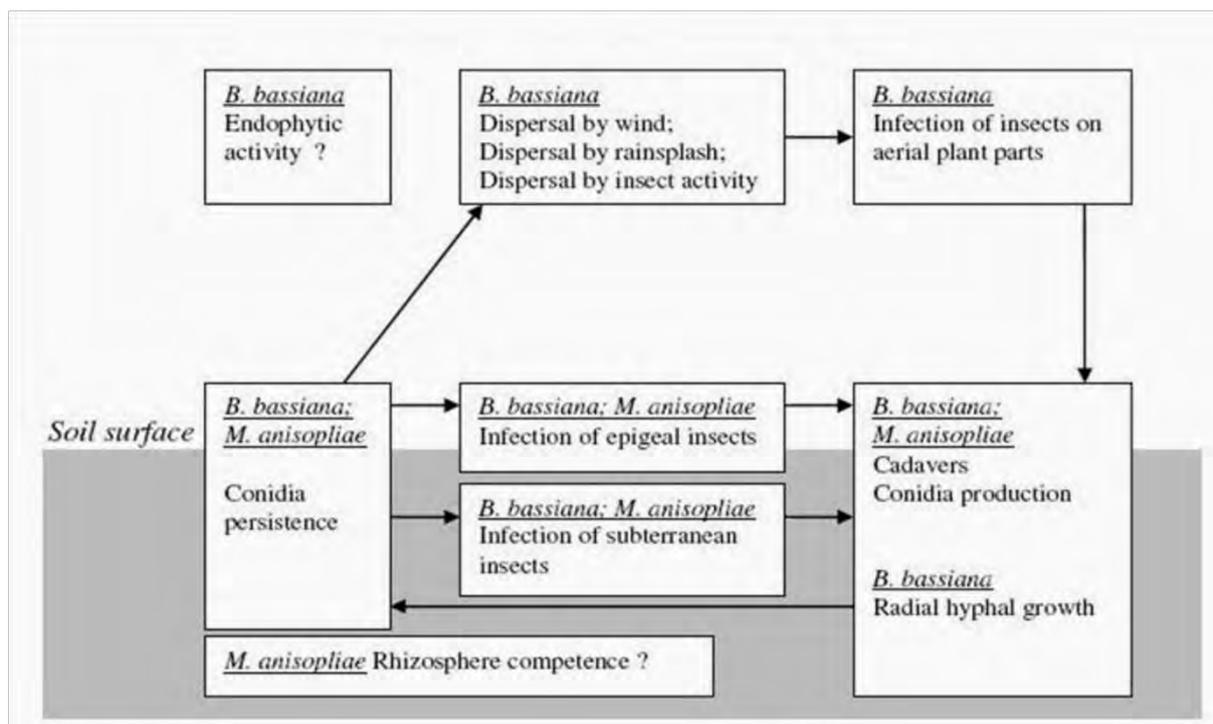


Figure 13: Les compartiments des écosystèmes terrestres tempérés où *B. bassiana* et *M. anisopliae* se produisent naturellement (Meyling et Eilenberg, 2007)

II.6. Avantages de l'utilisation de *Metarhizium anisopliae*

Le Champignon *M. anisopliae* est devenu la pierre angulaire de plusieurs programmes de lutte intégrée, notamment dans les secteurs agricoles où la présence de résidus de pesticides dans les aliments constitue une source de préoccupation majeure. Le champignon *M. anisopliae* est inoffensif pour la santé humaine, en plus d'être sans danger pour l'environnement (Faria et Wraight, 2001). Plusieurs facteurs favorisent une plus grande utilisation de *M. anisopliae* dans le futur, en particulier l'augmentation des coûts sociaux résultant de l'utilisation massive des pesticides chimiques et de production des nouveaux insecticides chimiques. Les occasions d'utiliser cet entomopathogène conjointement à d'autres agents de lutte biologique et à diverses pratiques culturales et pesticides courants se sont accrues considérablement avec la découverte de nouveaux isolats plus efficaces, l'optimisation des formulations et l'amélioration des procédés d'application.

Le champignon *M. anisopliae* comporte d'autres avantages. En effet, son activité insecticide est plus rapide que d'autres agents entomopathogènes et sa durée de conservation est longue. De plus sa production exige des milieux de culture relativement peu dispendieux. Son application s'effectue à l'aide d'équipements standards, et ses effets sur les insectes bénéfiques et les organismes non ciblés sont nuls à négligeables (Zimmermann 2007). Le

champignon *M. anisopliae* peut infecter l'hôte par ingestion ou par simple contact, contrairement aux autres agents entomopathogènes, qui doivent être ingérés pour infecter (Cloutier et Cloutier 1992). Ce mode d'action particulier rend tous les stades (oeuf, larve, adulte) sensibles. De plus, les conidies peuvent persister dans l'environnement par la propagation des enzooties ou des épizooties.

II.6.1. Production de *Metarhizium anisopliae*

Le champignon *M. anisopliae* possède deux phases de croissance. La phase végétative est caractérisée par la croissance du mycélium formé d'hyphes et la phase reproductive est celle pendant laquelle les spores sont formées et relâchées dans l'environnement (Kamp et Bidochka, 2002). Selon les conditions de croissance, trois types de spores peuvent être produits par le champignon. Lorsqu'il croît en milieu solide, *M. anisopliae* produit des conidies aériennes. En milieu liquide, il produit surtout des blastospores, des conidies submergées (Jenkins *et al.*, 1998). Les blastospores sont généralement de grande taille que les conidies et tendent à avoir une durée de vie plus courte que celles-ci lors de l'entreposage (Vega *et al.*, 2003). Chez les champignons *M. anisopliae* et *Hirsutella thompsonii*, les blastospores ont une stabilité limitée et sont moins virulentes que les conidies (Hegedus *et al.*, 1990). De plus, les blastospores sont plus sensibles à la dessiccation que les conidies (Burgess, 1998). Pour ces raisons, les formulations contenant des conidies sont plus souvent utilisées sur le terrain. Les champignons entomopathogènes peuvent être produits de différentes façons : par méthode simple en sacs plastiques en utilisant comme milieu du riz stérile, des grains concassés de maïs, de l'orge ou d'autres produits, en fermentation liquide ou en fermenteurs semi-solides. La production en milieu solide présente l'avantage qui est facile à réaliser et que les conidies produites ont tendance à être plus tolérantes à la dessiccation et plus stables que les produites en culture liquide. Malheureusement, les méthodes de fermentation solide présentent de nombreuses contraintes techniques et économiques (problèmes de stérilisation de substrats, échanges de gaz, contrôle de température, maintien d'une culture pure et récupération du produit à partir du substrat). La fermentation liquide est une méthode plus économique. Elle assure un environnement nutritionnel homogène et les facteurs environnementaux (pH, température, aération) sont facilement contrôlés par rapport à la fermentation solide. Plusieurs paramètres de croissance doivent être considérés afin d'obtenir de grandes quantités de spores et une forte virulence de celles-ci. Il a été démontré que la température d'incubation est un paramètre important lors de la production de champignons.

La température optimale peut varier non seulement entre les espèces de champignons, mais aussi entre les isolats de la même espèce (Jenkins *et al.*, 1998 ; Lopez-Lastra *et al.*, 2002 ; Mondal et Bhattacharya, 2004). Pour *Nomurea rileyi*, un autre entomopathogène, la température optimale pour la croissance optimale du mycélium se situe entre 22 et 26°C (Edelstein *et al.*, 2004). D'autres part, une étude a démontré que la production de conidies de *M. anisopliae* était plus importante à 20°C qu'à 23°C (Nelson *et al.*, 1996). Le niveau d'humidité peut aussi influencer la croissance et la sporulation de *M. anisopliae*. Des degrés d'humidité différents ont permis la production de conidies. La photopériode normale (Nelson *et al.*, 1996) ou à un cycle de lumière/obscurité de 12 :12 (Kamp et Bidochka, 2002) pourrait aussi affecter la production de conidies.

II.6.2. Formulation à base de champignons entomopathogènes

Pour obtenir les conditions optimales de production, on doit considérer non seulement le rendement en conidies, mais aussi la stabilité des conidies. Les formulations granulées peuvent être obtenues soit par enrobage des spores préalablement récoltées (Leland et Behle, 2005), soit par croissance et sporulation du champignon à la surface d'un support nutritif granulé. Ce premier procédé, déjà appliqué à de nombreux microorganismes auxiliaires, facilement industrialisable, est encore insuffisamment éprouvé au champ pour les champignons entomopathogènes et ses perspectives d'utilisation agronomique ne peuvent pas être précisément estimés. Les produits formulés, contenant de matériels tels que de protecteurs UV, d'huiles, d'humectants et de nutriments pour stimuler la germination et la croissance des spores, ont un grand potentiel pour obtenir des meilleurs résultats (Bateman, 1994 ; Burges, 1998 ; Goettel *et al.*, 2000 ; Wraight *et al.*, 2001). Par exemple, les huiles permettent une meilleure adhésion et un épandage adéquat des spores sur la cuticule hydrophobique de l'insecte (Ibrahim *et al.*, 1999). De plus, les conidies des champignons entomopathogènes formulées dans l'huile végétale pure et en présence d'adjuvants semblent être plus résistantes aux radiations UV que les conidies non-formulées (Alves *et al.*, 1998 ; Moore *et al.*, 1993).

II.6.3. Les essais biologiques et l'évaluation de l'infection

Les tests biologiques ou les bio tests sont une forme d'expérimentation pour l'estimation de la puissance d'une substance ou comparant l'efficacité de deux ou de plusieurs substances par le biais de la réaction qui suit leur application à la matière vivante (Rangaswamy, 1995). En entomologie, le sujet (hôte) peut être un insecte, le stimulus peut être un pesticide ou un agent

microbien et la réponse peut être le changement dans les caractéristiques des insectes en termes de poids, de forme, de taille, d'appétit, de changement, de comportement ou de la mort. La virulence peut être mesurée dans un essai biologique en exposant un nombre connu d'hôtes à un nombre connu d'agents pathogènes et en observant le nombre de morts au cours du temps (Reichelderfer, 1993).

I.3. Les Moustiques

I.3.1. Généralités sur les moustiques

I.3.1. 1. Position systématique

Le moustique est le nom commun des insectes de la famille des Culicidés qui forme le sous ordre des nématocères dans l'ordre des diptères (Tableau VIII). Leur corps est élancé et ils possèdent de longues antennes à plus de six articles. Leurs pattes sont fines et longues. Seules les femelles sont hématophages.

Tableau VIII : Position systématique de la famille des Culicidae Meigen, 1818 moustique (Berchi, 2000)

Classification	Dénomination	Signification
Règne	Animalia	Etre vivant hétérotrophe (se nourrissant de matière organique)
Sous règne	Metazoa	Organisme eucaryote pluricellulaire
Embranchement	Arthropoda	Corps segmenté (métamère) pourvu d'un squelette externe (cuticule)
Sous- embranchement	Hexapoda	Possèdent trois paires de pattes articulées
Classe	Insecta	Corps composé de trois parties(tête, thorax, abdomen) et d'une paire d'antennes
Sous-classe	Pterygota	Adulte possédant deux paires d'ailes
Infra-classe	Neoptera	Ailes pourvues d'un champ jugal et repliées en arrière au repos
Super-ordre	Holometabola	Larves et adultes différent radicalement. La larve est aptère et grandit sans changer de forme.
Ordre	Diptera	Une seule paire d'aile assure la fonction de vol, la deuxième assure la stabilité de l'insecte lors du vol (balanciers)
Sous-ordre	Nematocera	
Famille (Meigen,1818)	Culicidae	Non vernaculaire : Moustiques

Les Culicidae constituent un groupe d'êtres vivants hétérotrophes (se nourrissant de matière organique) faisant partie des organismes eucaryotes pluricellulaires. Ils ont un corps composé de trois parties (tête, thorax, abdomen) segmenté en métamères avec un squelette externe (cuticule) possédant trois paires de pattes articulées et une paire d'antennes. L'adulte de moustique possède deux paires d'ailes pourvues d'un champ jugal et repliées en arrière au repos. Larves et adultes différent radicalement. La larve est aptère et grandit sans changer de

forme. Une seule paire d'ailes assure la fonction de vol, la deuxième assure la stabilité de l'insecte lors du vol (balanciers)

Non vernaculaire : Moustiques

La famille des Culicidés se divise en trois sous-familles : les Culicinae, les Anophelinae et les Toxorhynchitinae (Figure 9). Cette dernière, formée d'un seul genre, n'est pas représentée en Europe occidentale (Duchauffour,1976; Matille, 1993) ni en Afrique Méditerranéenne (Brunhes et al., 1999). Environ 3500 espèces sont décrites de part le monde (Marquardt et al., 2005), dont trois-quarts environ sont originaires des zones subtropicales et tropicales humides.

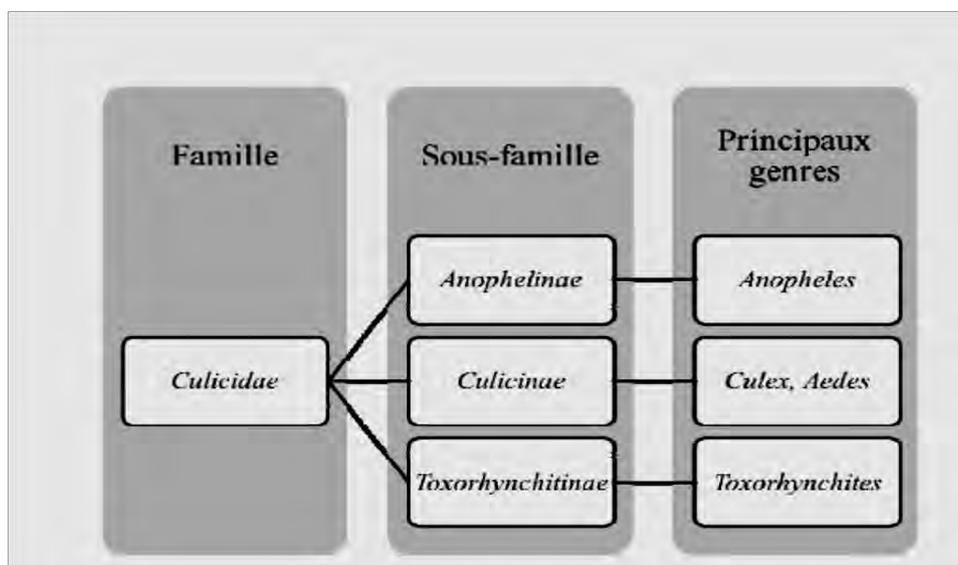


Figure 14: Classification des Culicidae ou moustiques (Anopheles Group, 2012)

Une liste taxonomique rapportée par Brunhes et al.,(1999) mentionne 66 espèces présentes en Algérie. Elles appartiennent à deux sous-familles, (*Culicinae* et *Anophelinae*) et se répartissent en 6 genres : *Anopheles* (Meigen,1818), *Culex* (Linnaeus,1758), *Culiseta* (Felt,1904), *Aedes* (Meigen,1818), *Orthopodomyia* (Theobalt,1904) et *Uranotaenia* (Lynch Arribalzaga,1891)

III.2. Bio écologie des moustiques

III.2.1. Cycle de vie

Les moustiques ont une métamorphose complète, ils sont holométaboles. Ils sont présents sur tous les continents sauf en Antarctique, à proximité de pièces d'eau stagnantes, nécessaires au développement de stades immatures (Lehane, 1991; Clements, 1999). Les moustiques se développent dans deux milieux radicalement différents en fonction de leur stade de vie :

aérien au stade imaginal (adulte) et aquatique aux stades larvaires et nymphals (Figure 15) (Clements, 1992). Les individus immatures passent par quatre stades de développement larvaires successifs, qui se nourrissent principalement de microorganismes, algues et débris. Ils ont une respiration aérienne qui se fait à l'aide d'un siphon (Culicinae) ou des stigmates respiratoires (Anophelinae). Après un stade nymphal de transformation complète de l'organisme (Insecte holométabole), l'imago émerge pour investir le milieu aérien.

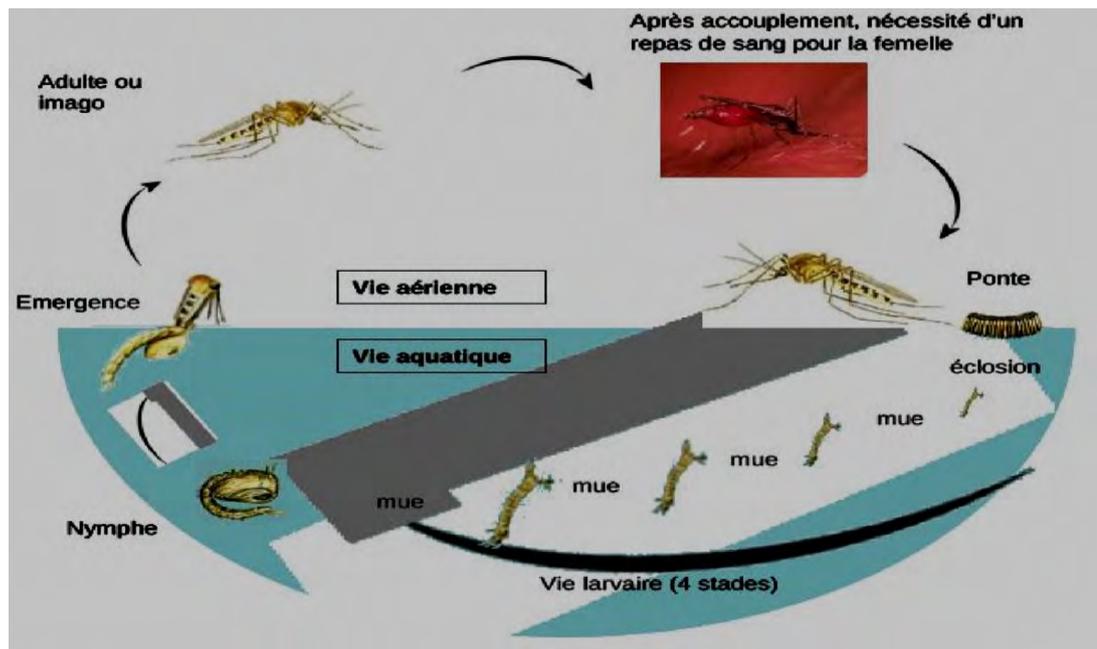


Figure 15: Cycle biologique des moustiques (Berchi, 2000)

De l'éclosion de l'œuf au stade adulte, le cycle dure environ 15 à 20 jours, lorsque les conditions de température et de nourriture sont favorables. Les moustiques respirent à la surface de l'eau l'oxygène aérien, sauf pour les genres *Coquillettidia* (Dyar, 1905) et *Mansonia* (Blanchard, 1901) qui puisent l'oxygène circulant dans les racines de certaines plantes aquatiques. Les *Culex* pondent leurs œufs groupés, collés les uns aux autres formant une "nacelle" flottante. Les anophèles pondent leurs œufs un à un à la surface d'eau généralement claires, ombragées ou ensoleillées, herbacées ou non. Les œufs d'*Aedes* sont pondus, isolés dans l'eau ou sur des supports secs, car ils sont résistants à la sécheresse et peuvent attendre la mise en eau plusieurs mois. Ils éclosent très rapidement dès qu'ils sont immergés (Rioux, 1958).

III.2.2. Comportement trophique

Les adultes se nourrissent de nectar de plantes, et après accouplement la femelle recherche un animal vertébré pour prendre un repas de sang nécessaire au développement des oeufs.

Les femelles de certaines espèces peuvent toutefois pondre sans avoir pris de repas de sang, il s'agit alors d'une ponte autogène. Certains comportements imaginaires peuvent présenter un intérêt pratique (Riuox et Cousserans, 2008). Les différences de modes d'accouplement permettent de distinguer des espèces eurygames et sténogames. Les premières ont besoin de grands espaces pour effectuer leur vol nuptial (*Aedes detritus* Haliday, 1833). Par contre, les espèces dites sténogames s'accouplent au sol, sur la végétation érigée (*Aedes coluzii*) ou sur les murs des grottes et des habitations (*Culex pipiens* Linné, 1758). L'étendue des aires de dispersion dépend des capacités de déplacement, propres à chaque espèce (portée de vol de quelques mètres pour *Culex quinquefasciatus*, de plusieurs kilomètres pour *Aedes caspius* et *Aedes detritus*) et du vent. Mais, quelle que soit l'espèce, les plus fortes densités s'observent généralement au voisinage des gîtes larvaires, ainsi dans les milieux ouverts ou la présence de vent est importante, les adultes trouvent un abri dans les arbustes les plus proches. Certaines espèces, qui évoluent habituellement à l'extérieur (exophiles), peuvent pénétrer dans les habitations pour se nourrir (endophiles) et digérer le repas sanguin ou pour hiverner (gîtes de diapause). Les espèces de moustiques sont plus nombreuses dans les zones tropicales et équatoriales que dans les régions tempérées car ces insectes supportent mal les écarts thermiques. Les femelles de moustiques n'ayant jamais pris de repas sanguin sont parfois capables de donner une première ponte fertile. Ce phénomène, observé pour la première fois par Théobald en 1901, est signalé par Roubaud (1929), qui lui attribue le nom d'autogénèse par opposition à l'anautogénèse qui est la nécessité de prendre un repas de sang pour produire une première ponte.

III.2.3. Intérêts dans l'écosystème

Les moustiques représentent un maillon essentiel dans le fonctionnement d'un écosystème aquatique. En effet, par sa présence en grand nombre, ils représentent une biomasse importante dont se nourrissent de nombreux organismes (batraciens, poissons...). Ils sont ainsi un maillon important de la chaîne trophique des zones humides. De plus, de part leur régime alimentaire, les larves participent au processus de destruction de la matière organique.

Leur régime omnivore, avec l'ingestion de feuilles en décomposition par exemple, accélère la décomposition des matières organiques dans les écosystèmes aquatiques.

III.2.4. Nuisance et intérêt médical

Les moustiques ont été toujours considérés comme source de nuisance pour l'homme, en raison du fait qu'ils sont responsables des plus grandes endémies dans le monde, ils constituent le groupe de vecteurs le plus important en santé publique humaine et vétérinaire.

Dans la sous famille des Culicinae les genres vecteurs des agents pathogènes sont: *Culex*, *Aedes* et *Anopheles*. Sur le plan santé, la pique par les adultes femelles de nombreux Culicidés anthropophiles, nécessaire à la maturation des pontes, ne se résume pas seulement au désagrément passager lié à la prise de sang (Failloux et Rodhain 1999). Cette prise directe du fluide dans les capillaires sanguins va permettre à différentes formes de vies (virus, protozoaires, ver et nématodes) d'exploiter les moustiques comme voie de transfert vers les hôtes vertébrés. Ainsi, les agents pathogènes comme par exemple les protozoaires (ex: *Plasmodium faciparum* responsable du paludisme) utilisent le moustique comme vecteur puis l'homme comme hôte pour la réalisation de leur cycle biologique infectant ainsi à l'homme de nombreuses maladies. Les maladies dont les moustiques sont porteurs sont : dengue (*Aedes*), paludisme (*Anopheles*) et la fièvre du Nil occidental (*Culex*).

III.3 Le complexe *Culex quinquefasciatus*

III.3.1. Caractères morphologiques

III.3.2. Les oeufs

Les oeufs sont fusiformes et mesurent environ 1mm de long. Généralement blanchâtres au moment de la ponte, ils s'assombrissent dans les heures qui suivent. Ils sont pondus dans l'eau, réunis par 200 à 400 en nacelle (Figure16) dont l'arrangement leur permet d'être insubmersibles (Rioux, 1958).



Figure 16: Aspect des oeufs de *Culex quinquefasciatus* agglomérés en nacelles (Berchi, 2000)

III.3.3. La larve

D'aspect vermiforme, le corps de la larve se divise en trois segments: la tête, le thorax trapu et l'abdomen (Figure 17). Sa taille varie de 12mm en moyenne en fonction des stades et elle est dépourvue d'appareil locomoteur. Son extrémité caudale est munie d'un siphon, long et étroit affleurant à la surface de l'eau. Ce tube est muni de 5 clapets qui s'ouvrent sur deux orifices par où l'air pénètre à l'intérieur quand la larve monte à la surface de l'eau. Ces clapets se rabattent quand elle gagne les profondeurs. Ses pièces buccales sont de types broyeurs, adaptées à un régime saprophyte (alimentation de type particulaire) (Kettle, 1995).



Figure 17: Morphologie générale d'une larve de IV ème de Culicinae (*Culex quinquefasciatus*) (Kettle,1995).

III.3.4. La nymphe

La tête et le thorax de la nymphe fusionnent pour donner un céphalothorax sur lequel on trouve deux trompes qui permettent à la nymphe de respirer. Sa forme globale rappelle celle d'un point d'interrogation. Les orifices anal et buccal étant bouchés, la nymphe ne se nourrit pas (Figure 18). Ses palettes natatoires, situées sur l'abdomen, lui permettent de se déplacer (Rioux, 1958 ; Cachereul, 1997).

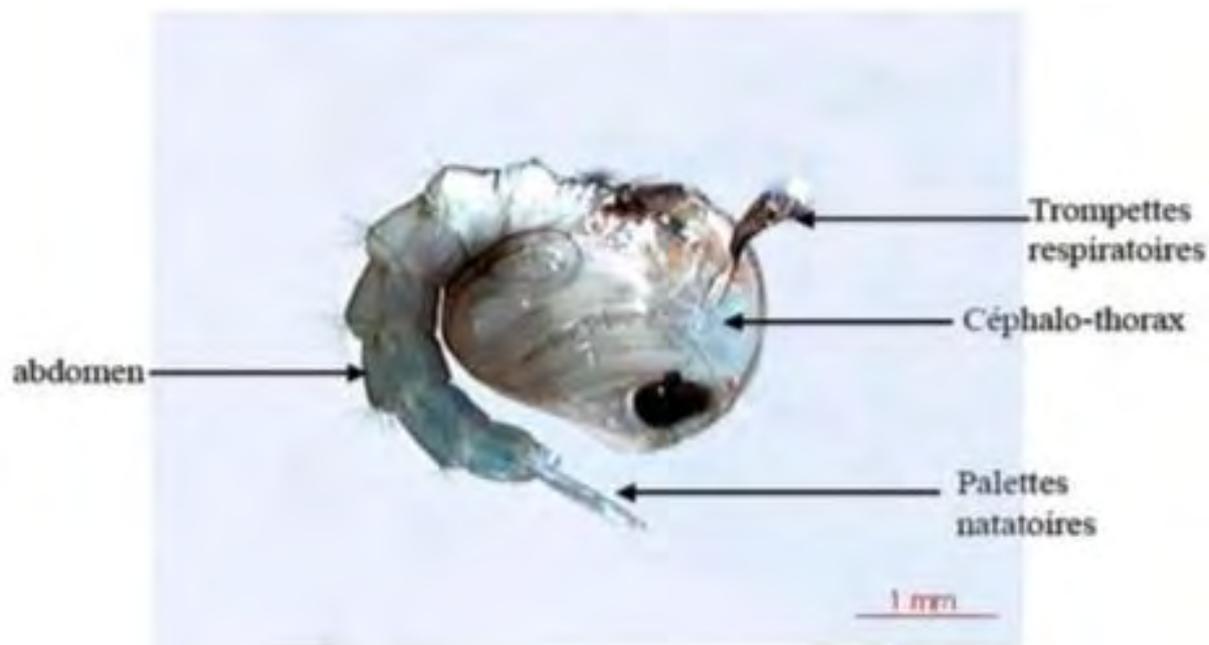


Figure 18: Aspect général d'une nymphe de Culicinae (*Culex quinquefasciatus*) (Berchi,2000)

III.3.5. L'adulte

Le *Culex* adulte mesure 3 à 6 mm de long (Figure 19). Les différentes parties sont :

La tête : Elle est sombre, couverte d'écailles fourchues dressées et sombres entre lesquelles sont situées des écailles blanches et des poils bruns. Sur les joues se trouvent des écailles plus courtes formant une tache blanche (Kettle,1995 ;Andreo,2003).

Le thorax : Il est Composé de trois segments soudés (le prothorax, le mésothorax et le métathorax), il porte les ailes et les pattes. Le thorax est brun recouvert d'écailles fauves foncées avec quelques écailles claires sur les cotés.

L'abdomen : Il est grêle et allongé, il est composé de 9 segments terminés par 2 cerques, appendices courts protégeant l'anus et l'orifice génital. Il est recouvert d'écailles claires, brunes et blanches avec de longs poils sur la face dorsale. Une ligne longitudinale sombre ainsi que quelques taches sombres sur les cotés ornent la face ventrale. Chez les males, l'abdomen se termine en une armature génitale servant à maintenir la femelle durant l'accouplement. Chez les femelles, on trouve un oviscapte qui intervient lors de la ponte (Bussieras et Chermette, 1991).

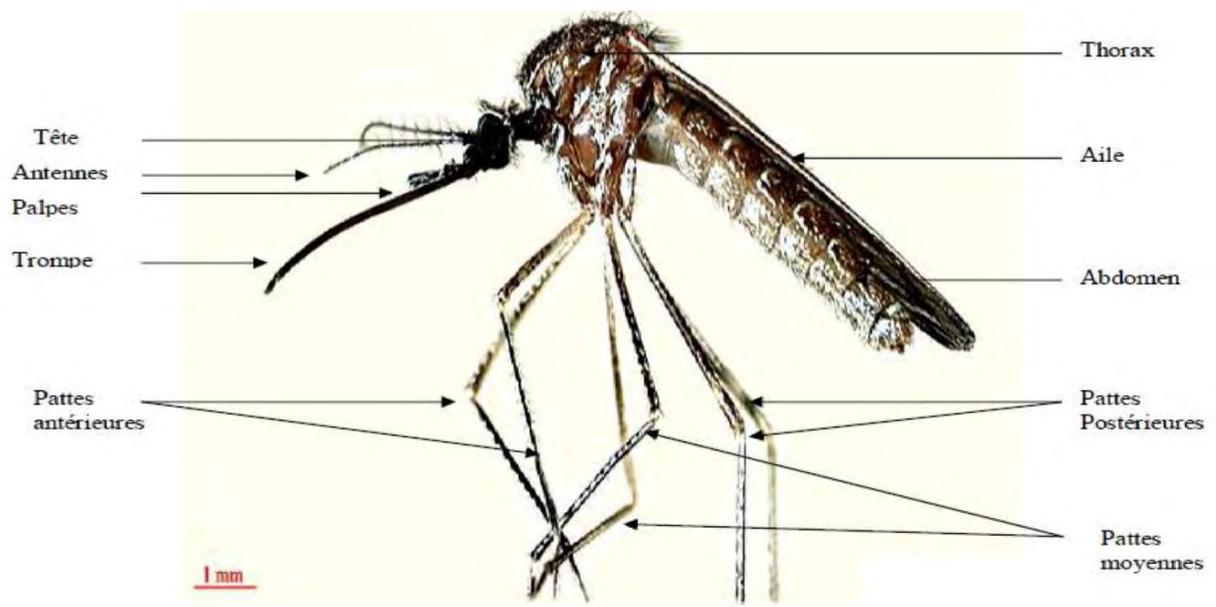


Figure 19: Morphologie du moustique adulte vu de profil (Brunhes et al, 1999).

III.4. Bio écologie du *Culex quinquefasciatus*

III.4.1. L'oeuf

Les lieux de ponte de la femelle sont variés : ce sont les petites collections d'eau proches des habitations comme les bassins, les citernes, les pots de fleurs, les vieux pneus, ou encore les boites de conserve. La femelle dépose les oeufs, qui ont un diamètre inférieur à 1 mm (Andreo, 2003), perpendiculairement à la surface de l'eau en amas groupes (Figure 20). Une femelle peut pondre jusqu'à 300 oeufs (Wall et Shearer, 1997), qui éclosent en 24 à 48 heures lorsque la température de l'eau est suffisante.



Figure 20: OEufs de *Culex quinquefasciatus* (Moulinier, 2003)

III.4.2. La larve

La larve sort de l'oeuf ; elle est disposée obliquement par rapport à la surface de l'eau (Euzeby, 2008; Ripert, 1998) et se déplace par mouvements saccadés. Son régime saprophyte est constitué de plancton et de particules organiques ingérés grâce à ses pièces buccales de type broyeur. Elle respire par un siphon (Figure 21). La larve évolue ainsi selon quatre stades pendant 8 à 12 jours, avant d'atteindre le stade nymphal (Cachareul, 1997 ; Wall et Shearer, 1997).

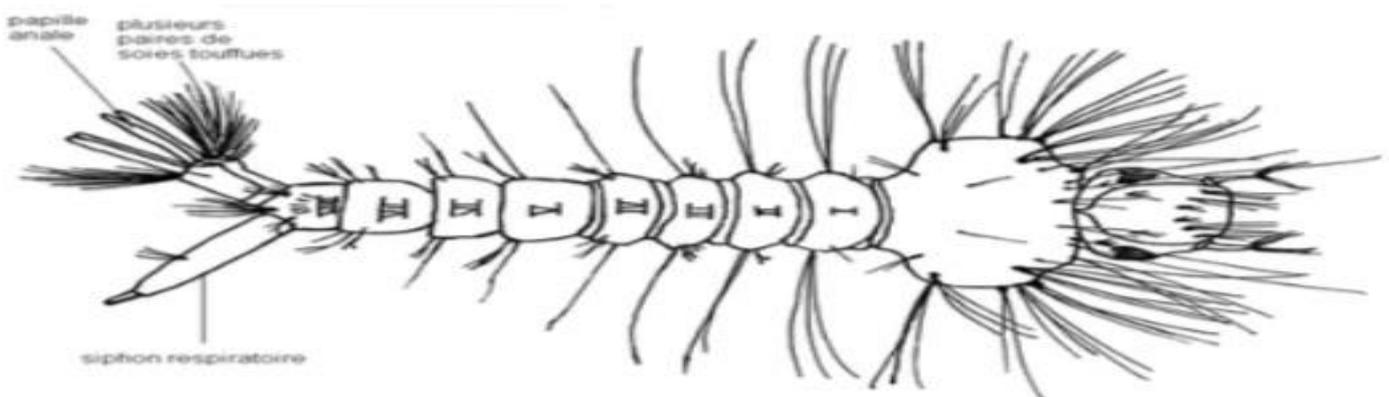


Figure 21: Larves de *Culex quinquefasciatus* (Moulinier, 2003)

III.4.3. La nymphe

La nymphe a une forme de point d'interrogation (Euzeby,2008) et respire par des trompettes respiratoires situées sur le céphalothorax (Figure 22) . Elle n'ingère par contre aucune nourriture. Elle est extrêmement sensible et plonge dans l'eau au moindre mouvement perçu (Cachareul, 1997 ; Wall et Shearer, 1997). *Culex pipiens* reste sous cette forme pendant 2 à 4 jours. A la fin de cette période, la nymphe donne un adulte, mâle ou femelle. Cette étape se fait généralement le matin (Ripert, 2007).

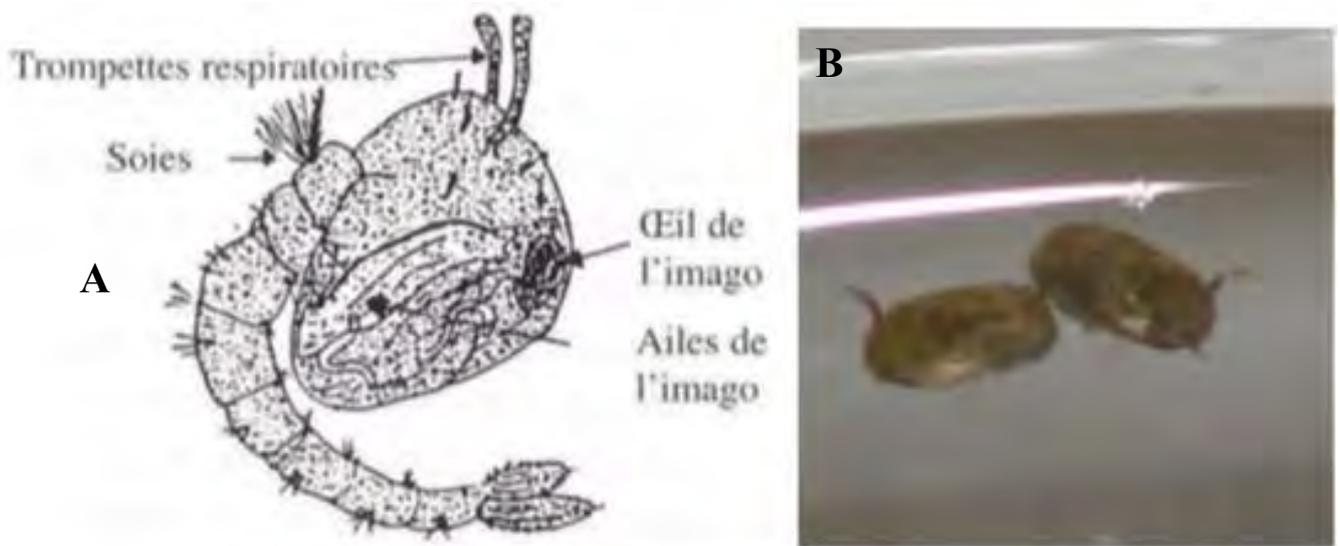


Figure 22: Nympe de *Culex quinquefasciatus* A et B (Moulinier, 2003)

III.4.4. L'adulte

Le mâle se nourrit exclusivement de suc et de nectar extrait de plantes, et meurt après la copulation. La femelle peut vivre 3 semaines à 3 mois selon la température et la qualité du gîte. Elle se nourrit du suc des plantes et est en plus hémaphage, ce qui est indispensable à la formation des oeufs (Ripert, 1998) (Figure 23).

Les adultes s'éloignent peu des gîtes larvaires après l'éclosion. Ils ne dépassent pas 3 km de distance, sauf lors de vent violent qui pousse les *Culex quinquefasciatus* beaucoup plus loin. L'accouplement se produit dans les 48 heures suivant l'émergence des femelles et avant le premier repas sanguin. La femelle s'accouple en général une seule fois au cours du vol, dans un large espace : c'est une espèce dite eurygame (Moulinier, 2003). Le mâle est attiré par les fréquences sonores ainsi que par des phéromones émises par la femelle. Après l'accouplement, la femelle part à la recherche d'un hôte pour se nourrir de sang nécessaire à la

maturation des ovules. La ponte a lieu environ 5 jours après le dernier repas (Moulinier,2003). Lorsque les journées commencent à raccourcir et que les températures baissent, Les femelles cherchent un gîte de repos et y passent plusieurs mois sans se nourrir : C'est la diapause. Elles sont capables de survivre grâce aux réserves lipidiques accumulées à partir des sucs végétaux. Elles sortiront et recommenceront leurs repas sanguins à partir du printemps (Robich et Denlinger, 2005).

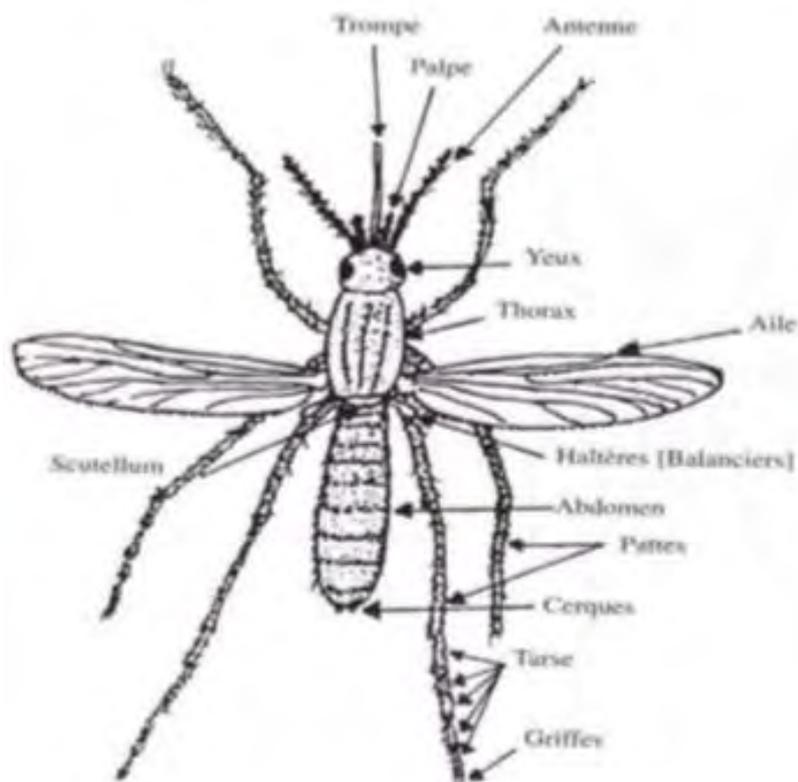


Figure 23: *Culex* adulte ou imago (femelle en haut à droite, mâle en bas à droite) (Moulinier,2003).

III.5. Les principales nuisances causées par le genre *Culex*

III.5.1. Les Piqûres

Chez l'homme comme chez l'animal, la piqûre du moustique femelle provoque une lésion ronde de quelques mm à 2 cm de diamètre souvent prurigineuse. Des réactions allergiques à ces piqûres peuvent apparaître, elles sont dues à l'injection d'antigènes salivaires mais pouvant aussi être dues au simple contact avec le moustique ou ses excréments (Candace et al., 2001). L'expression de cette allergie chez le chien peut être aussi bien locale que généralisée, et se manifeste par des plaques érythémateuses très prurigineuses (Prelaud, 1991).

III.5.2. La transmission de maladies

L'espèce *Culex pipiens* est connue comme étant vecteur de plusieurs maladies notamment des arboviroses. Savage et al., (1995) le considèrent comme l'un des principaux vecteurs du virus de l'encéphalite de Saint-Louis aux Etats-Unis. Il a été considéré aussi comme le principal responsable de l'épidémie du virus West Nile qui a frappé les Etats-Unis en 2002 (Palmisano et al., 2005). En effet, le virus de la maladie du West Nile a été isolé à partir de 43 espèces de moustiques, principalement du genre *Culex*. En Afrique et au Moyen-Orient, le principal vecteur est *Culex univittatus* (Theobald, 1901), bien que *Culex poicilipes* ; *Culex neavei* (Theobald,1901) ; *Culex decens* (Theobald,1901) ; *Aedes albocephalus* ou *Mimomyia* spp ,jouent un rôle important dans certaines régions. En Europe, les principaux vecteurs sont *Culex pipiens*, *Culex*, *Culex modestus* (Ficalbi, 1889) et *Coquillettidia richiardii* (Ficalbi, 1986). En Asie, *Culex quinquefasciatus* (Say, 1823), *Culex tritaeniorhynchus* (Giles, 1901) et *Culex vishnui*(Theobald,1901) prédominent (Hubalek et Halouzka,1999). Aux Etats-Unis (Andreadis *et al.*, 2001), en Roumanie (Savage *et al.*,1999), en Bulgarie et en République tchèque (Hubalek et Halouzka,1999), l'espèce *Culex pipiens* est le principal vecteur, d'où le virus a été également isolé. La compétence vectorielle de *Culex pipiens* pour cette maladie a été prouvée expérimentalement dans plusieurs régions du monde. Par ailleurs, en plus de cette compétence vectorielle, les femelles infectées de cette espèce sont capables de transmettre le virus à leur progéniture (Farajollahi *et al.*, 2005 ; Murgue *et al.*, 2001), ce qui fait de ce moustique le premier suspect du maintien et de la transmission de l'enzootie du virus West Nile.

Au Maroc, *Culex pipiens* joue un grand rôle dans la forte nuisance que connaît la majorité des zones urbaines. Son rôle dans la transmission des épidémies du virus West Nile qui ont touché le Maroc en 1996 (Harrack *et al.*, 1997, Murgue *et al.*, 2001), et en 2003 (Schuffenecker *et al.*, 2005), est fortement suspecté. Zientara *et al* (2001), rapportent qu'en Algérie des cas isolés chez l'homme ont été observés en 1994. Au Senegal, *Culex quinquefasciatus* présente le plus d'intérêt en raison de son abondance et de sa nuisance réelle dans les zones urbaines (Berchi, 2000).

III.6. Aperçu général sur les moyens de lutte contre les moustiques

III.6.1. La lutte mécanique

De part le monde, les premiers moyens de lutte furent l'élimination de certaines zones humides permanentes ou temporaires (étangs, marais, marécages,).

C'est le développement de l'élimination de ces zones d'eau, et donc de l'habitat naturel du moustique, qui a permis de diminuer les populations de moustiques et d'éradiquer certaines maladies (Boyer, 2006). Cependant, pour préserver ces milieux naturels, les recherches se sont intensifiées pour développer de nouvelles stratégies de lutte contre les moustiques. C'est ainsi que les premières luttés insecticides ont commencé avec la lutte chimique.

III.6.2. La lutte chimique

Les premiers insecticides chimiques utilisés dans la lutte anti vectorielle sont les Organochlorés tout particulièrement, le Dichloro-Tichloroéthane synthétisé la première fois en 1873 par Othman Zeidler et connu sous le nom de DDT. Cet insecticide décrit par Muller pour son efficacité insecticide ne fut reconnu qu'en 1939. Il s'agit d'un insecticide de la famille des organochlorés agissant au niveau des cellules nerveuses. Il s'accumule dans les membranes cellulaires et perturbe les équilibres cationiques K^+/Na^+ conduisant à des convulsions et des paralysies, puis la mort (Boyer, 2006). De part son efficacité, il a longtemps été employé partout dans le monde (Mouchet, 1995). Cependant, le DDT qui a provoqué une véritable révolution dans la lutte contre les insectes, a été interdit au bout d'un certain temps dans de nombreux pays à cause de son accumulation dans l'environnement et d'éventuels effets néfastes sur la santé humaine (Mouchet,1994). Le DDT a donc laissé place à d'autres insecticides organochlorés comme l'aldrine, la dieldrine, l'héptachlore et le lindane. Bien que les insecticides chimiques se soient révélés très efficaces sur les moustiques, ils présentent plusieurs inconvénients. En effet, en plus de leur coût élevé, ils peuvent être à l'origine de divers problèmes environnementaux. Pour Barbouche et al.(2001), l'accumulation significative de matières actives dans les écosystèmes traités, aquatiques et terrestres peut engendrer un problème de pollution. Par ailleurs, les substances actives des produits utilisés présentent un large spectre d'action et n'épargnent pas les organismes non cibles. A tous ces inconvénients, s'ajoute aussi un problème de développement de la résistance aux insecticides chez les insectes traités (Georghiou *et al.*, 1975 ; Sinigre *et al.*, 1977). Selon Georghiou et Lagunes-Tejeda (1991), plus de 500 espèces d'insectes ont développé en 1989, une résistance à une ou plusieurs familles d'insecticides. Ainsi, la résistance des moustiques aux insecticides

est connue dans de nombreux pays. Elle a été constatée en 1958 au Cameroun (Mouchet et al., 1960) à la suite de traitement au malathion de *Culex quinquefasciatus*. Une baisse de sensibilité au malathion des souches de *Culex pipiens* urbains et une faible résistance au fenthion sont observées par Chauvet *et al.*, (1971) à Madagascar. Plus tard, Sinègre *et al.*, (1976) observent après trois années de traitement au chlorpyrifos sur le littoral méditerranéen, une baisse du niveau de sensibilité et même une résistance. Au Sénégal, les travaux réalisés à l'université Cheikh Anta Diop par Raymond Ndione *et al* (2008) sur les populations larvaires urbaines et périurbaines de *Culex quinquefasciatus* ont montré une résistance vis-à-vis du malathion, organophosphoré utilisé dans la lutte anti larvaire. Ce phénomène de résistance rapporté par plusieurs auteurs comme ceux cités précédemment, a amené la communauté scientifique à chercher des solutions de rechange à la lutte chimique. La méthode alternative proposée est la lutte biologique.

III.6.3 La lutte biologique

La lutte biologique est l'utilisation d'organismes vivants pour prévenir ou réduire les dégâts causés par des ravageurs. Celle-ci s'illustre de différentes manières.

La lutte par entomophagie, qu'il soit parasitoïde ou ravageur, s'effectue par l'introduction d'un animal ravageur de l'organisme cible. La lutte microbiologique est l'utilisation de microorganismes (champignons, bactéries) qui infectent la cible souvent par ingestion. Si l'organisme antagoniste doit être lâché ou inoculé (en grand nombre) à chaque fois que l'effectif du ravageur croît dangereusement, c'est la lutte biologique inondative. Enfin, aux frontières de la lutte biologique ; la lutte autocide (encore dénommée lutte par mâles stériles) a pour principe l'introduction en grand nombre, dans une population naturelle, d'individus mâles de la même espèce rendus stériles mais au comportement sexuel intact. Deux grands types de luttes biologiques ont été utilisés à l'encontre des moustiques.

La première méthode biologique est l'utilisation d'un poisson prédateur, la gambusie (*Gambusia holbrooki*), qui a souvent été utilisée mais avec plus ou moins de succès (Pates et Curtis 2005). Ce poisson est un prédateur généraliste à utiliser avec grande précaution pour éviter les dommages sur les autres organismes aquatiques. D'autres formes de contrôles biologiques ont été tentées avec d'autres espèces de poissons, de champignons, de bactéries, de nématodes, des parasites protozoaires, des insectes prédateurs, mais peu d'entre elles ont été concluantes et donc adoptées. La deuxième méthode est l'utilisation d'organismes microbiens tels que le *Bacillus sphaericus* (Bs) et le *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*

(Bti). Ces bacilles sont d'ailleurs considérés comme des agents de contrôle biologique efficace (Becker 1998). Ils agissent sur les larves des moustiques, des simuliides et des diptères en général et sont aujourd'hui utilisés dans un large panel de gîtes larvaires, du fait de leur efficacité et leur spécificité qui respectent largement la faune compagne.

D'ailleurs, le Bt est le micro-organisme le plus utilisé comme bio-insecticide et représentent plus de 90% du marché des bio insecticides, mais seulement 2% à peine de la marche globale des insecticides (Fargues et Bourguet, 2005). Bien que le développement d'une résistance chez les moustiques n'ait pas encore été décelé avec ce composé, il est important de poursuivre les études en vue d'élaborer de nouveaux insecticides biologiques afin d'être prêt à répondre à toutes éventualités. Les champignons entomopathogènes sont des plus prometteurs. Ils jouent un rôle considérable dans la régulation des populations d'insectes (Roberts, 1973; Ferron, 1975). L'un des plus intéressants appartient à la classe des Ascomycètes : il s'agit d'un pathogène d'insectes connu sous le nom de *Metarhizium anisopliae* (Veen, 1968; Samuels et al. ,1989).

CHAPITRE II : TRAITEMENT DES LARVES EN MILIEU SEMI- NATUREL

INTRODUCTION

Cette thèse s'inscrit dans le cadre de la lutte contre les insectes en général et contre les moustiques en particulier qui causent des nuisances (bourdonnement et piqûres) et des maladies telles que la fièvre-jaune, la dengue, le paludisme. Pour cela, différentes méthodes de lutte (mécanique, chimique et biologique) sont adoptées. Face à l'apparition d'espèces résistantes, des chercheurs de l'Université Cheikh Anta Diop de Dakar et de l'IRD (Institut de Recherche pour le Développement) ont étudié les effets d'une double imprégnation des moustiquaires avec deux insecticides à modes d'action différents (un pyréthrianoïde et un carbamate). L'efficacité de cette association a aussi été démontrée à l'issue d'un essai mené sur le terrain en Côte d'Ivoire contre des moustiques du genre *Anopheles* et *Culex* résistants aux pyréthrianoïdes (Masson, 2003). Ce mélange fait intervenir un effet synergique entre ces deux insecticides, ce qui lui confère un avantage dans la lutte contre les moustiques. Ainsi, il y a une réduction des doses à appliquer, une durée d'action plus courte et une meilleure efficacité. Les mélanges d'insecticides chimiques peuvent constituer une stratégie efficace de gestion de la résistance, mais sont nuisibles aux non-cibles. C'est pourquoi les chercheurs s'orientent maintenant vers les insecticides d'origine biologique comme le neem (*Azadirachta indica*) et les champignons (*Aspergillus clavatus* et *Metarhizium anisopliae*). Pris isolément ou en association, ces insecticides d'origine biologique ont montré une efficacité sur les larves de moustique. C'est dans ce cadre que nous nous sommes intéressés à l'étude dans des milieux semi-naturels d'un effet synergique du Suneem 1% (*Azadirachta indica*) et d'un champignon entomopathogène (*Metarhizium anisopliae*) sur les larves de moustique. Et pour cela un certain nombre d'objectifs spécifiques ont été décrits notamment :

- Déterminer les taux de mortalité des larves de moustique tous genres confondus (*Anopheles*, *Aedes*, *Culex*) face au Suneem1% ;
- Déterminer les taux de mortalité des larves de moustique tous genres confondus (*Anopheles*, *Aedes*, *Culex*) face au champignon entomopathogène *Metarhizium anisopliae*;
- Déterminer la compatibilité entre le Suneem 1% et le champignon *Metarhizium anisopliae* ;
- Déterminer les taux de mortalité des larves des trois genres de moustique (*Anopheles*, *Aedes*, *Culex*) face au mélange entre le Suneem1% (*Azadirachta indica*) et un champignon entomopathogène (*Metarhizium anisopliae*).

II.1 MATERIEL ET METHODES

II.1.1. Matériel

II.1.1.1. Matériel expérimental

Nous avons choisi cinq bacs dans la zone expérimentale du département de biologie animale de la Faculté des Sciences et Techniques (FST) contenant chacun 5 litres d'eau distillée sur lesquels sont déposés des cages cubiques (50 x 50 x 50 cm) avec une armature en bois recouverte d'un tissu moustiquaire pour empêcher les larves émergées d'échapper. (Figure 24).



Figure 24: Dispositif pour l'élevage des larves dans des bacs couverts de cages avec tuile moustiquaire

II.1.1.2. Matériel biologique

Le matériel biologique que nous avons utilisé est constitué des larves de tous stades et de tous genres (*Aedes*, *Culex*, *Anopheles*) de moustique à l'image de celle du *Culex* dont la position systématique est la suivante :

Règne	Animal
Sous-règne	Métazoaires
Embranchement	Arthropodes
Sous-embranchement :	Antennates ou Mandibulates
Super classe :	Uniramés
Classe :	Insectes
Sous classe :	Ptérygotes
Section	Néoptères
Infra-classe	Oligonéoptères
Super-ordre	Mécoptéroïdes
Ordre	Diptères
Sous-ordre	Nématocères
Famille	Culicidés
Genre	<i>Culex</i>
Espèce	<i>quinquefasciatus</i>



Figure 25: Larve de moustique du genre *Culex*

II.1.1.3. Matériel de traitement des moustiques

1. Le Suneem 1% :

Le Suneem est un biopesticide à base d'azadirachtine. Le produit est fourni par la Senchim une industrie chimique Sénégalaise. Le Suneem est un produit biochimique qui peut lutter efficacement contre les moustiques. Il a des vertus larvicides, adulticides et antiappétantes en lutte biologique.

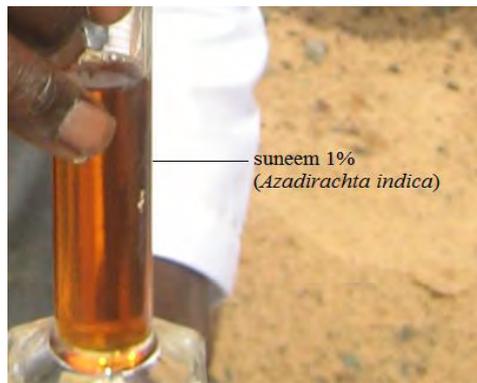


Figure 26: Le Suneem1%

2. *Metarhizium anisopliae*

Le champignon utilisé est *Metarhizium anisopliae*. Il est fourni par la Direction de la Protection des Végétaux (DPV) de Dakar sous le label « Green muscle». Les spores lyophilisées sous forme de souches ont été conservées dans des sachets dans les conditions du laboratoire. Par la suite ces souches sont multipliées sur un milieu de culture le riz préalablement stérilisé à l'autoclave (figure 27).

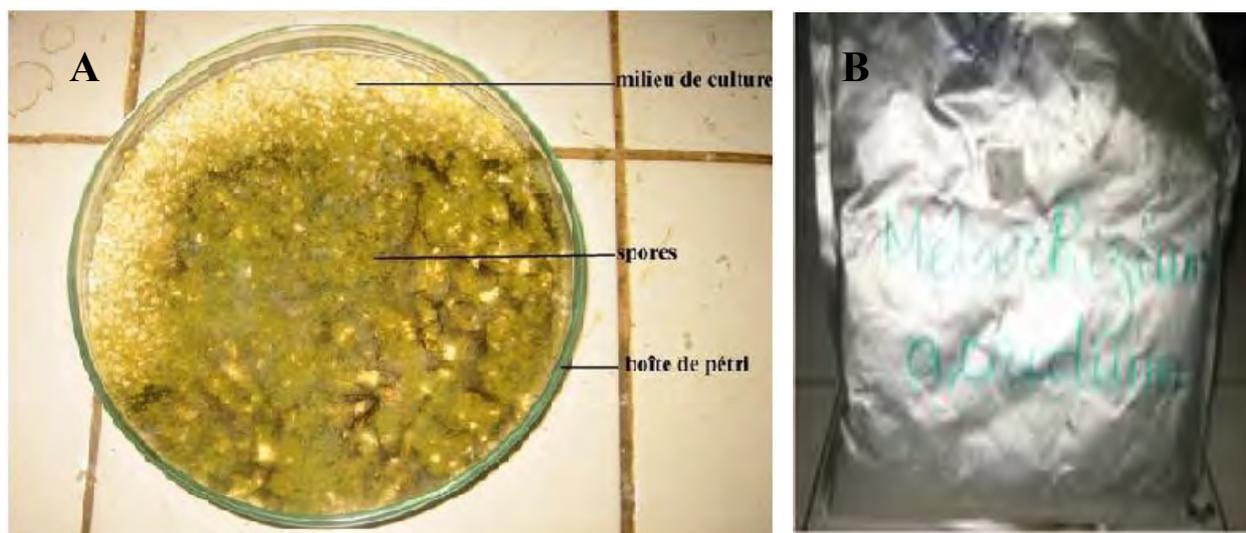


Figure 27: *Metarhizium anisopliae* culture(A) et dans le sachet(B)

II.1.1.4. Petit matériel de laboratoire nécessaire au traitement

Le matériel de laboratoire est composé de :

- Appareil numérique marque Nikon,
- Bêcher,
- 6 bocaux de dimensions 10 x 10 x 7cm,
- Boîtes de pétri (BP),
- Éprouvettes,
- Étuve de marque Kowell
- Un hygromètre,
- Cages d'émergences (cages de dimensions 30 x 30 cm)
- Gants en latex,
- Loupe binoculaire de marque motic,
- Des masques,
- Un microscope optique de marque motic,
- Des pipettes graduées
- La pipette thoma
- Des poires pipettes pour aspirer
- Un thermomètre

II.1.2. Méthodes

II.1.2. 1. Récoltes et identification des larves (methode)

Les larves servant à l'étude ont été récoltées au niveau des gîtes (eaux stagnantes dans des dépressions à ciel ouvert) se trouvant au quartier Bopp à la rue 1 dans la région de Dakar (Sénégal). Ces larves de moustique ont été identifiées au laboratoire de Biologie de la Reproduction (LBR) sise au département de Biologie Animale de l'Université Cheikh Anta Diop de Dakar à l'aide de clés d'identifications. Ensuite les larves ont été triées en larves de stade L3, L1 et L2. Ces larves ont été immergées dans les bacs contenant 5 litres d'eau distillée sur lesquels sont déposés des cages cubiques (50 x 50 x 50 cm) avec une armature en bois voilée de tissu comportant sur le coté un manchon de tulle pour permettre un accès facile et empêcher les larves émergées d'échapper.



Figure 28: Photo illustrant la phase de récolte des larves de moustiques

II.1.2.2. Etude de la compatibilité entre le Suneem 1% et le *Metarhizium anisopliae*

La formulation entre Suneem 1% et *Metarhizium anisopliae* consiste à mélanger 25 ml de Suneem 1% et 0,50 g de spores de *Metarhizium anisopliae* dans une boîte de pétri contenant le même milieu de culture (riz). Une autre boîte de pétri contenant un milieu de culture (riz) et les spores de *Metarhizium anisopliae* prises seules sert de témoin. Ensuite, nous avons suivi la germination des spores de *Metarhizium anisopliae* dans ces deux boîtes de pétri. Par la suite, nous avons comparé l'aspect et la couleur des spores dans les boîtes de Pétri contenant le mélange et le témoin. Cette expérience est répétée trois fois et la germination des spores a été obtenue au bout de six jours.

II.1.2.3. Traitement des larves de moustiques (genres: *Anopheles*, *Aedes*, *Culex*)

II.1.2.3.1. Traitement avec le Suneem1%

Pour trouver les CL50 et CL90, nous avons utilisé 6 bacs dont 5 traités avec Suneem1% à des concentrations différentes en fonction du temps et un bac servant de témoin. En effet, après avoir récolté les larves de moustiques (*Culex*, *Aedes* et *Anopheles*) nous les avons réparties dans six bacs contenant chacun 100 larves de stade L2/L3 et 5 litres d'eau distillée. Ensuite nous avons ajouté des concentrations croissantes de Suneem 1% avec des doses allant de 1 ml à 5 ml avec une augmentation progressive de 1 ml, ce qui nous permet d'avoir les concentrations suivantes : Bac témoin : 0 ml ; Bac 1: 4 ml ; Bac 2 = 5 ml ; Bac 3 = 6 ml; Bac 4 = 7 ml ; Bac 5 = 8 ml. Ainsi, ces bacs contiennent respectivement 0 g, $4 \cdot 10^{-3}$ g $5 \cdot 10^{-3}$ g, $6 \cdot 10^{-3}$ g, $7 \cdot 10^{-3}$ g et $8 \cdot 10^{-3}$ g d'azadirachtine car 1 litre d'huile de Suneem 1% contient 10g d'azadirachtine qui est la matière active qui tue les larves (figures 32 et 33). Une pincée de poudre de pain est versée dans chaque bac pour la nourriture des larves de moustique pendant la durée du traitement.



Figure 29: Traitement des moustiques avec le Suneem 1%



Figure 30: Bac traité avec le Suneem

II.1.2.3.2. Multiplication des spores de *Metarhizium anisopliae* et Traitement des moustiques avec le même biopesticide

a. Multiplication des spores de *Metarhizium anisopliae*

Le traitement est fait dans des boîtes de pétri de dimensions 9cm x 1cm. Dans chaque boîte, nous avons mis 15 g de riz et 20 ml d'eau distillée. Nous avons prélevé un volume de 0,1 ml d'une solution aqueuse de champignon que nous avons versé ensuite dans chaque boîte de pétri contenant du riz avec une bonne dispersion des spores. Les boîtes de pétri sont déposées sur la paille et recouvertes par des bocaux de dimension 50 cm x 20 cm x 10 cm. Trois jours après, une masse de spores apparaît et le tout est séché à l'air libre pour faire évaporer l'eau et rendre sec le milieu de culture. Par la suite, nous avons raclé le milieu de culture pour obtenir les spores, la masse est broyée et tamisée afin de récupérer le maximum de spores. Nous avons utilisé les spores sèches et le restant à savoir la poudre de spore et les granulats sont conservés dans un bocal en verre pyrex de 250 ml à une température moyenne de 27 °C et à une humidité relative moyenne de 82 %. Pour la détermination de la teneur en spores, nous avons mélangé une quantité de 0,05g de spores sèches dans 4 ml d'eau distillée. Ce mélange est agité plusieurs fois. Avec une pipette thoma, nous avons aspiré la solution jusqu'au niveau 1 correspondant à 0,2 ml. Nous avons ensuite essuyé le bout de la pipette avec du papier humidifié avant de compléter avec de l'eau distillée jusqu'au niveau 11 qui correspond à 1,1 ml. Après avoir agité plusieurs fois, des gouttes sont déposées sur la lame hématimétrique avant de couvrir avec une lamelle. Le comptage des spores de *Metarhizium* est effectué au microscope photonique de marque motic (grossissement : x 400). Dans un rectangle de 20 carreaux nous avons compté le nombre de spores dans 5 carreaux au hasard.

La moyenne est multipliée par 20 pour obtenir le nombre moyen de spores par rectangle, puis par 100 pour avoir le nombre de spores par mm³. Cette opération est effectuée sur 3 lames pour chaque produit. Les valeurs moyennes ont été calculées.

b. Traitement des moustiques avec le même biopesticide

Le traitement proprement dit a pour but de trouver les CL50 et CL90. Ainsi, nous avons utilisé 6 bacs traités avec du *Metarhizium* à des concentrations différentes en fonction du temps et 1 servant de témoin. Après avoir récolté les larves de moustiques, nous les avons réparties dans 6 bacs différents contenant chacun 100 larves de stades 2 et/ou 3 et 5 litres d'eau distillée. Ensuite nous avons appliqué les doses de *Metarhizium anisopliae* suivantes : $7,5 \cdot 10^8$ spores/ml dans le premier bac, $10 \cdot 10^8$ spores/ml dans le deuxième bac, $12,5 \cdot 10^8$ spores/ml dans le troisième bac, $15 \cdot 10^8$ spores/ml dans le quatrième bac et $17,5 \cdot 10^8$ spores/ml dans le cinquième bac. Le bac témoin ne contient que 5 litres d'eau distillée et 100 larves de moustiques. Une pincée de poudre de pain est versée dans chaque bac pour la nourriture.



Figure 31: Bac traité avec le *M. anisopliae*

II.1.2.3.3. Traitement avec le mélange

Le traitement avec le mélange consiste à déterminer des concentrations létales 50 et 90 ainsi que leurs temps létaux. Après avoir récolté les larves de moustiques nous les avons réparties dans 6 bacs différents contenant chacun 100 larves et 5 litres d'eau distillée.

Pour ce traitement nous avons fixé la quantité de Suneem1% et faire varier la quantité de *Metarhizium* qui va de 5.10^8 spores à 14.10^8 spores. Ensuite nous avons appliqué les doses de mélange suivantes : 2 ml + 5.10^8 spores dans le premier bac ; 2ml+ $7,5.10^8$ spores dans le deuxième bac ; 2ml+ 10.10^8 spores dans le troisième bac ; 2ml+ $12,5.10^8$ spores dans le quatrième bac et 2ml+ 14.10^8 spores dans le cinquième bac. Le bac témoin ne contient que 5 litres d'eau de robinet et 100 larves de moustique (tous genres confondus : *Anopheles*, *Aedes*, *Culex*). Une pincée de poudre de pain est versée dans chaque bac pour la nourriture des larves de stades L3.



Figure 32: Bacs de traitement avec le mélange



Figure 33: Bac traité avec le mélange

II.1.2.3.4. Traitement simultané avec les biopesticides

Après avoir récolté les larves de moustiques nous les avons réparties dans 4 bacs contenant chacun 100 larves et 5 litres d'eau distillée. Ensuite, nous avons appliqué les différents biopesticides Suneem1% dans le premier bac, *Metarhizium anisopliae* dans le deuxième bac et le mélange dans le troisième bac à des doses respectives de 4 ml, de $12,5 \cdot 10^8$ spores et de $2\text{ml} + 10 \cdot 10^8$ spores. Le quatrième bac qui est le bac témoin ne contient que 5 L d'eau de robinet et 100 larves de moustiques. Une pincée de poudre de pain est versée dans chaque bac pour la nourriture des larves de stades L3. Les constats sont faits quotidiennement pour déterminer les densités larvaires après traitement avec les produits. Tous ces traitements ont réalisées dans des conditions environnementales de température, de PH et d'humidité d'environ 29° C, 9 et 79%.



Figure 34: Milieu contrôlé de traitement

II.1.3. Méthodologie d'analyse résultats

L'analyse de Bayes a été faite au moyen du logiciel XL STAT 7.5.2 et a été utilisée pour la comparaison des mortalités moyennes obtenues avec les différents biopesticides. La dose létale à 50%, (DL50) de chaque produit a été estimée, après 24 heures de contact des larves de moustiques aux différentes concentrations testées. Ces valeurs ont été déterminées à partir d'une courbe expérimentale donnant les variations de la mortalité en fonction des concentrations croissantes des produits.

Formule de correction de la mortalité

Afin de déterminer les taux de mortalité nous suivrons l'évolution chronologique de la mortalité des larves de moustiques qui sont soumises aux différents produits à différentes concentrations, les observations sont réalisées successivement 24 heures, 48 heures, 72 heures après la mise en contact des larves de moustiques. Une loupe binoculaire a été utilisée pour dénombrer les larves de moustiques mortes. Pour calculer le pourcentage de mortalité (mortalité corrigée) des larves nous avons appliqué la formule d'ABBOT (ABBOT, 1925).

$$(\%)m = 100 * \frac{N_{LM} - N_{LMT}}{N_{LTotal} - N_{LMT}}$$

(%)m= pourcentage de mortalité ; **N_{Lm}**= nombre de larves mortes ; **N_{LmT}**= nombre total de larves mortes dans le témoin ; **N_{Ltotal}**= nombre de larves totales

Les résultats des mortalités sont présentés sous forme de tableau. Les témoins dont les taux de mortalité étaient compris entre 5% et 20% ont été corrigés par la formule d'Abott. Au delà de 20% de mortalité le test a été repris. Les recommandations de l'OMS quant à l'interprétation des résultats sont les suivantes: 98-100% de mortalité : sensible ; 80-97% de mortalité : résistance possible à confirmer ; < 80% de mortalité : résistance probable.

II.1.4. Résultats de traitement avec neem (Suneem 1%).

Les résultats montrent que plus la concentration en neem (Suneem1%) est élevée plus le taux de mortalité augmente. Dans un même bac le pourcentage de mortalité obtenu avec le Suneem1% augmente en fonction du temps. Par contre, au niveau du bac témoin, le taux de mortalité est très faible et est constant au cours du temps. Par ailleurs, les mortalités enregistrées dans les différentes concentrations utilisées sont largement supérieures à celles du témoin. La mortalité des larves de moustiques soumises aux différentes concentrations du suneem1% augmente suivant les périodes d'observation à 24 heures et à 48 heures.(Tableau 9 et figure 34). Avec ces conditions expérimentales, les doses des bacs 3, 4 et 5 ont donné un effet insecticide élevé. En effet elles ont entraîné des taux de mortalité supérieurs à 50% variant entre 65 à 100% après 24 heures de contact. Ainsi, l'analyse de ces résultats a montré une évolution positive bien marquée des taux de mortalité moyens avec l'augmentation de la concentration du neem (Suneem1%) quelle que soit la durée de contact des larves de moustiques avec le Suneem1%. Les doses de 8 ml et de 9 ml ont entraîné les plus forts taux

de mortalité (87 à 93%). Toutefois, toutes les doses testées se sont révélées toxiques aux larves par rapport au témoin qui a entraîné une mortalité de 2% en moyenne. La CL50 la plus marquée est à 0,003g/l d'azadirachtine. Par ailleurs, nous avons constaté que l'application du neem (Suneem) sur les larves de moustiques provoque des malformations, une réduction de la longévité et de la fécondité chez les adultes et leur mort.

Les résultats de ce traitement sont visibles dans le tableau IX et mises en évidence dans la figure 35 ci-dessous.

Tableau IX: Mortalité des larves moustiques en fonction des concentrations du Suneem 1% exprimées en (ml).

Temps (j)	Témoin	Bac 1	Bac 2	Bac 3	Bac 4	Bac 5
J1	2	35%	38%	44%	48%	56%
J2	2	59%	69%	72%	80%	92%
J3	2	75%	88%	93%	100%	100%

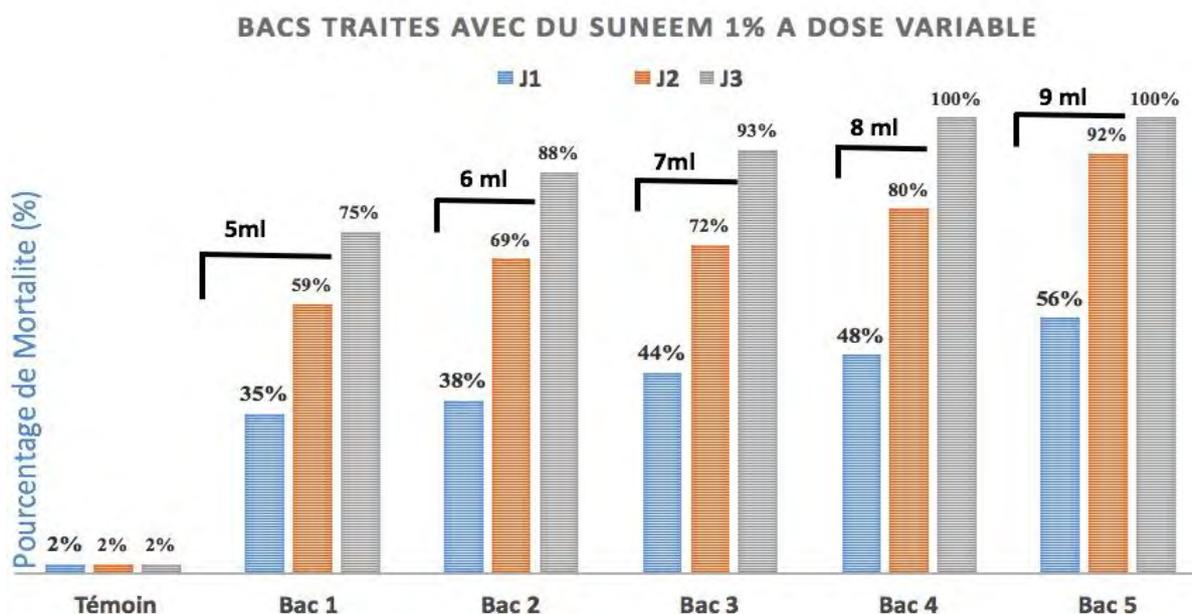


Figure 35: Evolution des taux de mortalité en fonction des concentrations du Suneem1%.

II.1.5. Résultats de traitement avec *Metarhizium anisopliae*

Comme dans le cas du Suneem1%, la mortalité des larves causée par la toxine a varié avec les concentrations appliquées et avec la durée de contact (Tableau 10). Cette tendance des résultats s'est fortement confirmée dans le temps avec la germination des spores sur la cuticule des larves de moustiques. Ces résultats ont révélé qu'après 48 heures de contact, les taux de mortalité sont parfaitement corrélés avec les concentrations. La concentration de 15.10^8 spores/ml a causé une mortalité supérieure à celle obtenue avec les concentrations de $7,5.10^8$ spores/ml qui présente les mêmes résultats que le bac témoin. Cette différence de taux de mortalité est maintenue au-delà de 48 heures. Après 72 heures de traitement des larves, les concentrations supérieures à 15.10^8 spores/ml ont donné des taux moyens de mortalité importants dont le plus faible est de 92%. La DL50 est obtenue au 3^{ème} jour dans le bac4 avec 52,17% de mortalité et la DL90 au 4^{ème} jour dans le bac4 avec 92% de mortalité.

En considérant les effets des concentrations de *Metarhizium anisopliae*, nous pouvons affirmer que le *Metarhizium anisopliae* seul montre plus d'efficacité en fonction du temps. (Tableau X, figure 36).

Tableau X : Mortalité des larves de moustiques en fonction des concentrations du *Metarhizium anisopliae*.

Temps (j)	Témoin	Bac 1	Bac 2	Bac 3	Bac 4	Bac 5
J1	2	2	12%	18%	26%	29%
J2	2	2	15%	24%	47,82%	53%
J3	2	2	24%	39%	52,17%	67%
J4	2	2	36%	46%	92%	98%

BACS TRAITES AVEC DU METARHIZIUM SEUL A DES CONCENTRATIONS VARIABLES

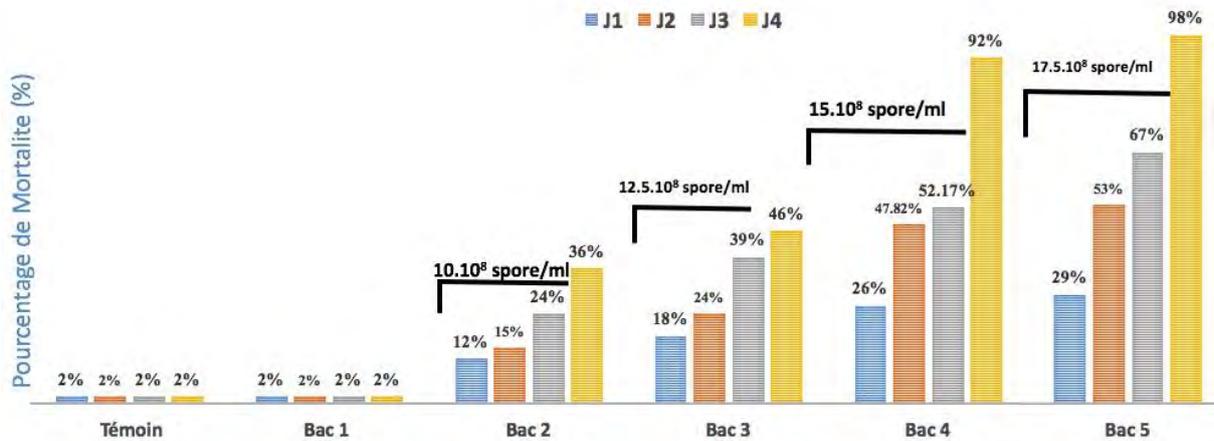


Figure 36: Evolution de la mortalité en fonction des doses du *Metarhizium anisopliae*.

Suivi de la germination du *Metarhizium anisopliae*

Certaines larves tuées par le champignon sont rincées avec de l'eau distillée et mises en incubation dans des boîtes de Pétri contenant un milieu de culture (farine de blé). Les observations sont faites à la loupe binoculaire 24 h et 48 h après. Les photos sont prises en format JPEG avec un appareil numérique. L'appareil a été monté sur la loupe pour prendre des photos



Figure 37: Suivi de la germination du *Metarhizium anisopliae*

II.1.6. Résultats de traitement avec le mélange

L'étude de compatibilité nous permet de dire que le *Metarhizium anisopliae* peut conserver sa toxicité en le mélangeant avec le Suneem 1%. Les résultats montrent que plus la concentration en mélange est élevée plus le taux de mortalité augmente. Dans un même bac le pourcentage de mortalité obtenu avec le mélange augmente en fonction du temps. Par contre, au niveau du bac témoin, le taux de mortalité est très faible et est constant au cours du temps. Par ailleurs, les mortalités enregistrées dans les différentes concentrations utilisées sont largement supérieures à celle du témoin.

La mortalité des larves de moustiques soumis aux différentes concentrations du Mélange augmente suivant les périodes d'observation à 24 heures et à 48 heures. (Tableau 11).

Avec ces conditions expérimentales, les doses des bacs 3, 4 et 5 ont donné un effet insecticide élevé. En effet elles ont entraîné des taux de mortalité supérieurs à 50 % variant entre 65 à 100 % après 24 heures de contact. Ainsi, l'analyse de ces résultats a montré l'évolution positive bien marquée des taux de mortalité moyens avec l'augmentation de la concentration du Mélange quelle que soit la durée de contact des larves de moustiques avec Mélange. Les concentrations allant de (2ml+5.10⁸ spores) ; (2ml+7,5.10⁸ spores) ; (2ml+10.10⁸ spores) ; (2ml+12,5.10⁸ spores) ; (2ml+14.10⁸ spores) ont occasionné les plus forts taux de mortalité (87 à 98%). Toutefois, toutes les doses testées se sont révélées relativement toxiques aux larves par rapport au témoin qui a entraîné une mortalité de 2 %.

Ces résultats de traitement sont consignés dans le tableau XI et analysés dans la figure 38.

Tableau XI : Pourcentage (%) de mortalité des larves de moustiques en fonction des concentrations du mélange Suneem1% et *Metarhizium anisopliae* exprimées en (2ml+X.10⁸ spores).

Temps (j)	Bac Témoin	Bac 1	Bac 2	Bac 3	Bac 4	Bac 5
J1	2	37%	41%	45%	42,17%	59%
J2	2	50%	52%	55%	57,14%	69%
J3	2	78%	83%	87%	95,91%	98

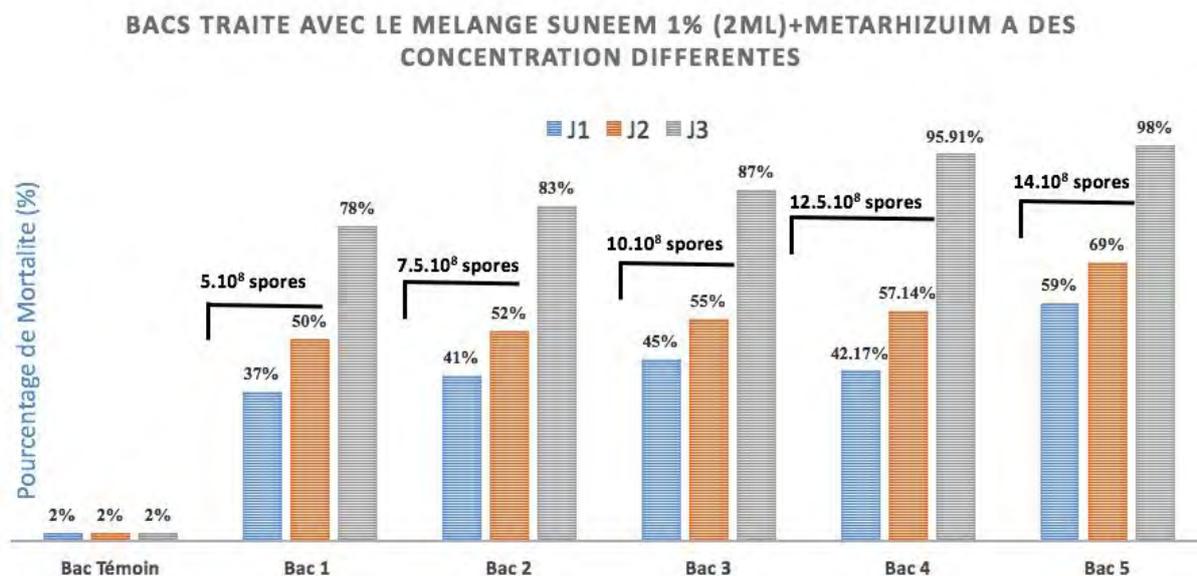


Figure 38: Evolution de la mortalité en fonction de la concentration du mélange

II.1.7. Résultats du traitement sumilatif

L'analyse des résultats de traitement avec la formulation de *Metarhizium anisopliae* et le mélange en milieu semi naturel nous montre que plus la concentration en spores augmente, plus le taux de mortalité larvaire augmente dans les différents bacs. Et que l'augmentation de la mortalité des larves évolue en fonction du temps. Les mortalités enregistrées avec les différentes concentrations utilisées sont largement supérieures à celles du témoin. Ces résultats montrent une nette augmentation des pourcentages de mortalité des larves de

moustique après un traitement au *Metarhizium anisopliae*. Cette augmentation correspond au taux moyen de mortalités qui est supérieur à la DL50 et qui avoisine les 70%. Preuve qu'en milieu naturel, le *Metarhizium anisopliae* est efficace contre les larves de moustique.

Les résultats obtenus avec le Suneem1% sont similaires à ceux obtenus avec le mélange. Par contre, au niveau du bac témoin, le taux de mortalité est très faible et même constant au cours du temps. Par ailleurs, les mortalités enregistrées dans les différentes concentrations utilisées sont largement supérieures à celle du témoin. (Tableaux XII et 13)

Tableau XII : Densités larvaires avant et après traitement avec les produits (Suneem 1%, *Metarhizium anisopliae*, mélange)

Produits	Paramètres	Bac témoin	Bac 1	Bac 2	Bac 3
Suneem 1%	DLAvT	100	100	100	100
	DLApT	100	48		
	TM	0	62		
Métarhizium	DLApT	100		45	
	TM	0		65	
Mélange	DLApT	100			09
	TM	0			91

Légende : B1 : Bac traité avec le suneem 1%, B2 : Bac traité avec le *Metarhizium anisopliae* B3 : Bac traité avec le mélange (Suneem 1% et *Metarhizium anisopliae*). Témoin : Bac témoin

Tableau XIII: Pourcentages de mortalité des larves traitées avec les produits (Suneem 1%, *Metarhizium anisopliae* et Mélange)

produits	Jours	Pourcentage de mortalité			
		Bac témoin	Bac 1	Bac 2	Bac 3
Suneem 1%	J1	2	44		
	J2	2	52		
	J3	2	93		
métarhizium	J1	2		26	
	J2	2		47,82	

	J3	2		52,17	
	J4	4		92	
mélange	J1	2			48,97
	J2	2			57,14
	J3	2			95,91

Légende :

B1 : Bac traité avec le suneem 1%, B2 : Bac traité avec le *Metarhizium anisopliae*

B3 : Bac traité avec le mélange (Suneem 1% et *Metarhizium anisopliae*). Témoin : Bac témoin



Figure 39:Adhésion de spores de *Metarhizium anisopliae* sur la cuticule de larves de *Culex quinquefasciatus* (cas du mélange).

II.1.8. - DISCUSSION

L'utilisation des produits naturels tels que le neem (Suneem 1%), *Metarhizium anisopliae* et le mélange des deux biopesticides dans la lutte contre les larves de moustiques est plus que d'actualité.

L'utilisation d'extrait de graines de neem à une concentration supérieure à 2,5%, peut provoquer un effet fongicide (Rodrigues-Lagunes et al, 1997). Les résultats portant sur l'application du neem (Suneem 1%) contre les larves de moustique confirment les travaux d'Attri et Prasad (1980) qui ont montré l'efficacité de l'huile de neem sur les larves de Culicidae de Scott et Kaushik (2000) sur l'efficacité du Margosan-O® sur les larves de *Culex quinquefasciatus*, de Sèye et al. (2004) et de Ndione et al. (2007) avec l'huile de neem formulée (DL50 à 3 mg/l en 48h). L'efficacité de l'azadirachtine du Suneem utilisé dans nos travaux est similaire à celle de l'azadirachtine du biopesticide utilisé par de Nogueira et al. (1996) traitant les espèces d'hémiptère *Rhodnius proxilus* (Hemiptera : Reduviidae) responsable de la maladie des Chagas : des changements significatifs dans l'organisation des cellules épithéliales de l'estomac et l'intestin, des destructions dans l'aspect normal et régulier des microvillosités,, une désorganisation de la membrane extracellulaire, des couches D'un point de vue efficacité, nos résultats sur le traitement des larves de moustiques avec le suneem1% sont assimilables à ceux de Nogueira et al. (1996). De la même manière des travaux ont été réalisés sur les larves d'orthoptères (criquets). On peut citer les travaux de Nasiruddin et Mordue (1993) qui, traitant les larves de *Schistocerca gregaria* et *Locusta migratoria* par l'azadirachtine, ont montré les pathologies suivantes : des cellules légèrement nécrosées, des cellules hypertrophiées, un tissu conjonctif sous la couche épidermique est devenu élargi avec de nombreux envahisseurs cellules, une bordure en brosse boudée en raison de l'enflure et de la vacuolisation des cellules. Ces résultats histopathologiques décrits par Nasiruddin et Mordue (1993) pourrait expliquer et même confirmer la pathogénicité du Suneem que nous avons décrite dans notre étude malgré que le matériel biologique d'étude ne soit le même. Dans cette étude, nous avons montré que le champignon a infecté les larves et nymphes en émergence à travers la cuticule. Ce qui a été observé dans des 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'hémoplympe et sporuler vers la surface. Mais également, les spores ingérées par les larves peuvent sécréter 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). Nos résultats ont confirmé tout cela. En Australie, Rae (2004) a effectué des traitements sur des larves de *Chortoicetes terminifera* (les criquets d'Australie) avec le Green Guard®, formulé à partir d'une souche de *Metarhizium anisopliae*. Lepage et al., (1992) ont utilisé plusieurs souches de champignons entomopathogènes (*Metarhizium anisopliae*, *Cordyceps militaris* et *Tolypocladium cylindrosporum*) afin de lutter contre quelques diptères piqueurs, Ils ont conclu que parmi toutes les souches testées, *Metarhizium anisopliae* semble être le plus intéressant pour la lutte biologique contre les larves de diptères piqueurs. Saint-Louis et al. (2001) ont confirmé que *Metarhizium anisopliae* est un champignon promoteur pour une lutte biologique de par son efficacité sur tous les stades de développement d'un insecte et peut être un excellent candidat comme mesure alternative aux pesticides de synthèse dans le cadre d'une lutte biologique ou une lutte intégrée. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par Alves et al. (2002) qui ont enregistré un début de mortalité des larves de *Culex quinquefasciatus* traitées par *Metarhizium anisopliae* à partir du 1^{er} jour de traitement.

Les travaux de Ravallec et al (2003) ont démontré que *Metarhizium anisopliae* avait un effet distinct sur les larves d'*Aedes albopictus*. Ces résultats portant sur les applications d'un champignon entomopathogène tel que *Metarhizium anisopliae* sur les larves d'insecte confirment les travaux de Touré (2006) qui ont montré que les spores de *Metarhizium anisopliae* ont entraîné la mortalité du criquet sénégalais avec un TL50 de 4 jours et un TL100 de 7 jours pour une dose de $4,3 \cdot 10^7$ spores/ml. Nos résultats vont dans le même sens que ceux obtenus par Alves et al., (2002) où ils ont enregistré un taux de mortalité 50% des larves de *Culex quinquefasciatus* traitées par *Metarhizium anisopliae* 1037 par le mode de contact après 24h. Nos résultats corroborent ceux obtenus par Alves et al., (2002) qui ont étudié la comparaison de l'effet des deux champignons *Metarhizium anisopliae* 1037 et *Metarhizium anisopliae* E9 sur les larves de *Culex quinquefasciatus*. Ils ont trouvé que la souche *M. anisopliae* 1037 est plus virulente que *M. anisopliae* E9, avec un taux de mortalité de 93,33% après 5 jours de traitement par rapport à un taux de mortalité de 55,55% de *M. anisopliae* E9 après 5 jours. D'après Roberts (1967) ce champignon entomopathogène *M. anisopliae* attaque les larves de moustiques préférentiellement par le siphon respiratoire. C'est pourquoi ce germe tue davantage de moustiques lorsqu'il est appliqué à la surface de l'eau. Mais, en fait si les larves sont mises dans des suspensions conidiennes de fortes

concentrations (10^7 spores/ml) le champignon peut tuer celles-ci avant toute colonisation fongique intrahémocoelienne. Les faits rapportés par cet auteur sont en totale concordance avec nos résultats (Benserradj et Mihoubi, 2014). Des essais au laboratoire réalisés par Daoust et Roberts (1982) pour l'étude de l'effet d'une souche de *Metarhizium sp* sur la mortalité des larves de *Culex pipiens* ont révélé un taux de mortalité de 50% après 3 jours de traitement en utilisant une dose de 1mg de conidies. Contrairement à Ramoska (1982) qui a observé ce taux de mortalité au bout d'un mois. Par ailleurs, Mohamed *et al.*,(1983) ont testé la sensibilité et la résistance de *Culex pipiens* et *Culex quinquefasciatus* au *Metarhizium anisopliae* (Ma 43 et E9) et ont affirmé que tous les stades du moustique sont très sensibles aux deux souches avec un taux de mortalité allant de 86 à 100% aux plus fortes doses, ce qui va dans le sens de nos résultats. Lepage *et al.*,(1992) ont utilisé plusieurs souches de champignons entomopathogènes (*Metarhizium anisopliae*, *Cordyceps militaris* et *Tolypocladium cylindrosporum*) afin de lutter contre quelques diptères piqueurs, Ils ont conclu que de toutes les souches testées, *Metarhizium anisopliae* semble être le plus intéressant pour la lutte microbiologique contre les larves de diptères piqueurs. Dans ce sens Saint-Louis *et al.*,(2001) ont confirmé que *Metarhizium anisopliae* est un champignon promoteur pour une lutte biologique de par son efficacité sur tous les stades de développement d'un insecte et pourrait être un excellent candidat comme mesure alternative aux pesticides de synthèse dans le cadre d'une lutte biologique ou une lutte intégrée. Les travaux de Ravallec *et al* (2003) ont démontré que *Metarhizium anisopliae* avait un effet distinct sur les larves d'*Aedes albopictus*. Ceux-ci ont développé la muscardine verte maladie due à *Metarhizium anisopliae* qui s'est propagé dans tout le corps des larves. En effet, ces mêmes auteurs ont révélé en 2006 que les larves d'*Aedes albopictus* soumises à de fortes doses de *Metarhizium anisopliae* ont montré une mort progressive (100% de mortalité au bout de 20 jours de traitement). Selon eux, si la dose de l'inoculum est assez élevée, les mycotoxines sont libérées dans l'hémocoel de l'insecte et c'est dans le mésantéron que les spores subissent une protéolyse alcaline (une larve de 4^{ème} stade ingère 3.10^5 spores). Effectivement, au fur et à mesure, les larves finissent par perdre leur capacité digestive. L'étude de l'effet de nos deux biopesticides et leur mélange sur la mortalité des larves de *Culex quinquefasciatus*, nous montre que le traitement a mis en évidence une efficacité hautement significative comparée aux témoins et les larves sont sensibles à ces biopesticides et leur mélange malgré leur effet différent. Après correction des pourcentages des mortalités obtenues après traitement des larves par les biopesticides, nous avons aussi calculé les DL50, les TL50 les DL90, les TL90. Nos résultats ont abouti à une

DL50 obtenue après 24 heures(TL50) de traitement et à une DL 90 obtenue 72 heures après traitement (TL90) avec le Suneem1% dans les conditions naturelles.La DL 50 a été obtenue après 48 heures(TL50) de traitement et la DL 90 obtenue après 96 heures(TL90) de traitement avec le *Metarhizium anisopliae* dans les conditions naturelles et enfin la DL 50 a été obtenue après 24 heures(TL50) de traitement et la DL 90 a été obtenue après 72 heures(TL90) de traitement avec le mélange dans les conditions naturelles. Les DL50 de ces biopesticides, enregistrés par les différents auteurs sont de $1,09.10^5$ spores/ml sur les larves de *Aedes albopictus* (Hazrat *et al.*, 2012) après 3 jours d'application. et 8ppm pour les larves de *Aedes triseriatus* (Lepage *et al.*, 1992). Quant aux larves de *Culex quinquefasciatus*, les DL50 obtenues étaient respectivement $1,97.10^4$ spores/ml pour la souche M. anisopliae 1037 et $3,01.10^5$ spores/ml pour M. anisopliae E9 (Alves *et al.*, 2002). Concernant les TL50, notre étude montre qu'ils sont proportionnels aux doses appliquées. Nos résultats corroborent ceux obtenus par Alves *et al.*,(2002).Ces auteurs ont constaté que les LT50 différaient selon les doses appliquées et les méthodes d'application : un TL50 de 1 jour quand ils avaient appliqué des conidies de *Metarhizium anisopliae* à la surface de l'eau et TL50 de 3,6 jours après traitement avec la même souche sous forme de spores sèches. Les résultats de l'effet larvicide des biopesticides (Suneem1%, *Metarhizium anisopliae* et leur mélange) que nous avons obtenus sont en corrélation avec ceux observés par plusieurs auteurs (Alves *et al.*, 2002; Scholte *et al.*, 2005; Amora *et al.*, 2010) et permettent de conclure que les biopesticides testés ont une action pathogène sur les larves de *Culex quinquefasciatus*. Malgré les résultats positifs obtenus, cette étude comporte certaines limites. Une bonne efficacité des biopesticides contre les larves de moustiques du genre *Culex quinquefasciatus* en milieu contrôlé et en milieu naturel est constatée, toutefois la durée de l'efficacité résiduelle obtenue en station expérimentale reste à confirmer en milieu naturel. Le phénomène de résistance aux insecticides qu'a développé *Culex quinquefasciatus* a suscité la recherche d'une autre solution pour combattre ces insectes nuisibles et vecteurs de maladies. Selon Failoux et Rodhain (1999), ce phénomène est apparu en 1990 en régions tempérées. *Culex pipiens* connue comme étant une espèce vectrice de filarioses et d'encéphalites a développé plusieurs types de résistance vis-à-vis des organo-phosphorés. Cette résistance est un phénomène dû à une forte production d'une protéine appelée estérase B protéine (à plus de 10% des protéines totales) et plus de 10 gènes sont impliqués dans sa production et donc dans la résistance aux organo-phosphorés (Chevillon, 1994). Corosmans *et al.*,(1992) ont proposé un programme de lutte intégrée contre *Anopheles gambiae* dans une région rizicole au Burundi qui comprend dans

son programme: un assainissement, l'emploi de moustiquaires imprégnés de deltamétrine ainsi que des traitements intra domiciliaires. Ces auteurs avaient montré que cette méthode avait réduit la prévalence palustre mais n'avait en aucun cas réduit la densité ni la charge des populations parasitaires cibles. Par ailleurs les travaux de Berchi (2000) sur le Malathion testé au laboratoire sur six populations de *Culex pipiens* des gîtes épigés et hypogés ont révélé que ces dernières étaient résistantes à ce produit. Dans nos études nous avons montré que Suneem1% est compatible avec le *Metarhizium anisopliae* et en formulation ils constituent un biopesticide efficace contre les larves de *Culex quinquefasciatus*. Cependant des études allant dans le sens de la compatibilité entre le neem (Suneem1%) et *Metarhizium anisopliae* ont été effectuées par certains auteurs qui trouvent une faible efficacité de la combinaison d'huile avec les champignons (Bajan et al., 1998, Hirose et al., 2001; Depieri et al, 2005) par contre Visalakshy et al., 2006, Rodrigues-Lagunes et al., 1997. Cette faible efficacité du mélange huile de neem et champignons décrite par ces auteurs pré-cités pourrait être expliqué par une non maîtrise du paramètre « température » de traitement. Cependant les travaux de Seye et Ndiaye 2008 qui ont trouvé une efficacité importante viennent confirmer et étayer les nôtres. 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, Sahayraj et al. (2011) ont montré l'importance de la compatibilité entre les champignons et les insecticides à base d'extraits de plantes. Notre étude s'inscrit en droite ligne avec ces différents articles publiés. En effet, les résultats de notre étude nous ont permis de noter une diminution considérable avoisinant les 50%, les 70% et 95% pour respectivement les traitements avec *Metarhizium anisopliae*, Suneem1% et le mélange des deux. Ces résultats confirment et même complètent les travaux des auteurs cités précédemment. L'adoption de cette méthode innovante de mélange de biopesticides efficaces créant ainsi un effet synergique dans la lutte contre les larves de moustique présente plusieurs avantages notamment, à une diminution des larves de moustiques d'une part et les maladies liées et d'autre part préserver un écosystème déjà fragile. En effet, nos gîtes naturels de traitement ont montré des valeurs moyennes de température, de PH et d'humidité relative respectivement de l'ordre de 30°C, de 10 et de 60%. Les travaux de Blanford & Klass (2004) ont conclu que des températures inférieures à 38 °C durant la journée et supérieures à 20 °C durant la nuit sont considérées comme favorables dans la lutte contre les moustiques. En plus du facteur stimulant qu'est les conditions physicochimiques des gîtes naturels, le facteur temps ou durée de traitement apparaît comme déterminant dans les résultats. Le séjour des larves dans la zone

traitée pendant au moins 48 h, entraîne une meilleure efficacité au traitement. La mortalité et le taux de sporulation après 6h et 24 h d'exposition sont inférieurs à ceux après une exposition de 48 h. En effet nous avons remarqué que le taux de mortalité des larves témoins utilisées pour les trois tests était presque nuls (2%). Ces mêmes résultats ont été constatés par Alves et al. (2002), ils n'ont enregistré aucune mortalité des larves témoins durant la période des biosessais. En effet, les DL50 obtenues ont montré que le *Metarhizium anisopliae* a donné la dose létale la plus faible dans le bac 2 à 72heures ($15 \cdot 10^8$ spores/ml) alors que les biopesticides les plus toxiques dont les DL50 atteintes à 72heures sont respectivement pour le Suneem1% 75% dans le bac1 avec une concentration de 4 ml, et pour le mélange (Suneem1% et *Metarhizium anisopliae*) 78% dans le bac3 avec une concentration de ($2\text{ml}+10 \cdot 10^8$ spores/ml). Ces doses sont fortes pour tuer plus de 90 % des larves de *Culex quinquefasciatus* au bout de 3 jours. D'après les résultats, nous avons remarqué que la mortalité de 50 % des larves traitées avec le mélange est plus rapide et intense par rapport à la mortalité des larves traitées avec suneem1% et *Metarhizium anisopliae*. La mortalité de 90 % des larves a été atteinte au 3^{ème} jour pour mélange et le Suneem 1%, au 4^{ème} jour pour le *Metarhizium anisopliae*.

II.1.9. - Conclusion et perspectives

II.1.9. 1. Conclusion

A l'issue de nos travaux dans le milieu contrôlé (semi naturel) nous pouvons retenir que :
Le Suneem1% employé seul est plus efficace dans la lutte contre les larves de moustiques que le *Metarhizium anisopliae* employé seul. Cependant ce dernier est aussi efficace dans la lutte contre les larves de moustique. Les deux produits sont compatibles en association. Le mélange (Suneem1% et *Metarhizium anisopliae*) est plus efficace que les deux biopesticides pris isolément dans la lutte contre les larves de moustique. Il a causé le plus fort taux de mortalité des larves de moustique (95,91%). Les résultats soutiennent l'hypothèse que les biopesticides testés étaient pathogènes pour les larves de moustiques et ont provoqué une réduction importante de la population larvaire dans les bacs lorsqu'ils sont appliqués comme formulation en poudre et huileuse à travers la méthode utilisée lors des travaux. La recherche sur l'utilisation des biopesticides comme agents de lutte biologique contre les larves de moustiques montrent qu'ils ont le potentiel d'être utilisés pour lutter contre les larves de moustique du genre *Culex*, *Aedes*, *Anophèles*. Bien que les biopesticides ont montré un potentiel pour contrôler les larves de moustiques, leur efficacité dépend de leur capacité à

infecter dans des conditions environnementales. Ils devraient être relativement sûrs et non-toxiques pour les organismes non cibles.

II.1.9. 2. Perspectives

A l'issue de nos travaux, un certain nombre d'axes de recherche nous paraissent très importants à investir :

- L'étude du mode d'action du neem (Suneem1%) sur les tissus des larves de moustique,
- L'étude du mode d'action du champignon *Metarhizium anisopliae* sur la cuticule et sur le tube digestif des larves de moustique traitées,
- L'étude de l'effet du mélange entre le neem (Suneem1%) et le champignon *Metarhizium anisopliae* sur le tube digestif des larves de moustiques traitées.

CHAPITRE III: TRAITEMENT DES LARVES EN MILIEU NATUREL

Introduction

En Afrique tropicale, le paludisme reste l'une des causes majeures de morbidité et de mortalité. La principale orientation stratégique pour lutter efficacement contre cette maladie consiste à combiner des mesures préventives et curatives. Les mesures préventives intègrent à la fois le contrôle des vecteurs et la chimioprophylaxie. La lutte contre les larves de moustiques a pour objectif la suppression ou, à défaut, la réduction des populations larvaires en vue de diminuer, ou de supprimer les maladies transmises telles que la fièvre-jaune, la dengue, le paludisme. En Afrique, les principales mesures de lutte anti-larvaires mises en œuvre ont pour cible les larves de moustique par des traitements à petite, moyenne et grande échelles de biopesticides. Ces mesures de lutte ont contribué à la baisse de la population larvaire de telle sorte que dans certaines zones la préélimination des maladies est envisagée. La lutte antilarvaire par la formulation de biopesticides est l'une des stratégies utilisées par des chercheurs lorsque les gîtes larvaires sont peu nombreux, bien définis et très accessibles. Cette stratégie peut être particulièrement importante dans les zones de traitement. Les essais à grande échelle réalisés dans des zones où les conditions éco-épidémiologiques sont convenables montrent que la lutte contre les larves de moustiques peut contribuer à contrôler efficacement les moustiques qui causent des nuisances (bourdonnement et piqûre). Dans certaines zones urbaines tropicales, les conditions socio-économiques et environnementales augmentent la transmission de la maladie qui devient un problème majeur de santé publique. Au Sénégal, la banlieue de Dakar, de Kaffrine et de Goudiry sont confrontées à de sérieux problèmes environnementaux liés à la présence d'habitats spontanés et irréguliers dans des bas-fonds inondables. Cela entraîne des inondations dès l'arrivée des pluies, favorisant ainsi la présence des gîtes de développement des populations larvaires des moustiques, en particulier des vecteurs du paludisme, pouvant être à l'origine d'une transmission presque permanente. À Dakar, l'utilisation de moustiquaires imprégnées d'insecticides demeure la principale stratégie de lutte antivectorielle. Les résultats enregistrés dans la lutte contre les larves de moustiques pourraient être améliorés si le mélange des biopesticides considéré comme une stratégie de contrôle supplémentaire était mise en œuvre dans cette zone de forte densité de vecteurs. La mise en œuvre d'une formulation (mélange) soulève cependant un certain nombre d'interrogations sur la faisabilité et les produits à utiliser. C'est dans cette perspective que nos travaux ont été conduits avec pour objectif global d'évaluer en station expérimentale (conditions semi-naturelles : cf chapitre II) et dans des gîtes larvaires (conditions naturelles) l'efficacité des deux biopesticides et de leur mélange (Suneem1%,

Metarhizium anisopliae et mélange) pour le contrôle des populations larvaires de moustiques dans les gîtes de la banlieue de Dakar, de Kaffrine et de Goudiry.

En raison des résistances qui commencent à se développer (Ndiaye 2009 ; Ndione *et al.*, 2014) mais aussi d'une diminution progressive de l'efficacité des biopesticides pris isolément (neem 'suneem) seul ou *Metarhizium* seul), les chercheurs s'orientent maintenant vers des formulations (mélange) comme le neem (*Azadirachta indica*) et les champignons (*Aspergillus clavatus* et *Metarhizium anisopliae*) par de traitement à grande échelle (sur le terrain). Par conséquent, un objectif supplémentaire de cette étude était d'évaluer l'effet des conditions physicochimiques sur les biopesticides utilisés en milieu naturel, ce qui pourrait influencer la capacité et efficacité des biopesticides comme agents de lutte biologique. Pris en association, ces biopesticides ont montré une efficacité meilleure sur les larves de moustique. C'est dans cette optique que nous nous sommes intéressé après des tests en milieu semi naturel à l'étude dans un milieu naturel d'un effet synergique entre le Suneem 1% (*Azadirachta indica*) et un champignon entomopathogène (*Metarhizium anisopliae*) sur les larves de moustique des genres *Culex*, *Aedes*, *Anophèles*. Et pour cela nous allons :

- Montrer les effets larvicides du Suneem1% sur les larves de moustique notamment de *Culex*, *Aedes*, *Anophèles* ;
- Caractériser les effets larvicides du champignon entomopathogène *Metarhizium anisopliae* sur les larves de moustique de *Culex*, *Aedes*, *Anophèles* ;
- Déterminer les effets synergiques du neem (Suneem1%) (*Azadirachta indica*) et du champignon entomopathogène (*Metarhizium anisopliae*) sur les larves de moustique de *Culex*, *Aedes*, *Anophèles*.

III.1. Présentation du milieu d'étude

III.1.1. Situation géographique

Les zones d'investigations se situent la région de Dakar à l'ouest, la région de Kaffrine au centre et la région de Tambacounda à l'est. Elles sont soumises à des contrastes climatiques élevées, passant de d'un climat sahélien (région de dakar) à un climat soudano-sahélien, avec des nuances géologiques remarquables. Le département de Pikine se trouvant dans la région de Dakar est limité au nord par l'océan atlantique à l'est par le département de Rufisque, à l'ouest par le département de Dakar et au sud par le département de Guédiawaye. Il s'étend sur 87 km² avec une population estimée à 1 170 791 habitants. Le département de Pikine compte plusieurs communes que sont : Dalifort, Djidah Thiaroye Kaw, Guinaw Rail Nord, Guinaw Rail Sud, Pikine Est, Pikine Nord, Pikine Ouest, Keur Massar, Malika, Yeumbeul Nord, Yeumbeul Sud, Tivaoune Diacksao, Diamaguene Sicap Mbao, Mbao, Thiaroye Sur Mer et Thiaroye Gare. Le département de Kaffrine se trouvant dans la région de Kaffrine est limité par trois départements : Birkelane à l'ouest, Malem Hodar à l'est, Mbacké au nord et au sud par la Gambie avec une population estimant à 28396 habitants. Le département de Goudiry, situé dans la région de Tambacounda, a été créé en 2008, il est limité par trois départements au Nord par Matam au Sud et à l'Ouest par Tamba, à l'est par Bakel. Il se situe dans l'extrême Sud - Est du pays, dans la région historique du Boundou et à 115 km de Tambacounda. Le département de Goudiry polarise un vaste territoire (17100 km²) et abrite une population estimée à plus de 89208 habitants dont 43645 hommes et 45563 femmes. De par leurs positions dans le pays, les départements d'étude sont sous l'influence de certains des facteurs qui caractérisent la géographie du Sénégal (topographie, géologie, climatologie). Sur les cartes des températures, on constate que le tracé des isothermes est souvent étroitement lié à l'altitude. Elle décroît environ de 0,5 à 0,6 °C à chaque fois que l'on s'élève de 100 m en altitude (on parle de gradient thermique vertical).

➤ L'altitude agit directement sur la constitution des sols, la pluviosité, la température et la végétation en corollaire et sur la répartition des espèces animales.

➤ Au Sénégal, les larves de moustique se développent dans les bassins, mares, bas-fonds, trous creusés par les maraîchers. Ces sites assurent, chacun un rôle de réservoir (Izri, 1994).

➤ La répartition spatiale des pluies montre qu'elles sont caractérisées par un gradient latitudinal décroissant du littoral vers l'intérieur, altéré par l'effet du relief jusqu'à la raréfaction des précipitations dans le département de Pikine. L'humidité relative est également favorable au développement des larves de moustique. Les cycles humides peuvent résulter de

précipitations in situ ou d'orage à distance alimentant les gîtes en larves de moustique de tous genres *Culex Aedes* et *Anopheles*.

➤ La température ayant un rôle prépondérant n'est assurée que pendant la saison chaude qui correspond à l'activité des vecteurs. Les températures estivales augmentent et sont supérieures à 23 - 32°C.

➤ La végétation, avec la pluie, est la première à accuser un développement fulgurant. Ainsi, les œufs de moustiques éclosent en quelques jours et les larves obtenues grandissent rapidement.

III.1.2. Description des sites et des gîtes d'échantillonnage

Les essais ont été réalisés au Sénégal dans les localités de Pikine, ville située à l'Ouest du pays dans la région de Dakar avec des coordonnées géographiques (14° 45' N et 17° 24" W) et une altitude de 15m par rapport à Kaffrine. Cette dernière est une ville située au centre-ouest c'est à dire à 257 km de Dakar par la route nationale N°1 avec des coordonnées géographiques (14° 06' 05,1° N et 15" 32' 35,5" W) et une altitude de 15m par rapport à Goudiry. Goudiry est une ville à l'Est du pays qui est à 570 km de Dakar par la route nationale N°1 avec des coordonnées géographiques (14° 11' N/ 12° 43' W) et une altitude de 57m. La géomorphologie des sites est encore intacte et la végétation naturelle y est développée de façon typique pour les larves de moustique avec une strate buissonnante dominée par *Euphorbia balsamifera* (Euphorbiaceae) et *Calotropis procera* (Asclepiadaceae).

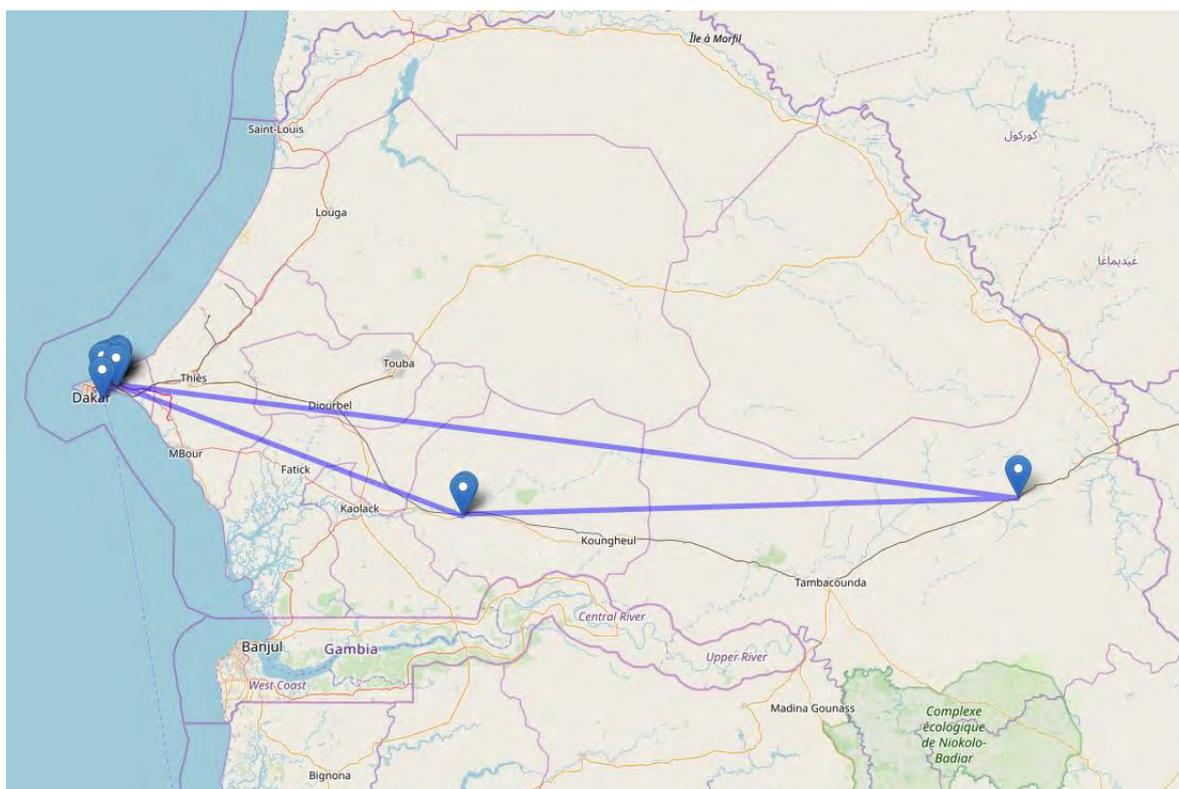


Figure 40: Localisation des zones d'étude

III.1. 3. Les différents sites de traitement (gîtes larvaires) et leurs paramètres géographiques

Cette étude porte sur un échantillon de 14 sites contenant des gîtes constitués de bassins, de marais et de vallées choisis selon différents critères : l'abondance relative en larves de moustiques, l'accessibilité, la pérennité et le non-traitement par les insecticides. Ces gîtes sont structurés en gîtes permanents positifs avec végétation et en gîtes permanents positifs sans végétation. Un total de 200 larves de moustique ont été testées dans chacun des trois répétitions. Les gîtes des sites de test avec les larves de moustique ont été placés dans des conditions physico-chimiques à 32°C et 80 à 100% d'humidité relative durant tout le temps de traitement. Les gîtes ont été examinés quotidiennement et la mortalité des larves de moustique dans chaque gîte a été enregistrée toutes les 24 heures durant tout temps des travaux de traitement.

III.1. 4. Les conditions physico-chimiques des différents sites de traitement

L'étude entomologique avant traitement a permis de sélectionner 14 sites possédant chacun des gîtes permanents de larves de moustique durant la période de cette étude. Elle a aussi apporté pour chaque site des informations sur les espèces culicidiennes présentes, la densité

des populations de moustiques et les types de gîtes larvaires des moustiques. Des gîtes larvaires permanents, semi-permanents et temporaires ont été localisés au niveau des départements de Pikine, Kaffrine et Goudiry. La forte densité de larves de moustique sur les sites est probablement due au fait que la prospection larvaire et le traitement ont été faits en pleine saison pluies (février), une période caractérisée par un nombre élevé de gîtes, des conditions climatiques favorables et un développement des moustiques. Cinquante six gîtes (56) au total ont été choisis sur les 14 sites en fonction de la présence de gîtes larvaires potentiels permanents ou semi-permanents (mares, bas-fonds, trous creusés par les maraîchers, bassins). Les gîtes témoins ont été choisis sur la base du protocole de l’OMS. Les gîtes traités étaient distants des témoins d’environ 100 m.

Le site de keur Mbaye FALL

Ce site est situé dans le département de Pikine, il est caractérisé par les paramètres physicochimiques consignés dans le tableau XIV et par les paramètres géographiques présentés dans le tableau XV.



Figure 41: Gîtes de bassin Keur Mbaye Fall avec végétation (A) et sans végétation (B)

Tableau XIV: Paramètres physico-chimiques des gîtes de Keur Mbaye Fall**Gites (G) (KEUR MBAYE FALL)**

Paramètres	Gîte Témoin			G1			G2			G3		
	T	pH	HU	T	pH	HU	T	pH	HU	T	pH	HU
Gîtes sans végétation	31,2	11,5	66%	30,1	9,7	74%	30,9	9,5	61%	31,4	9,8	65%
Gîtes avec végétation	30,5	12,4	70%	29,5	10	85%	30,2	11,5	68%	30,5	10,5	72%

Légende : G1: gîte 1 ;G2: gîte 2 ; G3 : gîte 3 ; T : température ; H : humidité

Le tableau XIV nous montre que la température, le pH et de l'humidité relative du site de Keur Mbaye FALL varient dans le temps. La température ambiante qui règne dans ce site tourne autour de 31,1°C en moyenne aussi bien pour le gîte sans végétation que pour le gîte avec végétation. On note un pH d'environ 11,10 en moyenne plus ou moins basique pour les gîtes avec végétation et sans végétation. L'humidité relative présente une valeur d'environ 76,12%, en moyenne aussi bien pour les deux gîtes avec végétation ou sans végétation.

Tableau XV: Paramètres géographiques des gîtes de Keur MBAYE FALL**Site KEUR MBAYE FALL**

	Gîte Témoin	G1	G2	G3
Latitude	14°44'31''N	14°45'41''N	14°45'32''N	14°46'04''N
Longitude	17°23'53''W	17°21'25''W	17°23'53''W	17°22'32''W
Altitude	19 m	19 m	14 m	19 m

Ce site se situe globalement entre la latitude 14°44'31''N et 14°46'04''N et une longitude comprise entre 17°23'53''W et 17°22'32''W avec une altitude de 19 m. Ainsi, la température ambiante moyenne est de 29° C, le PH moyen 9 et l'humidité moyenne 79% (Tableau XIV).

Le site de Mbao Baobab

Ce site est situé dans le département de Pikine, il est caractérisé par les paramètres physicochimiques consignés dans le tableau XVI et par les paramètres géographiques présentés dans le tableau XVII.

Tableau 1VI : Paramètres physico-chimiques des gîtes de traitement de Mbaob Baobab

Paramètres	Gîtes (G)											
	Gîte Témoin			G1			G2			G3		
	T	pH	HU	T	pH	HU	T	pH	HU	T	pH	HU
Gîtes sans végétation	31,4	9,6	72%	30,3	10,5	71%	32	10	72%	31	9,7	65%
Gîtes avec végétation	30,6	12,4	80%	29,2	11,8	78%	30,8	12,4	82%	29,9	11,6	89%

Légende : G1: gîte 1 ;G2: gîte 2 ; G3 : gîte 3 ;T : température ; H : humidité



Figure 42: Gîtes de bassin Mbaob Baobab avec végétation (A) sans végétation(B)

Le tableau XVI nous montre une variation de la température, de pH et de l'humidité relative du site de Mbaob Baobab. La température ambiante qui régnait dans ce site tourne autour de 31,17 en moyenne aussi bien pour le gîte sans végétation que pour le gîte avec végétation. On note un pH d'environ 9,95 en moyenne plus ou moins basique pour les gîtes avec végétation et sans végétation. L'humidité relative présente une valeur d'environ 70 %, en moyenne aussi bien pour les deux gîtes avec végétation ou sans végétation.



Figure 43: Gîtes de bassin Keur Massar U 3 avec végétation (A) et sans végétation(B)

Tableau XVII : Paramètres géographiques des gîtes de Mbaobab

Gîtes (G)				
	Gîte Témoin	G1	G2	G3
Latitude	14°45'41''N	14°45'41''N	14°45'32''N	14°46'04''N
Longitude	17°23'53''W	17°21'25''W	17°23'53''W	17°22'32''W
Altitude	19 m	19 m	14 m	19 m

Ce site se situe globalement entre les latitudes 14°45'32''N et 14°46'04''N et une longitude comprise entre 17°23'53''W et 17°22'32''W avec une altitude de 19m.

Le site de Keur Massar Unité 03

Ce site est situé dans le département de Pikine, il est caractérisé par les paramètres physicochimiques consignés dans le tableau XVIII et par les paramètres géographiques présentés dans le tableau XIX.

Tableau XVIII : Paramètres physico-chimiques des gîtes de Keur Massar U3.

Gîtes (G)												
Paramètres	Gîte Témoin			G1			G2			G3		
	T	pH	HU	T	pH	HU	T	pH	HU	T	pH	HU
Gîtes sans végétation	31,9	9,8	53%	31,6	10,6	56%	31,8	10,4	66%	32	10,5	52%
Gîtes avec végétation	30,3	10,5	66%	36,2	12,5	72%	30	12,4	74%	30,9	11,9	71%

Le tableau XVIII nous montre une variation de la température, de PH et de l'humidité relative du site de Keur Massar U3. La température ambiante qui règne dans ce site tourne autour de 31,82 en moyenne aussi bien pour le gîte sans végétation que pour le gîte avec végétation. On note un PH d'environ 10,32 en moyenne plus ou moins basique pour les gîtes avec végétation et sans végétation. L'humidité relative présente une valeur d'environ 56,75 %, en moyenne aussi bien pour les deux gîtes avec végétation ou sans végétation.

Tableau XIX: Paramètres géographiques des gîtes de Keur Massar U3

Gites (G)				
	Gite Témoin	G1	G2	G3
Latitude	14°45'41''N	14°45'41''N	14°45'32''N	14°46'04''N
Longitude	17°23'53''W	17°21'25''W	17°23'53''W	17°22'32''W
Altitude	19 m	19 m	14 m	19 m

Ce site se situe globalement entre les latitudes 14°45'41''N et 14°46'04''N et une longitude comprise entre 17°23'53''W et 17°22'32''W avec une altitude de 19m.

Le site de SANTE YALLA 2 K M

Ce site est situé dans le département de Pikine, il est caractérisé par les paramètres physicochimiques consignés dans le tableau XX et par les paramètres géographiques présentés dans le tableau XXI.



Figure 44: Gîtes bassin Sante Yalla 2 avec végétation(A) et sans végétation(B)

Tableau XX : Paramètres physico-chimiques des gîtes de Sante Yalla 2

Paramètres	Gites (G) (SANTE YALLA 2 K M)											
	Gite Témoin			G1			G2			G3		
	T	pH	HU	T	pH	HU	T	pH	HU	T	pH	HU
Gîtes sans végétation	32,4	9,6	72%	31,3	10,5	71%	31	10	72%	32,3	9,7	65%
Gîtes avec végétation	31,5	11,3	80%	30,2	12,4	79%	29,3	11,8	82%	31	12,6	78%

Légende : G1: gîte 1 ;G2: gîte 2 ; G3 : gîte 3 ;T : température ; H : humidité

Le tableau XX nous montre une variation de la température, de PH et de l'humidité relative du site de Sante Yalla 2. La température ambiante qui régnait dans ce site tourne autour de 32,75 en moyenne aussi bien pour le gîte sans végétation que pour le gîte avec végétation. On note un PH d'environ 9,95 en moyenne plus ou moins basique pour les gîtes avec végétation et sans végétation. L'humidité relative présente une valeur d'environ 70 %, en moyenne aussi bien pour les deux gîtes avec végétation ou sans végétation.

Tableau XXI : Paramètres géographiques des gîtes de Sante Yalla 2 KM
SANTE YALLA 2 K M

	Gîte Témoin	G1	G2	G3
Latitude	14°45'41''N	14°45'41''N	14°45'32''N	14°46'04''N
Longitude	17°23'53''W	17°21'25''W	17°23'53''W	17°22'32''W
Altitude	19 m	19 m	14 m	19 m

Ce site se situe globalement entre les latitudes 14°45'41''N et 14°46'04''N et une longitude comprise entre 17°23'53''W et 17°22'32''W avec une altitude de 19m.

Le site de KEUR MASSAR MARCHE

Ce site est situé dans le département de Pikine, il est caractérisé par les paramètres physicochimiques consignés dans le tableau XXII et par les paramètres géographiques présentés dans le tableau XXIII.

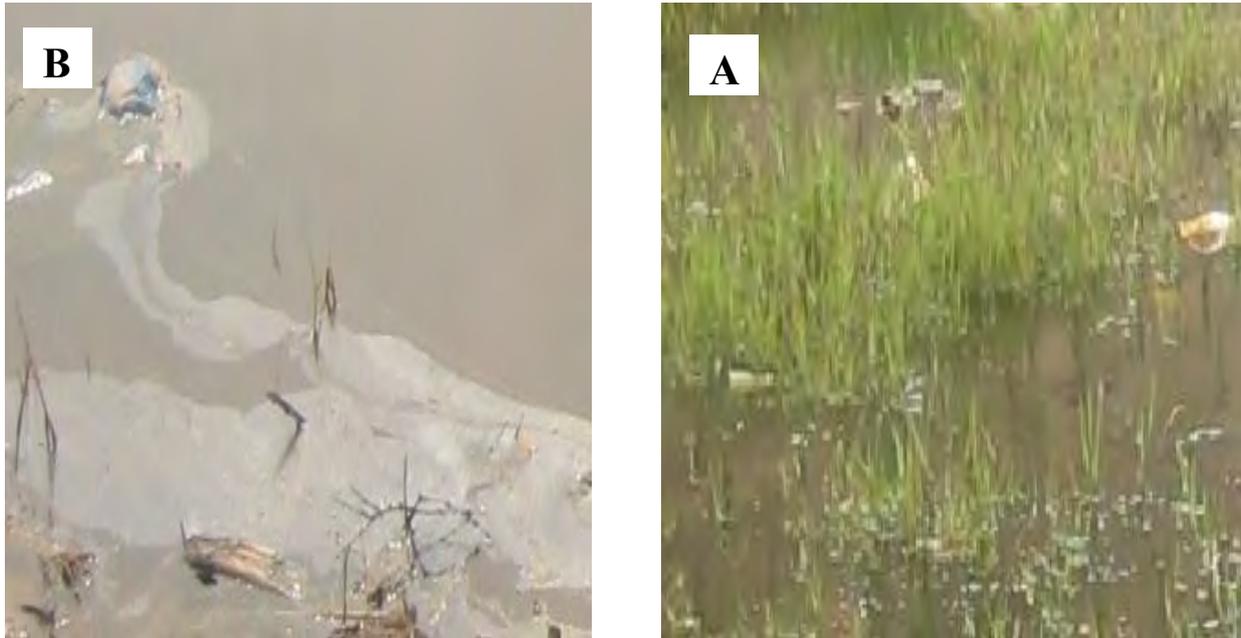


Figure 45: Gîtes bassin Keur Massar Marché avec végétation(A) et sans végétation(B)

Tableau XXII: Paramètres physico-chimiques des gîtes de Keur Massar Marché

Gîtes (G) (KEUR MASSAR MARCHE)

Paramètres	Gîte Témoin			G1			G2			G3		
	T	pH	HU	T	pH	HU	T	pH	HU	T	pH	HU
Gîtes sans végétation	31,7	9,6	72%	32,3	10,5	71%	31,4	10	72%	32	9,7	65%
Gîtes avec végétation	30,5	10,4	86%	30,5	12,8	78%	30	11,2	75%	30,8	11,4	72%

Légende : G1: gîte 1 ;G2: gîte 2 ; G3 : gîte 3 ;T : température ; H : humidité

Le tableau XXII nous montre une variation de la température, de PH et de l'humidité relative du site de Keur Massar Marché. La température ambiante qui régné dans ce site tourne autour de 31,85 en moyenne aussi bien pour le gîte sans végétation que pour le gîte avec végétation.

Nous notons un PH d'environ 9,95 en moyenne plus ou moins basique pour les gîtes avec végétation et sans végétation. L'humidité relative présente une valeur d'environ 70 %, en moyenne aussi bien pour les deux gîtes avec végétation ou sans végétation.

Tableau XXIII 2: Paramètres géographiques des gîtes de Keur Massar Marché

KEUR MASSAR MARCHÉ				
	Gîte Témoin	G1	G2	G3
Latitude	14°45'32''N	14°45'41''N	14°45'32''N	14°46'04''N
Longitude	17°23'53''W	17°21'25''W	17°23'53''W	17°22'32''W
Altitude	19 m	19 m	14 m	19 m

Ce site se situe globalement entre les latitudes 14°45'32''N et 14°46'04''N et une longitude comprise entre 17°23'53''W et 17°22'32''W avec une altitude de 19m.

Le site de KEUR MASSAR LYCEE

Ce site est situé dans le département de Pikine, il est caractérisé par les paramètres physicochimiques consignés dans le tableau XXIV et par les paramètres géographiques présentés dans le tableau XXV.



Figure 46: Gîtes bassin Keur Massar lycée avec végétation(A) et sans végétation(B).

Tableau XXIV : Paramètres physico-chimiques des gîtes de Keur Massar Lycée

Paramètres	Gîtes (G) (KEUR MASSAR LYCEE)											
	Gite Témoin			G1			G2			G3		
	T	pH	HU	T	pH	HU	T	pH	HU	T	pH	HU
Gîtes sans végétation	30,2	10,5	60%	31,1	9,5	70%	31,5	9,3	65%	30,4	9,2	63%
Gîtes avec végétation	29,1	12,5	66%	30,4	11,8	72%	30,3	10,9	72%	29,8	11,6	70%

Légende : G1: gîte 1 ;G2: gîte 2 ; G3 : gîte 3 ;T : température ; H : humidité

Le tableau XXIV nous montre une variation de la température, du pH et de l'humidité relative du site de Keur Massar Lycée. La température ambiante qui règne dans ce site tourne autour de 30,8 en moyenne aussi bien pour le gîte sans végétation que pour le gîte avec végétation. On note un PH d'environ 9,62 en moyenne plus ou moins basique pour les gîtes avec végétation et sans végétation. L'humidité relative présente une valeur d'environ 64,5%, en moyenne aussi bien pour les deux gîtes avec végétation ou sans végétation.

Tableau XXV: Paramètres géographiques des gîtes Keur Massar Lycée

	KEUR MASSAR LYCEE			
	Gite Témoin	G1	G2	G3
Latitude	14°45'32''N	14°45'41''N	14°45'32''N	14°46'04''N
Longitude	17°23'53''W	17°21'25''W	17°23'53''W	17°22'32''W
Altitude	19 m	19 m	14 m	19 m

Ce site se situe globalement entre les latitudes 14°45'32''N et 14°46'04''N et une longitude comprise entre 17°23'53''W et 17°22'32''W avec une altitude de 19m. Les conditions environnementales du milieu naturel au moment du traitement des larves de *Culex quinquefasciatus*, en particulier la température, le PH et l'humidité peuvent influencer les résultats. Ainsi, la température ambiante moyenne est de 29 ° C, le PH moyen 9 et l'humidité moyenne 79%.

Le site de PIKINE GUINAW RAIL NORD

Ce site est situé dans le département de Pikine, il est caractérisé par les paramètres physicochimiques consignés dans le tableau XXVI et par les paramètres géographiques présentés dans le tableau XXVII.



Figure 47: Gîtes de bassin Guinaw rail sans végétation(B) et avec végétation(A)

Tableau XXVI: Paramètres physico-chimiques des gîtes de Guinaw Rail Nord

Gîtes (G) (PIKINE GUINAW RAIL NORD)

Paramètres	Gîte Témoin			G1			G2			G3		
	T	PH	HU	T	PH	HU	T	PH	HU	T	PH	HU
Gîtes sans végétation	30,4	10,6	71%	32,3	11,5	69%	30,8	11	71%	31,2	9,9	64%
Gîtes avec végétation	29,1	11,4	77%	30,5	12,6	73%	29,9	12,5	78%	30,2	11,7	70%

Légende : G1: gîte 1 ;G2: gîte 2 ; G3 : gîte 3 ;T : température ; H : humidité

Le tableau XXVI nous montre une variation de la température, de PH et de l'humidité relative du site de Pkine Guinaw Rail Nord. La température ambiante qui règne dans ce site tourne autour de 31,17 en moyenne aussi bien pour le gîte sans végétation que pour le gîte avec végétation. On note un PH d'environ 10,75 en moyenne plus ou moins basique pour les gîtes avec végétation et sans végétation. L'humidité relative présente une valeur d'environ 76,12%, en moyenne aussi bien pour les deux gîtes avec végétation ou sans végétation.

Tableau XXVII : Paramètres géographiques des gîtes Pikine Guinaw Rail Nord

PIKINE GUINAW RAIL NORD

	Gîte Témoin	G1	G2	G3
Latitude	14°45'41''N	14°45'41''N	14°45'32''N	14°46'04''N
Longitude	17°23'53''W	17°21'25''W	17°23'53''W	17°22'32''W
Altitude	19 m	19 m	14 m	19 m

Ce site se situe globalement entre les latitudes 14°45'41''N et 14°46'04''N et une longitude comprise entre 17°23'53''W et 17°22'32''W avec une altitude de 19m.

Le site de PIKINE RUE 10

Ce site est situé dans le département de Pikine, il est caractérisé par les paramètres physicochimiques consignés dans le tableau XXVIII et par les paramètres géographiques présentés dans le tableau XXIX.



Figure 48: Gîtes de bassin Pikine Rue 10 sans végétation(B) et avec végétation(A)

Tableau XXVIII : Paramètres physico-chimiques des gîtes de Pikine Rue 10

Gîtes (G) (PIKINE RUE 10)												
Paramètres	Gîte Témoin			G1			G2			G3		
	T	PH	HU	T	PH	HU	T	PH	HU	T	PH	HU
Gîtes sans végétation	32,4	9,6	61%	30,6	11,4	69%	31,8	10,6	70%	30,6	10,2	68%
Gîtes avec végétation	30,3	11,4	66%	29,2	12,8	74%	30,2	12,4	72%	29,2	12,6	74%

Légende : G1: gîte 1 ;G2: gîte 2 ; G3 : gîte 3 ;T : température ; H : humidité

Le tableau XXVIII nous montre une variation de la température, de PH et de l'humidité relative du site de Pikine Rue 10. La température ambiante qui règne dans ce site tourne autour de 31,35 en moyenne aussi bien pour le gîte sans végétation que pour le gîte avec végétation. On note un PH d'environ 10,45 en moyenne plus ou moins basique pour les gîtes avec végétation et sans végétation. L'humidité relative présente une valeur d'environ 67%, en moyenne aussi bien pour les deux gîtes avec végétation ou sans végétation.

Tableau XXIX: Paramètres géographiques des gîtes de Pikine Rue 10

PIKINE RUE 10				
	Gite Témoin	G1	G2	G3
Latitude	14°45'41''N	14°45'41''N	14°45'32''N	14°46'04''N
Longitude	17°23'53''W	17°21'25''W	17°23'53''W	17°22'32''W
Altitude	19 m	19 m	14 m	19 m

Ce site se situe globalement entre les latitudes 14°45'41''N et 14°46'04''N et une longitude comprise entre 17°23'53''W et 17°22'32''W avec une altitude de 19m. Ainsi, la température ambiante moyenne est de 29 ° C, le PH moyen 9 et l'humidité moyenne 79% (Tableau XXVIII).

Le site de DJIDDAH THIAROYE KAW

Ce site est situé dans le département de Pikine, il est caractérisé par les paramètres physicochimiques consignés dans le tableau XXX et par les paramètres géographiques présentés dans le tableau XXXI.

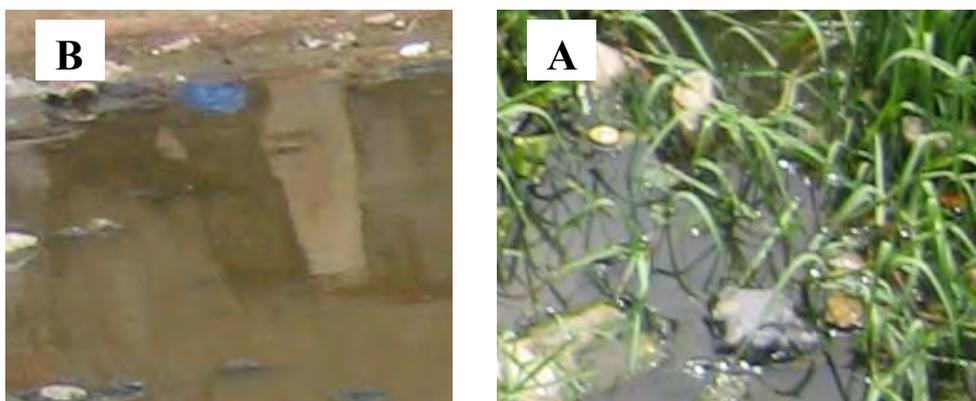


Figure 49: Gîtes de Djida Thiaroye Kao sans végétation(B) et avec végétation(A)

Tableau XXX : Paramètres physico-chimiques des gîtes de Djida Thiaroye Kao

Gîtes (G) (DJIDDAH THIAROYE KAO)												
Paramètres	Gite Témoin			G1			G2			G3		
	T	pH	HU	T	pH	HU	T	pH	HU	T	pH	HU
Gites sans végétation	31,9	10,8	53%	30,5	10,6	56%	31,7	10,4	63%	31,4	10,5	55%
Gites avec végétation	30,4	12,6	65%	29	12,8	64%	30,3	12,4	69%	30,1	12,6	66%

Légende : G1: gîte 1 ;G2: gîte 2 ; G3 : gîte 3 ;T : température ; H : humidité

Le tableau XXX nous montre une variation de la température, de PH et de l'humidité relative du site de Djiddah Thiaroye Kao. La température ambiante qui règne dans ce site tourne autour de 31,37 en moyenne aussi bien pour le gîte sans végétation que pour le gîte avec végétation. On note un PH d'environ 10,57 en moyenne plus ou moins basique pour les gîtes avec végétation et sans végétation. L'humidité relative présente une valeur d'environ 56,75%, en moyenne aussi bien pour les deux gîtes avec végétation ou sans végétation.

Tableau XXXI: Paramètres géographiques des gîtes de Djiddah Thiaroye Kao

DJIDDAH THIAROYE KAO				
	Gite Témoin	G1	G2	G3
Latitude	14°45'32''N	14°45'41''N	14°45'32''N	14°46'04''N
Longitude	17°23'53''W	17°21'25''W	17°23'53''W	17°22'32''W
Altitude	19 m	19 m	14 m	19 m

Ce site se situe globalement entre les latitudes 14°45'32''N et 14°46'04''N et une longitude comprise entre 17°23'53''W et 17°22'32''W avec une altitude de 19m.

Le site de Thiaroye Darou Salam

Ce site est situé dans le département de Pikine, il est caractérisé par les paramètres physicochimiques consignés dans le tableau XXXII et par les paramètres géographiques présentés dans le tableau XXXIII.



Figure 50: Gîtes de bassin Thiaroye Darou Salam sans végétation(B) et avec végétation(A)

Tableau XXXII: Paramètres physico-chimiques des gîtes de Thiaroye Darou Salam

	Gîtes (G) THIAROYE DAROU SALAM											
	Gite Témoin			G1			G2			G3		
Paramètres	T	PH	HU	T	PH	HU	T	PH	HU	T	PH	HU
Gîtes sans végétation	31,2	9,5	60%	32,1	10,7	69%	30,5	9,5	65%	31,4	10,8	67%
Gîtes avec végétation	30	10,8	66%	30,4	11,9	73%	29,7	11,4	69%	30,1	12,3	73%

Légende : G1: gîte 1 ;G2: gîte 2 ; G3 : gîte 3 ;T : température ; H : humidité

Le tableau XXXI nous montre une variation de la température, de PH et de l'humidité 65,25% relative du site de Thiaroye Darou SALAM. La température ambiante qui règne dans ce site tourne autour de 31,3 en moyenne aussi bien pour le gîte sans végétation que pour le gîte avec végétation. On note un PH d'environ 10,12 en moyenne plus ou moins basique pour les gîtes

avec végétation et sans végétation. L'humidité relative présente une valeur d'environ 65,25%, en moyenne aussi bien pour les deux gîtes avec végétation ou sans végétation.

Tableau XXXIII: Paramètres géographiques des gîtes de Thiaroye Darou SALAM
THIAROYE DAROU SALAM

	Gite Témoin	G1	G2	G3
Latitude	14°45'32''N	14°45'41''N	14°45'32''N	14°46'04''N
Longitude	17°23'53''W	17°21'25''W	17°23'53''W	17°22'32''W
Altitude	19 m	19 m	14 m	19 m

Ce site se situe globalement entre les latitudes 14°45'32''N et 14°46'04''N et une longitude comprise entre 17°23'53''W et 17°22'32''W avec une altitude de 19m.

Le site de YEUMBEUL/ SUD

Ce site est situé dans le département de Pikine, il est caractérisé par les paramètres physicochimiques consignés dans le tableau XXXIV et par les paramètres géographiques présentés dans le tableau XXXV.



Figure 51: Gîtes de bassin Yeumbeul Sud sans végétation (B) et végétation (A)

Tableau XXXIV: Paramètres physico-chimiques des gîtes de Yeumbeul Sud

Gites (G) YEUMBEUL SUD												
Parametres	Gite Témoin			G1			G2			G3		
	T	pH	HU	T	pH	HU	T	pH	HU	T	pH	HU
Gîtes sans végétation	32	9,3	68%	30,3	10,5	71%	30,3	11	71%	31,5	9,4	62%
Gîtes avec végétation	31,2	11,9	72%	29,4	11,8	74%	29,1	12,7	73%	29,8	11,6	69%

Légende : G1: gîte 1 ;G2: gîte 2 ; G3 : gîte 3 ;T : température ; H : humidité

Le tableau XXXIV nous montre une variation de la température, de PH et de l’humidité relative du site de Yeumbeul Sud. La température ambiante qui règne dans ce site tourne autour de 31,02 en moyenne aussi bien pour le gîte sans végétation que pour le gîte avec végétation. On note un PH d’environ 10,05 en moyenne plus ou moins basique pour les gîtes avec végétation et sans végétation. L’humidité relative présente une valeur d’environ 68%, en moyenne aussi bien pour les deux gîtes avec végétation ou sans végétation.

Tableau XXXV: Paramètres géographiques des gîtes de Yeumbeul Sud.

YEUMBEUL SUD				
	Gite Témoin	G1	G2	G3
Latitude	14°45’32’’N	14°45’41’’N	14°45’32’’N	14°46’04’’N
Longitude	17°23’53’’W	17°21’25’’W	17°23’53’’W	17°22’32’’W
Altitude	19 m	19 m	14 m	19 m

Ce site se situe globalement entre les latitudes 14°45’32’’N et 14°46’04’’N et une longitude comprise entre 17°23’53’’W et 17°22’32’’W avec une altitude de 19m.

Le site de KAFFRINE 2 SUD

Ce site est situé dans le département de Kaffrine, il est caractérisé par les paramètres physicochimiques consignés dans le tableau XXXV et par les paramètres géographiques présentés dans le tableau XXXVI.

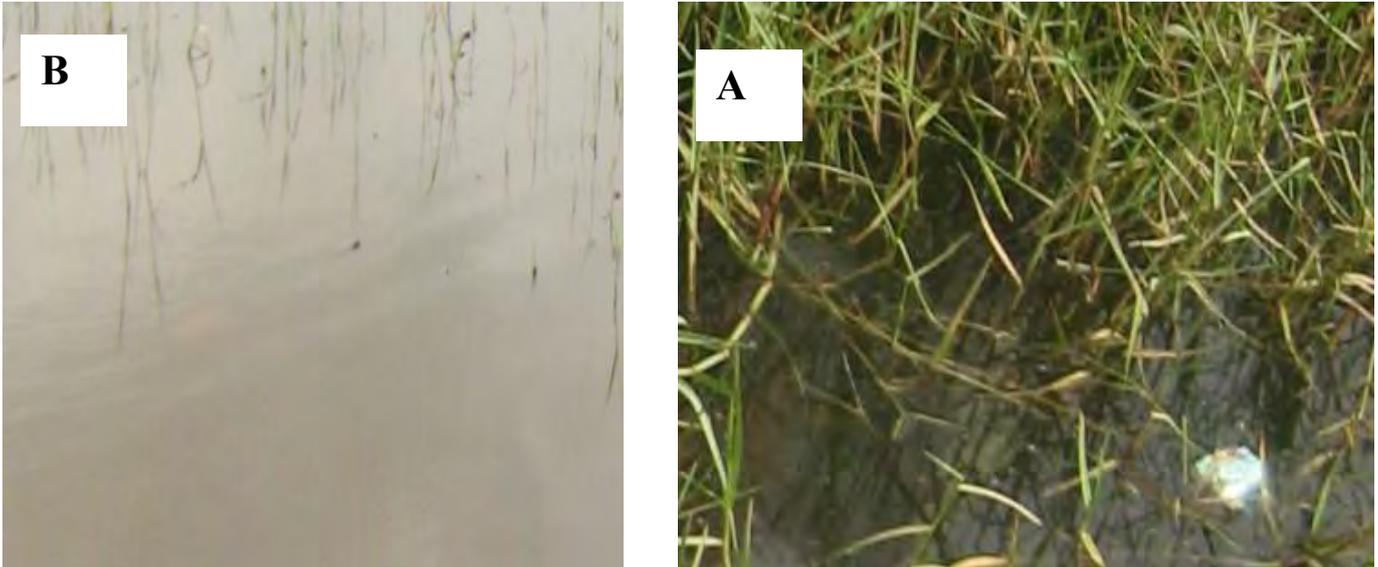


Figure 52: Gîtes bassin Kaffrine Sud sans végétation(B) et avec végétation(A).

Tableau XXXIV: Paramètres physico-chimiques des gîtes de Kaffrine 2 Sud

Gîtes (G) KAFFRINE 2 SUD

Paramètres	Gîte Témoin			G1			G2			G3		
	T	pH	HU	T	pH	HU	T	pH	HU	T	pH	HU
Gîtes sans végétation	30,4	9,7	56%	31,2	10,2	66%	31,5	10,2	61%	30,1	10,5	59%
Gîtes avec végétation	29,2	12,5	60%	30	11,8	70%	29,9	12,3	64%	29	12,1	63%

Légende : G1: gîte 1 ;G2: gîte 2 ; G3 : gîte 3 ;T : température ; H : humidité

Le tableau XXXVI nous montre une variation de la température, de PH et de l'humidité relative du site de Kaffrine 2 Sud. La température ambiante qui régnait dans ce site tourne autour de 30,8 en moyenne aussi bien pour le gîte sans végétation que pour le gîte avec végétation. On note un PH d'environ 10,15 en moyenne plus ou moins basique pour les gîtes avec végétation et sans végétation. L'humidité relative présente une valeur d'environ 60,5%, en moyenne aussi bien pour les deux gîtes avec végétation ou sans végétation.

Tableau XXXVII 3: Paramètres géographiques des gîtes de Kaffrine 2 Sud

KAFFRINE 2 SUD				
	Gite Témoin	G1	G2	G3
Latitude	14°45'41''N	14°45'41''N	14°45'32''N	14°46'04''N
Longitude	15°32'53''W	15°32'25''W	15°32'53''W	15°32'32''W
Altitude	15 m	15 m	15 m	15 m

Ce site se situe globalement entre les latitudes 14°45'32''N et 14°46'04''N et une longitude comprise entre 15°32'53''W et 15°32'32''W avec une altitude de 15m.

Le site de KAFFRINE2 NORD

Ce site est situé dans le département de Kaffrine, il est caractérisé par les paramètres physicochimiques consignés dans le tableau XXXVIII et par les paramètres géographiques présentés dans le tableau XXXIX.



Figure 53: Gîtes kaffrine 2 Nord sans végétation(B) et avec végétation(A)

Tableau XXXVIII : Paramètres physico-chimiques des gîtes de Kaffrine 2 Nord**Gîtes (G) KAFFRINE 2 NORD**

Paramètres	Gîte Témoin			G1			G2			G3		
	T	pH	HU	T	pH	HU	T	pH	HU	T	pH	HU
Gîtes sans végétation	31,2	10,8	60%	32,1	10,7	70%	32,5	9,5	61%	32,4	10,8	63%
Gîtes avec végétation	29,7	12,3	67%	30,5	12,4	79%	30,9	11,8	66%	31,4	12,6	78%

Légende : G1: gîte 1 ;G2: gîte 2 ; G3 : gîte 3 ;T : température ; H : humidité

Le tableau XXXVIII nous montre une variation de la température, de PH et de l'humidité relative du site de Kaffrine 2 Nord. La température ambiante qui règne dans ce site tourne autour de 32,05 en moyenne aussi bien pour le gîte sans végétation que pour le gîte avec végétation. On note un PH d'environ 10,45 en moyenne plus ou moins basique pour les gîtes avec végétation et sans végétation. L'humidité relative présente une valeur d'environ 63,5%, en moyenne aussi bien pour les deux gîtes avec végétation ou sans végétation.

Tableau XXXIX : Paramètres géographiques des gîtes de Kaffrine 2 Nord**KAFFRINE 2 NORD**

	Gîte Témoin	G1	G2	G3
Latitude	14°45'41''N	14°45'41''N	14°45'32''N	14°46'04''N
Longitude	15°32'53''W	15°32'25''W	15°32'53''W	15°32'32''W
Altitude	15 m	15 m	15 m	15 m

Ce site se situe globalement entre les latitudes 14°45'32''N et 14°46'04''N et une longitude comprise entre 15°32'53''W et 15°32'32''W avec une altitude de 15m.

Le site de GOUDIRY

Ce site est situé dans le département de Goudiry, il est caractérisé par les paramètres physicochimiques consignés dans le tableau XL et par les paramètres géographiques présentés dans le tableau XLI.

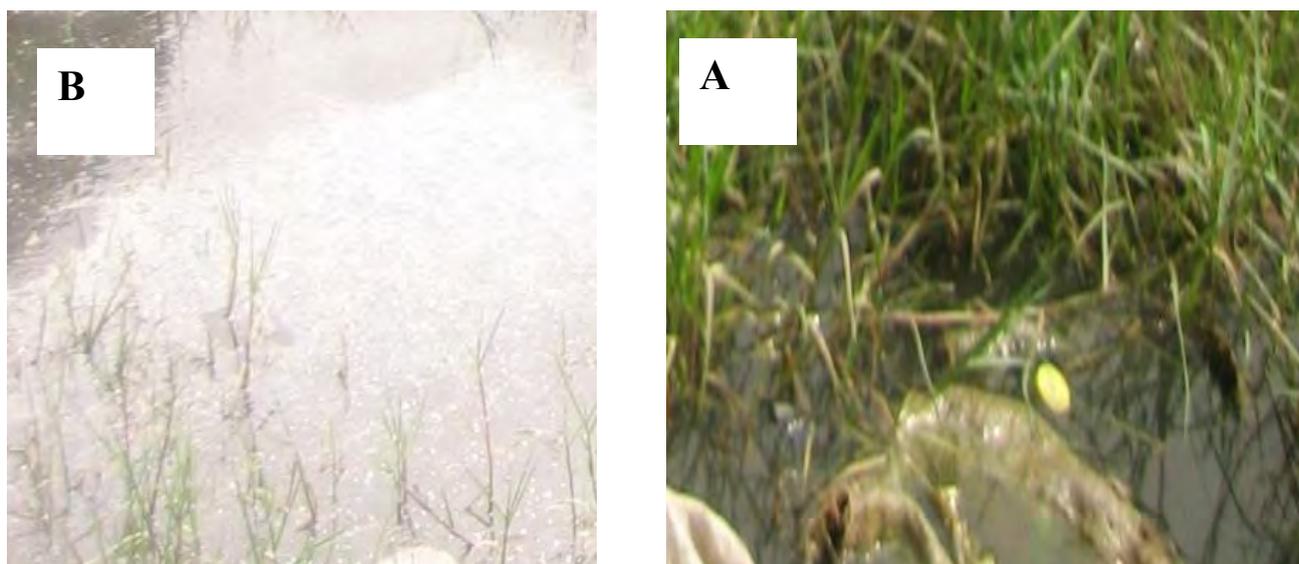


Figure 54: Gîtes bassin Goudiry sans végétation (B) et avec végétation (A)

Tableau XL : Paramètres physico-chimiques des gîtes de Goudiry

Paramètres	Gîtes (G) GOUDIRY											
	Gîte Témoin			G1			G2			G3		
	T	pH	HU	T	pH	HU	T	pH	HU	T	pH	HU
Gîtes sans végétation	32,4	9,8	62%	32,8	10,5	69%	33	10	66%	32,9	9,9	65%
Gîtes avec végétation	30,1	11,9	68%	31,6	12,3	73%	31,8	12,8	69%	31,2	12,6	70%

Légende : G1: gîte 1 ;G2: gîte 2 ; G3 : gîte 3 ;T : température ; H : humidité

Le tableau XL nous montre une variation de la température, de PH et de l'humidité relative du site de Goudiry. La température ambiante qui régné dans ce site tourne autour de 32,77 en moyenne aussi bien pour le gîte sans végétation que pour le gîte avec végétation. On note un

PH d'environ 10,05 en moyenne plus ou moins basique pour les gîtes avec végétation et sans végétation. L'humidité relative présente une valeur d'environ 65,5%, en moyenne aussi bien pour les deux gîtes avec végétation ou sans végétation.

Tableau XLI : Paramètres géographiques des gîtes de Goudiry

GOUDIRY				
	Gite Témoin	G1	G2	G3
Latitude	14°45'32''N	14°45'41''N	14°45'32''N	14°46'04''N
Longitude	12°43'53''W	12°43'25''W	12°43'53''W	12°43'32''W
Altitude	57 m	57 m	57 m	57 m

Ce site se situe globalement entre les latitudes 14°45'32''N et 14°46'04''N et une longitude comprise entre 12°43'53''W et 12°43'32''W avec une altitude de 57m.

III.2 MATERIEL ET METHODES

III.2.1. Matériel

III.2.1.1. Matériel biologique

Le matériel biologique est constitué de larves de moustique des genres *Culex*, *Aedes*, *Anophéles*.

III.2.1.2. les biopesticides utilisés.

Les biopesticides que nous avons utilisés en milieu naturel sont constitués par :

- le neem (*Azadirachta indica*) (suneem 1%) ;
- *Metarhizium anisopliae* ;
- le mélange de ces deux biopesticides. (cf : chapitre II)

III.2.1.3. Matériel de traitement:

Le matériel utilisé au laboratoire et sur le terrain est composé de :

- Appareil numérique marque Nikon,
- Bêcher,
- Bocaux de dimensions 10 x 10 x 7cm,
- Boîtes de pétri (BP),
- Eprouvettes,
- Etuve de marque Kowell
- Hygromètre,
- Gants en latex,
- Loupe binoculaire de marque motic,
- Masques,
- Microscope optique de marque motic,
- Pipettes graduées
- Pipette thoma
- Poires pipettes pour aspirer
- Thermomètre
- Louche
- Bottes
- PH mètre
- GPS
- Seau pour l'eau

- Bandelette contenant les produits (le neem (*Azadirachta indica*), *Metarhizium anisopliae* et formulation mélange)

III.2.2. Méthodes

III.2.2. 1. Evaluation des densités larvaires avant traitement

L'évaluation des densités larvaires avant traitement des larves de moustique a consisté à l'utilisation de la méthode des coups de louche d'une capacité de 500 millilitres. Cette technique consiste à plonger la louche dans l'eau du gîte positif, puis à la déplacer avec un mouvement uniforme en évitant les remous. Ceci aura permis de prélever des larves de moustique et par la suite de procéder au comptage. Ceci permet d'aboutir aux densités qui sont des rapports du nombre de larves obtenues aux volumes d'eaux des louches.



Figure 55: Evaluation des densités larvaires avant traitement

III.2.2. 2. Etude de la compatibilité entre le Suneem 1% et le *Metarhizium anisopliae*

La formulation entre le neem (*Azadirachta indica*) (Suneem 1%) et *Metarhizium anisopliae* consiste à mélanger 25 ml de Suneem 1% et 0,50 g de spores de *Metarhizium anisopliae* dans une première boîte de pétri contenant le milieu de culture (riz). Une autre boîte de pétri contenant le milieu de culture (riz) et les spores de *Metarhizium anisopliae* uniquement sert de témoin. Ensuite, nous avons suivi la germination des spores de *Metarhizium anisopliae* dans les boîtes de pétri. Nous comparons l'aspect et la couleur des spores dans les boîtes de Pétri contenant le mélange et les boîtes de Pétri témoins. Cette expérience est répétée durant six jours.

III.2.2. 3. Méthode de traitement des larves de moustiques aux biopesticides

III.2.2. 3.1. Protocole expérimental commun pour Suneem 1%, *Metarhizium anisopliae* et Mélange des deux

Pour le traitement des gîtes naturels nous avons répertorié les gîtes (cartographie) Par la suite nous avons relevé leurs paramètres physicochimiques (PH,T°) et géographiques . Les

densités larvaires des gîtes ont été évaluées avant et après traitement par les biopesticides. Quant au gîte témoin les densités larvaires ont été évaluées sans traitement avec les biopesticides. Toutefois le traitement des gîtes larvaires consiste à prendre trois louches dans le gîte et compter les larves prélevées ensuite les reverser dans le gîte. La moyenne est obtenue par la somme des larves des trois (3) louches sur trois (3). Ainsi pour contrôler les émergences nous avons prélevé l'eau des gîtes avec des larves et nous les avons reversés dans les bacs artificiels munis de cases à moustiques pour contrôler et compter les émergences et les nymphes toutes les 24 heures.

- Nous avons répertorié 4 gîtes sur des rayons de 100m dans chaque site que nous avons traité (un gîte témoin, gîte Suneem1%, un gîte *Metarhizium anisopliae* et un gîte mélange)
- Ensuite nous avons mesuré les gîtes (longueur, largeur et la profondeur de l'eau). Nous avons déterminé les paramètres des gîtes : PH, T°, humidité, salinité...
- Quatorze (14) sites avec chacun quatre gîtes ont été choisis au hasard et traité **avec de la** formulation de Suneem 1% seul avec 40ml d'azadirachtine, de la formulation sèche de 15mg de *Metarhizium anisopliae* et de la formulation de mélange de 10mg de *Metarhizium anisopliae* et 20ml de Suneem 1% appliqué au gîte. Et enfin le gîte témoin n'a pas été traité.

III.2.2. 3. 2. Traitement des larves avec Suneem1%

Les larves de moustique ont été traitées directement dans les gîtes. Ces gîtes ont été traités avec des quantités de neem (*Azadirachta indica*) (Suneem1%) allant de 25, 30, 35 et 40 ml. Les gîtes ont été mesurés grâce à un décimètre pour connaître leur étendue. Les volumes d'eau ont été obtenus par calcul à partir de ces résultats. Pour connaître les densités après traitement la méthode des louches a été appliquée (réf. Méthode commune). Ce qui nous a permis de calculer les densités moyennes pour chaque gîte.

III.2.2. 3.3. Traitement des larves avec *Metarhizium anisopliae*

a. Production en masse de spores de *Metarhizium anisopliae*

Des travaux ont été effectués avec le *Metarhizium anisopliae*. Cette souche a été antérieurement étudiée au laboratoire sur des criquets sénégalais ce qui motive notre choix de ce champignon entomopathogène. Cette production est faite dans des boîtes de pétri de dimensions 9 x 1cm. Dans chaque boîte de Pétri nous avons mis 15 g de riz et 20 ml d'eau distillée. A partir d'une solution aqueuse de champignon (1g de spores dans 5 ml d'eau

distillée), nous avons prélevé un volume de 0,1 ml qui est ensuite versé dans chaque boîte de pétri. Nous avons mélangé les spores de *Metarhizium anisopliae* avec du riz dans des boîtes de pétri pour une bonne dispersion des spores. Les boîtes de pétri sont déposées sur la paille et recouvertes par des bocaux de dimension 50 x 20 x 10 cm. Trois jours après, une masse de spores apparaît et le tout est séché à l'air libre pour faire évaporer l'eau et rendre sec le milieu de culture. D'autre part, nous avons raclé le milieu de culture pour obtenir les spores, la masse est broyée et tamisée afin de récupérer le maximum de spores. Nous avons utilisé les spores sèches et le restant à savoir la poudre de spore et les granulats sont conservés dans un bocal en verre pyrex de 250ml à une température moyenne de 27 degrés Celsius et à une humidité relative moyenne de 82%.

b. Méthode de préparation de la solution entomopathogène

À l'aide d'une spatule stérile, de petits fragments du champignon en germination dans la boîte de Pétri ont été prélevés par grattage de la surface de la boîte pour être introduits dans un tube à essai contenant 9 ml d'eau distillée. La solution ainsi obtenue a été agitée pendant 10 minutes pour une libération maximale des spores. La concentration de la solution entomopathogène a été évaluée à l'aide d'une cellule hématimétrique «Cellule de Thoma». Cinq différentes concentrations de la solution entomopathogène ont été utilisées pour le traitement des larves : 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , et 10^9 spores / ml.

c. Traitement proprement dit

Les larves de moustique ont été traitées directement dans les gîtes. Ainsi, des quantités de spores de *Metarhizium anisopliae* de 10 à 12,5 mg sont appliquées dans différents gîtes. Après calcul des volumes d'eau des gîtes, les densités larvaires ont été réévaluées par la même méthode des louches (réf. Méthode commune).

III.2.2. 3. 4. Traitement des larves avec le mélange *Metarhizium anisopliae* et Suneem 1%

La même méthodologie utilisée avec le neem (*Azadirachta indica*) (Suneem 1%) et *Metarhizium anisopliae* a été utilisée à nouveau pour le mélange de ces deux biopesticides. Seulement les concentrations utilisées ont changé. En effet, on a utilisé un mixte de concentration de 40 ml d'azadirachtine suneem1% additionnée à 10 mg de spores de *Metarhizium anisopliae* (40 ml d'azadirachtine +10mg de spores de *Metarhizium anisopliae*).

III.2.2. 4. Calcul de mortalité corrigée

Les tests ont été réalisés aux différents gîtes contenant des larves de moustiques de stade L3 de la même espèce. Les larves ont été laissées dans les gîtes naturels. Pour chacune des 3 concentrations de la solution entomopathogène ainsi que pour le témoin, trois répétitions ont été effectuées. Ces comptages permettent d'obtenir la sensibilité larvaire, exprimée par le taux de mortalité (%) en fonction du temps d'exposition et de la dose du biopesticide. Cependant si le taux de mortalité des témoins est compris entre 5 et 20%, une correction est effectuée selon la formule (Abbott,1925) qui permet d'éliminer la mortalité naturelle et de connaître la toxicité réelle du larvicide. Si la mortalité est supérieure à 20%, le test est annulé et doit être renouvelé. Pour calculer le pourcentage de mortalité (mortalité corrigée) des larves selon la formule d'ABBOT (ABBOT, 1925).

$$(\%)m = 100 * \frac{N_{LM} - N_{LMT}}{N_{LTotal} - N_{LMT}}$$

(%)m= pourcentage de mortalité

N_{Lm} = nombre de larves mortes

N_{LmT} = nombre total de larves mortes dans le témoin

N_{Ltotal} = nombre de larves totales

Les recommandations de l'OMS quant à l'interprétation des résultats sont les suivantes:

98-100% de Mortalité : Sensible

80-97% de Mortalité : Résistance possible à confirmer

< 80% de Mortalité : Résistance probable

III.2.2. 5. Calcul de la DL50

Afin de déterminer la DL50 (Dose létale suffisante pour tuer 50% des individus) nous avons décelé les pourcentages de mortalité enregistrés après le 1ier jour de traitement dans le tableau des pourcentages (Tableau 48). Nous avons, ensuite projeté dans la figure 75 la droite qui a permis d'estimer la DL50 relative à la mortalité de 50% des larves de moustique.

III.2.2. 6. Calcul des TL50

Pour calculer les TL50, nous avons décelé les pourcentages des mortalités enregistrés après le 1ier jour de traitement dans le tableau des pourcentages (Tableau 48). A partir de la figure

nous avons projeté la droite permettant d'estimer la TL50 relative au temps de mortalité de 50% des larves de moustique (Figure 75).

III.2.2. 7. Calcul de la DL90

Afin de déterminer la DL90 (Dose létale suffisante pour tuer 90% des individus) nous avons décelé les pourcentages de mortalité enregistrés après le 1ier jour de traitement dans le tableau des pourcentages (Tableau 49). Nous avons ensuite projeté dans la figure la droite a permis d'estimer la DL90 relative à la mortalité de 50% des larves de moustique (Figures 75).

III.2.2. 8. Calcul des TL90

Pour calculer les TL90, nous avons décelé les pourcentages des mortalités enregistrés après le 1ier jour de traitement dans le tableau des pourcentages (Tableau 49). A partir de la figure nous avons ensuite projeté la droite permettant d'estimer la TL90 relative à la mortalité de 90% des larves de moustique (Figures 75).

III.2.2. 9. Analyse statistique

Une analyse de Bayes a été réalisée afin de mieux interpréter les résultats.

III.2.2.9.1. Analyse de BAYES

Selon Dagnelie (1975), l'analyse de BAYES consiste à étudier la comparaison des moyennes à partir de la variabilité des échantillons. Pour prouver l'efficacité du facteur étudié nous avons fait appel à l'analyse de la variance à deux critères de classification dans le but de tester la sélectivité statistique des différences entre les facteurs étudiés, en utilisant le logiciel SPSS.

III.2.2.9. 2. Analyses des données

L'analyse de Bayes a été faite au moyen du logiciel XL STAT. Elle a été utilisée pour la comparaison des mortalités moyennes obtenues avec les différents biopesticides. La dose létale à 50%, (DL50) de chaque produit a été estimée, après 24 heures de contact des larves de moustiques aux différentes concentrations testées. Ces valeurs ont été déterminées à partir d'une courbe expérimentale donnant les variations de la mortalité en fonction des concentrations croissantes des produits.

III.3. Résultats

Cette partie a été consacrée à l'analyse des résultats de l'étude de l'effet larvicide des biopesticides (du Suneem 1%, du champignon entomopathogène *Metarhizium anisopliae* et de leur mélange) sur les larves de moustique.

III.3.1. Densités larvaires avec le Suneem 1%

Les résultats de traitement avec Suneem 1% sont présentés sous la forme de densités larvaires consignées dans le tableau 41.

Tableau XLII : Densités larvaires avant et après traitement avec le Suneem 1%

Gites	Par.	KMF	MB	PKR10	KM U3	PGR	DTK	TDS	YS	KF	G
Suneem 1%	DLAvT	134	99	98	154	109	96	75	95	89	89
	DLApT	47	32	35	46	37	34	28	35	36	29
	TM	65	68	64	70	66	65	62	63	60	67

Légende : KFM : « Keur Mbaye Fall », MB : « Mbao Baobab », PKR10 : « Pikine Rue 10 », KM U3 : « Keur Massar U3 », PGR : « Pikine Guinaw Rail », DTK : « Djiddah Thiaroye Kaw », TDS : « Thiaroye Darou Salam », YS : « Yembeul Sud », KF : « Kaffrine », G : « Goudiry », DLA_vT : Densités larvaires avant traitement, DLA_pT : Densités larvaires après traitement, TM : Taux de mortalités ; Par. : Paramètres.

Ces résultats montrent une nette diminution des densités larvaires de moustique après un traitement au Suneem 1%. Cette diminution correspond au taux moyen de mortalités qui est supérieur à la DL50 et qui avoisine les 70%. Preuve qu'en milieu naturel, le Suneem1% est efficace contre les larves de moustique.

III.3. 2. Densités larvaires avec le *Metarhizium anisopliae*.

Tableau XLIII : Les résultats de traitement avec le *Metarhizium anisopliae* sont présentés sous la forme de densités larvaires consignées dans le tableau 42.

Tableau XLIII: Densités larvaires avant et après traitement avec le *Metarhizium*

Gites	Paramètres	KMF	MB	PKR10	KM U3	PGR	DTK	TDS	YS	KF	G
Metarhizium anisopliae	DLAvT	107	82	90	141	87	92	69	84	85	92
	DLApT	44	38	38	62	35	36	31	35	37	40
	TM	59	54	58	56	60	61	55	58	56	56

***anisopliae*.**

Légende : KFM : « Keur Mbaye Fall », MB : « Mbao Baobab », PKR10 : « Pikine Rue 10 », KM U3 : « Keur Massar U3 », PGR : « Pikine Guinaw Rail », DTK : « Djiddah Thiaroye Kaw », TDS : « Thiaroye Darou Salam », YS : « Yembeul Sud », KF : « Kaffrine », G : « Goudiry », DLA_vT : Densités larvaires avant traitement, DLA_pT : Densités larvaires après traitement, TM : Taux de mortalités.

Ces résultats montrent une nette diminution des densités larvaires de moustique après un traitement avec *Metarhizium anisopliae*. Cette diminution correspond au taux moyen de mortalités qui est supérieur à la DL50 et qui avoisine les 70%. Preuve qu'en milieu naturel, le *Metarhizium anisopliae* est efficace contre les larves de moustique

III.3.3. Densités larvaires avec le mélange (Suneem 1% et *Metarhizium anisopliae*)

Les résultats de traitement avec le mélange (Suneem 1% et *Metarhizium anisopliae*) sont présentés sous la forme de densités larvaires consignées dans le tableau 43.

Tableau XLIV: Densités larvaires avant et après traitement avec le mélange (Suneem 1% et *Metarhizium anisopliae*).

Gites	Paramètres	KMF	MB	PKR10	KMU3	PGR	DTK	TDS	YS	KF	G
Melange	DLAvT	164	103	115	162	113	109	98	112	107	98
	DLApT	11	08	06	08	09	05	03	06	06	03
	TM	93	92	95	95	92	95	97	95	94	97

Légende : KFM : « Keur Mbaye Fall », MB : « Mbao Baobab », PKR10 : « Pikine Rue 10 », KM U3 : « Keur Massar U3 », PGR : « Pikine Guinaw Rail », DTK : « Djiddah Thiaroye Kaw », TDS : « Thiaroye Darou Salam », YS : « Yembeul Sud », KF : « Kaffrine », G : « Goudiry », DLA_vT : Densités larvaires avant traitement, DLA_pT : Densités larvaires après traitement, TM : Taux de mortalités.

Le tableau 44 montre une nette diminution des densités larvaires de moustique après un traitement avec le mélange (Suneem 1% et *Metarhizium anisopliae*). Cette diminution correspond au taux moyen de mortalités qui est supérieur à la DL50 et qui avoisine les 70%. Preuve qu'en milieu naturel, le mélange entre Suneem 1% et *Metarhizium anisopliae* est efficace contre les larves de moustique.

Tableau XLV: Densités larvaires avant et après traitement avec le mélange (Suneem 1% et *Metarhizium anisopliae*).

Gites	Par.	KMF	MB	PKR10	KM U3	PGR	DTK	TDS	YS	KF	G
Mélange	DLAvT	164	103	115	162	113	109	98	112	107	98
	DLApT	11	08	06	08	09	05	03	06	06	03
	TM	93	92	95	95	92	95	97	95	94	97

Légende : **KFM** : « Keur Mbaye Fall », **MB** : « Mbao Baobab », **PKR10** : « Pikine Rue 10 », **KM U3** : « Keur Massar U3 », **PGR** : « Pikine Guinaw Rail », **DTK** : « Djiddah Thiaroye Kaw », **TDS** : « Thiaroye Darou Salam », **YS** : « Yembeul Sud », **KF** : « Kaffrine », **G** : « Goudiry », **DLAvT** : Densités larvaires avant traitement, **DLApT** : Densités larvaires après traitement, **TM** : Taux de mortalités. Par. : Paramètres.

Ces résultats montrent que les larves de moustique ont subi de fortes mortalités suite au traitement avec le mélange (Suneem 1% et *Metarhizium anisopliae*). Ces mortalités tournent autour de 95%. Donc le mélange (Suneem 1% et *Metarhizium anisopliae*) est efficace contre les larves de moustique.

Par l'analyse de R par les boxplot nous avons pu comparer les densités de mortalités des larves de moustique traitées avec les différents biopesticides. Ceci a été consigné dans la figure 56.

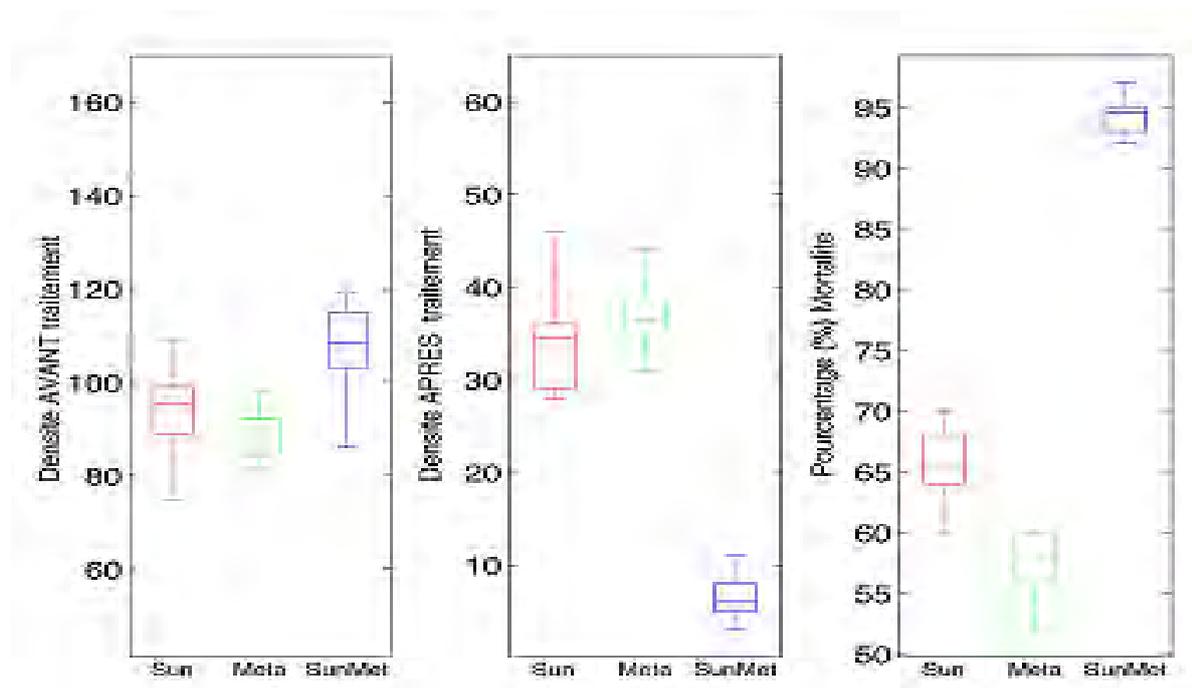


Figure 56: Densités larvaires comparatives des trois biopesticides utilisés (Suneem1%, *Metarhizium anisopliae* et le mélange (Suneem1% et *Metarhizium anisopliae*)).

Légende : **Sun** : « Suneem1% » ; **Meta** : « *Metarhizium anisopliae* » ; **Sun Meta** : « Suneem+*Metarhizium anisopliae* »

On constate que les densités larvaires après traitement sont beaucoup plus faibles pour le mélange que pour le Suneem1% et le *Metarhizium anisopliae* pris isolément. Les pourcentages de mortalité qui sont très forts pour le mélange, suivi du Suneem 1% et du *Metarhizium anisopliae* confirment ces résultats. En définitive le mélange apparaît beaucoup plus efficace que le Suneem1% et *Metarhizium anisopliae*. Nos résultats de recherche permettent de dire que *Metarhizium anisopliae* agit en synergie avec Suneem1%, ce qui accroît encore davantage sa valeur dans un contexte de lutte intégrée.

III.3. 4. Analyse des résultats des différents sites

Site de Keur Mbaye FALL

On voit nettement, d'après ces figures le traitement avec Suneem 1% du site de Keur Mbaye FALL, que la densité larvaire avant traitement est de 74% alors que la densité larvaire après traitement est de 26% soit une nette diminution du nombre des larves d'environ 48%. Ceci montre un effet toxique du Suneem1% avec un pourcentage élevé de mortalités des larves de moustique.

On voit nettement d'après ces figures du traitement avec Suneem1% un nombre élevé de mortalité des larves. Par contre, avec *Metarhizium anisopliae* la densité larvaire avant traitement est de 71% alors que la densité larvaire après traitement est de 29% soit une nette diminution du nombre des larves d'environ 42%. Ceci montre un effet toxique du *Metarhizium anisopliae* avec un pourcentage élevé de mortalités des larves de moustique. Vu qu'on a obtenu légèrement un nombre élevé de mortalité des larves, nous nous sommes limité à 4 jours. D'après la figure du traitement du mélange, la densité larvaire avant traitement est de 94% alors que la densité larvaire après traitement est de 6% soit une nette diminution du nombre des larves d'environ 88%. Ceci montre un effet toxique du mélange (Suneem1% et *Metarhizium anisopliae*) avec un pourcentage élevé de mortalités des larves de moustique. Vu qu'on a obtenu un nombre élevé de mortalité des larves, nous nous sommes limités à 3 jours. D'après ces figures, avec une forte concentration, on a un pourcentage de mortalité élevé. Dans le témoin, il n'y a aucune mortalité. Les chiffres indiquent le nombre de larves de moustique vivantes, et ceci aussi bien pour ces figures que pour les figures qui vont suivre (voir figure).

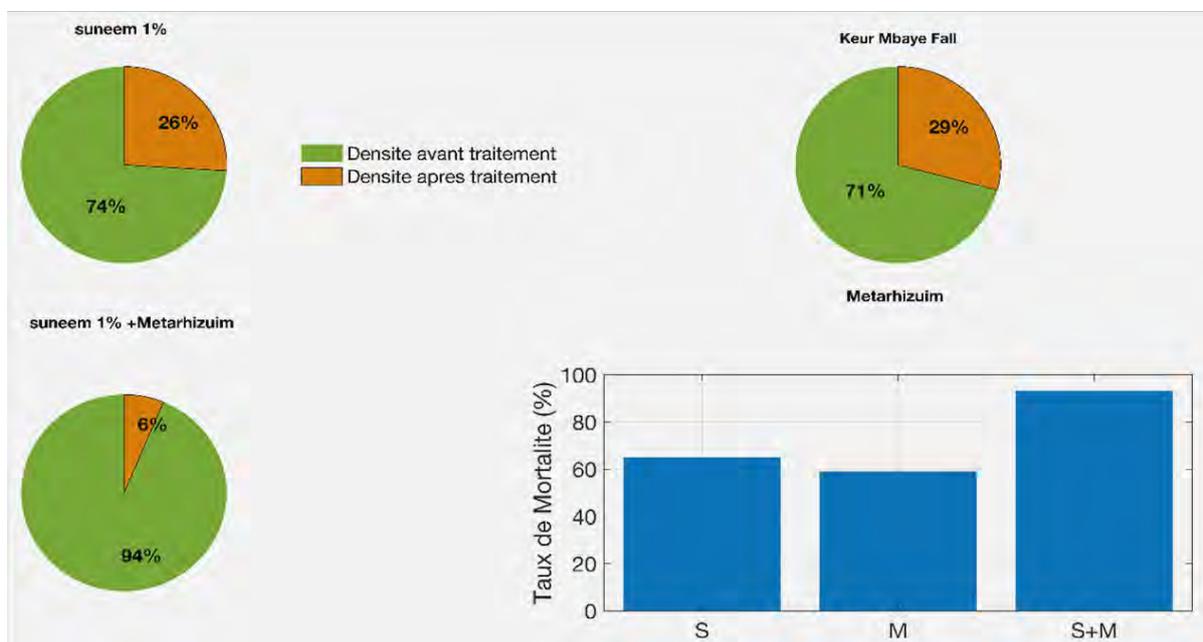


Figure 57: Distribution des taux de mortalité des différents larvicides à Keur Mbaye Fall

Site de Mbaob Baobab

On voit nettement, d'après ces figures le traitement avec Suneem1%, que la densité larvaire avant traitement est de 76% alors que la densité larvaire après traitement est de 24% soit une nette diminution du nombre des larves d'environ 52%. Ceci montre un effet toxique du Suneem1% avec un pourcentage élevé de mortalités des larves de moustique. Par contre, avec *Metarhizium anisopliae* la densité larvaire avant traitement est de 68% alors que la densité larvaire après traitement est de 32% soit une diminution du nombre de larves de 36%. Ceci montre un effet toxique du *Metarhizium anisopliae* avec un pourcentage élevé de mortalités des larves de moustique. D'après la figure du mélange, la densité larvaire avant traitement est de 93% alors que la densité larvaire après traitement est de 7% soit une diminution de 86%. Ceci montre un effet toxique du mélange (suneem1% et *Metarhizium anisopliae*) avec un pourcentage élevé de mortalités des larves de moustique. D'après ces figures, avec une forte concentration, on a un pourcentage de mortalité élevé. Dans le témoin, il n'y a aucune mortalité (Voir figure)

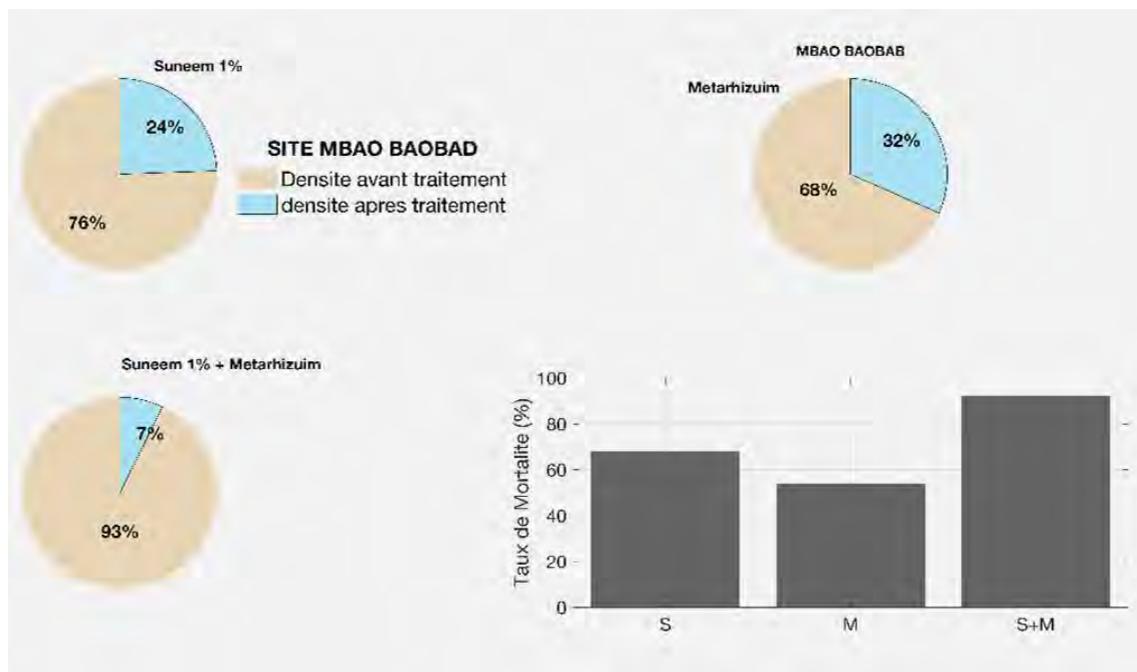


Figure 58: Distribution des taux de mortalité en fonction des différents larvicides au niveau du bassin de Mbaob Baobab

Site de Keur Massar Unité 03

On voit nettement, d'après ces figures le traitement avec Suneem1%, que la densité larvaire avant traitement est de 77% alors que la densité larvaire après traitement est de 23% soit une nette diminution du nombre des larves d'environ 54%. Ceci montre un effet toxique du Suneem1% avec un pourcentage élevé de mortalités des larves de moustique. Par contre, avec le *Metarhizium anisopliae*, la densité larvaire avant traitement est de 69% alors que la densité larvaire après traitement est de 31% soit une nette diminution du nombre des larves d'environ 38%. Ceci montre un effet toxique du *Metarhizium anisopliae* avec un pourcentage élevé de mortalités des larves de moustique. D'après la figure du mélange, la densité larvaire avant traitement est de 95% alors que la densité larvaire après traitement est de 05% soit une nette diminution du nombre des larves d'environ 90%. Ceci montre un effet toxique du mélange (suneem1% et *Metarhizium anisopliae*) avec un pourcentage élevé de mortalités des larves de moustique. D'après ces figures, avec une forte concentration, on a un pourcentage de mortalité élevé. Dans le témoin, il n'y a aucune mortalité (Voir figure).

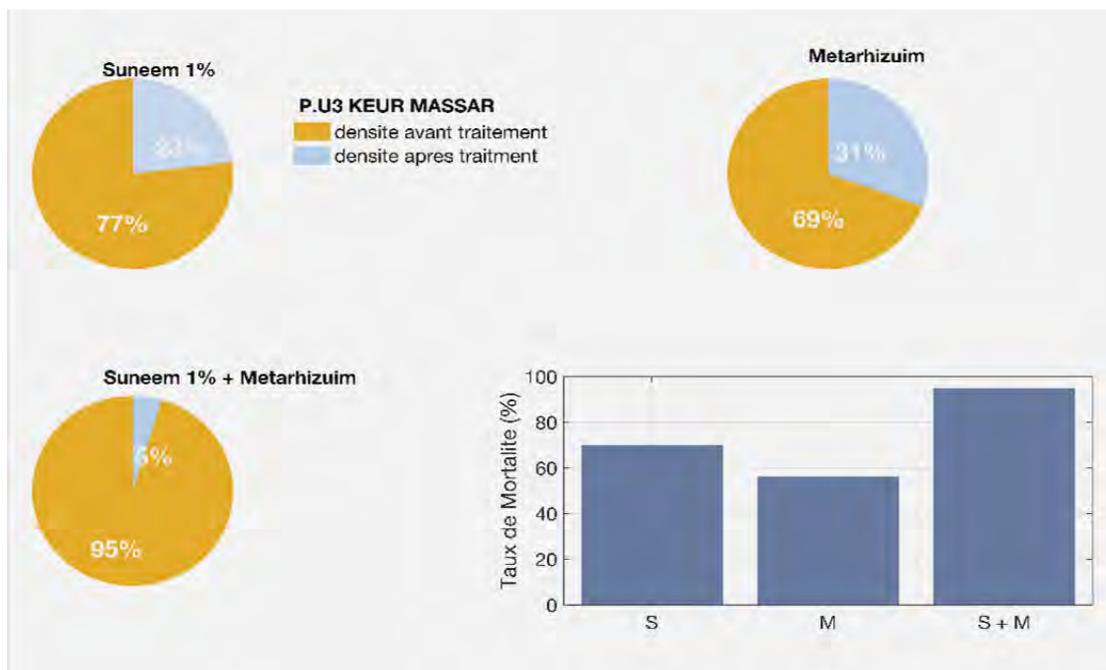


Figure 59: Taux de mortalité en fonction des différents larvicides pour le site de Keur Massar U3

Site de Sante Yalla

D'après ces figures le traitement avec Suneem1%, que la densité larvaire avant traitement est de 76% alors que la densité larvaire après traitement est de 24% soit une nette diminution du nombre des larves d'environ 52% .Ceci montre un effet toxique du Suneem1% avec un pourcentage élevé de mortalités des larves de moustique. Par contre, avec le *Metarhizium anisopliae*, la densité larvaire avant traitement est de 72% alors que la densité larvaire après traitement est de 28% soit une nette diminution du nombre des larves d'environ 44%. Ceci montre un effet toxique du *Metarhizium anisopliae* avec un pourcentage élevé de mortalités des larves de moustique. D'après la figure du mélange, la densité larvaire avant traitement est de 94% alors que la densité larvaire après traitement est de 06% soit une nette diminution du nombre des larves d'environ 88%. Ceci montre un effet toxique du mélange (suneem1% et *Metarhizium anisopliae*) avec un pourcentage élevé de mortalités des larves de moustique. D'après ces figures, avec une forte concentration, on a un pourcentage de mortalité élevé. Dans le témoin, il n'y a aucune mortalité (Voir figure).

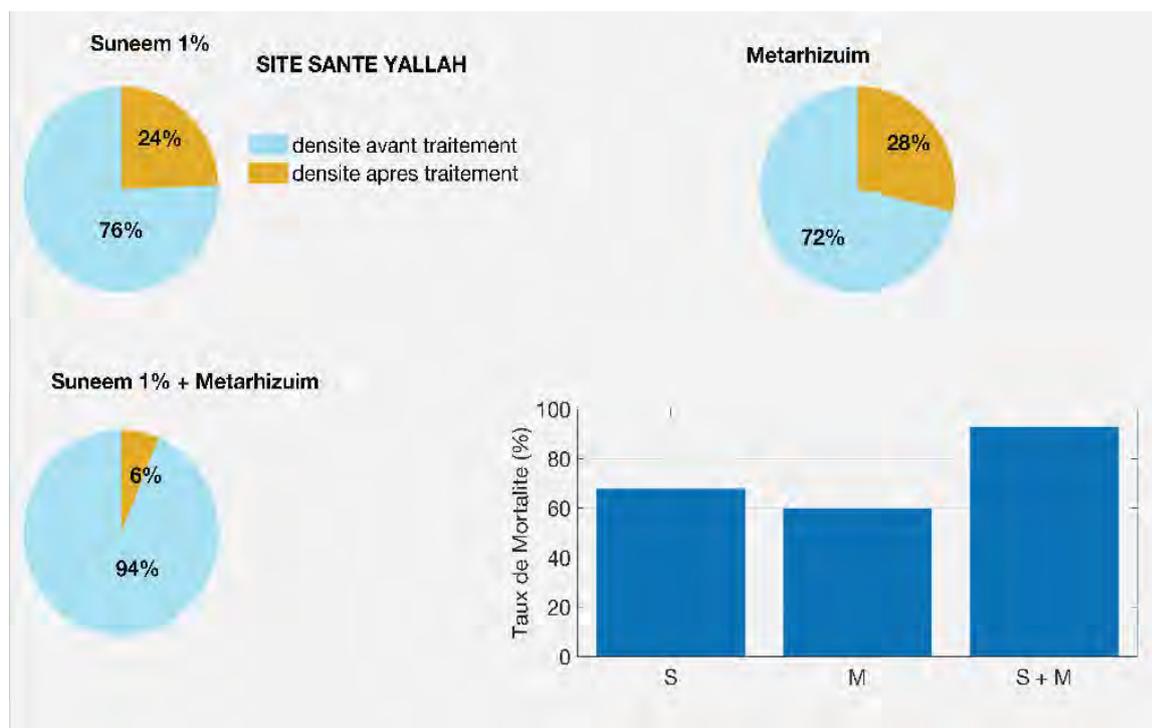


Figure 60: Distribution des taux de mortalité en fonction des larvicides pour le site de Sante Yallah

Site de Keur Massar Marché

Ces figures montrent qu'avec Suneem1% la densité larvaire avant traitement est de 76% alors qu'après traitement elle descend jusqu'à 24% soit une diminution de 52%. Ceci montre un effet toxique du Suneem1% avec un pourcentage élevé de mortalités des larves de moustiques. Par contre, avec le *Metarhizium anisopliae*, la densité larvaire avant traitement est de 70% alors que la densité larvaire après traitement est de 30% soit une nette diminution du nombre des larves d'environ 40%. Ceci montre un effet toxique du *Metarhizium anisopliae* avec un pourcentage élevé de mortalités des larves de moustique. D'après la figure du mélange, la densité larvaire avant traitement est de 96% alors que la densité larvaire après traitement est de 04% soit une nette diminution du nombre des larves d'environ 92%. Ceci montre un effet toxique du mélange (suneem1% et *Metarhizium anisopliae*) avec un pourcentage élevé de mortalités des larves de moustique. D'après ces figures, avec une forte concentration, on a un pourcentage de mortalité élevé. Dans le témoin, il n'y a aucune mortalité (Voir figure).

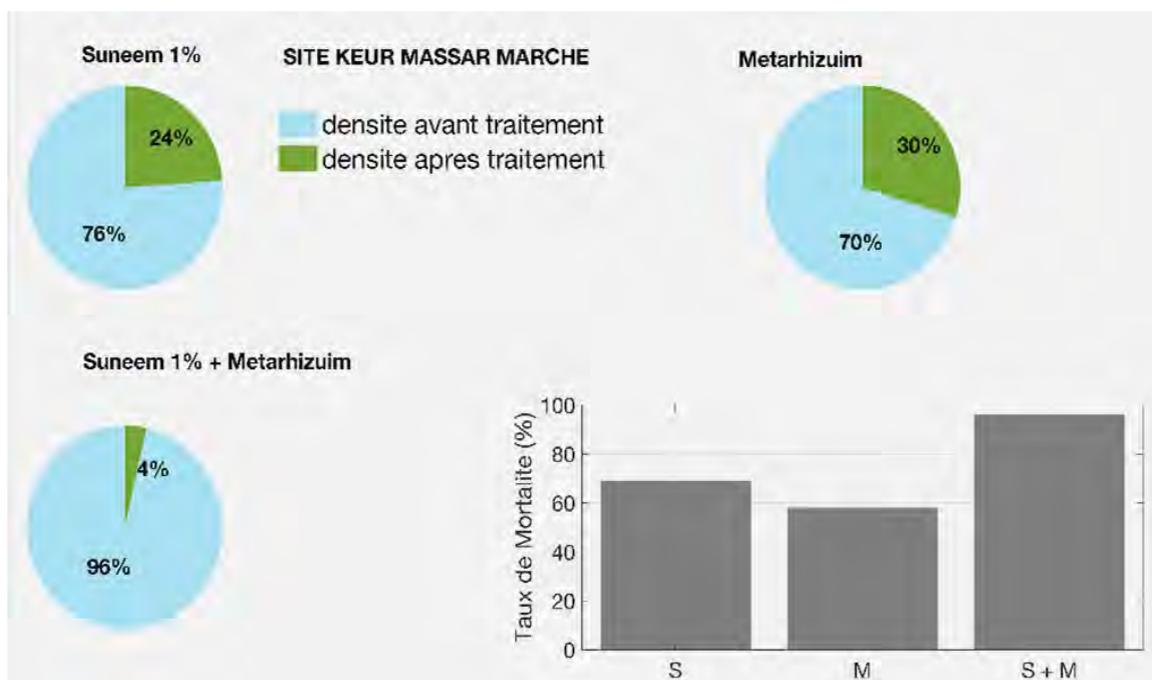


Figure 61: Distribution des taux de mortalité en fonction des larvicides pour le site de Keur Massar Marché

Site de Keur Massar Lycée

Le traitement avec Suneem1% montre que la densité larvaire avant traitement est de 76% alors que la densité larvaire après traitement est de 24% soit une nette diminution du nombre des larves d'environ 52%. Ceci montre un effet toxique du Suneem1% avec un pourcentage élevé de mortalités des larves de moustique. Pour le *Metarhizium anisopliae*, la densité larvaire avant traitement est de 68% alors que la densité larvaire après traitement est de 32% soit une nette diminution du nombre des larves d'environ 36%. Ceci montre un effet toxique du *Metarhizium anisopliae* avec un pourcentage élevé de mortalités des larves de moustiques. D'après la figure du mélange, la densité larvaire avant traitement est de 93% alors que la densité larvaire après traitement est de 07% soit une nette diminution du nombre des larves d'environ 86%. Ceci montre un effet toxique du mélange (suneem1% et *Metarhizium anisopliae*) avec un pourcentage élevé de mortalités des larves de moustiques. D'après ces figures, avec une forte concentration, on a un pourcentage de mortalité élevé. Dans le témoin, il n'y a aucune mortalité (Voir figure).

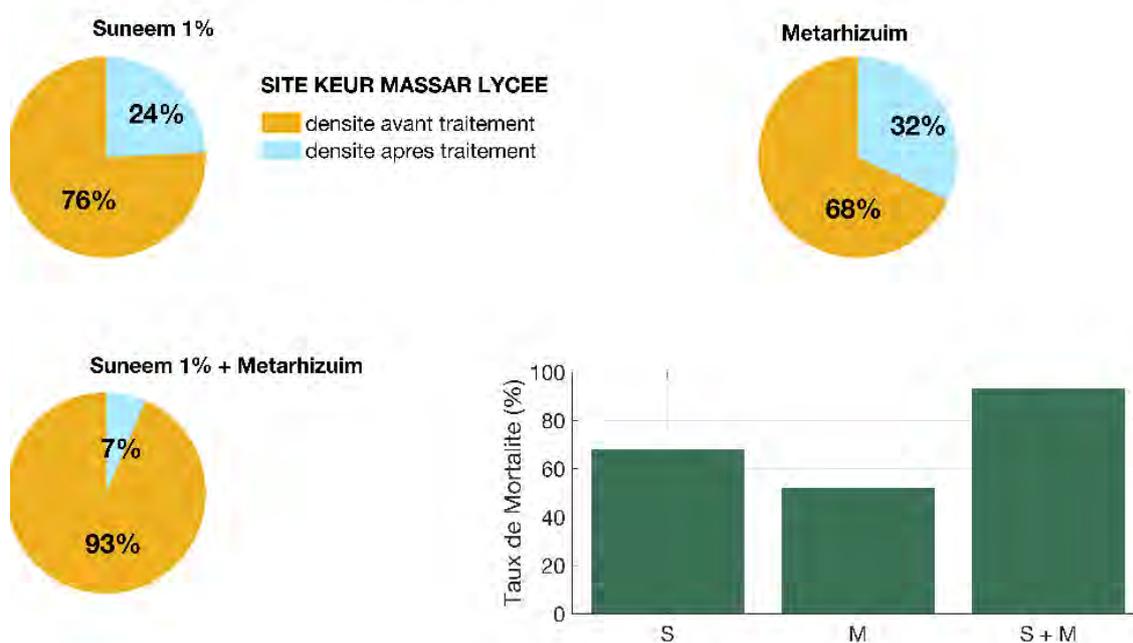


Figure 62: Distribution des taux de mortalité en fonction des larvicides pour le site de Keur Massar Lycée

Analyse des résultats du site de Pikine Guinaw Rail

On voit nettement, d'après ces figures le traitement avec Suneem1%, que la densité larvaire avant traitement est de 75% alors que la densité larvaire après traitement est de 25% soit une nette diminution du nombre des larves d'environ 50%. Ceci montre un effet toxique du Suneem1% avec un pourcentage élevé de mortalités des larves de moustiques. Par contre, avec le *Metarhizium anisopliae*, la densité larvaire avant traitement est de 71% alors que la densité larvaire après traitement est de 29% soit une nette diminution du nombre des larves d'environ 42%. Ceci montre un effet toxique du *Metarhizium anisopliae* avec un pourcentage élevé de mortalités des larves de moustique. D'après la figure du mélange, la densité larvaire avant traitement est de 93% alors que la densité larvaire après traitement est de 7% soit une nette diminution du nombre des larves d'environ 86%. Ceci montre un effet toxique du mélange (suneem1% et *Metarhizium anisopliae*) avec un pourcentage élevé de mortalités des larves de moustique. D'après ces figures, avec une forte concentration, on a un pourcentage de mortalité élevé. Dans le témoin, il n'y a aucune mortalité (Voir figure).

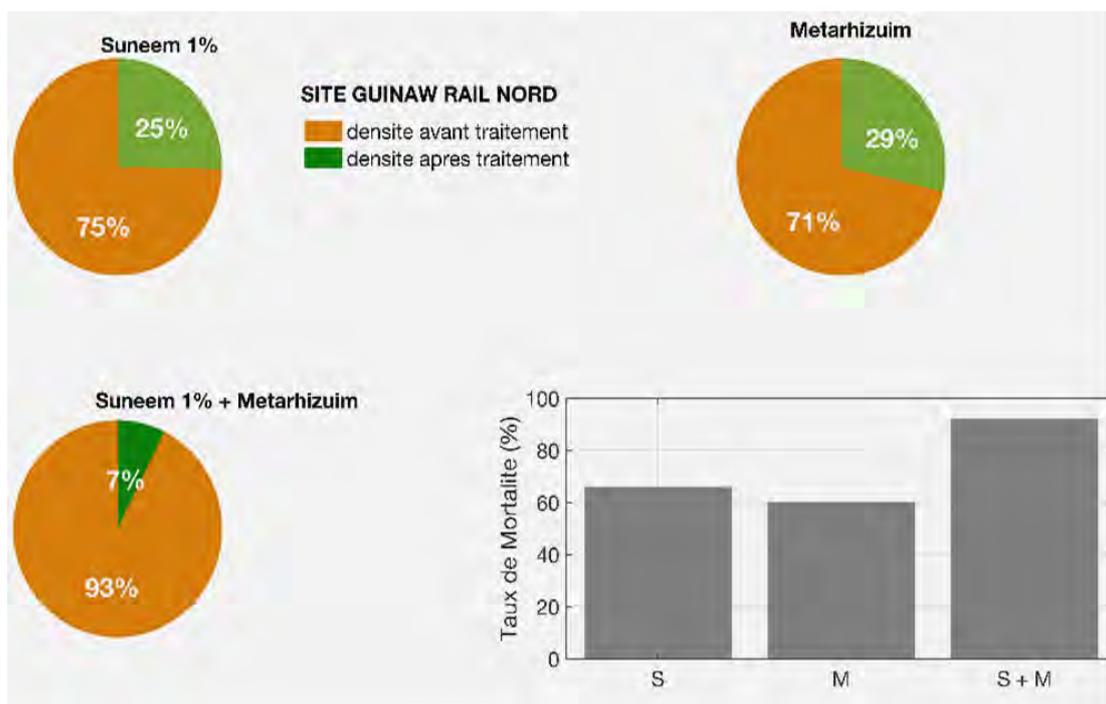


Figure 63: Statistiques de distribution des taux de mortalité des larvicides, site Guinaw Rail Nord

Analyse des résultats du site de Darou Salam

On voit nettement, d'après ces figures le traitement avec Suneem1%, que la densité larvaire avant traitement est de 73% alors que la densité larvaire après traitement est de 27% soit une nette diminution du nombre des larves d'environ 46%. Ceci montre un effet toxique du Suneem1% avec un pourcentage élevé de mortalités des larves de moustique. Pour le *Metarhizium anisopliae*, la densité larvaire avant traitement est de 69% alors que la densité larvaire après traitement est de 31% soit une nette diminution du nombre des larves d'environ 38%. Ceci montre un effet toxique du *Metarhizium anisopliae* avec un pourcentage élevé de mortalités des larves de moustique. D'après la figure du mélange, la densité larvaire avant traitement est de 97% alors que la densité larvaire après traitement est de 03% soit une nette diminution du nombre des larves d'environ 94%. Ceci montre un effet toxique du mélange (suneem1% et *Metarhizium anisopliae*) avec un pourcentage élevé de mortalités des larves de moustique. D'après ces figures, avec une forte concentration, on a un pourcentage de mortalité élevé. Dans le témoin, il n'y a aucune mortalité (Voir figure).

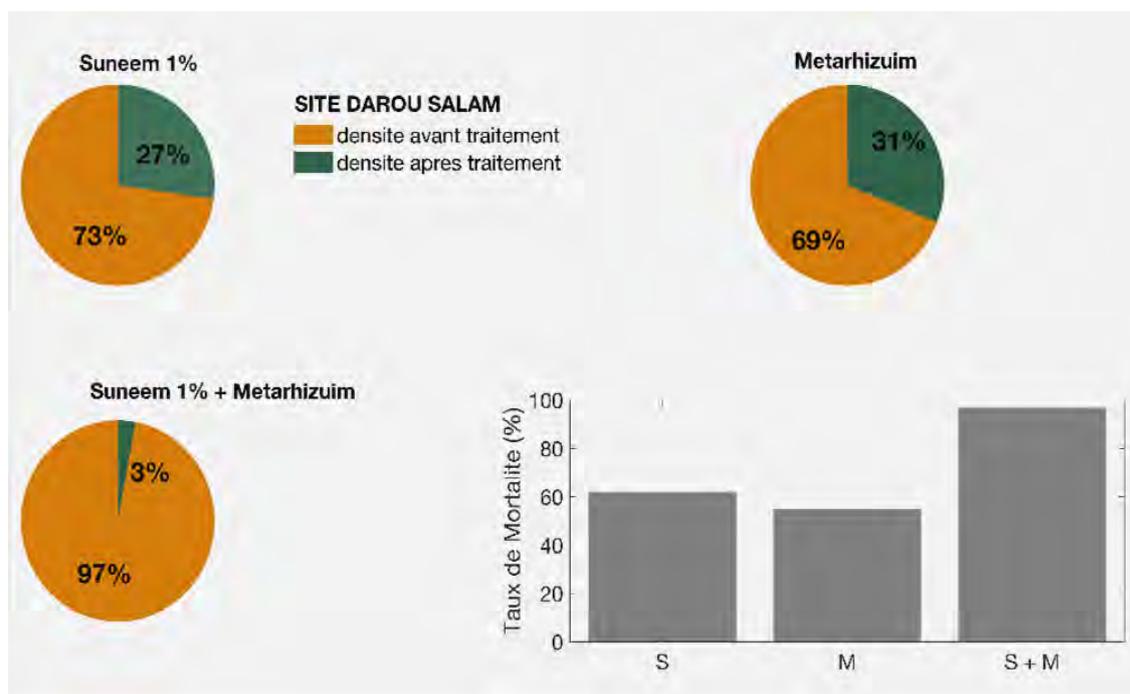


Figure 64: Distribution des taux de mortalité en fonction des larvicides pour le site de Darou Salam.

Site de Pikine Rue 10

On voit nettement, d'après ces figures le traitement avec Suneem1%, que la densité larvaire avant traitement est de 74% alors que la densité larvaire après traitement est de 26% soit une nette diminution du nombre des larves d'environ 52%. Ceci montre un effet toxique du Suneem1% avec un pourcentage élevé de mortalités des larves de moustique. Avec *Metarhizium anisopliae*, la densité larvaire avant traitement est de 70% alors que la densité larvaire après traitement est de 30% soit une nette diminution du nombre des larves d'environ 52%. Ceci montre un effet toxique du *Metarhizium anisopliae* avec un pourcentage élevé de mortalités des larves de moustique. D'après la figure du mélange, la densité larvaire avant traitement est de 95% alors que la densité larvaire après traitement est de 05% soit une nette diminution du nombre des larves d'environ 90%. Ceci montre un effet toxique du mélange (suneem1% et *Metarhizium anisopliae*) avec un pourcentage élevé de mortalités des larves de moustique. D'après ces figures, avec une forte concentration, on a un pourcentage de mortalité élevé. Dans le témoin, il n'y a aucune mortalité (Voir figure).

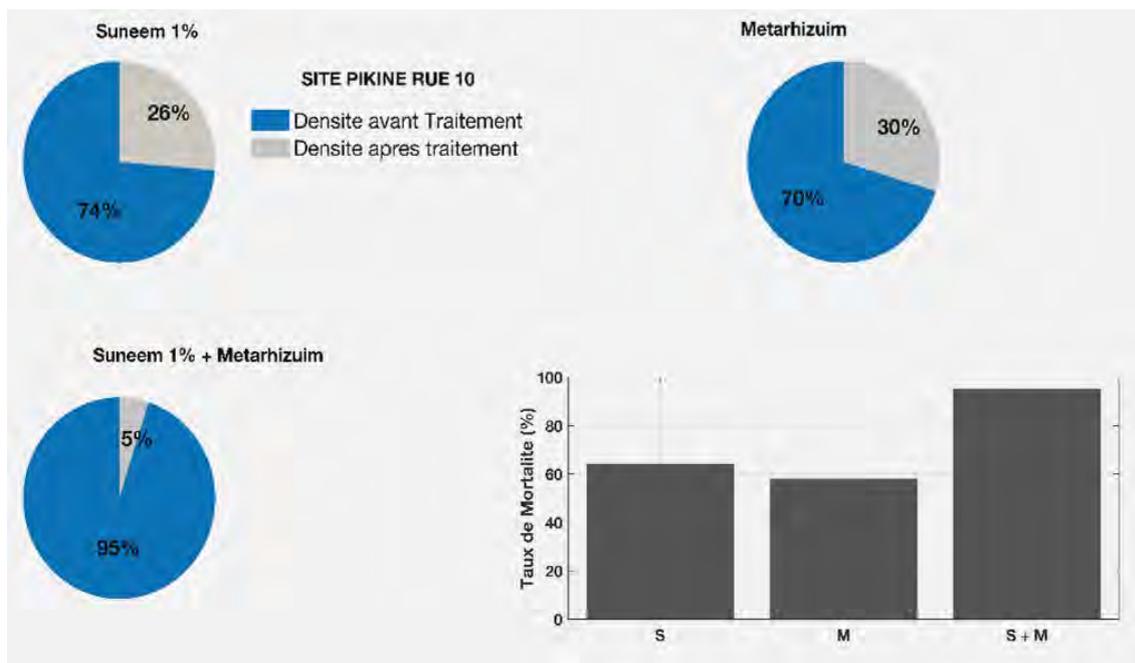


Figure 65: Distribution des taux de mortalité en fonction des larvicides pour le site de Pikine Rue 10

Site de Thiaroye Kaw

On voit nettement, d'après ces figures le traitement avec Suneem1%, que la densité larvaire avant traitement est de 74% alors que la densité larvaire après traitement est de 26% soit une nette diminution du nombre des larves d'environ 52%. Ceci montre un effet toxique du Suneem1% avec un pourcentage élevé de mortalités des larves de moustique. Avec le *Metarhizium anisopliae*, la densité larvaire avant traitement est de 72% alors que la densité larvaire après traitement est de 28% soit une nette diminution du nombre des larves d'environ 44%. Ceci montre un effet toxique du *Metarhizium anisopliae* avec un pourcentage élevé de mortalités des larves de moustique. D'après la figure du mélange, la densité larvaire avant traitement est de 96% alors que la densité larvaire après traitement est de 04% soit une nette diminution du nombre des larves d'environ 92%. Ceci montre un effet toxique du mélange (suneem1% et *Metarhizium anisopliae*) avec un pourcentage élevé de mortalités des larves de moustique. D'après ces figures, avec une forte concentration, on a un pourcentage de mortalité élevé. Dans le témoin, il n'y a aucune mortalité (Voir figure).

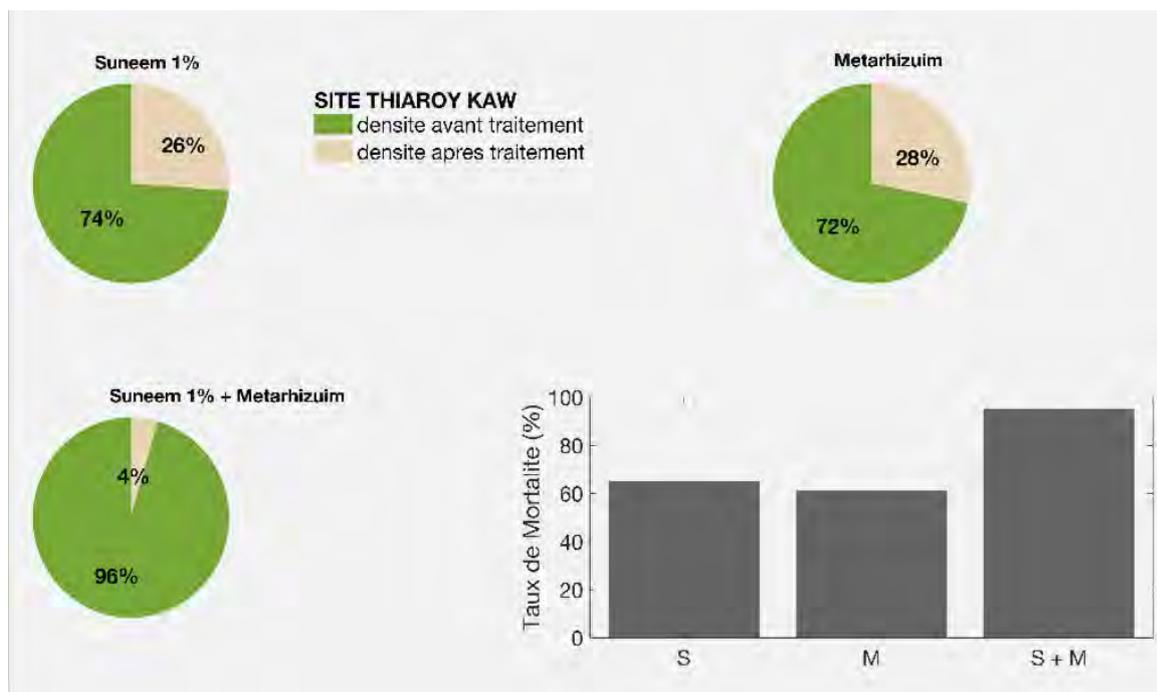


Figure 66: Distribution des taux de mortalité en fonction des larvicides pour le site de Djida Thiaroye Kao.

Site de Yeumbeul Sud

On voit nettement, d'après ces figures le traitement avec Suneem1%, que la densité larvaire avant traitement est de 73% alors que la densité larvaire après traitement est de 27% soit une nette diminution du nombre des larves d'environ 46%. Ceci montre un effet toxique du Suneem1% avec un pourcentage élevé de mortalités des larves de moustique. Pour le *Metarhizium anisopliae*, la densité larvaire avant traitement est de 71% alors que la densité larvaire après traitement est de 29% soit une nette diminution du nombre des larves d'environ 42%. Ceci montre un effet toxique du *Metarhizium anisopliae* avec un pourcentage élevé de mortalités des larves de moustique.

D'après la figure du mélange, la densité larvaire avant traitement est de 95% alors que la densité larvaire après traitement est de 05% soit une nette diminution du nombre des larves d'environ 90%. Ceci montre un effet toxique du mélange (suneem1% et *Metarhizium anisopliae*) avec un pourcentage élevé de mortalités des larves de moustique. D'après ces figures, avec une forte concentration, on a un pourcentage de mortalité élevé. Dans le témoin, il n'y a aucune mortalité (Voir figure).

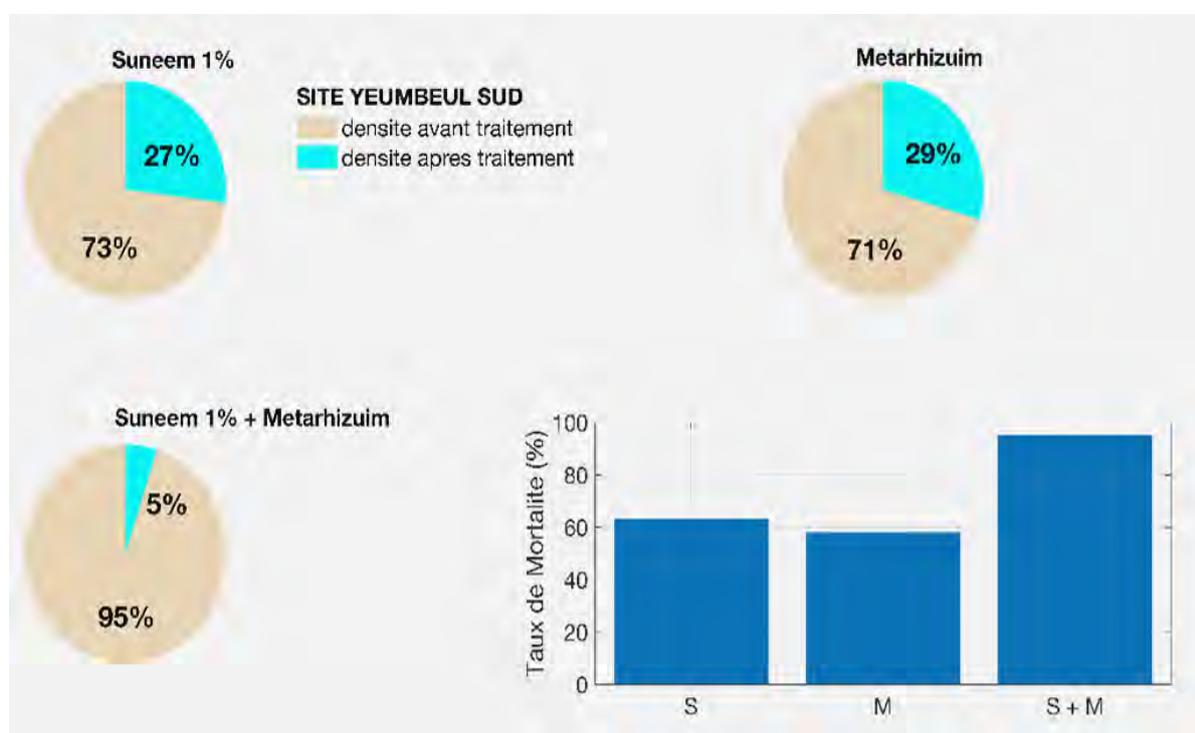


Figure 67: Statistiques de distribution des taux de mortalité des larvicides, site de Yeumbeul Sud
Site de Kaffrine 2 sud

On voit nettement, d'après ces figures le traitement avec Suneem1%, que la densité larvaire avant traitement est de 71% alors que la densité larvaire après traitement est de 29% soit une nette diminution du nombre des larves d'environ 42%. Ceci montre un effet toxique du Suneem1% avec un pourcentage élevé de mortalités des larves de moustique. Avec le *Metarhizium anisopliae*, la densité larvaire avant traitement est de 70% alors que la densité larvaire après traitement est de 30% soit une nette diminution du nombre des larves d'environ 40%. Ceci montre un effet toxique du *Metarhizium anisopliae* avec un pourcentage élevé de mortalités des larves de moustique. D'après la figure du mélange, la densité larvaire avant traitement est de 95% alors que la densité larvaire après traitement est de 05% soit une nette diminution du nombre des larves d'environ 90%. Ceci montre un effet toxique du mélange (suneem1% et *Metarhizium anisopliae*) avec un pourcentage élevé de mortalités des larves de moustique. D'après ces figures, avec une forte concentration, on a un pourcentage de mortalité élevé. Dans le témoin, il n'y a aucune mortalité (Voir figure).

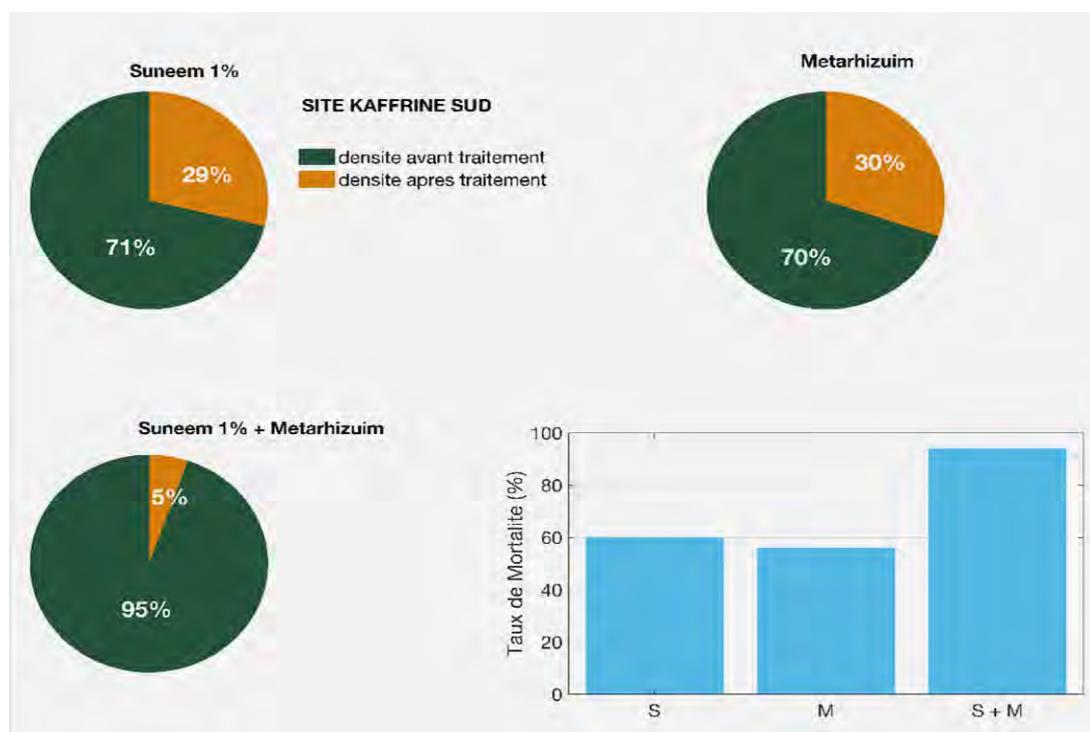


Figure 68: Distributions des taux de mortalité en fonction des larvicides pour le Site de Kaffrine Sud.

Site de Kaffrine 2 Nord

On voit nettement, d'après ces figures le traitement avec Suneem1%, que la densité larvaire avant traitement est de 74% alors que la densité larvaire après traitement est de 26% soit une nette diminution du nombre des larves d'environ 52%. Ceci montre un effet toxique du Suneem1% avec un pourcentage élevé de mortalités des larves de moustique. Pour le *Metarhizium anisopliae*, la densité larvaire avant traitement est de 72% alors que la densité larvaire après traitement est de 28% soit une nette diminution du nombre des larves d'environ 44%. Ceci montre un effet toxique du *Metarhizium anisopliae* avec un pourcentage élevé de mortalités des larves de moustique. D'après la figure du mélange, la densité larvaire avant traitement est de 94% alors que la densité larvaire après traitement est de 06% soit une nette diminution du nombre des larves d'environ 88%. Ceci montre un effet toxique du mélange (suneem1% et *Metarhizium anisopliae*) avec un pourcentage élevé de mortalités des larves de moustique. D'après ces figures, avec une forte concentration, on a un pourcentage de mortalité élevé. Dans le témoin, il n'y a aucune mortalité (Voir figure).

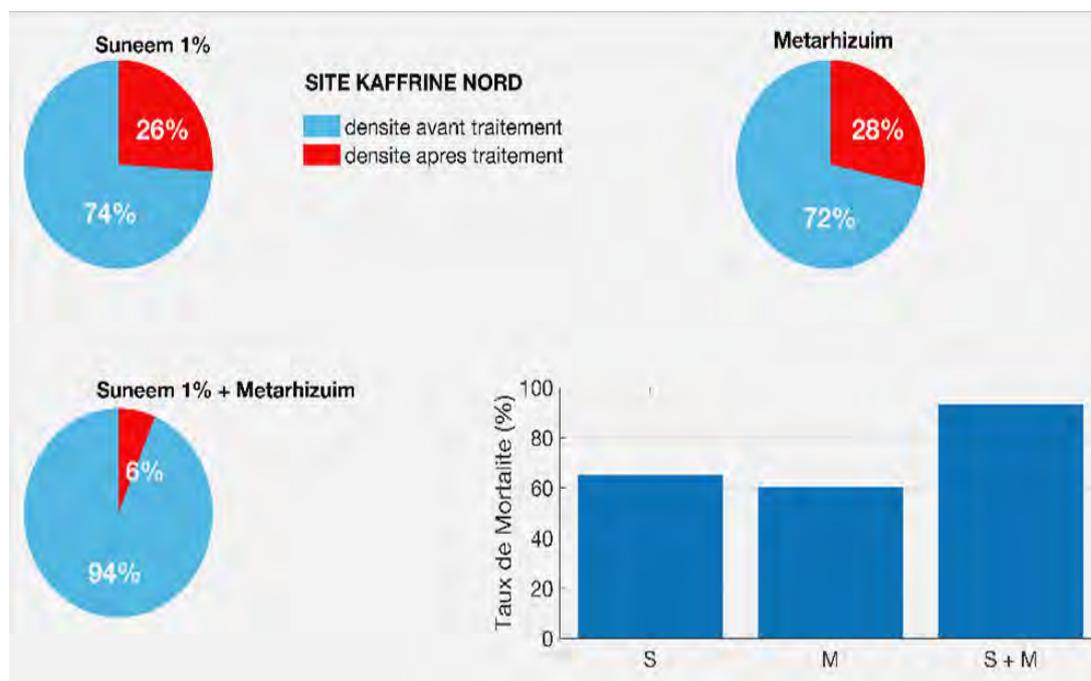


Figure 69: Distributions des taux de mortalité en fonction des larvicides pour le site de Kaffrine Nord.

Site de Goudiry

On voit nettement, d'après ces figures le traitement avec Suneem1%, que la densité larvaire avant traitement est de 75% alors que la densité larvaire après traitement est de 25% soit une nette diminution du nombre des larves d'environ 50%. Ceci montre un effet toxique du Suneem1% avec un pourcentage élevé de mortalités des larves de moustique. Avec le *Metarhizium anisopliae*, la densité larvaire avant traitement est de 70% alors que la densité larvaire après traitement est de 30% soit une nette diminution du nombre des larves d'environ 40%. Ceci montre un effet toxique du *Metarhizium anisopliae* avec un pourcentage élevé de mortalités des larves de moustique. D'après la figure du mélange, la densité larvaire avant traitement est de 97% alors que la densité larvaire après traitement est de 03% soit une nette diminution du nombre des larves d'environ 94%. Ceci montre un effet toxique du mélange (suneem1% et *Metarhizium anisopliae*) avec un pourcentage élevé de mortalités des larves de moustique. D'après ces figures, avec une forte concentration, on a un pourcentage de mortalité élevé. Dans le témoin, il n'y a aucune mortalité (Voir figure).

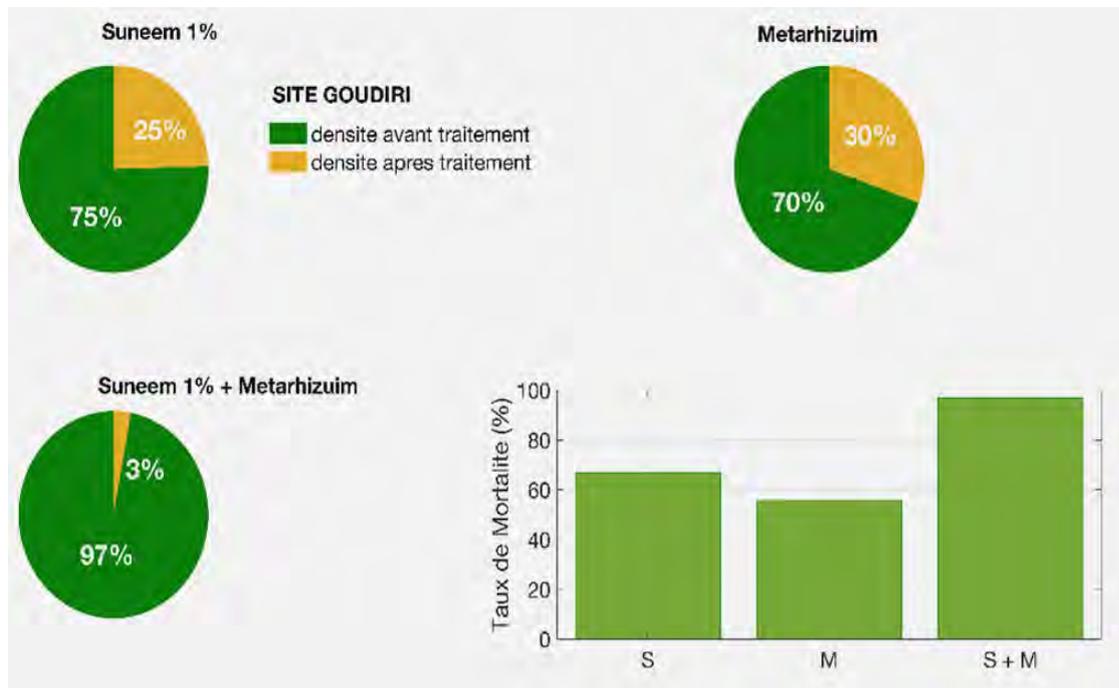


Figure 70: Distributions des taux de mortalité en fonction des larvicides pour le site de Goudiry.

III.3. 5. Pourcentage de mortalité des larves de moustique traitées avec le mélange

Les résultats de traitement avec le mélange sont présentés sous la forme de pourcentages de mortalités larvaires consignés dans le tableau 45.

Tableau XLVI: Pourcentage de mortalité des larves de moustique traitées avec le mélange.

Jours	Sites													
	KM F	MB	PK R10	KM U3	SY 2	KM M	KM L	PG R	D T K	TD S	YS	KF2 S	KF2 N	G
J1	47	49	52	54	46	48	51	53	50	54	49	48	53	50
J2	65	68	64	70	68	69	68	66	65	62	63	90	65	67
J3	93	97	91	96	96	95	94	90	93	90	91	96	98	94

Légende : KFM : « Keur Mbaye Fall », MB : « Mbao Baobab », PKR10 : « Pikine Rue 10 », KM U3 : « Keur Massar U3 », SY2: « Sante Yalla2 », PGR : « Pikine Guinaw Rail », DTK : « Djiddah Thiaroye Kaw », TDS : « Thiaroye Darou Salam », YS : « Yembeul Sud », KF2S : « Kaffrine2 sud », KF2N : « Kaffrine2 nord », G : « Goudiry ».

Ces résultats du tableau 46 montrent une nette augmentation du nombre de larves de moustique mortes après un traitement avec le mélange. On note des mortalités qui atteignent et même dépassent les 50% dans la plupart des gîtes sauf certains (« keur Mbaye Fall », « Mbao Baobab », « Keur Massar Marché » et « Sante Yallah 2 ») où elles tournent autour des valeurs 47% à 49%. La CL50 a été très tôt obtenue après 24 heures de traitement dans les conditions naturelles. La CL90 a été obtenue après 72 heures de traitement. Preuve qu'en milieu naturel, le mélange (Suneem1% et *Metarhizium anisopliae*) semble être le plus efficace et donc le meilleur dans la lutte contre ces larves de moustique.

D'après l'analyse du tableau 46, nous notons une évolution de la mortalité de manière verticale et horizontale. Ainsi de manière verticale, le pourcentage de mortalité augmente vertigineusement en fonction des doses administrées. Et de manière horizontale le pourcentage de mortalité augmente en fonction du temps de traitement. L'analyse montre que l'effet du mélange a commencé dès le 1er jour et varie de 47% à 54% pour le premier jour, et entre 62% à 90% au 2^e jour de traitement. Cet effet larvicide est plus prononcé au fur et à mesure qu'on avance dans le temps pour atteindre un taux de mortalité de plus de 90%, au

3^{ème} jour ; pour cette concentration la plus élevée de 40ml d'azadirachtine +10mg de spores de *Metarhizium anisopliae*.

Cet effet larvicide est plus prononcé au fur et à mesure qu'on avance dans le temps pour atteindre un taux de mortalité de 98 % selon les gîtes au 3^{ème} jour. Les résultats obtenus ont été traduits en courbes (Figure 73) pour mieux connaître les niveaux de mortalité. Les résultats relatifs aux pourcentages de mortalités moyennes des larves traitées pour le mélange sont mentionnés dans le tableau 46 et représentés par la figure 73. Les pourcentages de mortalité corrigés sont égaux aux pourcentages de mortalités observés et une mortalité supérieure à 50% a été observée à partir du 1^{er} jour. Les courbes des mortalités cumulées représentent de manière comparative les mortalités du mixte (suneem1% et *Metarhizium anisopliae*), du suneem1% et du *Metarhizium anisopliae*. La figure 73 présente la même allure et évolue dans le même sens, se caractérisent par une évolution exponentielle dans le temps en réponse aux doses auxquelles les larves ont été soumises. En effet, les mortalités sont plus accentuées et plus rapides pour le mélange suivi du suneem1%, et du *Metarhizium anisopliae*.

Ces graphes ci-dessous illustrent cumulativement trois (3) phénomènes que sont :

- Une différence de mortalité des larves de moustique pour les trois (3) biopesticides (Suneem1%, *Metarhizium anisopliae* et mélange).
- Une toxicité différentielle des biopesticides
- Une efficacité différente vis-à-vis des larves de moustique

Pour les sites les mêmes phénomènes s'observent du point de vue mortalité, toxicité et efficacité. En effet pour le cas de Kaffrine 2 Sud nous notons une légère sensibilité par rapport aux autres sites visibles sur la figure. L'efficacité du produit est affectée par les conditions physicochimiques de l'eau (t° ph salinité)

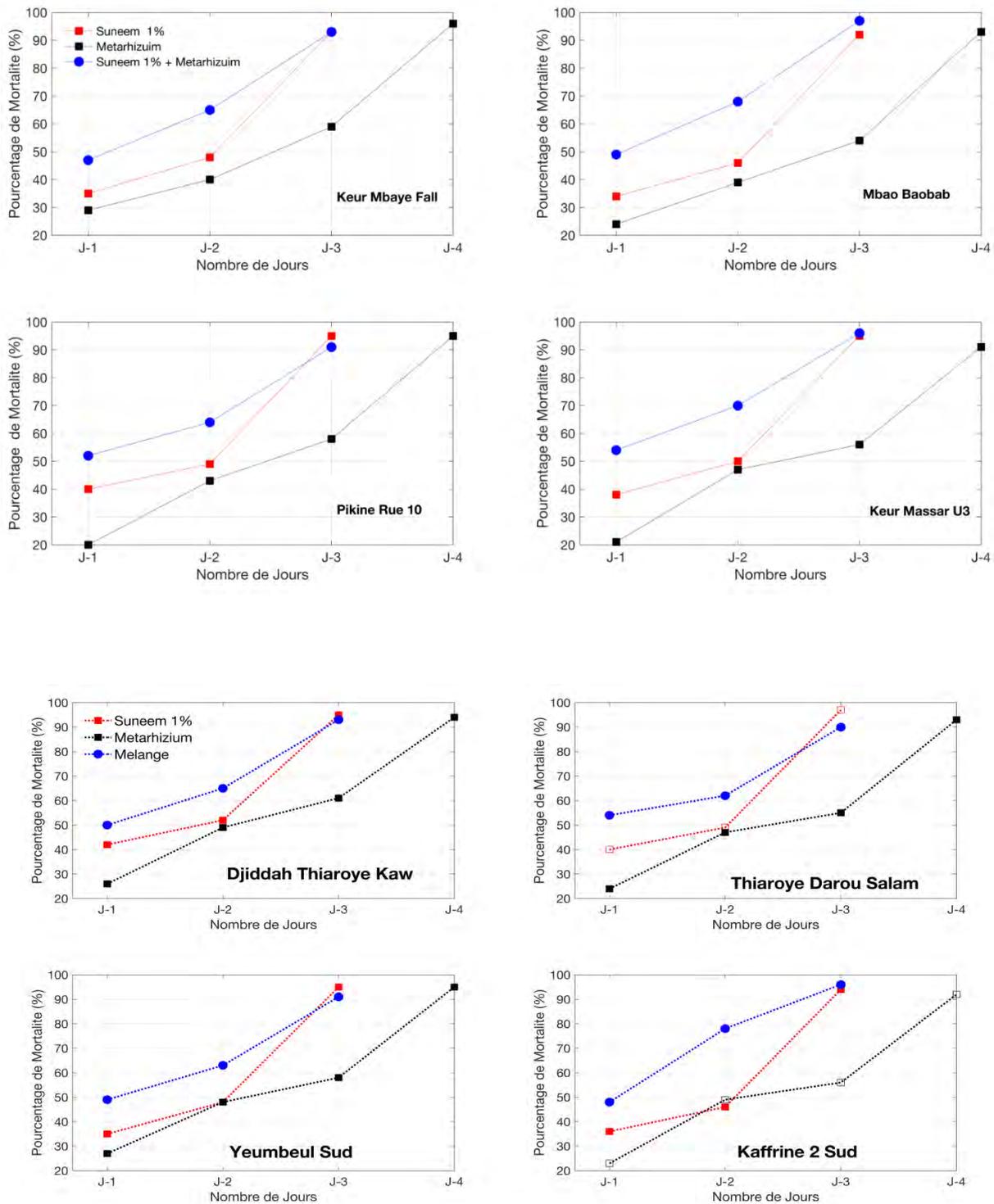


Figure 71: Comparaison des pourcentages de mortalité des larves de moustique pour les deux biopesticides utilisés (Suneem1%, *Metarhizium anisopliae*) et leur mélange dans les différents sites.

Les graphes de la figure 73 montrent que les larves se trouvant dans certains sites sont plus sensibles au mélange (c'est le cas de Kaffrine 2 sud qui s'est détaché à partir du deuxième jour de traitement) et où on a une augmentation très significative du nombre de larves mortes. Les autres sites se comportent de la même façon avec la même allure. Au troisième jour, il n'y a pas de différence significative du point de vue du nombre de larves mortes entre les différents sites larvaires traités. La CL50 est atteinte au premier jour de traitement au niveau des sites traités avec le mélange. La CL90 est atteinte au troisième jour de traitement au niveau des sites larvaires traités avec le mélange. Les graphes de la figure 73 illustrent l'allure de la progression des pourcentages de mortalité des larves de moustique traitées par le mélange. Nous remarquons une augmentation du pourcentage de mortalité des larves traitées avec le mélange. L'augmentation est très tôt notée au 1^{er} jour de traitement entre 47% et 54% de mortalité, entre 62% et 90% pour le deuxième jour et entre 90% et 94% pour le troisième jour avec la même concentration.

III.3.6. Analyse statistique de Bayes des résultats

L'analyse statistique de Bayes a révélé une différence très significative entre les pourcentages de mortalité des larves de moustique pour les différentes concentrations et à différents temps avec $P = 0.000$ pour l'effet des deux biopesticides et de leur mélange. L'analyse statistique de Bayes a permis de classer les biopesticides selon leur efficacité et selon leur toxicité. En effet, le mélange est plus efficace suivi du Suneem 1% et du *Metarhizium anisopliae*.

L'analyse statistique de Bayes montre une différence significative entre les différentes mortalités enregistrées pour les larves traitées et les témoins, à différents niveaux de temps et à différentes doses avec un niveau de probabilité ($P = 0,000$)

Entre le mélange et le *Metarhizium anisopliae*

La différence d'amplitude est entre 34,9% et 38,7% avec une probabilité de 95%. Cela veut dire qu'à 95% que le mélange est au moins plus important que le *Metarhizium anisopliae*. En moyenne le mélange est statistiquement de 34,9 fois plus efficace que le *Metarhizium anisopliae*. Nous avons fait une simulation pour savoir qu'elle est la moyenne de mortalité entre 93,1% et 95,2% c'est-à-dire si nous faisons l'expérience plusieurs fois sur plusieurs sites nous trouverions la même moyenne entre 64% et 67% avec une probabilité de 95% (High Density Intervall (HDI)).

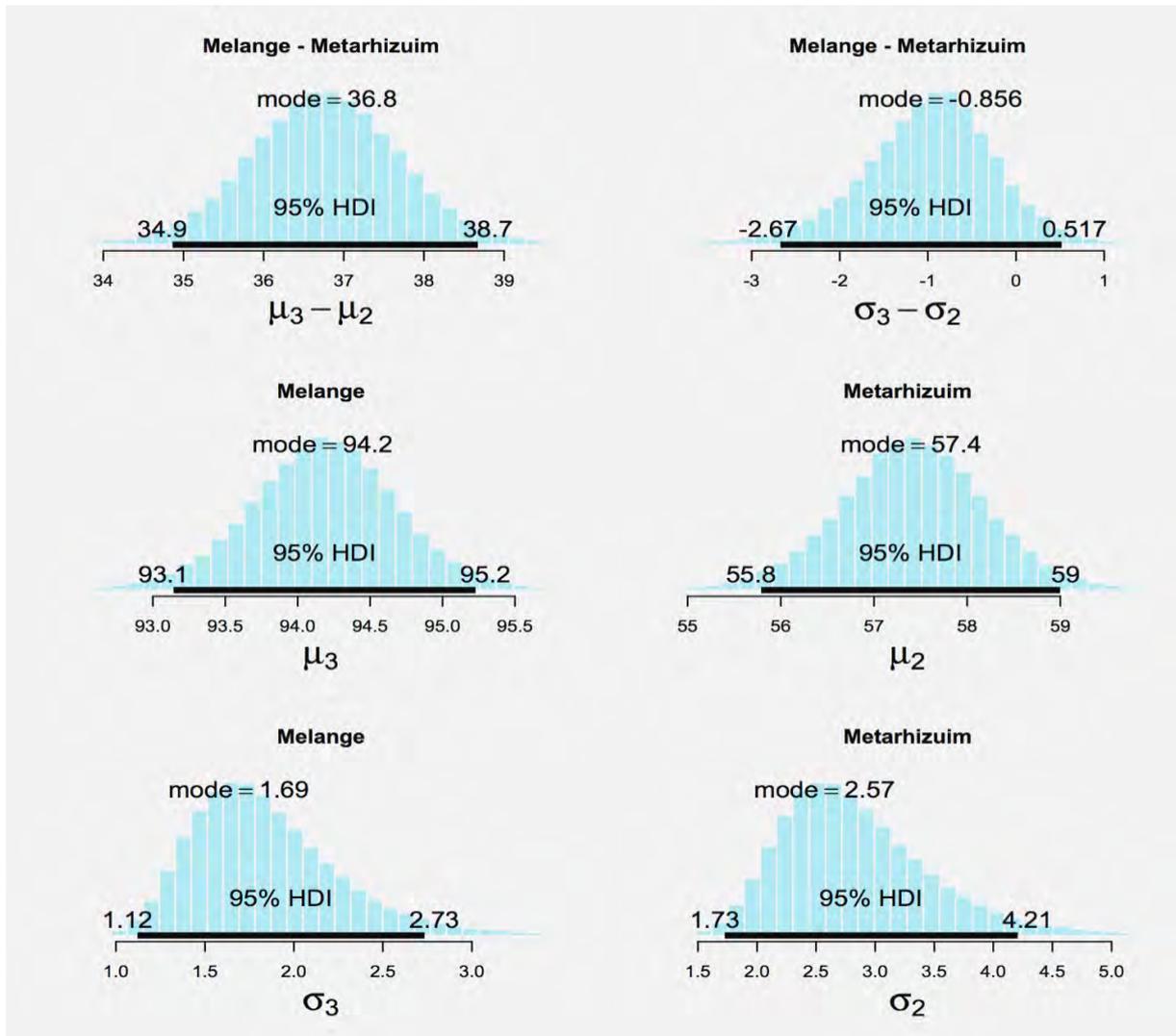


Figure 72: l'analyse statistique des Bayes entre les larvicides le *Metarhizium anisopliae* et le mélange

Entre le Mélange -Suneem1%

La difference d'amplitude est entre 26,4% et 30,5% avec une probabilité de 95%. Cela veut dire qu'à 95% que le Suneem1% est au moins plus toxique que le mélange. En moyenne le mélange est statistiquement 26,4 fois plus efficace que le Suneem1%. Nous avons fait une simulation pour savoir qu'elle est la moyenne de mortalité entre 93,1% et 95,2% c'est-à-dire si nous faisons l'expérience plusieurs fois sur plusieurs sites nous trouverions la même moyenne entre 93,1% et 95,2% avec une probabilité de 95% (Hight Density Intervall (HDI)).

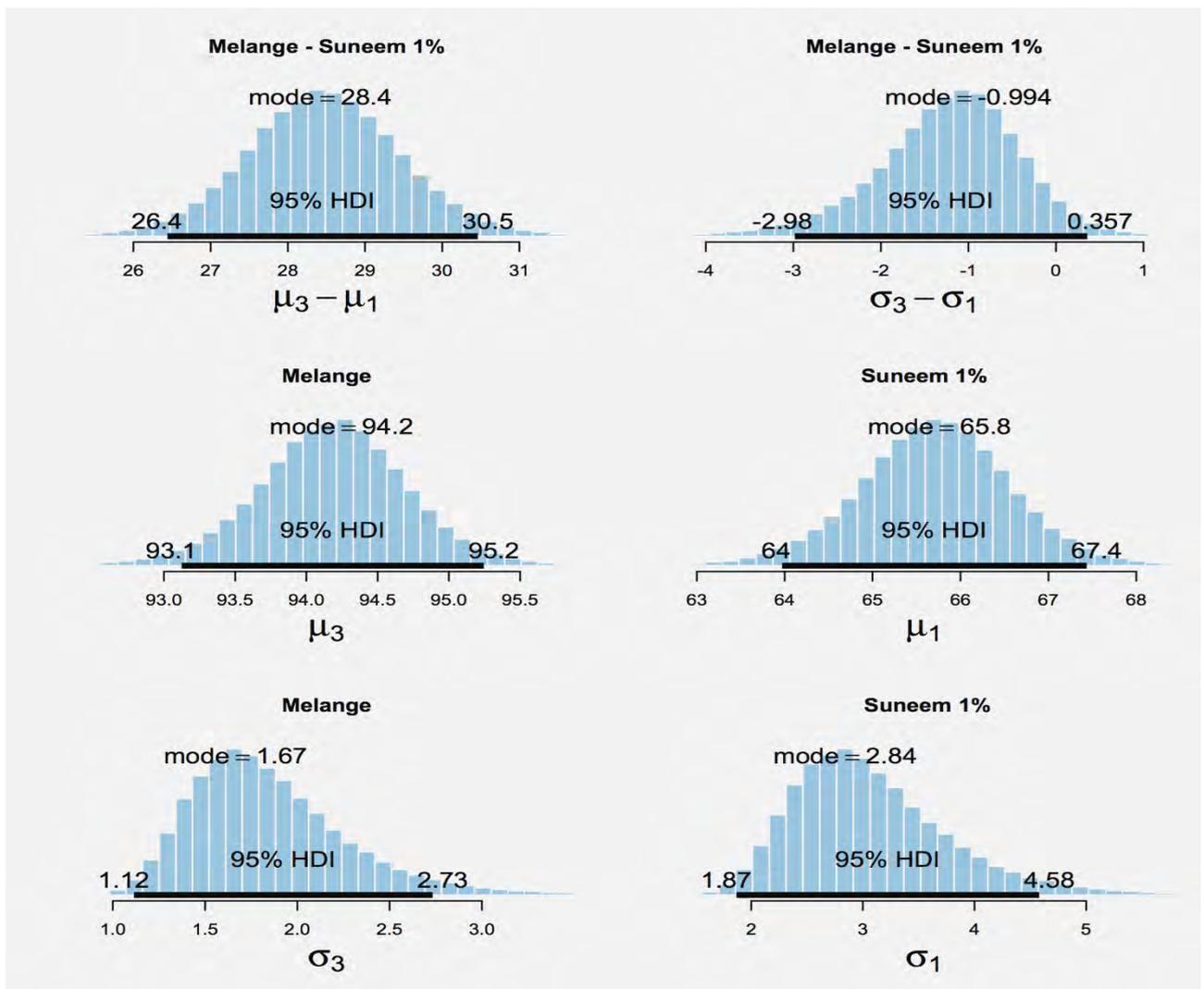


Figure 73: L'analyse statistique de Bayes entre les larvicides du Suneem 1% et le mélange

Entre le Suneem1% et le *Metarhizium anisopliae*

La difference d'amplitude est entre 5,90% et 10% avec une probabilité de 95%. Cela veut dire qu'à 95% que le Suneem1% est au moins plus important que le *Metarhizium anisopliae*. En moyenne le Suneem1% est statistiquement 5,9 fois plus efficace que le *Metarhizium anisopliae*. Nous avons fait une simulation pour savoir qu'elle est la moyenne de mortalité entre 64% et 67% c'est-à-dire si nous faisons l'expérience plusieurs fois sur plusieurs sites nous trouverions la meme moyenne entre 64% et 67% avec une probabilité de 95% (Hight Density Intervall (HDI)). Le mélange est au moins 26 fois plus efficace que le suneem1% traité seul à une probabilité de 95%. En moyenne le mélange est 28,4 fois plus efficace que le

suneem1%. La différence est entre 26,4% et 30,5% de pourcentage de mortalité avec une probabilité de 95%.

Suneem1% - *Metarhizium anisopliae*

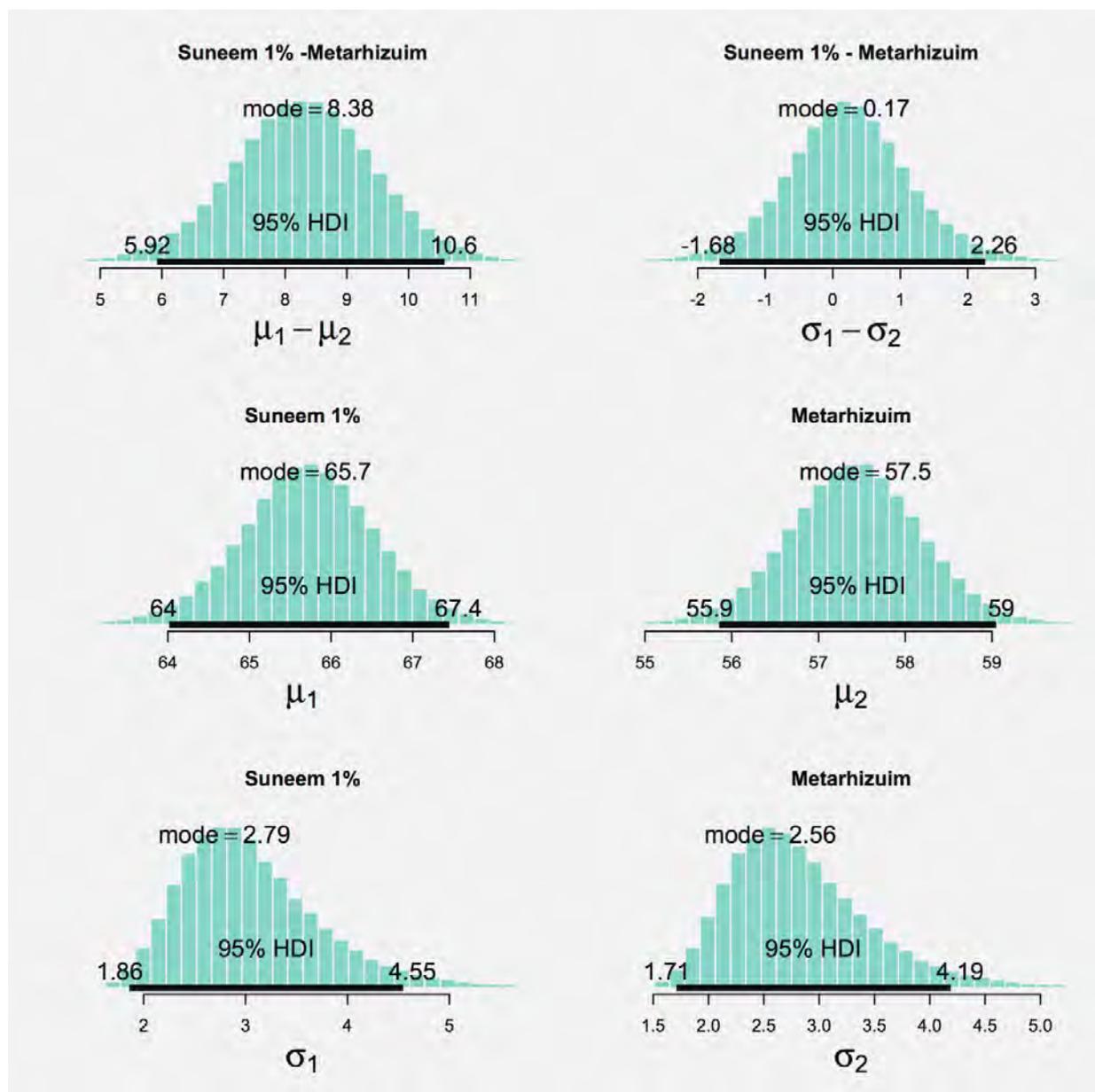


Figure 74: Analyse statistique de Bayes entre le Suneem 1% et le *Metarhizium anisopliae*

III.3. 7. Pourcentage de mortalité des larves de moustique traitées avec *Metarhizium anisopliae*

Les résultats de traitement avec *Metarhizium anisopliae* sont présentés sous la forme de pourcentage de mortalités larvaires consignées dans le tableau 47. Les résultats relatifs aux pourcentages de mortalités moyennes des larves traitées par *Metarhizium anisopliae* sont mentionnés dans le tableau 46 et représentés par la figure 77.

Tableau XLVII : Pourcentage de mortalité des larves de moustique traitées par *Metarhizium anisopliae* après 4 jours.

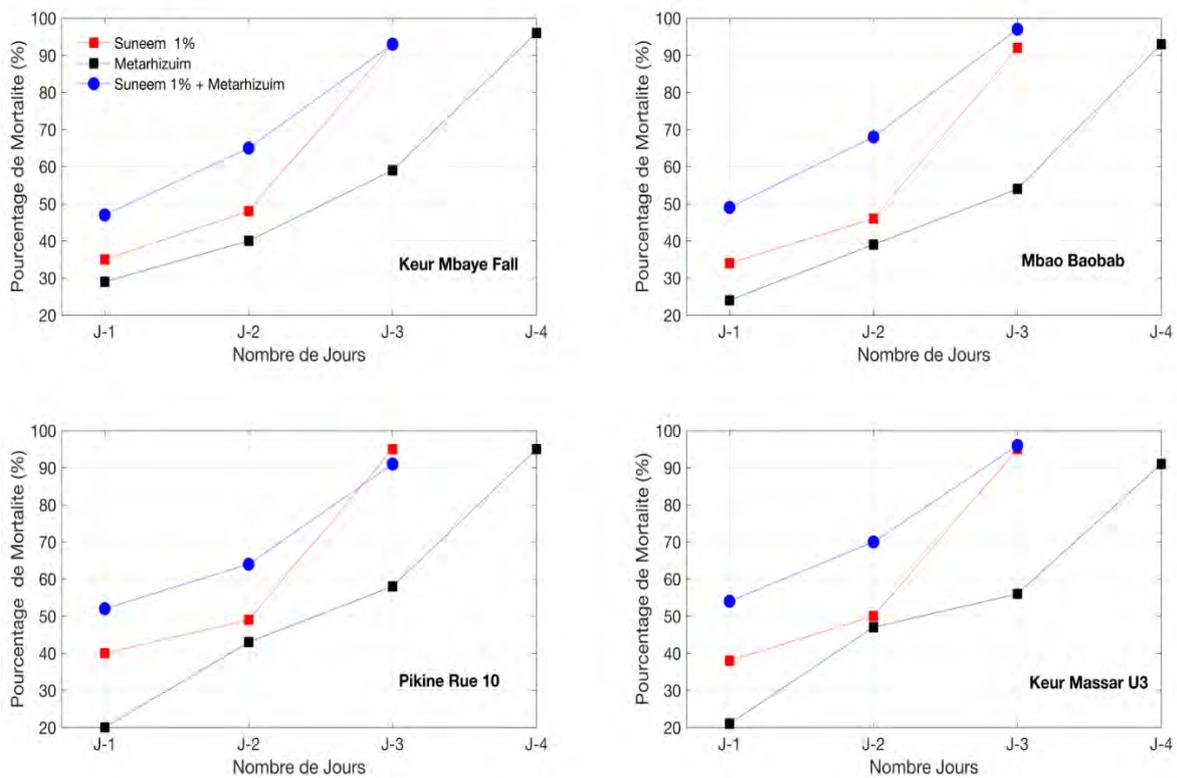
Jours	Sites													
	K MF	M B	PK R1 0	K M U3	SY 2	K M M	K M L	PG R	D T K	TD S	Y S	KF 2S	KF2 N	G
J1	29	24	20	21	25	23	27	30	26	24	27	23	29	28
J2	40	39	43	47	49	38	36	51	49	47	48	49	52	50
J3	59	54	58	56	60	58	52	60	61	55	58	56	60	56
J4	96	93	95	91	97	90	91	96	94	93	95	92	94	95

Légende : KFM : « Keur Mbaye Fall », MB : « Mbao Baobab », PKR10 : « Pikine Rue 10 », KM U3 : « Keur Massar U3 », KMM : « Keur Massar Marché », KML : « Keur Massar Lycée », PGR : « Pikine Guinaw Rail », DTK : « Djiddah Thiaroye Kaw », TDS : « Thiaroye Darou Salam », YS : « Yembeul Sud », SY1 : « Sante yalla1 », SY2 : « Sante yalla2 », KF2S : « Kaffrine2 Sud », KF2N : « Kaffrine2 Nord », G : « Goudiry ».

Ces résultats du tableau 47 montrent une nette augmentation du nombre de larves de moustique mortes après un traitement avec le *Metarhizium anisopliae*. On note des mortalités qui atteignent et même dépassent les 50% dans la plupart des gîtes sauf certains (« keur Mbaye Fall », « Mbao Baobab », « Keur Massar Marché » et « Sante Yallah 2 ») où elles tournent autour des valeurs 47% à 49%. La CL50 a été très tôt obtenue après 48 heures de traitement dans les conditions naturelles. La CL90 a été obtenue après 96 heures de

traitement. Preuve qu'en milieu naturel, le mélange (Suneem1% et *Metarhizium anisopliae*) semble être le plus efficace et donc le meilleur dans la lutte contre ces larves de moustique. Les courbes de la figure 77 ci-dessous illustrent cumulativement trois (3) phénomènes que sont :

- Une différence de mortalité des larves de moustique pour les trois (3) biopesticides (Suneem1%, *Metarhizium anisopliae* et mélange) .
- Une toxicité différentielle des biopesticides
- Une efficacité différente vis-à-vis des larves de moustique



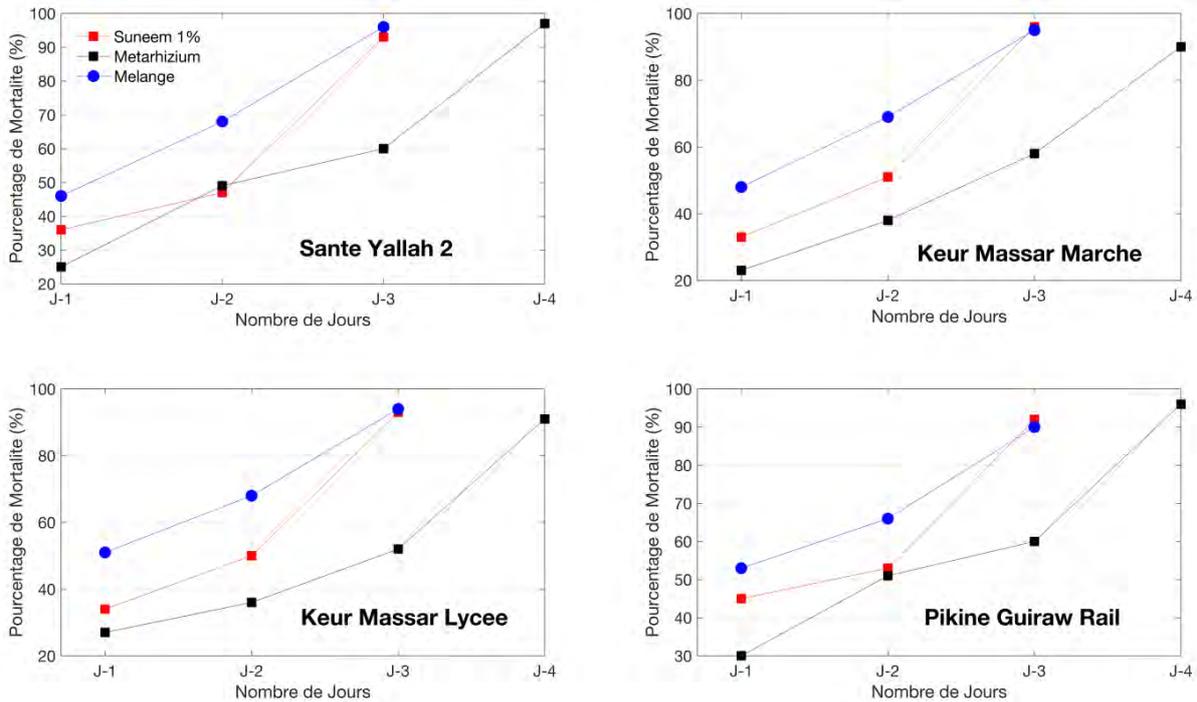


Figure 75: Comparaison des pourcentages de mortalité des larves de moustique pour les deux biopesticides utilisés (Suneem1%, *Metarhizium anisopliae*) et leur mélange dans les différents sites.

D'après la Figure 75, les pourcentages de mortalité des larves de moustique traitées avec les deux biopesticides (Suneem1%, *Metarhizium anisopliae*) et leur mélange dans les différents sites ont montré qu'en fonction du temps le nombre de larves de moustique mortes augmentent dans tous les sites de traitement. Au troisième jour il n'y a pas de différence significative du point de vue nombre de larves mortes entre les différents sites larvaires traités. La CL50 est atteinte au premier jour de traitement des sites larvaires traités avec le suneem1%. La CL90 est atteinte au troisième jour de traitement des sites larvaires traités avec le suneem1%.

III.3. 8. Pourcentage de mortalité des larves de moustique traitées avec le Suneem 1%.

Les résultats de traitement avec le Suneem 1% sont présentés sous la forme pourcentage de mortalité des larves de moustique consignés dans le tableau ci-dessous.

Tableau XLVIII: Pourcentage de mortalité des larves de moustique traitées avec le Suneem 1%.

Jours	Sites													
	KM F	M B	PKR10	K M U3	SY 2	KM M	KM L	PG R	DT K	TD S	Y S	KF2 S	KF2 N	G
J1	35	34	40	38	36	33	34	45	42	40	35	36	39	37
J2	48	46	49	50	47	51	50	53	52	49	48	46	54	55
J3	93	92	95	95	93	96	93	92	95	97	95	94	93	97

Légende : KFM : « Keur Mbaye Fall », MB : « Mbao Baobab », PKR10 : « Pikine Rue 10 », KM U3 : « Keur Massar U3 », PGR : « Pikine Guinaw Rail », DTK : « Djiddah Thiaroye Kaw », TDS : « Thiaroye Darou Salam », YS : « Yembeul Sud », KF : « Kaffrine », G : « Goudiry ».

Ces résultats du tableau 48 montrent une nette augmentation du nombre de larves de moustique mortes après un traitement avec le Suneem1%. On note des mortalités qui atteignent et même dépassent les 50% dans la plupart des gîtes sauf certains (« keur Mbaye Fall », « Mbao Baobab », « Keur Massar Marché » et « Sante Yallah 2 ») où elles tournent autour des valeurs 47% à 49%. La CL 50 a été très tôt obtenue après 24 heures de traitement dans les conditions naturelles. La CL 90 a été obtenue après 72 heures de traitement. Preuve qu'en milieu naturel, le mélange (Suneem1% et *Metarhizium anisopliae*) semble être le plus efficace et donc le meilleur dans la lutte contre ces larves de moustique. Le tableau 47 montre que l'effet Suneem 1% a commencé dès le 1er jour et met en évidence une évolution nette de mortalité. En effet, le pourcentage moyen de mortalité des larves de moustique est proportionnel aux doses administrées et au temps de traitement.

Il varie de 33% à 45% pour une dose de 50ml le premier jour, de 46% à 55% pour une dose de 50ml le deuxième jour et enfin la variation est entre 92% et 97% pour une dose de 50ml

le troisième jour. Les résultats obtenus ont été traduits en courbes (Figure 75) pour mieux suivre les niveaux de mortalité. Les résultats relatifs aux pourcentages de mortalités moyennes des larves traitées par le Sunneem 1% sont mentionnés dans le tableau 48.

Les courbes des mortalités cumulées représentées sur la figure 78 présentant la même allure et évoluant dans le même sens, se caractérisent par une augmentation dans le temps en réponse aux doses auxquelles les larves ont été soumises.

Ces graphes ci-dessous illustrent cumulativement trois (3) phénomènes que sont :

- Une différence de mortalité des larves de moustique pour les trois (3) biopesticides (Sunneem1%, *Metarhizium anisopliae* et mélange).
- Une toxicité différentielle des biopesticides
- Une efficacité différente vis-à-vis des larves de moustique

Pour les sites les mêmes phénomènes s'observent du point de vue mortalité, toxicité et efficacité. En effet pour le cas de Kaffrine 2 Sud nous notons une légère sensibilité par rapport aux autres sites visibles sur la figure.

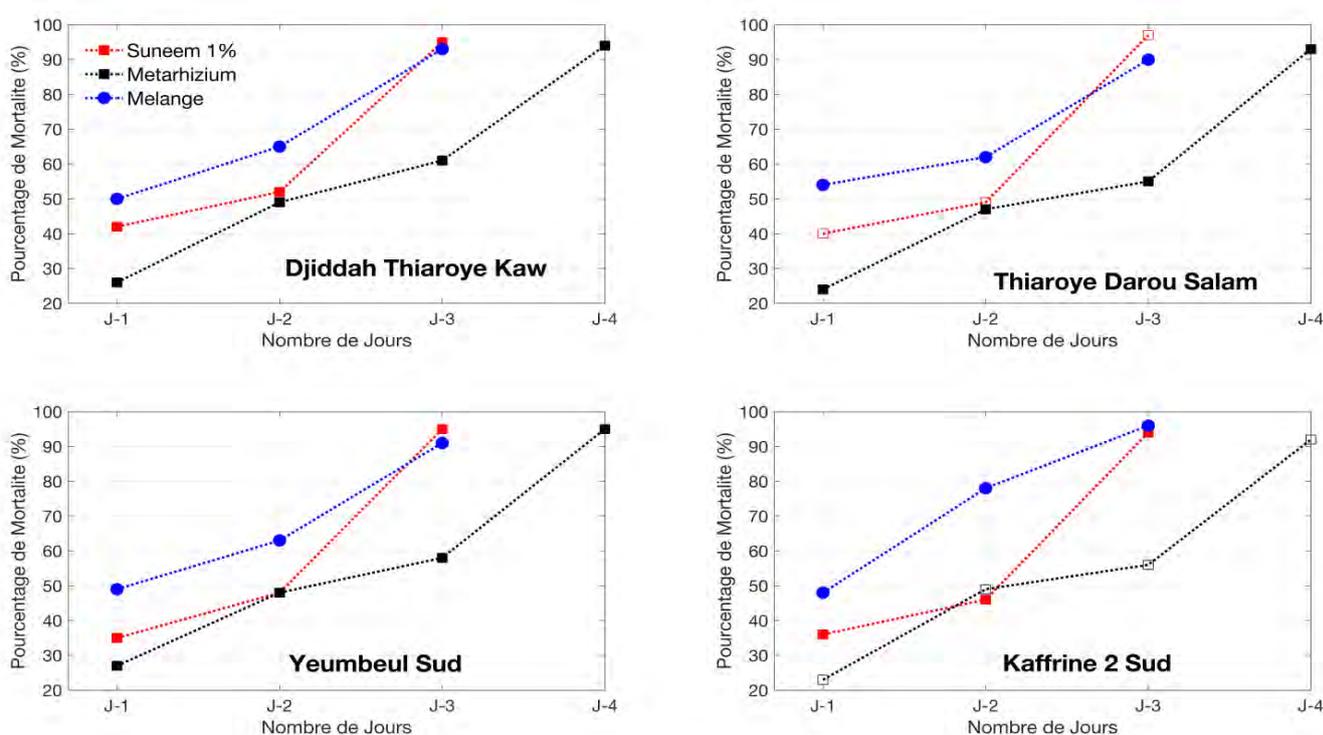


Figure 76: Comparaison des pourcentages de mortalité des larves de moustique pour les deux biopesticides utilisés (Sunneem1%, *Metarhizium anisopliae*) et leur mélange dans les différents sites (Djiddah Thiaroye Kaw, Thiaroye Darou Salam, Yeumbeul Sud).

Au troisième jour il n'y a pas de différence significative du nombre de larves mortes entre les différents sites larvaires traitées. La CL50 est atteinte au premier jour de traitement des sites larvaires traités avec le suneem1%. La CL90 est atteinte au troisième jour de traitement des sites larvaires traités avec le Suneem1%. Ces courbes illustrent l'allure de la progression des pourcentages de mortalité des larves de moustique traitées par le mélange (Suneem 1% et *Metarhizium anisopliae*). Nous remarquons une augmentation du pourcentage de mortalité des larves traitées par le mélange (Suneem 1% et *Metarhizium anisopliae*) avec 40 ml d'azadirachtine +10 mg de spores, l'effet est tout de suite aperçu à partir du 1ier jour de traitement avec un taux qui varie entre 33% et 50% de mortalité, et entre 46% et 55% de mortalité après le 2ème jour et entre 92% et 97% à partir du 3ème jour de traitement.

Ces deux courbes de la Figure 77 montrent pour Kaffrine et goudiry de légères différences quant aux traitements des larves de moustique avec Suneem seul, *Metarhizium anisopliae* seul et le mélange des deux produits. En effet, l'évolution de la mortalité des larves dans le mélange est très rapide dans les deux sites pour le Suneem seul et *Metarhizium anisopliae* seul.

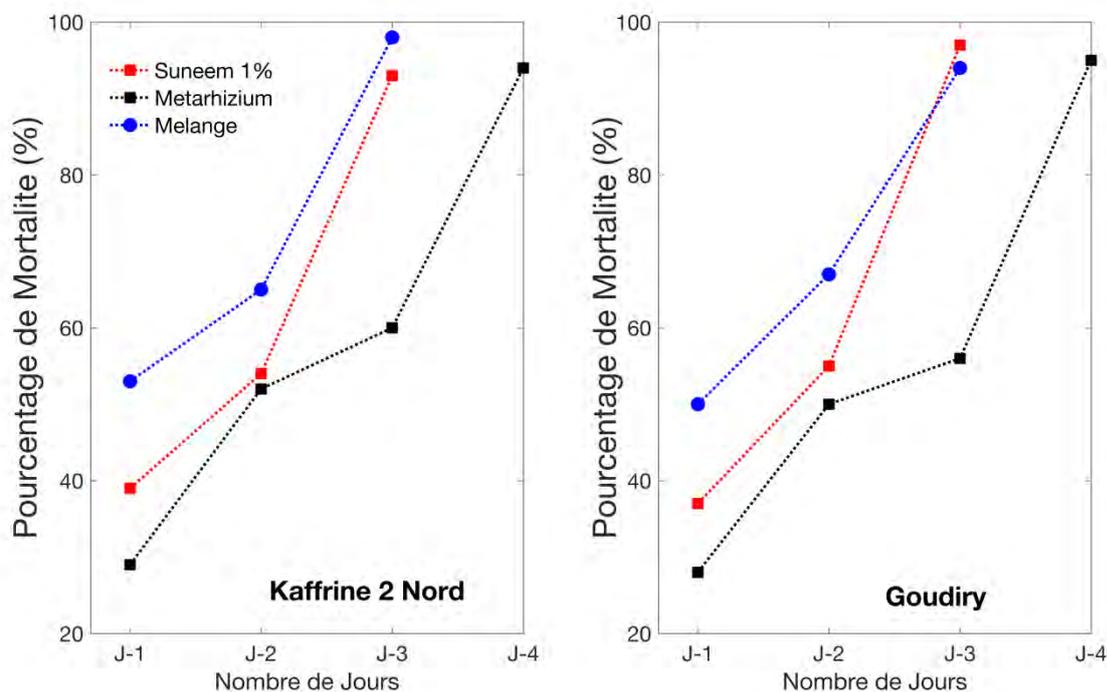


Figure 77: Comparaison des pourcentages de mortalité des larves de moustique pour les deux biopesticides utilisés (Suneem1%, *Metarhizium anisopliae*) et leur mélange dans les différents sites (Kaffrine 2 Nord et Goudiry).

III.4. Discussion

Beaucoup d'insectes sont sensibles aux microorganismes dont les champignons, les bactéries et les virus (Scholte *et al.* 2004). Approximativement, 750 espèces de champignons décrites sont des pathogènes obligatoires ou facultatifs sur un ou plusieurs stades de développement des insectes dans des habitats aquatiques, terrestres et souterrains (McCray *et al.*, 1973).

Dans nos études nous avons montré que le Suneem1% est compatible avec le *Metarhizium anisopliae* et en formulation ils constitueraient un efficace biopesticide contre les larves de moustique. Cependant des études allant dans le sens de la compatibilité entre le Suneem1% et *Metarhizium anisopliae* ont été effectuées par certains auteurs qui trouvent une faible efficacité de la combinaison d'huile de neem 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, Rodrigues-Lagunes *et al.*, 1997, Seye et Ndiaye, 2008). Par contre, l'utilisation d'extraits de graines de neem à une concentration supérieure à 2,5%, peut provoquer un effet fongicide (Rodrigues-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, Sahayraj *et al.*, (2011) ont montré l'importance sur la compatibilité entre les champignons et les 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 les 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'hémoplympe et sporuler vers la surface. Mais également, les spores ingérées par les larves peuvent sécréter des toxines dans le tube digestif et/ou par voie mécanique détruisent les tissus larvaires provoquant la mort larvaire (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).

L'utilisation des produits naturels tels que le Suneem 1%, *Metarhizium anisopliae* et le mélange des deux biopesticides dans la lutte contre les larves de moustiques est plus que d'actualité. En Australie, Rae (2004) a effectué des traitements sur des larves de *Chortoicetes terminifera* (les criquets d'Australie) avec le Green Guard®, formulé à partir d'une souche de *Metarhizium anisopliae*.

Les résultats portant sur l'application du Suneem 1% contre les larves de moustique confirment les travaux d'Attri et Prasad (1980) qui ont montré l'efficacité de l'huile de neem

sur les larves de *Culicidae* et ceux de Scott et Kaushik (2000) sur l'efficacité du Margosan-O® sur les *Culex de quinquefasciatus*, ceux de Sèye *et al.*, (2004) avec l'huile de neem formulée (DL50 à 3 mg/l en 48h) et ceux de Ndione *et al.*, (2007). Lepage *et al.*, (1992) ont utilisé plusieurs souches de champignons entomopathogènes (*Metarhizium anisopliae*, *Cordyceps militaris* et *Tolypocladium cylindrosporum*) afin de lutter contre quelques diptères piqueurs. Ils ont conclu que de toutes les souches testées, *Metarhizium anisopliae* semble le plus intéressant pour la lutte biologique contre les larves de diptères piqueurs. Saint-Louis *et al.*, (2001) ont confirmé que *Metarhizium anisopliae* est un champignon promoteur pour une lutte biologique de par son efficacité sur tous les stades de développement d'un insecte et pourrait être un excellent candidat comme mesure alternative aux pesticides de synthèse dans le cadre d'une lutte biologique ou d'une lutte intégrée. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par Alves *et al.*, (2002) qui ont enregistré un début de mortalité des larves de *Culex quinquefasciatus* traitées par *Metarhizium anisopliae* à partir du 1^{er} jour de traitement.

Les travaux de Ravallec *et al.*, (2003) ont démontré que *Metarhizium anisopliae* avait un effet distinct sur les larves d'*Aedes albopictus*. Ces résultats portant sur les applications d'un champignon entomopathogène tel que *Metarhizium anisopliae* sur les larves d'insectes confirment les travaux de Touré, 2006 qui ont montré que les spores de *Metarhizium anisopliae* ont entraîné la mortalité du criquet sénégalais avec un TL50 de 4 jours et un TL100 de 7 jours pour une dose de $4,3.10^7$ spores/ml.

Notre étude s'inscrit en droite ligne avec ces différents articles publiés. En effet, les résultats de notre étude nous ont permis de noter une diminution considérable avoisinant les 50%, les 70% et 95% pour respectivement les traitements avec *Metarhizium anisopliae*, Suneem1% et le mélange des deux. Ces résultats confirment et même complètent les travaux des auteurs cités précédemment. L'adoption de cette méthode innovante de mélange de biopesticides efficaces créant ainsi un effet synergique dans la lutte contre les larves de *Culex quinquefasciatus* présente plusieurs avantages notamment une diminution des larves de moustiques d'une part et les maladies liées et d'autre part préserver un écosystème déjà fragile. En effet, nos gîtes naturels de traitement ont montré des valeurs moyennes de température, de PH et d'humidité relative respectivement de l'ordre de 30°C, de 10 et de 60%. Les travaux de Blanford & Klass (2004) ont conclu que des températures inférieures à 38 °C durant la journée et supérieures à 20 °C durant la nuit sont considérées comme favorables dans la lutte contre les moustiques.

En plus du facteur stimulant qu'est les conditions physicochimiques des gîtes naturels, le facteur temps ou durée de traitement apparaît comme déterminant dans les résultats. Le séjour des larves dans la zone traitée pendant au moins 48 h, procure une meilleure efficacité au traitement. La mortalité et le taux de sporulation après 6h et 24 h d'exposition sont inférieurs à ceux après une exposition de 48 h. Nos résultats ont montré un effet significatif quant à la mortalité des larves. En effet nous avons remarqué que le taux de mortalité des larves témoins utilisées pour les trois tests était nul. Ces mêmes résultats ont été constatés par Alves et al. (2002) où ils n'ont enregistré aucune mortalité des larves témoins durant la période des bio essais.

Cependant le pourcentage de mortalité des larves était de 50% après 24h de traitement avec des quantités de Suneem1% de 50 ml. Ce même taux de mortalité a été enregistré avec les larves traitées avec des quantités de spores de *Metarhizium anisopliae* de 12,5 mg et le mélange avec un mixte de concentration de 40ml d'azadirachtine (Suneem1%) additionnée à 10mg de spores de *Metarhizium anisopliae* (40ml d'azadirachtine +10mg de spores de *Metarhizium anisopliae*). Nos résultats vont dans le même sens que ceux obtenus par Alves et al, (2002) où ils ont enregistré un taux de mortalité 50% des larves de *Culex quinquefasciatus* traitées par *Metarhizium anisopliae* 1037 par le mode de contact après 24h.

Ensuite, nous avons comparé l'efficacité de nos biopesticides sur les larves de moustique, d'après les résultats de mortalité nous avons remarqué que la mortalité des larves traitées avec le mélange est plus rapide et intense par rapport à la mortalité des larves traitées avec suneem1%, *Metarhizium anisopliae* et le mélange. La mortalité complète des larves a été atteinte au 3ème jour pour mélange, au 4ème jour pour le *Metarhizium anisopliae*. Nos résultats corroborent ceux obtenu par Alves *et al.*, (2002) qui ont étudié la comparaison de l'effet des deux champignons *Metarhizium anisopliae* 1037 et *Metarhizium anisopliae* E9 sur les larves de *Culex quinquefasciatus*. Ils ont trouvé que la souche M. anisopliae 1037 est plus virulente que M. anisopliae E9, avec un taux de mortalité de 93,33% après 5 jours de traitement par rapport à un taux de mortalité de 55,55% de M. anisopliae E9 après 5 jours.

D'après Roberts (1967) ce champignon entomopathogène *M. anisopliae* attaque les larves de moustiques préférentiellement par le siphon respiratoire. C'est pourquoi ce germe tue davantage de moustiques lorsqu'il est appliqué à la surface de l'eau. Mais, en fait si les larves sont mises dans des suspensions conidiennes de fortes concentrations (10^7 spores/ml) le champignon peut tuer celles-ci avant toute colonisation fongique intrahémocoelienne. Les

faits rapportés par cet auteur sont en totale concordance avec les résultats de Benserradj et Mihoubi, 2014.

L'étude de la virulence des biopesticides (du suneem1%, *Metarhizium anisopliae*) vis-à-vis de différentes espèces de moustiques a fait l'objet de plusieurs travaux. Des essais au laboratoire réalisés par Daoust et Roberts (1982) pour l'étude de l'effet de cette même souche sur la mortalité des larves de *Culex pipiens* ont révélé un taux de mortalité de 50% après 3 jours de traitement en utilisant une dose de 1mg de conidies. Contrairement à Ramoska (1982) qui a observé ce taux de mortalité au bout d'un mois. Par ailleurs, Mohamed *et al.*, (1983) ont testé la sensibilité-résistance de *Culex pipiens* et *Culex quinquefasciatus* au *Metarhizium anisopliae* (Ma 43 et E9) et ont affirmé que tous les stades du moustique sont très sensibles aux deux souches avec un taux de mortalité allant de 86 à 100% aux plus fortes doses, ce qui va dans le sens de nos résultats.

Lepage *et al.*, (1992) ont utilisé plusieurs souches de champignons entomopathogènes (*Metarhizium anisopliae*, *Cordyceps militaris* et *Tolypocladium cylindrosporium*) afin de lutter contre quelques diptères piqueurs, Ils ont conclu que de toutes les souches testées, *Metarhizium anisopliae* semble plus intéressante pour la lutte microbiologique contre les larves de diptères piqueurs. Dans ce sens Saint-Louis *et al.*, (2001) ont confirmé que *Metarhizium anisopliae* est un champignon promoteur pour une lutte biologique de par son efficacité sur tous les stades de développement d'un insecte et pourrait être un excellent candidat comme mesure alternative aux pesticides de synthèse dans le cadre d'une lutte biologique ou une lutte intégrée.

Les travaux de Ravallec *et al.*, (2003) ont démontré que *Metarhizium anisopliae* avait un effet distinct sur les larves d'*Aedes albopictus*. Ceux-ci ont développé la muscardine verte maladie due à *Metarhizium anisopliae* qui s'est propagé dans tout le corps des larves. En effet, ces mêmes auteurs ont révélé en 2006 que les larves d'*Aedes albopictus* soumises à de fortes doses de *Metarhizium anisopliae* ont montré une mort progressive (100% de mortalité au bout de 20 jours de traitement). Selon eux, si la dose de l'inoculum est assez élevée, les mycotoxines sont libérées dans l'hémocoèle de l'insecte et c'est dans le mésantéron que les spores subissent une protéolyse alcaline (une larve de 4^{ème} stade ingère 3.10^5 spores). Effectivement, au fur et à mesure, les larves finissent par perdre leur capacité digestive.

L'étude de l'effet de nos 2 biopesticides et leur mélange sur la mortalité des larves de *Culex quinquefasciatus*, nous montre que le traitement a mis en évidence une efficacité très

hautement significative comparativement aux témoins et les larves ont été sensibles envers ces biopesticides et leur mélange malgré leur effet différent.

L'analyse statistique de Bayes a révélé une différence très significative entre les pourcentages de mortalité des larves de moustique des genres *Culex*, *Aedes*, *Anophèles* pour les différentes doses et à différents temps avec $P=0.000$ pour l'effet des deux biopesticides et de leur mélange.

Pour les biopesticides champignons l'analyse statistique de Bayes a révélé l'existence de trois biopesticides (Suneem1%, *Metarhizium anisopliae* et mélange) et de ce fait classé les biopesticides selon leur efficacité. Le mélange est le biopesticides le plus efficace contre les larves suivi du Suneem1% et du *Metarhizium anisopliae* ce qui nous a permis de déduire que les biopesticides employés ont été efficaces sur les larves et ont eu le plus d'effet car ils ont permis de tuer plus de 90% de larves et ce dès le 3^{ème} jour de traitement avec le mélange et le Suneem1% seul, le 3^{ème} jour de traitement avec *Metarhizium anisopliae*. Cependant les larves témoins n'ont subi aucune dose de traitement.

Les concentrations de 50 ml de Suneem1%, de 12,5 mg de spores de *Metarhizium anisopliae* et un mixte de concentration de 40 ml d'azadirachtine (Suneem1%) additionnée à 10 mg de spores de *Metarhizium anisopliae* (40ml d'azadirachtine +10mg de spores de *Metarhizium anisopliae*) sont aussi fortes car elles ont suffi à tuer plus de 90% des larves de moustique au bout de 3 jours.

Nous pouvons également conclure que l'analyse statistique de Bayes explique que les biopesticides employés ont été efficaces. En effet, ils ont permis d'avoir de grands taux de mortalité dans un intervalle de temps compris entre 1 et 4 jours.

Après correction des pourcentages des mortalités obtenues après traitement des larves par les biopesticides, nous avons aussi calculé les CL50, les TL50 les CL90, les TL90. Nos résultats ont abouti à une CL50 obtenue après 24 heures (TL50) de traitement et à une CL 90 obtenue après 72 heures de traitement (TL90) avec le Suneem1% dans les conditions naturelles. La CL 50 a été obtenue après 48 heures (TL50) de traitement et la CL 90 obtenue après 96 heures (TL90) de traitement avec le *Metarhizium anisopliae* dans les conditions naturelles et enfin la CL 50 a été obtenue après 24 heures (TL50) de traitement et la CL 90 a été obtenue après 72 heures (TL90) de traitement avec le mélange dans les conditions naturelles. Les DL50 de ces biopesticides, enregistrés par les différents auteurs sont de $1,09.10^5$ spores/ml sur les larves de *Aedes albopictus* (Hazrat *et al.*, 2012) après 3 jours d'application. et 8ppm pour les larves de *Aedes triseriatus* (Lepage *et al.*, 1992). Quant aux larves de *Culex quinquefasciatus*, les

DL50 obtenues étaient respectivement $1,97.10^4$ spores/ml pour la souche *M. anisopliae* 1037 et $3,01.10^5$ spores/ml pour et *M. anisopliae* E9 (Alves *et al.*, 2002).

Concernant les TL50, notre étude montre qu'ils sont proportionnels aux doses appliquées.

Nos résultats corroborent ceux obtenus par Alves *et al.*, (2002). Ces auteurs ont constaté que les TL50 différaient selon les doses appliquées et les méthodes d'application : un TL50 égal à 1 jour quand ils avaient appliqué des conidies de *Metarhizium anisopliae* à la surface de l'eau et TL50 égale à 3,6 jours après traitement avec la même souche sous forme de spores sèches.

Les résultats de l'effet larvicide des biopesticides (Suneem1%, *Metarhizium anisopliae* et leur mélange) que nous avons obtenus sont en corrélation avec ceux observés par plusieurs auteurs (Alves *et al.*, 2002; Scholte *et al.*, 2005; Amora *et al.*, 2010) et permettent de conclure que les biopesticides testés ont une action pathogène sur les larves de *Culex quinquefasciatus*.

Malgré les bons résultats obtenus, cette étude comporte certaines limites. Une bonne efficacité des biopesticides contre les larves de moustiques en milieu contrôlé et en milieu naturel est constatée, toutefois la durée de l'efficacité résiduelle obtenue en station expérimentale reste à confirmer en milieu naturel. En effet, le nombre limité et la durée d'existence des gîtes larvaires naturels suivis au cours de l'étude ne permettent pas de conclure sur la durée de l'efficacité résiduelle des biopesticides étudiés.

III.5. Conclusion

A l'issue de nos travaux dans le milieu naturel nous pouvons retenir que :

Le Suneem1% seul est plus efficace dans la lutte contre les larves de moustique que le *Metarhizium anisopliae* seul qui lui aussi est efficace dans la lutte contre les larves de moustique ; Les deux produits sont compatibles ; Le mélange (Suneem1% et *Metarhizium anisopliae*) est plus efficace que les deux biopesticides pris isolément dans la lutte contre les larves de moustique. Les biopesticides testés en milieu contrôlé et en milieu naturels ont causé la mortalité des larves de culex. Le mélange a causé le plus fort taux de mortalité des larves de moustique. Les résultats soutiennent l'hypothèse que les biopesticides testés étaient pour les larves de moustique et ont provoqué une réduction importante de la population larves dans les gîtes lorsqu'ils sont appliqués en formulation de poudre et d'huile. La recherche sur l'utilisation des biopesticides comme agents de lutte biologique contre les larves de moustique montrent qu'ils sont efficace dans la lutte contre les larves de moustique. Bien que les biopesticides ont montré un potentiel pour contrôler les larves de moustique, leur efficacité en tant que bio-pesticide dépend de leur capacité à infecter et tuer les larves de *culex*

dans des conditions environnementales des gîtes tels que la température et de l'humidité. Ils devraient être relativement sûr et non-toxique pour les organismes non cibles. En plus de leur efficacité, la capacité des biopesticides pour infecter et tuer les larves de moustique dépend également de la disponibilité, de la densité et de la distribution des produits à atteindre les larves dans les gîtes.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

CONCLUSION GENERALE

Dans ce présent travail de recherche, qui entre dans le cadre de l'axe d'évaluation de l'activité larvicide des biopesticides (Suneem1%, *Metarhizium anisopliae* et leur mélange) contre les larves de moustiques, nous nous sommes intéressé aux aspects efficacité du mélange des deux biopesticides.

La synthèse bibliographique porte essentiellement sur les travaux antérieurs faites par des chercheurs portant sur des connaissances aux différents termes du sujet de mémoire à savoir neem, *Metarhizium anisopliae*, les moustiques. D'après cette étude, il a été démontré que les biopesticides Suneem1% et *Metarhizium anisopliae* étaient larvicides mais à des degrés moindres que l'on pouvait améliorer par la formulation de ces deux biopesticides en un mélange qui est beaucoup plus efficace que les biopesticides pris isolément. Selon certains chercheurs et d'après des connaissances antérieures l'emploi de ces biopesticides agit contre les larves de moustiques et ne favorise que le développement des organismes cibles se trouvant dans les gîtes de traitement. L'étude de l'effet des biopesticides a montré que le taux de mortalité des larves traitées augmente en fonction du temps et de la concentration utilisée. La mortalité a commencé après le 1^{er} jour de traitement avec les deux biopesticides Suneem1% et le mélange (Suneem 1% et *Metarhizium anisopliae*). Cependant le pourcentage de mortalité des larves était de 50% après 24h de traitement avec des quantités de Suneem1% de 50 ml. Ce même taux de mortalité a été enregistré avec les larves traitées avec des quantités de spores de *Metarhizium anisopliae* de 12,5 mg et le mélange avec un mixte de concentration de 40 ml d'azadirachtine (Suneem1%) additionnée à 10mg de spores de *Metarhizium anisopliae* (40ml d'azadirachtine +10mg de spores de *Metarhizium anisopliae*). Comparativement aux témoins, aucune mortalité n'a été observée durant les biotests. En augmentant la concentration, la mortalité devient plus rapide, elle atteint plus de 90% le 3^{ème} jour après traitement par Suneem1% et le mélange, et le 4^{ème} jour après traitement avec *Metarhizium anisopliae*. Les résultats de la TL50 des larves traitées avec les biopesticides montrent que la sensibilité des larves est en fonction de la concentration et du temps. Par contre, les larves traitées par mélange (Suneem 1% et *Metarhizium anisopliae*), leur mortalité était très rapide et intense, car nous avons enregistré 98% de mortalité le 2^{ème} jour de traitement. L'analyse statistique de Bayes a confirmé nos résultats, nous avons constaté qu'il y a un effet significatif des deux facteurs temps et concentration sur la mortalité des larves traitées avec les biopesticides. Les travaux réalisés ainsi que les résultats obtenus peuvent être résumés comme suit :

- l'efficacité du Suneem1% sur les larves de moustique ;
- l'efficacité du *Metarhizium anisopliae* sur les larves de moustique ;
- l'efficacité du mélange de ces deux biopesticides sur les larves de moustique.

En résumé, les résultats de notre recherche nous ont permis de confirmer et de préciser l'importance du potentiel larvicide des biopesticides Suneem1%, *Metarhizium anisopliae* et leur mélange à l'égard des larves de moustiques. Les études en cours sur les principes actifs de ces agents à savoir les toxines du *Metarhizium anisopliae* et l'azadirachtine du Suneem1%, notamment en ce qui concerne l'approfondissement de leurs mécanismes d'action au niveau cellulaire et moléculaire, devraient aider à la compréhension du mécanisme d'agression particulier que manifeste ces biopesticides Suneem1%, *Metarhizium anisopliae* et leur mélange au niveau des larves de moustiques et sur un plan application des résultats de recherche, fournir des données utilisables pour la mise au point de formulations appropriées de ces biopesticides, permettant à la fois le maintien de son potentiel d'infection et l'expression optimale de leurs effets toxiques, ou de leurs métabolites à propriétés insecticides.

En somme, il apparaît pertinent de retenir que Sunnem 1% et *Metarhizium anisopliae* sont très efficaces contre les larves de moustique. Mais cette efficacité apparaît beaucoup plus importante quand ces deux biopesticides sont mélangés. Par ailleurs, en perspective il s'ouvre à la communauté scientifique une utilisation d'entomopathogènes (bactéries ou champignons), de dérégulateurs de croissance dans une lutte biologique beaucoup plus efficace.

Ce travail a fait l'objet de deux publications dans des revues de renommées ainsi que de plusieurs communications dans des journées scientifiques.

PERSPECTIVES

A l'issue de nos travaux, un certain nombre d'axes de recherche nous paraissent très importants à investir :

- l'étude du mode d'action du Suneem1% sur les tissus des larves de moustique,
- l'étude du mode d'action du champignon *Metarhizium anisopliae* sur la cuticule et sur le tube digestif des larves de moustique traitées,
- l'étude de l'effet du mélange entre le Suneem1% et le champignon *Metarhizium anisopliae* sur le tube digestif des larves de moustique traitées.

Dans nos travaux ultérieurs nous continuerons à rechercher l'effet synergique entre le Suneem1% et les champignons sur les larves des trois genres de moustique (*Culex*, *Aedes*, *Anopheles*).

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Abbot, W.S. (1925)**-A method of computing the effectiveness of an insecticide. J. Econ. Entomol. 18:265-267. 1992, Heidelberg, Germany, 176 p.
2. **Aguda et al., (1996) et Gonzalez et al., (1996)** ont vérifié l'effet négatif causé par le neem au *Metarhizium* sur la germination
3. **Aguda RM. Rombach MC. and Shepard BM. 1986.** Effect of "neem" oil on germination and sporulation of the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae*. Int. Rice Res. Newsletter; 11: 34-35.
4. **Ahmed, S.,** Potential of using the neem tree (*azadirachta Indica*) for pest control and rural development. Neem Newsl. 5 (4), 49-55 (1988).
5. **Aliero, B.L. (2003)**- Larvicidal effects of aqueous extracts of *Azadirachta indica* (neem) on the larvae of *Anopheles* mosquito. African journal of Biotechnology Vol.2 (9) : 325-327, September 2003.
6. **Alves et al., (2000)** sur les méthodes de calcul de la compatibilité entre l'huile de neem et le *Metarhizium*.
7. **Alves R.T., Batman R.P., Prior C et Leather S.R. (1998).** Effects of simulated solar radiation on conidial germination of *Metarhizium anisopliae* in different formulations. Crop Prot. 17: 675-679.
8. **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.
9. **Alves(2002)** Potential of some *Metarhizium anisopliae* isolates for control of *Culex quinquefasciatus* (Dipt.Culidae).J.of appl.Ent, 126: 504-509.
10. **Amora S.S.A., Bevilaquaa C.M.L., Feij F.M.C., Pereira R.H.M.A., Alves N.D., Freire F.A.M., Kamimura M.T.K., De Oliveira D.M., Lima E.A.L.A et Rocha. M.F.G. (2010).** The effects of the fungus *Metarhizium anisopliae* var. *acidum* on different stages of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). Acta Tropica. 113 :214–220.
11. **Andersen S.O. (1979).**Biochemistry of insecte cuticle. Annual Review Entomol. 24 :2961.
12. **Anderson J.F et Crabdreadis V. (2001).** Mosquito surveillance for West Nile virus in Connecticut, 2000: isolation from *Culex pipiens*, *Culex restuans*, *Culex salinarius* and *Culiseta melanura*. Emerg Infect Dis.7: 670-674

13. **ANON.** Devastating disease of the neem tree in West Africa. Echo Devel. Notes, Issue 36, North Ft. Myers, FL. (1992).
14. **Attri B.S & Prasad G.R. (1980)**- Neem oil extractive an effective mosquito larvicide. Indian J. Entomol. 42 : 371-374.
15. **Balandrin, M.F., Lee, S.M., Klocke, J.A.,** Biologically active volatile organo-sulfur compounds from seeds of the neem tree, *Azadirachta indica* (Meliaceae). Journal Agric. Food Chem. 36, 1048-1054 (1988).
16. **Becker N. (1998).** The use of *Bacillus thuringiensis* subsp. israelensis (BTI) against mosquitoes, with special emphasis of the ecological impact. Israel. J. Entomol. 63-69.
17. **Beilharz V.C., Parbery D.G et Swart H.J. (1982).** Dodine: A selective agent for certain fungi. T. Br. Mycol. Soc. **79** (3): 507-511.
18. **Benserradj O et Mihoubi I. (2014).** Larvicidal activity of entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* against mosquito larvae in Algeria. Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci. **3** (1): 54-62.
19. **Bidochka M.J et Small C. (2005).** Phylogeography of *Metarhizium*, an insect pathogenic fungus. In: F.E. Vega & M. Blackwell (Eds.) Insect-Fungal Associations. 28-49. Oxford University Press Inc., New York.
20. **Bilton, J.N., Jones, P.S., LEY, S.V., Robinson, N.G., Sheppard, R.N.** Chemistry of insect antifeedants from *Azadirachta indica* (part 1): Conversion from the azadirachtin at the azadirachtinin skeletons. Tetrahedron Lett. 29, 1849-1852 (1988).
21. **Bischoff J.F., Rehner S.A et Humber R.A. (2006).** *Metarhizium frigidum* sp. nov.: a cryptic species of *M. anisopliae* and a member of the *M. flavoviride* complex. Mycologia .**98**:737-745.
22. **Bischoff J.F., Rehner S.A et Humber R.A. (2009).** A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage ,Mycologia, **101** : 512-530.
23. **Boucias D.G et Pendland J.C.(1991).** Attachment of mycopathogens to cuticle. In: The Fungal Spore and Disease Initiation in Plants and Animals. (Cole GT, Hoch HC (Editors). Plenum Press, New York.
24. **Boucias D.G., Pendland J.C et Latge J.P. (1988).** Nonspecific factors involved in attachment of entomopathogenic Deuteromycetes to host insect cuticle. Appl.Environ..Microbiol.**54** :1795-1805.
25. **Boucias DG, Pendland JC. 1998.** Principles of insect pathology. Boston, MA: Kluwer Academic Publishers.568 p.

26. **Boyer S. (2006).** Résistance Métabolique des larves de Moustiques aux insecticides : Conséquences Environnementales. Thèse pour l'obtention du titre de docteur de l'université Joseph Fourier-Grenoble I.78p
27. **Brown A.W.A ., Haworth J et Zahar A.R. (1976).** Malaria eradication and control from a global stand point. J. Med. Ent. **13** :1-25.
28. **Brunhes J., Rhaim A., Geoffroy B., Angel G et Hervy J.P. (1999).** Les moustiques de l'Afrique méditerranéenne. Logiciel d'identification et d'enseignement. IRD édition
29. **Burges D.H.(1998).** Formulation of mycoinsecticides. In: Formulation of microbial biopesticides: beneficial microorganisms, nematodes and seed treatments. Ed. by Burges HD, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 31-185.
30. **Butt T.M et Becket A. (1994)** . Pathogenicity of entomogenous fungi *Metharizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* against crucifer pests and the honeybee. Biocontr.Sci.Techn. **4** :207-214.
31. **Butt T.M., Ibrahim L., Ball B.V et Clark S.J. (1994).** Pathogenicity of the entomogenous fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* against crucifer pests and the honey bee. Biocontr;. Sci. Technol. **4** :207-214
32. **Butt TM. (1990).** Fungal infection processes. A Mini-Review 5th Int. Colloquium of Invertebrate Pathology. Adelaide. Soc. Inverbr. Pathol. 121-124.
33. **Butterworth, J.H., Morgan, E.D.,** Investigation of the locust feeding inhibition of the seeds of neem tree, *Azadirachta Indica*. J. Insect. Physiol ., **17**: 969-977 (1972).
34. **Butterworth, J.H., Morgan, E.D.,** Isolation of a substance that supresses feeding in locusts. J. Chem. Soc. Chem. Comm. 23-24 (1968).
35. **Cachereul A. (1997).** Les moustiques : cycle de développement
36. **Cavalier M. (1976).** Cours de phytopharmacie. Ed. Institut National Agronomique, T.1, El- Harrach, 514 p.
37. **Champagne, D.E., Isman, M.B., Towers, O.H.N.,** Insecticidal activity of phytochemicals and extracts of the Meliaceae. In ARNASON, J.T., PHILOGENE, B.J.R., MORAND, P. [Eds.] Insecticides of Plant Origin. ACS Symp. Ser. 387, American Chemical Society, Washington, DC, pp. 95-109 (1989).
38. **Charnley A.K et St Leger. (1991).** The role of cuticle degrading enzymes in fungalpathogenesis of insects. In :The fungal spore and disease initiation in plants an animals. Plenum Publishing Co.,New York, p 267-286.

39. **Charnley A.K. (1989)** .Mechanisms of fungal pathogenesis in insects. In :Biotechnology of fungi for improving plant growth.Whipps JM, Lumsden RD (eds), Cambridge Univ .Press ,UK .p.85-123
40. **Chase A.R., Osborne L.S et Ferguson V.M. (1986)**.Selective isolation of the entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* from an artificial potting medium. Fla. Entomol. **69** (2): 285-292.
41. **Chauvet G.(1978)**. Lutte biologique contre les vecteurs d'affections humaines et tropicales. Moyens actuels et perspectives. Méd.Trop. **6** : 651- 657.
42. **Chauvet G., Ravaonjanahary C. et Brunhes J. (1971)**. Sensibilité et résistance à divers insecticides organophosphorés chez *Culex pipiens fatigans* Wied. En milieu urbain à Madagascar. C.R. Soc. Biol.**165** (2) : 444-484.
43. **Cherton J.C., Lange C., Mulheim C., Pais M., Cassier P et Vey A. (1991)**.Direct in vitro and in vivo monitoring of destruxins metabolism in insects using internal surface reversed-phase high performance liquid chromatography; I. Behaviour of E destruxin in locusts. J. Chromatogr. B . **566** :511–524.
44. **Chevillon C. (1994)**. Evolution de mécanismes adaptatifs : flux géniques, sélection et contre sélection. Thèse de doctorat, Université de Montpellier,140 p .
45. **Chopra, I.C., Gupta, K.C., and Nazir, B.N.**, Preliminary study of antibacterial substance from *Melia azadirachta*. Indian Journal of Medical Research, 40, 511-515 (1952).
46. **Clark H.E, Geldriche E.F.B, Kabler P.W et Huff C.B.(1985)**.Identification of Industrial microorganismes. Appl. Microbiol. Process Biochem. **30** :723-727.
47. **Clark T.B., Kellen W.R. , Fukuda R et Lindegren, J. E. (1968)**. Field and laboratory studies on the pathogenicity of the fungus *Beauveria bassiana* to three genera of mosquito. J. Invertebr. Pathol. **11**: 1-8.
48. **Clarkson J.M et Charnley A.K. (1996)** .New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects,TrendsMicrobiol.**4** :197-204.
49. **Clements A.N. (1992)**. Biology Of Mosquitoes : Development, Nutrition And Reproduction Chapman & Hall, London
50. **Cloutier C et Cloutier C. (1992)**. Les solutions biologiques de lutte pour la répression des insectes et acariens ravageurs des cultures. Dans: La lutte biologique, Tech & Doc Lavoisier (Vincent, c., Coderre, D.) 671p.

51. **Coosmans M., Barutwanayo M et Delacoelette C.H. (1992).** Lutte anti-paludique intégrée dans une région rizicole au Burundi. Mém. Soc. belge. Ent. **35** :97-101.
52. **Dagnelie B. (1975).** Théorie et méthodes de statistiques : applications agronomiques. Ed.Presse agronomique de Gembloux, Vol. II, Gembloux, 459 p
53. **Danis M & Mouchet J. (1991)-** Paludisme, Edition Marketing/ Ellipses, 1991 I.S.S.N 0993 ; 3948, N° L 37094, 240p.
54. **Daoust R.A., Ward M.G et Roberts D.W. (1982).**Effect of formulation on the virulence of *Metarhizium anisopliae* conidia against mosquito larvae, *J .Invertebr.Pathol*, **40** :228–236.
55. **Darriet F. (1998)-** La lutte contre les moustiques nuisant et vecteurs de maladies. L'évolution de nouveaux insecticides utilisables contre les moustiques en Afrique tropicale. Edition Kartala ISBN : 120p.
56. **DE Barjac H., Sutherland D.J. (1990)-** Bacterial control of mosquitoes and blackflies : chemistry, genetic and applications of *Bacillus thuringiensis israelensis* and *Bacillus sphaericus*. New Brunswick, NJ, Rutgers university press
57. **Doberski J.W. et Tribe H.T. (1980).** Isolation of entomogenous fungi from elm bark and soil with reference to ecology of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *Trans.Brit Mycol Soci* .**74** :95–100.
58. **Donald W et Roberts .(1969).** Toxins from the Entomogenous Fungus *Metarhizium anisopliae*: Isolation of Destruxins from Submerged Cultures. *J.Invertebr.Pathol*. **14** :82-88
59. **Dong C., Zhang J., Chen W., Huang H et Hu Y. (2007).** Characterization of a newly discovered China variety of *Metarhizium anisopliae* (*M. anisopliae* var) for virulence to termites, isoenzyme and phylogenetic analysis. *Microbiol.Res*. **162** :53–61.
60. **Driver et al. (2000):** effect of "neem" oil on germination and sporulation of the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae*
61. **Edelstein J.D., Lecuona R.E et Trumper E.V. (2004).**Selection of culture media and In Vitro assessment of temperature-dependent development of *Nomuraea rileyi*. *Biol.Contr*.**33**: 773-742.
62. **Ekesi S., Maniania N.K. et Ampong-nyarko K. (1999).** Effect of temperature on germination, radial growth and virulence of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* on *Megalurothrips sjostedti*. *Bioconrt Scie and Technol* **9** :177-185

63. **Ermel, K., Pahlich, E., Schmutterer, H.**, Azadirachtin content of kernel from different geographical location and its dependence on temperature, relative humidity and light. In **Schmutterer, H., Ascher, K.R.S. [Eds.] (1987)**. Natural Pesticides from the Neem Tree and Other Tropical Plants, Proc. 3rd Int. Neem Conf. (Nairobi, Kenya, 1986) (1987).
64. **Ermel, K., Pahlich, E., Schmutterer, H.**, Comparison of the azadirachtine content of neem seed from ecotypes of Asian and African origin. Proc. 2nd Int. neem Conf. (Rauischholzhausen. Germany, 1983), pp. 91-93 (1984).
65. **Essaid A., (1991)**. La lutte anti-acridienne edition, John Libbery Eurotext. Bristsh Library cataloging in publication data AUPELF/UREF: 306p
66. **Failloux A.B. et Rodhain F. (1999)**. Apport des études de génétique des populations de moustiques (Diptera: culicidae) en entomologie médicale. Exemples choisis en Polynésie française. Anna. Soci ; Entomol .France .**35** (1): 1-16.
67. **Fargues J et Bourguet D. (2005)**. La lutte microbiologique contre les insectes ravageurs des cultures: contraintes, bilan et perspectives. Enjeux phytosanitaires pour l'agriculture et l'environnement. E. T. DOC. Paris-Londres-New-York, Lavoisier: 1013.
68. **Fargues J et Luz C. (2000)**. Effects of fluctuating moisture and temperature regimes on sporulation of *Beauveria bassiana* on cadavers of *Rhodnius prolixus*. Biocontrol. Sci.Technol. 8: 323-334.
69. **Fargues J et Robert P.H. (1986)**. Potentialités insecticides des destruxines ,mycotoxines produites par l'hyphomycète entomopathogène, *Metarhizium anisopliae* (Metsch), Congrès sur la protection de la santé humaine et des cultures en milieu tropical , Marseille, 357-362
70. **Faria M et Wraight S.P.(2001)**. Biological control of *Bemisia tabaci* with fungi. Crop Protect. **20** :767-778.
71. **Faye 2010**. Cf. p 12
72. **Feng K.C., Rou T.M., Liu B.L., Tzeng Y.M et Chang Y.N.(2004)**. Effect of fungal pellet size on the high yield production of destruxin B by *Metarhizium anisopliae*. Enzy. Microb. Technol. **34**(1): 22-25
73. **Fernandes E.K.K., Keyser C.A., Rangel D.E.N., Foster R.N et Roberts D.W. (2010)**. CTC medium: A novel dodine-free selective medium for isolating

- entomopathogenic fungi, especially *Metarhizium acridum*, from soil. *Biol. Control.* **54** (6): 197-200.
74. **Ferron P. (1975)** . Les champignons entomopathogènes : évolution des recherches au cours des dix dernières années. *Bull . SROP/WPRS.* 54 p
75. **Ferron P. (1977)**. Influence of relative humidity on the development of fungal infection caused by *Beauveria bassiana* (Fungi Imperfecti Moniliales) in imagos of *Acanthoscelides obtectus* (Col.: Bruchidae). *Entomophaga* .**22** :393-396.
76. **Ferron P.(1978)**. Biological control of insect pests by entomopathogenic fungi. *Ann Rev Entomol.* **23** :409-442.
77. **Ferron P., Fargues J et Riba G. (1991)**. Fungi as microbial insecticides against pests. In: Arora D.K., Ajello L., Mukerji K.G (eds) *Handbook of Applied Mycology. Volume 2: Humans, Animals, and Insects.***18**: 665–706. Marcel Dekker, Inc, New York.
78. **Fishwick, R.W.**, Neem (*Azadirachta indica* A. Juss.) plantations in the Sudan zone of Nigeria. Report prepared for the Chief Conservator of Forests, northern Nigeria (undated).
79. **Garcia, E.S., De Azanibuja, P., Forster, H., Rembold, H.** Feeding and molt inhibition by azadirachtins A, B, and 7-acetylazadirachtin A in *Rhodnius prolixus* nymphs. *Z. Naturforsch.* 39c, 11551158(1984).
80. **Georghiou G.P et Lagunes-Tejada A. (1991)**.The occurrence of resistance to pesticides in arthropods. An index of cases reported through 1989. FAO, Rome.
81. **Georghiou G.P., Ariaratnam V., Pasternak M.E et Lin C.S. (1975)**. Organophosphorus multiresistance in *Culex quinquefasciatus* in California. *J. Econ. Entomol.* **68** : 461–467.
82. **Gillespie J.P., Bailey A.M., Cobb B et Vilcinskis A .(2000)**. Fungi as elicitors of insect immune responses. *Arch Insect Biochem Physiol.* **44** :49–68
83. **Goettel M.S et Inglis G.D. (1997)**.Fungi: hyphomycetes. In: Lacey LA (ed.) *Manu Tech. Insect. Pathol.* **5** (3):213–248. Academic Press, San Diego.
84. **Goettel M.S. (1992)**.Des champignons comme agents de lutte biologique. In *La lutte biologique contre les acridiens*, sous la direction de C.J. Lomer et C. Prior p.122-131. Ibadan, Nigeria: CAB International/IITA.

85. **Goettel M.S., Inglis G.D et Wraight S.O.(2000).** Fungi. In: Field manual of techniques in invertebrate pathology. Lacey LA, Kaya HK (eds), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 255-282
86. **Goettel M.S., St Leger R.J., Rizzo N.W., Staples R.C et Roberts D.W. (1989).** Ultrastructural localization of a cuticle-degrading protease produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* during penetration of host (*Manduca sexta*) cuticle. J. General. Microbiol. **135** :2233-2239.
87. **Gonzales, M.S., Garcia, E.S.,** Effect of azadirachtin on the development of *Trypanosoma cruzi* in different species of triatomine insect vectors: long-term and comparative studies. J. Invertebr. Pathol. 60, 201205 (1992).
88. **Gonzalez, D. M. E.; Valbuena, P. B. F.; Rivera, M. A.; Bustillo, P. A. E. and Chaves, B. (1996),** Viabilidad del hongo *Metarhizium anisopliae* en mezcla con agroquímicos, Rev. **Quintela et al (1997a)** Colomb. de Entomol., 22, 31-36.
89. **Govindachari, T.R.,** Chemical and biological investigations on *Azadirachta indica* (the neem tree). Current Science, 63, 117-122 (1992).
90. **Gruha E.A., Woods S.P et Russel H. (1984).** Studies utilizing *Beauveria bassiana* as an entomopathogen. In: Infection processes of fungi. Conference Report. Robert DW, Aist JR (eds). Rockefeller Foundation, New York. 147-152
91. **Guarro J., Gené J et Stchigel A.M. (1999).** Developments in fungal taxonomy. Clinic and Microbiol Rev. 12 (3): 454–500.
92. **Gupta S., Roberts D.W et Renwick J.A.A. (1989a).** Insecticidal cyclodepsipeptides from *Metarhizium anisopliae*. J. Chem. Soc. Perkin Trans. **1** :2347-2357.
93. **Gupta S., Roberts D.W et Renwick, J.A.A.(1989b).** Preparative isolation of destruxins from *Metarhizium anisopliae* by high performance liquid chromatography. J. Liq. Chromatogr. **12** :383-395.
94. **Hajek A.E et St Leger.(1994).** Interaction between fungal pathogens and insect host. Ann.Rev.Entomol. **39** :293-322.
95. **Hallsworth J.F et Magan N. (1996).** Culture age, temperature and pH affect the polyol and trehalose contents of fungal propagules. Appl Environ. Microbiol. **62** :2435-2442.
96. **Hallsworth J.F et Magan K.E. (1999).** Hallsworth and N. Magan, Water and temperature relations of growth of three entomogenous fungi *Beauveria*

- bassiana, *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces farinosus*, J. Invertebr. Pathol. 261-266.
97. **Hammadi D., Boubidi S.C., Chaib S.E., Saber A., Khechache Y., Gasmi M. et Harrat Z.(2009).** Le paludisme au Sahara algérien. Bull Soc Pathol Exot. **102** (3): 185-192
 98. **Hamon J., Mouchet J., Coz J., Challier A., Subra R. et Adam J.P. (1972) .** Résistance aux insecticides et contrôle des vecteurs de maladies en Afrique Occidentale et Centrale. Doc.Tech. OCCGE. **5** : 217.
 99. **Hastuti B.S., Glare T.R. et Chapman, R. B. (1999).** Effect of temperature and humidity on the susceptibility of *Parosia clypealis* to *Beauveria bassiana*. Proc. 52nd N.Z. PlantProtection Conf.103-107.
 100. **Hazrat B., Soaib A.H et Imtinan A.K. (2012).** Isolation and efficacy of entomopathogenic fungus (*Metarhizium anisopliae*) for the control of *Aedes albopictus* Skuse larvae: suspected dengue vector in Pakistan. Asian Pacific.J .Trop. Biomed. 298-300.
 101. **Hegde, N.G.,** Neem production and development-constraints at grass root level. World neem Conference, Bangalore, India. pp. 1-5 (1993).
 102. **Hegedus D.D., Bidochka M.J et Khachatourians G.G. (1990).** *Beauveria bassiana* Submerged Conidia Production in a Defined Medium Containing Chitin, Two Hexosamines or Glucose', Appl. Microbiol. Biotechnol. **33** :641-647.
 103. **Hirose et al. (2001)** qui ont montré 36% inhibition avec l'huile de neem avec le champignon. **Ibrahim L., Butt T.M., Beckett A et Clark S.J. (1999).** The germination of oilformulated conidia of the insect pathogen *Metarhizium anisopliae*. Mycol. Res. **103**:901-907.
 104. **Ibrahim L., Butt T.M., Beckett A et Clark S.J. (1999).** The germination of oilformulated conidia of the insect pathogen *Metarhizium anisopliae*. Mycol. Res. **103**:901-907.
 105. **Ignoffo C.M . (1988).** CRC handbook of natural pesticides. Volume V. Microbial insecticides. Part A. Entomogenous protozoa and fungi . Editeur Ignoffo, C.M. CRC Press, Inc . , Florida. 272 p.
 106. **Ihara F., Yaginuma K., Kobayashi N., Mishiro K et Sato T. (2001).** Screening of entomopathogenic fungi against the brown-winged green bug, *Plautia stali* Scott (Hemiptera: Pentatomidae). Appl.Entomol.Zool. **36** (4): 495-500.

107. **Ishida, M., SeriT, M., Nakata, K, Juneja, L.R., Kim, M., Takahashi, S.,** Several antifeedants from neem oil, *Azadirachta indica* A Juss., against *Reticulitermes speratus* Kolbe (Isoptera: Rhinotermitidae). *Biosci. Biotech. Biochem.* 56, 1835-1838 (1992).
108. **Isman, M.B., Koul, O., Luczynski, A, Kaminski, J.,** Insecticidal and antifeedant bioactivities of neem oils and their relationship to azadirachtin content. *J. Agric. Food Chem.* 38, 1406-1411 (1990).
109. **Jarvis, A.P., Johnson, S., Morgan, E.D.,** Stability of the Natural Insecticide Azadirachtin in Aqueous and Organic Solvents. *Pestic. Sci.*, 53, 217-222 (1998)
110. **Jennifer, A.M.L., Nisbet, A.J.,** Azadirachtin from the Neem Tree *Azadirachta indica* : its Action Against Insects. *An. Soc. Entomol.* 29, 615-632 (2000).
111. **Kaijiang L et Roberts D.W. (1986).**The production of destruxins by the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae* var major. *J. Invertebr. Pathol.* **47** :120–122.
112. **Kamp A.M et Bidocbka M.J. (2002)** .Conidium production by insect pathogenic fungi on commercially available agars. *Lett. App. Microbiol.* **35** :74-77.
113. **Kandji T. (1996)-** Optimisation de l'utilisation du neem (*Azadirachta indica* A. Juss) dans la protection des semences de trois légumineuses forestières contre des espèces du genre *Caryedon*
114. **Karch S. & COZ J. (1983)-** Histopathologie de *Culex pipiens* Linne (diptera : culidae) soumis a l'activité larvicide de *Bacillus sphaericus* 1593-4. *Cah. ORSTOM*, (ser. Entom. Med. Et Parasitol.) 21 : 225-230.
115. **Kaura, S.K., Gupta, S.K., Chowdhury, J.B.,** Morphological and oil content variation in seeds of *Azadirachta indica* A. Juss. (Neem) from northern and western provenances of India *Plant Foods for Human Nutrition*, 52, 293–298 (1998).
116. **Kaushik, N.,** Determination of azadirachtin and fatty acid methyl esters of *azadirachta Indica* seeds by HPLC and GLC. *J. Anal. Bioanal Chem.*, 374, 1199-1204 (2002).
117. **Kaushik, N., Vir, S.,** Variations in fatty acid composition of neem seeds collected from the Rajasthan state of India. *Biochemical Society Transactions*, 28, part 6 (2000).

118. **Ketkar, C.M., Ketkar, M.S.**, Azadirachtin content of neem and its by products from different parts of India. (abstr.) Proc. (World Neem conf. Bangalore, India, 1993) (1993).
119. **Ketkar, C.M.**, Utilisation of neem (*Azadirachta indica* Juss) & Its By-products. Khadi & Village Industries Commission, Bombay, India. (1976).
120. **Konam Y.L., Koffi A.A., Doannio J.M.C. & Darriet F. (2003)**- Resistance de *Culex quinquefasciatus* (SAY, 1823) a la Deltamethrine et l'utilisation de la moustiquaire imprégnée en milieu urbain de Bouake, Cote d'Ivoire. Entomologie Médicale. 128-129
121. **Koua K.H. (1994)**- Mise en évidence de l'activité larvicide de *Persea americana* sur *Anopheles gambiae* s.l. un moustique d'importance medicale. Thèse Doctorat 3eme cycle. Univ. Cocody Abidjan (Cote d'ivoire). 123p.
122. **Koua K.H. Han S.H. & Almeida M.A. (1998)**- Histopathologie d'*Anopheles gambiae* s.l. Giles, 1902 (diptere, culicidae) soumis a l'activité de l'extrait aqueux de *Persea americana* Miller, 1768 (Lauraceae). Entomologie Medicale Maniscrit n0 1868.
123. **Koul, O., Isman, M.B., Ketkar, C.M.**, Properties and uses of neem, *Azadirachta indica*. Can J. Bot. 68, 1-11(1990).
124. **Kpoviessi, D.S.S., Accrombessi, G.C., Kossouoh, C., Soumanou, M.M., Moudachirou, M.**, Propriétés physico-chimiques et composition de l'huile non conventionnelle de pourghère (*Jatropha curcas*) de différentes régions du Bénin C. R. Chimie 7 , 1007–1012 (2004). **KRAUS, W.**, Biologically active compounds from meliaceae. Proced. 2nd Inter. Conf. Chem. Biochem. of Active Nature Compounds, Budapest, Hungary, pp. 331-345 (1983).
125. **Kraus, W., Baumann, S., Bokel, M., Keller, u., Klenk, A., Klingele, M., Pohnl, H., Schwinger, M.**, Control of insect feeding and development by constituents of *Melia azedarach* and *Azadirachta indica*. In SCHMUTTERER, H., ASCHER, K.R.S. [Eds.] Natural Pesticides from the Neem Tree and Other Tropical Plants. Proc. 3rd Int. Neem Conf. (Nairobi, Kenya, 1986), pp. 149-160 (1987b).
126. **Kraus, W.**, Biologically active compounds from meliaceae. Stud. Org. Chem. 17, 331-345 (1984)
127. **Kraus, W., Bokel, M., Bruhn, A., Cramer, R., Klaiber, I., Klenk, A., Nagl, G., Pöhl, H., Sadlo, H., Vogler, B.**, Structure determination by NMR of azadirachtin

and related compounds from *Azadirachta indica* A. Juss (Meliaceae). *Tetrahedron*, 43, 2817-2830 (1987c).

128. **Kraus, W., Bokel, M., Cramer, R., Klenk, A., Pöhl, H.,** Constituents of neem and related species. A revised structure of azadirachtine. *Third Int. Conf. On chemistry and Biotechnology of Biologically Active Natural Products* (Sofia, Bulgaria, 1985), Abstr. p. 446-450 (1985a).
129. **Kraus, W., Bokel, M., Klenk, A., Pöhl, H.,** The structure of azadirachtin and 22,23-dihydro-23 β -methoxyazadirachtin. *Tetrahedron Lett.* 26, 6435-6438 (1985b).
130. **Kraus, W., Bokel, M., Schwinger, M., Vogler, B., Soellner, R., Wendisch, D., Steffens, R., Wachendorff, U.** The chemistry of azadirachtin and other insecticidal constituents of Meliaceae. In VAN BEEK, T., BRETELER, H. [Eds.] *Phytochemistry and Agriculture*. Oxford University Press, pp. 18-39 (1993a).
131. **Kraus, W.,** Constituents of neem and related species. A revised structure of azadirachtin. *Stud. Org. Chem.* 26, 237-256 (1986).
132. **Kubo, L., Klocke, J.A.,** Azadirachtin, insect ecdysis inhibitor. *Agric. Biol. Chem.* 46, 1951-1953 (1982).
133. **Kubo, L., Matsumoto, A., Matsumoto, T., Klocke, J.A.,** New insect ecdysis inhibitory limonoid deacetylazadirachtinol isolated from *Azadirachta indica* (Meliaceae) oil. *Tetrahedron* 42, 489-496 (1986).
134. **Kumar, A.R.V., Jayadevi, H.C., Ashoka, H.J., Chandrashekara, K.,** Azadirachtin use efficiency in commercial neem formulations. *J. Current science* 84 (11) 1459-1464 (2003).
135. **Lacey, Urbina M.J. & Heizman C.M. (1984)-** Sustained-release formulations of *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis* (H-14) for control of contereeding *Culex quinquefasciatus*. *Mosquito News*.
136. **Lanoiselle, J.L.,** Contribution à l'étude du pressage hydraulique des graines oléoprotéagineuses : Mécanisme de pressage et modélisation, Thèse de doctorat, Université Paris XII Val-de-Marne (1994).
137. **Lecuona R., Clement J.L., Riba G., Joulie C et Juarez P. (1997).** Spore germination and hyphal growth of *Beauveria* sp .on insect lipids. *J .Econ .Entomol* .90:119-123

138. Lee, S.M., Klocke, J.A., Barney, M.A., Yamasaki, R.B., Baladrin, M.T., Insecticida] constituents of *Azadirachta indica* and *Melia azedarach* (Meliaceae). In HEDIN, P.A. [Ed.] Naturally Occurring Pest Bioregulators. ACS Symposium Series No. 449, American Chemical Society, Washington, DC, pp. 293304 (1991).
139. Lepage S., Oi-Pentier G., Pecoueur D., Vey A. et Quiot J.M . (1991).(Sous presse). Utilisation des toxines de champignons entomopathogenes dans la lutte contre les diptères piqueurs. Actes de la Troisième Conférence Internationale des Entomologistes d' Expression Française . Gembloux Belgique . Mémoires de la Société Internationale des Royale Belge d'Entomologie .7p.
140. Lepage S., Charpentier G., Pecqueur D., Vey A et Quiot J.M. (1992). Utilisation des toxines de champignons entomopathogènes dan la lutte contre les Diptères piqueurs. Mém.Soc. Belge. Ent. **35** :139-143.
141. Lewis, W.H., Elvin-Lewis, M.P.F., Neem (*Azadirachta Indica*) cultivated in Haiti. Econ. Bot. 37, 69-70 (1983).
142. Liu B.L et Tzeng Y.M .(2011). Development and applications of destruxins: A review. Biotechnol Adv.1-13
143. Liu B.L et Tzeng Y.M. (1999).Water content and water activity for the production of cyclodepsipeptides in solid-state fermentation by *Metarhizium anisopliae*. Biotechnol .Lett.**21**: 657–661.
144. Liu B.L., Chen J.W et Tzeng Y.M .(2000).Production of cyclodepsipeptides destruxin A and B from *Metarhizium anisopliae*. Biotechnol Prog .**16** :993–999.
145. Liu Z.Y., Milner R.J., McRae C.F et Lutton G.G. (1993). The use of dodine in selective media for the isolation of *Metarhizium spp.* from soil. J. Invertebr. Pathol. **62** :248–251.
146. Lopez Lastra C.C., Hajek A.E et Humber R.A. (2002). Comparing methods for preservation of cultures of entomopathogenic fungi. Can. J.Bot. **80** :1126-1130.
147. Luscombe, D.K., Taha, S.A., Pharmacological studies on the leaves of *Azadirachta indica*. Journal of the Pharmacy and Pharmacology, 26, Suppli., 111p (1974).
148. Luz C., Fargues J., Romaña C.A., Moreno J., Goujet R., Rougier M et Grunewald J. (1994).Potential of entomopathogenic hyphomycetes for the control of the triatomine vectors of Chagas' disease. Proc6 Int Coll Invertebr Path Microbiol Control. **1** :272- 276.

149. **Maire A et Aubin A. (1980).** Les moustiques du Québec (Diptera : Culicidae) .
Essai de synthèse écologique. Mémoires de la Société Entomologique du Québec.6
:107.
150. **Marechal, V., Rigal, L.,** Characterization of by-products of sunflower culture:
commercial applications for stalks and heads. Ind. Crops Prod., 10, 185-200 (1999).
151. **Marquardt W.C., Black W.C., Higgs S., Freier J.E., Hagedorn H.H.,
Kondratieff B., Hemingway J et Moore C.G. (2005).** Biology of Disease Vectors.
Second Edition, Elsevier Academic Press.
152. **Masson, 2003** essai mené sur le terrain en Côte d'Ivoire contre des moustiques du
genre Anophèles et Culex résistants aux pyrèthriinoïdes..
153. **McCoy A., Quintela E.D et Faria M. (1990).**Environmental Persistence of
Entomopathogenic Fungi. In, New direction in biological control. R.R. Baker and P.E.
Dunn (eds), A.R. Liss, New York, 139-159.
154. **McCray Jr E.M., Womelderoff D.J., Husbands R.C et Eliason D.A. (1973).**
Laboratory observation and field tests with *Legnidium* against California
Mosquitoes. Proc Cali MosqControl Assoc **41** :123–128.
155. **McGaughey W.H et Whalon M.E. (1992).** Managing insect resistance to *Bacillus*
thuringiensis toxins. Science 1451–1455.
156. **Meisner, J., Ascher, K.R.S., Aly, R., Warthen, J.D.Jr.,** Response of *Spodoptera*
littoralis (Boisd.) and *Earias insulana* (Boisd.) larvae to azadirachtin and salannin.
Phytoparasitica, 9, 2732 (1981).
157. **Mensier, P.H.,** Dictionnaire des huiles végétales. Editions Paul Lechevalier, Paris,
(1957)
158. **Metschnikoff E. (1879).** Krankheiten der Larve des Getreidekäfers. Odessa, 32p.
159. **Meyling N.V et Eilenberg J. (2007).**Ecology of the entomopathogenic fungi
Beauveria bassiana and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems:
Potential for conservation biocontrol. **43** :145-155.
160. **Mietkiewski R., Tkaczuk C et Zasada L. (1992).** Occurrence of entomopathogenic
fungi in arable soil and meadow soil. *Acta Mycologica*.**27** (2): 197-200.
161. **Milner R.J., Lutton G.G et Zouyi L. (1992).**Methods for isolating *Metarhizium*
anisopliae from soil. XXV Annual Meeting Society for Invertebrate Pathology,
August 16-21,

162. **Miranpuri G.S et Khachatourians G.G. (1991).**Infection sites of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in the larvae of the mosquito *Aedes aegypti*. *Entomol.* **16** :215- 234.
163. **Mitsuaki S. (2004).** Effect of temperature on growth of *Beauveria bassiana* F-263, a strain highly virulent to the Japanese pine sawyer, *Monochamus alternatus*, especially tolerance to high temperatures. *Appl Entomol Zool.* **39** : 469-475.
164. **Mohamed A.K., Hernandez D et Nelson R.S. (1983).** Susceptibility of various instars of *Culex quinquefasciatus* to two strains *Metarhizium anisopliae* var.*anisopliae*. *Journ. Flor.Anti- Mosquito. Asso.* **54** (1) : 5-8.
165. **Mohanty S.S., Raghavendra K., Mittal P.K et Dash A.P. (2008).** Efficacy of culture filtrates of *Metarhizium anisopliae* against larvae of *Anopheles stephensi* and *Culexquinquefasciatus* *J.Ind.Microbiol.Biotechnol.* **35** :1199–1202.
166. **Mohanty S.S., Raghavendra K., Mittal P.K et Dash A.P. (2008).** Efficacy of culture filtrates of *Metarhizium anisopliae* against larvae of *Anopheles stephensi* and *Culexquinquefasciatus* *J.Ind.Microbiol.Biotechnol.* **35** :1199–1202.
167. **Mondal P et Bhattacharya A.K. (2004).**Assessment of different media for mass multiplication of entomopathogenic fungus. *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin *Proc.Nat.Acad.Sci.India.***74**:161-169.
168. **Morgan, D.D., Mandava, N.B.,** Handbook of natural pesticides, Vol. III, Insect Growth Regulators, Part B., CRC Press Inc. Florida, USA (1987).
169. **Mouchet J., Elliot R., Gariou R et Voelckel J.(1960)** . La résistance aux insecticides chez *Culex pipiens fatigans* Wied . Et les problèmes d’hygiènes urbaines au Caméroun..*Méd. Trop.* **20** :447-456.
170. **Munoz-Valenzuela, S., Ibarra-Lopez, A.A., Rubia-Silva, L.M., Vadez-Davila, H., Borboa-Flores, J.,** Neem Tree Morphology and Oil Content. In new crops and new uses. Janick, J and Whipkey, A. (eds). ASHS Press, Alexandria, VA (2007).
171. **Murthy, S.P., and Sirsi, M.,** Pharmacology studies in *Melia azadirachta*. Part II. Estrogenic and antipyretic activity of neem oil and its fractions. *Indian Journal of Physiology and Pharmacology*, 2, 456 (1958a).
172. **N’diaye, S., Rigal, L., Larocque, P., Vidal, P.F.,** Extraction of hemicelluloses from poplar, *Populus tremuloides*, using an extruder-type twin-screw reactor: A feasibility study, *Bioresource Technology*, 57, 61-67 (1996).

173. **Napolitano R et Juárez M.P. (1997)** .Entomopathogenous fungi degrade epicuticular hydrocarbons of *Triatoma infestans* .Arch.Biochem.Biophys. **344** :208-214.
174. **Ndiaye, O.B.K.**, Valorisation de l'huile de neem par extraction de l'acide stéarique, de la glycérine et production de savon, Mémoire d'Ingénieur, Dakar (2002).
175. **Ndione et al(2007)** :Biocontrôle des larves de moustiques(*Culex quinquefasciatus*, *Aedes*, *Aegypti* linnaeus, *Anopheles gambiae* s.l) par des produits de neem(*Azadirachta indica*,A.JUSS) :étude de la sensibilité et de l'histopathologie.
176. **Nelson T.L., Low A et Glare T.R. (1996)**. Large scale production of New Zealand strains of *Beauveria* and *Metarhizium*, Proc. 49th New Zealand .Plant Production Conf.257-261.
177. **Nielsen C., Eilenberg J., Harding S et Vestergaard S. (2004)**.Biological Control of Weevils (*Strophosoma melanogrammum* and *S. capitatum*) in Greenery Plantations in Denmark Pesticide Research Danish Environmental Protection Agency, Copenhagen
178. **O.M.S. (1963)**. Méthodes à suivre pour déterminer la sensibilité ou la résistance des larves de moustiques aux insecticides. In Résistance aux insecticides et lutte contre les vecteurs. Treizième rapport du comité OMS d'experts des insecticides, Genève : OMS, Sér .Rapp.techn.256, p 55-60.
179. **O.M.S. (1970)**. Résistance aux insecticides et lutte anti vectorielle. Sér.Rapp.Techn.443
180. **Odier F., Vey A et Bureau J.P. (1992)**.In vitro effects of fungal cyclodepsipeptides on leukemic cells: study of destruxins A, B and E. Biol. Cell .74: 267–271.
181. **OO, L.T.**, Neem tree research (Terminal report). Burmese-German Plant Protection and Rodent Control project, Rangoon. Tana Press, Bangkok, Thailand (1989).
182. **ORR, E.**, The production of proteins concentrates from oil-seeds. Eds. Tropical Products Institute, Londres, (1971).
183. **Osborne, T.B.**, The vegetable proteins. 2nd Ed., Ed. Longmans, Green and Co, London, 56-67 (1984).
184. **Pais M., Das B.C et Ferron P. (1981)**.Depsipeptides from *Metarhizium anisopliae* .Phytochem.**20** :715-723.
185. **Parmar, B.S., Ketkar, C.M.**, Commercialization. In Neem Research and Development; Randhawa, N. S., Parmar, B. S., Eds.; Publication 3; Society of Pesticide Science: New Delhi, 270-283 (1993).

186. **Pascual, N., Marco, M.P., Bellés, X.**, Azadirachtin induced imaginal moult deficiencies in *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae). *J. Stored Prod. Res.* 26, 53-57 (1990).
187. **Pates H et Curtis C. (2005)**. Mosquito behavior and vector control. *Ann. Rev. Entomol.* 50: 53-70.
188. **Pelissier, P., Laclavere, G.**, Atlas du Sénégal. Editions Jeune Afrique, Paris, 1983, 72 P. ISBN : 285258-288-0
189. **Perrin, R., Scharff, J.P.**, Chimie Industrielle, 2eme édition ; Dunod, Paris (1999).
190. **Pillai, N.R., Santha Kumari, G.**, Effect of nimbidin on acute and chronic gastro-duodenal ulcer models in experimental animals. *Planta Medica*, 50, 143-146 (1984).
191. **Poprawiski T.J et Yule W.N. (1991)**. Incidence of fungi in natural populations of *Phyllophaga* spp. and susceptibility of *Phyllophaga anxia* (LeConte) (Col., Scarabidae) to *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina). *J. Appl. Entomol.* 112 (3): 359-365.
192. **Quesada-Moraga E., Navas-Cortes J., Maranhao E., Ortiz-Urquiza A et Santiago- Alvarez C. (2007)**. Factors affecting the occurrence and distribution of entomopathogenic fungi in natural and cultivated soils. *Mycol. Res.* 111: 947-966.
193. **Quintela ED. and McCoy CW. 1998**. Synergistic Effect of Imidacloprid and Two Entomopathogenic Fungi on the Behavior and Survival of Larvae of *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae) in Soil. *J. Econ. Entomol.* 91: 110-122.
194. **Rajab, M.S., Bentley, M.D., Alford, A.R., Mendel, M.L.**, A new limonoid insect antifeedant from the fruit of *Melia volkensii*. *J. Nat. Prod.* 51, 168-171 (1988).
195. **Ramoska W.A. (1982)**. An examination of the longterm epizootic potential of various artificially introduced mosquito larval pathogens. *Mosquito News.* 42 :603-607.
196. **Ramoska W.A., Watts S et Watts H.A. (1981)**. Effects of sand formulated *Metarhizium anisopliae* spores on larvae of three mosquito species. *Mosquito News* .41 :725-728
197. **Rao, A.R., Kumar, S.S., Paramasivam, T.B., Kamalkashi, S., Parashuram, A.R.**, Study of antiviral activities of tender leaves of margosa tree (*Melia Azadirachta*) on vaccinia and variola viruses- a preliminary report. *Indian Journal of Medical Research*, 57, 495-502 (1969).

198. **RAO, P.**, Chemistry, biological activity and utilization aspects of some promising neem extractives. In: Eschborn (ed), Natural Pesticides from Neem Tree (*Azadirachta indica* A. Juss.) and other Tropical Plants, 3rd Int. Neem Conf. Nairobi, Kenya, 10–15 July, 1986, pp. 127–148 (1987).
199. **Ravallec M, Riba G et Vey A. (2006)**. Sensibilité d'*Aedes albopictus* (Dipt., Culicidae) à l'hyphomycète entomopathogène *Metarhizium anisopliae*. *Biocontr.* **34** (2):209-217.
200. **Ravallec M., Riba G et Vey A. (1989)**. Sensibilité d ' *Aedes albopictus* (Diptera : Culicidae à l' hyphomycète entomopathogène *Metarhizium anisopliae*. *Entomophaga*.**34**:209-217.
201. **Ravallec M., Robert P. et Coz J. (2003)**. Sensibilité d'un prédateur culiciphage *Toxorynchites ambionensis* à l'hyphomycète entomopathogène *Metarhizium anisopliae* (Sorokin). *Cah. ORSTROM .Sér. Ent. Médic. Parasitol.***24** (4): 275-278.
202. **Reichelder C.F. (1993)**. Biological assays with insect pathogens. In: N. B. Mandava (ed.). *CRC handbook of natural pesticides: methods. V.I Theory practice and detection*. New Delhi. CBS Publishers and Distributors. 489-515.
203. **Remboldt, H.**, Azadirachtins, their structure and mode of action. In ARNASON, J.T., PHILOGÈNE , B.J.R., MORAND, P. [Eds.] *Insecticides of Plant Origin*. ACS Symp. Ser. 387, American Chemical Society, Washington, DC, pp. 150-163 (1989b).
204. **Remboldt, H., Forster, H., Czoppelt, Ch.**, Structure and biological activity of azadirachtins A and B. In Schemutterer H, Ascher K R S (eds.) *Natural pesticides from the neem tree and others tropical plants*, Proc. 3rd Int. Neem Conf. (Nairobi, Kenya, 1986) 149-160 (1987a).
205. **Remboldt, H., Forster, H., Sonnenbichler, J., Klenk, A.**, Structure of azadirachtine B. *Zeitschrift fur Naturofrschung, C-Biosciences*, 42, 4-6 (1987b).
206. **Rengasamy, N., Kaushik N., Kumar, J., Koul, O., Parmar, B.** In: Singh RP (ed) *World Neem Conf.* Oxford and IBHCO, New Delhi, p 207 (1993).
207. **Riba G(1986)**.Comparative studies of *Metarhizium anisopliae* and *Tolypocladium cylindrosporum* as pathogens of mosquito larvae.*J.Am.Mosq Control.Assoc.*,2,p:469-473.
208. **Richard I et Samuels. (1998)**. A sensitive bioassay for destruxins,cyclodepsipeptides from the culture filtrates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. *An. Soc. Entomol.Bras.* 27 (2).

209. **Rioux J.A. (1958).** Les Culicidae du "Midi" méditerranéen. Etude systématique et écologique, Ed. Paul lechevalier, Paris: 301p.
210. **Roberts D. W. (1967).** Some effects of *Metarhizium anisopliae* and its toxins on mosquito larvae. In "Insect Pathology and Microbial Control" (P. A. van der Laan, Ed.), p 243-246. North-Holland, Amsterdam.
211. **Roberts D.W. (1981).** Toxins of entomopathogenic fungi . Dans "Microbial control of pests and plant diseases» 1970-1980. Editeur Burges, H.D. , Academic Press, New-York .441-464
212. **Robich R.M et Denlinger D.L. (2005).** Diapause in the mosquito *Culex pipiens* evokes a metabolic switch from blood feeding to sugar gluttony. Proceedings of the National Academy of Sciences.**102**: 15912-15917.
213. **Rochanakij, S., Thebt Aranonth, Y., Yenjai, C.,** Nimbolide, a constituent of *Azadirachta indica*, inhibits *Plasmodium falciparum* in culture. Southeast Asiall 1. Trop. Med. Public Health 16, 66-72 (1985).
214. **Roubaud E. (1929).** Cycle autogène d'attente et générations hivernales suractives inapparentes chez le moustique commun *Culex pipiens* L.C.R. Acad.Sci.,Paris. **88** :735-738
215. **Ruscoe, C.N.E.,** Growth disruption effects of an insect antifeedant. Nature New Biol, 236, 159-160 (1972).
216. **Saint -Louis M., Firlej A., Gagne I., Grjelchan M., Kouassi M., Pelletier F., Provost C. et VanoosThuys F. (2001).** Eléments de recherche pour une meilleure utilisation des prédateurs et des champignons entomopathogènes en lutte biologique. Antennae. **8** (2): 1-6.
217. **Samson R.A, Evans H.C et Latge J.P. (1988).**Atlas of Entomopathogenic Fungi. Springer-Verlag, Netherlands,187 p .
218. **Samuels R.I, Charnley A.K, Reynolds S.E.(1988).** The role of destruxins in the pathogenicity of three strains of *Metarhizium anisopliae* for the tobacco hornworm *Manducasexta*. Mycopathologia. **104** :51–58.
219. **Saxena R.C., Jilani, G., Kareem, A.A.,** Effect of the neem on stored grain insects. In JACOBSON, M., (Ed.) Focus on phytochemical. Vol I, The neem tree. Pp. 1-18. CRC Press, Boca Raton, FL. pesticides Ed. 1988 (1989).
220. **Schmutterer, H.,** (eds.), The Neem Tree, *Azadirachta indica* A. Juss and other Meliaceous Plants. VCH: Weinheim (1995).

221. **Schmutterer, H., Ascher, K.R.S.**, [Eds.] (1987). Natural Pesticides from the Neem Tree and Other Tropical Plants, Proc. 3rd Int. Neem Conf. (Nairobi, Kenya, 1986).
222. **Schneider, B.H., Ermel, K.**, Quantitative determination of azadirachtin from neem seeds using high liquid performance chromatography. In SCHMUTTERER, H., ASCHER, K.R.S. [Eds.] (1987). Natural Pesticides from the Neem Tree and Other Tropical Plants, Proc. 3rd Int. Neem Conf. (Nairobi, Kenya, 1986). (1987).
223. **Scholte E.J., Knols B.G et Takken W.** (2004) . Auto dissemination of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* amongst adults of the malaria vector *Anopheles gambiae sensu stricto*. Mala. J. **3** :45.
224. **Scholte et al., 2003 a, b:** effect of "neem" oil on germination and sporulation of the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae*
225. **Schroeder, D.R., Nakanishi, K.**, A simplified isolation procedure for azadirachtin. Journal of Natural products, 50, 241-244 (1987).
226. **Schwinger, M., Ehhammer, B., Kraus, W.**, Methodology of the *Epilachna varivestis* bioassay of antifeedants demonstrated with some compounds from *Azadirachta indica* and *Melia azedarach*. In SCHMUTTERER, R, ASCHER, K.R.S. [Eds.] Natural Pesticides from the Neem Tree and Other Tropical Plants. Proc. 2nd Int. Neem Conf. (Rauischholzhausen, Germany, 1983), pp. 181-198 (1984).
227. **Scott I.M. & Kaushik N.K. (1998)**- The toxicity of Margosan-O a product of neem seeds, to selected target and nontarget aquatic invertebrates, Arch Environ Contam. Toxicol., 35:436-431.
228. **Scott I.M. & Kaushik N.K. (2000)**- The toxicity of a neem insecticide to populations of Culicidae and other Aquatic Invertebrates as in in situ Microcosms Archives of Environmental Contamination and toxicology, 39, P. 329-336.
229. **Sèye et al. (2004)** Test d'efficacité des produits du neem(*Azadirachta indica* A .JUSS) à la Deltaméthrine sur les larves et nymphes et moustique (*Culex quinquefasciatus*) : étude histopathologique.
230. **Seye F., Ndiaye M., Faye O et Afoutou J.M. (2012)**.Evaluation of Entomopathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae* Formulated with Suneem (Neem Oil) against *Anophelesgambiae* s.l. and *Culex quinquefasciatus* Adults. Malaria Chemotherapy, Control & Elimination. **1**:1-6.

231. **Siddiqui, S.**, A note on the isolation of three new bitter principles from the neem oil. *Current Science*, 11, 278-279 (1942).
232. **Siddiqui, S., Faizi, S., Siddiqui, B.S.**, Studies on the chemical constituents of *Azadirachta indica* A. Juss (Meliaceae). *J. Naturforsch.* 42b, 922-924 (1986d).
233. **Sidhu, O.P., Kumar, V., Behl, H.M.**, Variability in Neem (*Azadirachta indica*) with Respect to Azadirachtin Content *J. Agric. Food Chem.* 5, 910-915 (2003).
234. **Sidhu, O.P., Kumar, V., Behl, H.M.**, Variability in triterpenoids (nimbin and salanin) composition of neem among different provenances of India *J. Industrial Crops and Products*, 19, 69-75 (2004).
235. **Siebeneicher S.R., Vinson S.B et Kenerley C.M. (1992)**. Infection of the red imported fire ant by *Beauveria bassiana* through various routes of exposure *J. Invertebr. Pathol.* **59** : 280-285.
236. **Silvestre, F., Rigal, L., Leyris, J., Gaset, A.**, Colle à l'eau à base d'extrait protéique végétal et procédé de préparation. Brevet Européen EP 0,997,513 (1999).
237. **Silvy C et Riba G. (1989)**. Biopesticides contre maladies, insectes, mauvaise herbe. Dossier de l'environnement N° 9, 157-200.
238. **Sinha, K.C., Riar, B., Jaya, Thomas, P., Jain, A.K., and JAIN, R.K.**, Anti-Implantation effect of neem oil. *Indian Journal of Medical Research*, 80, 708-710 (1984)
239. **Snegre G., Jllien J.L et Rcopse O. (1976)**. Résistances de certaines populations de *Culex pipiens* (L.) au chlorpyrifos (Dursban) en Languedoc-Roussillon (France). *Cahier O.R.S.T.O.M., Ser. Entomol. méd. et Parasitol.* **14** : 49-59.
240. **Soltani N., Rehim N., Beldi H et Bendali F. (1999)**. Activité du Triflumuron sur *Culex pipiens* (Diptera : Culicidae) et impact sur deux espèces larvivoires non visées. *Ann. Soc. Entomol. Fr. (N.S.)*, **35** (suppl.) :502-508.
241. **Soza-Gómez D.R et Alves S. B. (2000)**. Temperature and relative humidity requirements for conidiogenesis of *Beauveria bassiana* (Deuteromycetes: Monilliceae). *Anais da SociedadeEntomológica do Brasil (english version)* **29** :515-521
242. **St Leger R.J.(1993)**. Biology and mechanisms of insect-cuticle invasion by deuteromycete fungal pathogens, In :Parasites and pathogens of insects .Beckage NE, Thompson SN,(eds),Federici BA (eds.).Academic Press Inc.,New York,USA .**2** : 211-225.

243. **St Leger R.J., Lacetti L.B., Staples R.C et Roberts D.W. (1990).** Protein kinases in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. J. Gen. Microbiol. **136** :1401-1411.
244. **St Leger R.J. (1986a).** Cuticule- degrading enzymes of entomothogenic fungi : Synthesis in culture on cuticle. J. Inverbr.Pathol. **48** :85-95
245. **St Leger R.J.(1986b).** Cuticule- degrading enzymes of entomothogenic fungi : cuticule degradation in vitro by enzymes from entomothogens.. J. Inverbr.Pathol. **47** :167-177.
246. **Staiber, W.,** Effects of azadirachtin on Balbiani ring gene activities and development of *Acricotopus lucidus* (Diptera, Chironomidae). Chromatin, 1, 185-194. (1992).
247. **Starnes R.L., Liu C.L et Marone P.G. (1993).** History, use and future of microbial insecticides. Amer. Entomol. **39** :83-91.
248. **Tella, A.,** Studies on *Azadirachta indica* in Malaria. British Journal of Pharmacology, 58, 318. (1976).
249. **Thurston G., Kettelae., Lucarotii C., Weaver C., Halmes S., (2003)-** Entomologie et produits naturels. Service Canadien des forets- centre de foresterie de l'Atlantique. www.ultrateck.net
250. **Todorova S.J., Côté L.C., Martel P et Coderre D. (1994).**Heterogeneity of two *Beauveria bassiana* strains revealed by biochemical tests, protein profiles and bioassays on *Leptinotarsa decemlineata* (Col: Coccinelidae) larvae. Entomophaga. **39** :159-169.
251. **Toure 2006 :** Utilisation d'un biopesticide : *Metarhizium anisopliae* contre les stades larvaires du criquet pèlerin :*Schistocerca gregaria* et du criquet sénégalais :*Aedaleus senegalensis* :étude histopathologique.
252. **Troup, R.S.,**The Silviculture of Indian Forest Trees. Vol 1. Clarendon Press, Oxford, UK. (1921). **Veen K.H. (1968).** Recherches sur la maladie due à *Metarhizium anisopliae* chez le criquet pèlerin .Meded . Land bouwhoge school, Wageningen .**68** :1-77.
253. **Veen K.H.et Ferron P. (1966).** A selective medium for the isolation of *Beauveria tenella* and of *Metarhizium anisopliae*. J. Invertebr.Pathol. **8** :268–269.

254. **Vega F.E., Jackson M.A., Mercadier G et Poprawski T.J. (2003).**The impact of nutrition on spore yields for various fungal entomopathogens in liquid culture, *World J. Microbiol.Biotechnol.* **19** :363-368.
255. **Vey A., Ouiot J.M et Vago C. (1987).** Mode d'action insecticide d'une mycotoxine, la destruxine E, sur les diptères vecteurs et disséminateurs de germes. *Pathologie animale .C.R . Acad . Sc. Paris, 304, Série III* : 229-234 .
256. **Vey A., Ouiot J.M. (1989).** Effet 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 .
257. **Vey A., Ouiot J.M. et Pais M. (1986).** Toxémie d'origine fongique chez les invertébrés et ses conséquences cytotoxiques : étude sur l'infection de *Metarhizium anisopliae* (Hyphomycète, Moniliales) chez les Lépidoptères et les Coléoptères .*Pathologie comparée. C. R. Soc. Biol.* **180** :105-112 .
258. **Wachendorff, U.,** Constituents of neem and other Meliaceae species in pest control. In AHMED, S. [Ed.] *Neem (Azadirachta indica) for pest control and rural development in Asia and the Pacific.* 1 7th Pacific Science Congress (Honolulu, HI, 1991), in press (1991).
259. **Warthen, J.D. Jr., Stokes, J.B., Jacobson, M., Kosempel, M.F.,** Estimation of azadirachtin content of neem extract and formulations. *Journal of liquid Chromatography*, 7, 591-598 (1984).
260. **Weiser J., Bridggs J.D. (1971).** Identification of pathogens, In H.D. BURGER y N.W.HUSSEY (eds). *Microbial control of insects and mites.* Academic Press. New York . 13-66.
261. **Wood D.M. (1985).** Diptères piqueurs du Canada qui s'attaquent à l' homme et au bétail. *Agriculture Canada . Publication 1781/f.* 38.
262. **Wraight R.J et Roberts D.W. (1987).** Insect control effort with fungi. *Devel. Industr. Microbiol.* **28** :77-87.
263. **Wraight S.P., Jackson M.A et de Kock S.L. (2001).**Production, stabilization and formulation of fungal biocontrol agents. In: Butt TM, Jackson CW, Magan N (eds) *Fungi As Biocontrol Agents, Progress, Problems and Potential.*253–288. CABI Publishing, New York.

264. **Yakkundi, S.R., Tejanathi, R., Ravendranath, B.**, Variation of azadirachtin content during growth and storage of neem *Azadirachta indica* seed. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 43, 2517-2519 (1995).
265. **Yamasaki, R.B., Klocke, J.A.**, Structure bioactivity relationship of azadirachtin, a potential insect control agent. *J Agric Food Chem* , 35, 467-471 (1987).
266. **Zimmermann G. (2007)**. Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Biocontr.Sci.Technol* .17 :879-920.

Annexes

RESUME

Les moustiques ont pendant longtemps constitué une source de nuisance de par les maladies qu'ils transmettent, les piqûres et les bourdonnements gênants. Ils constituent par ailleurs un problème de santé publique. C'est pourquoi cette étude s'est inscrite dans un but de trouver un biopesticide qui peut lutter efficacement contre les larves de moustique, mais aussi être une alternative aux pesticides chimiques rémanents dans l'environnement. Pour atteindre ce but, en milieu semi-naturel, nous avons déterminé les CL50 et CL90. Pour cela, nous avons prélevé les larves de moustiques que nous avons réparties dans 6 bacs différents dont 5 sont traités avec les biopesticides et un servant de témoin. Chaque bac contenait 100 larves, 5 litres d'eau distillée et une pincée de poudre de pain servant de nourriture aux larves de moustique. Les concentrations suivantes ont été utilisées : avec Suneem1% : Bac témoin : 0 ml ; Bac 1: 4 ml ; Bac 2 = 5 ml ; Bac 3 = 6 ml; Bac 4 = 7 ml ; Bac 5 = 8 ml ; avec du *Metarhizium* : 7,5.10⁸ spores/ml dans le premier bac, 10.10⁸ spores/ml dans le deuxième bac, 12,5.10⁸ spores/ml dans le troisième bac, 15.10⁸ spores/ml dans le quatrième bac et 17,5.10⁸ spores/ml dans le cinquième bac ; avec le mélange : 2 ml + 5.10⁸ spores dans le premier bac ; 2ml+7,5.10⁸ spores dans le deuxième bac ; 2ml+10.10⁸ spores dans le troisième bac; 2ml+12,5.10⁸ spores dans le quatrième bac et 2ml+14.10⁸ spores dans le cinquième bac. En milieu naturel les larves de moustique ont été traitées directement dans les gîtes avec des quantités de Suneem1% allant de 25, 30, 35 et 40 ml. Et des quantités de spores de *Metarhizium anisopliae* de 10 à 12,5 mg sont appliquées dans différents gîtes. Pour traiter les larves de moustique avec le mélange Suneem 1% et *Metarhizium anisopliae* on a utilisé un mixte de concentration de 40 ml d'azadirachtine suneem1% additionnée à 10 mg de spores de *Metarhizium anisopliae*. Cette méthodologie nous a permis d'obtenir les résultats suivants. En effet, *Metarhizium anisopliae* var. *acridium* ou « Green muscle » provoque 50% mortalité des larves de moustique au bout de 3 jours. Suneem 1% a donné une mortalité satisfaisante de plus de 60% au bout de 2 jours. Le mélange Suneem1% et *Metarhizium anisopliae* a occasionné une forte mortalité avec un taux de plus de 90% en 3 jours et a aussi empêché une mue larvaire stoppant ainsi leur croissance et leur développement. En somme, *Metarhizium anisopliae* et Suneem 1% sont tous les deux efficaces contre les larves de moustique et sont compatibles et peuvent sommer leur action toxique sur les larves de moustiques.

Mots clés : Paludisme, larves de moustiques, biopesticides, Suneem1%, *Metarhizium anisopliae*

ABSTRACT

Mosquitoes have long been a source of nuisance due to diseases they transmit, punctures and annoying buzz. They are also a public health problem. That is why this study was set up with the aim of finding a biopesticide that can fight effectively against mosquito larvae but also be an alternative to persistent chemical pesticides in the environment. To achieve this goal, in a semi-natural environment, we determined the LC50 and CL90. For this, we took the mosquito larvae that we divided into 6 different bins, 5 of which are treated with biopesticides and one serving as a control. Each bin contained 100 larvae, 5 liters of distilled water, and a pinch of bread powder to feed the mosquito larvae. The following concentrations were used: with Suneem 1%: Control: 0 ml; Tray 1: 4 ml; Tray 2 = 5 ml; Tray 3 = 6 ml; Tray 4 = 7 ml; Tray 5 = 8 ml; with *Metarhizium*: 7.5.10⁸ spores/ml in the first tray, 10.10⁸ spores/ml in the second tray, 12.5.10⁸ spores/ml in the third tray, 15.10⁸ spores/ml in the fourth tray and 17.5.10⁸ spores/ml in the fifth tray; with the mixture: 2 ml + 5.10⁸ spores in the first tank; 2ml + 7,5.10⁸ spores in the second tank; 2ml + 10.10⁸ spores in the third tray; 2ml + 12.5.10⁸ spores in the fourth tray and 2ml + 14.10⁸ spores in the fifth tray. In the wild mosquito larvae have been treated directly in the deposits with amounts of Suneem 1% ranging from 25, 30, 35 and 40 ml. And quantities of *Metarhizium anisopliae* spores of 10 to 12.5 mg are applied in different roosts. To treat mosquito larvae with Suneem 1% and *Metarhizium anisopliae* a 40 ml concentration of azadirachtin suneem1% was added to 10 mg of *Metarhizium anisopliae* spores. This methodology allowed us to obtain the following results. Indeed, *Metarhizium anisopliae* var. *acridium* or "green muscle" causes 50% mortality of mosquito larvae after 3 days. Suneem 1% gave a satisfactory mortality of more than 60% after 2 days. The mixture Suneem1% and *Metarhizium anisopliae* caused a high mortality with a rate of more than 90% in 3 days and also prevented a larval moult thus stopping their growth and their development. In short, *Metarhizium anisopliae* and Suneem 1% are both effective against mosquito larvae and are compatible and can add to their toxic action on mosquito larvae.

Keywords: Malaria, mosquito larvae, biopesticides, Suneem1%, *Metarhizium anisopliae*

