

## **LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS**

**AIEA** : Agence Internationale de l'Énergie Atomique

**BIOPASS** : Biologie des Populations Animales Sahélo-Soudaniennes

**CIRAD** : Centre de coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement

**DL50** : Dose Létale 50

**DPV** : Direction de la Protection des Végétaux

**FF** : Femelles Fertiles

**GLM** : Modèle Linéaire Généralisé

**IRD** : Institut de Recherche pour le Développement

**FF** : Femelle fertile

**MAT** : Male Annihilation Technique

**MF** : Mâle Fertile

**MS** : Mâle Stérile

**SDA** : Sabouraud Dextrose Agar

**TIS** : Techniques d'Insectes Stériles

**TL50** : Temps létale 50

**UCAD** : Université Cheick Anta Diop de Dakar

## LEXIQUE

**Adjuvants** : Substance généralement démunie d'activité biologique propre, ajoutée au produit fini et capable de modifier significativement les propriétés physiques (degré de pulvérisation, solubilité, pouvoir de dispersion, l'adhérence au végétal...) et biologiques (bonne pénétration intra-cuticulaire, ou une plus lente décomposition) des produits phytopharmaceutiques.

**Appressoria** : Chez les champignons parasites, on distingue une structure ramifiée à l'extrémité d'un hyphe permettant un accroissement de la surface d'échange avec l'organisme hôte, pluriel d'appressorium.

**Blastospore** : Spore arrondie ou ovoïde formée par bourgeonnement apical d'un filament mycélien ou d'une cellule, comme chez les levures.

**Conidie** : Spore fongique (Ascomycètes, Basidiomycètes...) assurant la multiplication asexuée.

**Dose**: Quantité d'une substance à laquelle une cible est exposée (durant une période donnée).

Une dose mesure l'exposition.

**Dose minimale infectante ou Lowest Observed Effect Level (LOEL)**: C'est la plus faible dose d'un produit utilisé dans un test de toxicité induisant un effet toxique.

**Dose saturante** : C'est la dose au-delà de laquelle la réponse (mortalité) atteint un plateau

**DL50** : C'est la dose létale qui tue 50% des individus exposés.

**Endophyte** : Un micro-organisme souvent une bactérie ou un champignon, qui vit dans une plante pendant au moins une partie de son cycle de vie sans provoquer de maladie apparente.

**Entomopathogène** : Micro-organisme susceptible de causer des maladies aux insectes.

**Entomovectoring** : Technique qui consiste à utiliser des insectes comme vecteur pour propager une substance utilisée dans la lutte biologique contre les ravageurs et les maladies des plantes.

**Infection** : Une infection désigne l'envahissement puis la multiplication de micro-organismes au sein d'un organisme vivant.

**Mycélium** : Partie végétative des champignons ou de certaines bactéries filamenteuses comme les Actinomycètes. Il est composé d'un ensemble de filaments, plus ou moins ramifiés, appelés hyphes, que l'on trouve dans le sol ou le substrat de culture.

**Pathogénicité** : La capacité d'un agent microbien à provoquer une maladie.

**Technique de l'insecte stérile** : Technique de lutte contre les ravageurs qui vise à produire en masse des mâles conspécifiques stériles, dans le but de faire des lâchers inondatifs pour qu'ils entrent en compétition avec les mâles sauvages et s'accouplent avec les femelles sauvages.

**TL50** : Temps léthal moyen théorique après lequel 50% de la population exposée à une dose déterminée meurent.

**Virulence** : La virulence est considérée comme la gravité de la manifestation d'une maladie qui ne peut être mesurée que chez les individus infectés. En écologie, la virulence est mesurée par la diminution de valeur sélective (survie et/ou reproduction) de l'hôte due à l'infection.

## LISTE DES FIGURES

Figure 1: Œufs de <i>B. dorsalis</i> .....	10
Figure 2: Larves de <i>B. dorsalis</i> .....	11
Figure 3: Pupes de <i>B. dorsalis</i> .....	11
Figure 4: Adultes de <i>B. dorsalis</i> .....	12
Figure 5: Cycle biologique de <i>B. dorsalis</i> à 25°C (Fletcher, 1987).....	13
Figure 6: Poudre de spores non enrobées .....	18
Figure 7: Spores enrobées .....	19
Figure 8: Élevage de <i>B. dorsalis</i> .....	20
Figure 9: Étapes de la préparation du milieu de culture .....	21
Figure 10: Inoculât fongique .....	22
Figure 11: Spores de <i>Metarhizium anisopliae</i> sur cellule de Malassez.....	23
Figure 12: Vortexage.....	24
Figure 13: Tubes de contamination .....	25
Figure 14: Dispositif du test de virulence.....	28
Figure 15: Dispositif de contamination des larves (L3) et pupes .....	30
Figure 16: Nombre de spores par gramme de poudre de formulation sèche .....	32
Figure 17: Taille des spores en fonction des souches.....	33
Figure 18: Charge en spores de la mouche en fonction de la durée de vortexage.....	34
Figure 19: Charge en spores des mouches en fonction de la taille du dispositif de contamination .....	34
Figure 20: Évolution du nombre de spores et de capsules d'enrobage en solution au cours du temps .	35
Figure 21: Capsule de petite taille sur Malassez .....	36
Figure 22: Capsule de taille moyenne sur cellule de Malassez .....	37
Figure 23: Capsule de grande taille sur Malassez .....	37
Figure 24: Évolution du mycélium avec spores enrobées .....	38
Figure 25: Nombre de boîtes présentant du mycélium par enrobage en fonction du temps.....	39
Figure 26: Nombre de spores dans un gramme de formulation enrobée.....	40
Figure 27: Taux de survie des mâles fertiles de <i>B. dorsalis</i> en fonction du temps.....	41
Figure 28: Taux de survie des femelles fertiles de <i>B. dorsalis</i> en fonction du temps .....	42
Figure 29: Taux de survie des mâles stériles de <i>B. dorsalis</i> en fonction du temps .....	42
Figure 30: Charge en spores de tous types de mouches confondus en fonction des souches.....	43
Figure 31: Taux de survie ( $\pm$ intervalle d'erreur) des mâles et femelles fertiles (confondus) de <i>B. dorsalis</i> (n=20) en fonction du temps .....	44

Figure 32: Charge en spores des mouches en fonction des produits .....	45
Figure 33: Charge en spores des mouches contaminées avec le MET69 OD et MET1 en fonction des Doses .....	46
Figure 34: Taux de survie des MF et FF de <i>B. dorsalis</i> en fonction des doses pour MET1 et MET69 OD .....	47
Figure 35: Taux de survie des mouches en fonction de différentes doses de MET1 au cours du temps .....	47
Figure 36: Taux de survie des mouches en fonction de différentes doses de MET69 OD au cours du temps .....	48
Figure 37: Pourcentage de mortalité des pupes et adultes de <i>B. dorsalis</i> (larves L3 placées dans du sable contaminé).....	49
Figure 38: Pourcentage de mortalité des pupes et adultes de <i>B. dorsalis</i> (pupes placées dans du sable contaminé).....	50

### **LISTE DES TABLEAUX**

Tableau 1 : Distribution granulométrique des enrobages .....	19
Tableau 2 : Pourcentage de germination des souches en fonction du temps.....	31

## RÉSUMÉ

La lutte biologique, notamment l'utilisation de champignons entomopathogènes, est une alternative intéressante aux produits chimiques pour lutter contre *Bactrocera dorsalis*. Pour veiller à l'utilisation rationnelle de ces entomopathogènes, l'entomovectoring, qui consiste à utiliser des individus stériles comme vecteur pour propager l'entomopathogène dans les populations cible de *B. dorsalis*, serait prometteur. C'est dans ce contexte qu'une étude visant à évaluer la pathogénicité de différentes souches de *Metarhizium anisopliae* et de différents enrobages des spores pour lutter contre *B. dorsalis* a été effectuée. L'objectif de cette étude est d'identifier une souche qui pourra servir pour la mise au point d'un programme de lutte biologique par entomovectoring au Sénégal. Quatre souches de *M. anisopliae* et quatre formulations d'enrobage d'origine végétale ont été étudiées. L'étude a ciblé des mâles et femelles fertiles ainsi que des mâles stériles de *B. dorsalis*. Des expérimentations préliminaires ont d'abord été effectuées pour calibrer les protocoles. Ensuite (i) la virulence des différentes souches et de l'enrobage le plus prometteur a été évaluée, (ii) l'effet dose des deux souches les plus prometteuses a été testé, et (iii) la pathogénicité de la souche du partenaire privé la plus prometteuse a été évaluée aux stades larves et pupes de *B. dorsalis*. Toutes les souches ont permis d'atteindre 100% de mortalité pour tous les types de mouches testées (*B. dorsalis* mâle/femelle, fertile/stérile) à des vitesses différentes mais toutes en moins de 7 jours. Au mieux 50% des mouches étaient tuées au bout de 2.49 jours. Les autres TL(Temps Létaux)<sub>50</sub> obtenues étaient de 2.99 jours, 3.67 jours et 6.6 jours. Le test de virulence effectué avec l'enrobage montre que plus de 30% des mouches fertiles ont survécu 20 jours après la contamination avec un TL<sub>50</sub> trop tardif. Le test de dose a montré des DL(Doses Létales)<sub>50</sub> (sous 2 semaines) de  $2.23 \times 10^7$  spores/cm<sup>2</sup> et  $2.21 \times 10^7$  spores/cm<sup>2</sup> pour les dispositifs de contamination. Les DL<sub>99</sub> ont des valeurs très élevées. La dose minimale infectante n'a pas pu être déterminée. La contamination des larves par du sable contaminé a montré un effet significatif sur la mortalité. Par contre, la contamination des pupes par le même moyen n'a pas été efficace. Nos résultats ont permis de mettre en évidence une souche plus intéressante que les autres pour l'entomovectoring bien que toutes les souches testées soient efficaces contre *B. dorsalis*. Une utilisation complémentaire de l'entomopathogène en pulvérisation au sol pourrait aussi être envisagée dans un programme de lutte.

Mots clés : Lutte biologique, Entomovectoring, *Bactrocera dorsalis*, *Metarhizium anisopliae*, Enrobages, Pathogénicité, Virulence, Dose, Mortalité

## ABSTRACT

Biological control, including the use of entomopathogenic fungi, is an interesting alternative to chemicals to control *Bactrocera dorsalis*. Entomovectoring, which consists in using sterile individuals as a vector to spread the entomopathogen in the target pest populations, would be promising to ensure the rational use of these entomopathogens. In this context, a study aiming at assessing the pathogenicity of different strains of *Metarhizium anisopliae* and different spore coatings to control *B. dorsalis* was carried out. The objective of this study is to identify a strain suitable to be used in a biological control program through entomovectoring in Senegal. Four strains of *M. anisopliae* and four coatings made of plant-derived formulations were studied. The study targeted fertile males and females as well as sterile males of *B. dorsalis*. To begin, preliminary experiments were performed to calibrate the experimental design. Then, (i) the virulence of the different strains and the most promising coating was evaluated, (ii) the dose-effect of the two most promising strains was tested, and (iii) the pathogenicity to the larval and pupae stages of *B. dorsalis* was evaluated for the most promising strain of the private partner. All strains achieved 100% mortality for all types of flies tested (male/female, fertile/sterile *B. dorsalis*) at different speeds but all within 7 days. At best, 50% of the flies were killed after 2.49 days. The other LT(Lethal Times)<sub>50</sub> obtained were 2.99 days, 3.67 days, and 6.6 days. The virulence test carried out with the coating showed that more than 30% of the fertile flies survived 20 days after contamination with a too late LT<sub>50</sub>. The dose test showed LD(Lethal Doses)<sub>50</sub> (within two weeks) of  $2.23 \times 10^7$  spores/cm<sup>2</sup> and  $2.21 \times 10^7$  spores/cm<sup>2</sup> in the contamination device. The LD<sub>99</sub> values were very high. The minimum infective dose was not determined. Contamination of the larvae with contaminated sand showed a significant effect on mortality. Conversely, contamination of pupae by the same means was not effective. Our results showed that one strain was more interesting than the others for entomovectoring, although all strains tested were effective against *B. dorsalis*. Complementary use of the entomopathogen in soil application could also be considered in a control program.

**Keywords:** Biological control, Entomovectoring, *Bactrocera dorsalis*, *Metarhizium anisopliae*, Coatings, Pathogenicity, Virulence, Dose, Mortality

## TABLE DES MATIÈRES

DÉDICACES.....	i
REMERCIEMENTS .....	ii
LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS.....	iii
LEXIQUE .....	iv
LISTE DES FIGURES.....	v
LISTE DES TABLEAUX .....	vi
RÉSUMÉ .....	vii
ABSTRACT .....	viii
TABLE DES MATIÈRES .....	ix
INTRODUCTION .....	1
CHAPITRE 1 : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE .....	3
1.1. La lutte biologique.....	3
1.1.1. Les différents types de luttés biologiques.....	3
1.2. Les entomopathogènes utilisés en lutte biologique .....	4
1.2.1. Les bactéries .....	4
1.2.2. Les Virus.....	4
1.2.3. Les champignons .....	5
1.2.3.1. Intérêt et utilisation des champignons entomopathogènes.....	5
1.2.3.2. Pathogénicité et virulence des champignons entomopathogènes .....	6
1.2.3.3. Facteurs affectant l'efficacité des champignons entomopathogènes .....	6
1.2.3.4. Modes d'application des champignons entomopathogènes .....	7
1.3. La technique d'enrobage appliquée aux entomopathogènes .....	8
1.4. Les modèles biologiques .....	9
1.4.1. <i>Bactrocera dorsalis</i> .....	9
1.4.1.1. Répartition géographique .....	9
1.4.1.2. Position taxonomique de <i>Bactrocera dorsalis</i> .....	9
1.4.1.3. Description des stades de développement .....	10
1.4.1.3.1. Œuf.....	10
1.4.1.3.2. Larve .....	10
1.4.1.3.3. Pupa.....	11
1.4.1.3.4. Adulte .....	11
1.4.1.4 Bioécologie .....	12
1.4.1.5. Plantes hôtes .....	13

1.4.1.6. Méthodes de lutte aux champs contre <i>B. dorsalis</i> .....	13
1.4.1.6.1. La lutte préventive (prophylactique).....	13
1.4.1.6.2. Lutte biologique .....	14
1.4.1.6.3. Lutte Chimique .....	15
1.4.2. <i>Metarhizium anisopliae</i> ssp:.....	16
1.4.2.1. Origine .....	16
1.4.2.2. Systématique .....	16
1.4.2.3. Description morphologique .....	16
1.4.2.4. Mode d'infection et d'action.....	16
CHAPITRE 2 : MATERIEL ET METHODES .....	18
2.1. Matériel biologique .....	18
2.1.1. Le champignon entomopathogène <i>Metarhizium anisopliae</i> .....	18
2.1.1.1. <i>Metarhizium anisopliae</i> en spores libres .....	18
2.1.1.2. L'enrobage des spores.....	18
2.1.2. La mouche des fruits <i>Bactrocera dorsalis</i> .....	19
2.2. Méthodologie .....	20
2.2.1. Tests Préliminaires .....	21
2.2.1.1. <i>Metarhizium anisopliae</i> en spores libres .....	21
2.2.1.1.1. Évaluation du taux de germination des souches.....	21
2.2.1.1.2. Évaluation du nombre de spores par gramme de poudre de formulation sèches	22
2.2.1.1.3. Caractérisation de l'impact de la durée de vortexage sur le nombre de spores comptées sur les mouches contaminées .....	23
2.2.1.1.4. Caractérisation de l'impact de la taille du dispositif de contamination sur la charge en spores de la mouche.....	24
2.2.1.2. <i>Metarhizium anisopliae</i> en spores enrobées .....	25
2.2.1.2.1. Test de dissolution de l'enrobage .....	25
2.2.1.2.2. Caractérisation de la taille des capsules d'enrobage par rapport aux spores non enrobées.....	26
2.2.1.2.3. Évaluation du taux de germination des spores enrobées .....	26
2.2.2. Test de virulence .....	26
2.2.2.1. <i>Metarhizium anisopliae</i> en spores libres .....	26
2.2.2.2. <i>Metarhizium anisopliae</i> en spores enrobées .....	27
2.2.3. Dose minimale infectante et dose saturante.....	28
2.2.4. Pathogénicité sur larves et pupes .....	29
2.2.5. Analyses statistiques .....	30
CHAPITRE 3 : RESULTATS ET DISCUSSION .....	31
3.1. Résultats.....	31

3.1.1. Tests préliminaires .....	31
3.1.1.1. <i>Metarhizium anisopliae</i> en spores libres .....	31
3.1.1.1.1. Évaluation du taux de germination des souches.....	31
3.1.1.1.2. Évaluation du nombre de spores par gramme de poudre de formulation sèches	32
3.1.1.1.3. Estimation de la taille des spores pour chaque formulation sèche .....	32
3.1.1.1.4. Caractérisation de l'impact de la durée de vortexage des mouches contaminées	33
3.1.1.1.5. Caractérisation de l'impact de la taille du dispositif de contamination sur la	34
charge en spores .....	34
3.1.1.2. <i>Metarhizium anisopliae</i> en spores enrobées .....	35
3.1.1.2.1. Test de dissolution de l'enrobage .....	35
3.1.1.2.2. Caractérisation de la taille des capsules d'enrobage par rapport aux spores non	35
enrobées.....	35
3.1.1.2.3. Évaluation du taux de germination des spores enrobées.....	38
3.1.1.2.4. Évaluation du nombre de spores par gramme de poudre de formulation enrobée	39
.....	39
3.1.2. Test de virulence .....	40
3.1.2.1. <i>Metarhizium anisopliae</i> en spores libres .....	40
3.1.2.2. <i>Metarhizium anisopliae</i> en spores enrobées .....	43
3.1.3. Dose minimale infectante et dose saturante .....	45
3.1.4. Pathogénicité sur larves et pupes .....	48
3.1.4.1. Contact avec du sable contaminé au stade larvaire.....	48
3.1.4.2. Contact avec du sable contaminé au stade pupes .....	49
3.2. Discussion .....	50
CONCLUSION : .....	54
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	55

## INTRODUCTION

La mangue est une des filières les plus dynamiques du secteur horticole du Sénégal. Elle représente 63 % de la production de fruits et de légumes et emploie des milliers de personnes (Ndoye, 2011). Malgré son importance la filière est confrontée à de nombreuses contraintes qui sont entre autres les attaques d'insectes notamment les mouches des fruits (Vayssières *et al.*, 2014).

Les mouches tropicales de la famille des Tephritidae sont classées parmi les ravageurs les plus dévastateurs des fruits et des légumes dans le monde, causant à la fois des pertes quantitatives et qualitatives (White et Elson-Harris, 1992). Ces pertes sont dues à plusieurs espèces de mouches des fruits dont *Ceratitidis capitata*, *Ceratitidis cosyra* et surtout la mouche orientale des fruits *Bactrocera dorsalis* (Hendel) (syn. *B. invadens*) (Diptera: Tephritidae) qui provoque d'importants dégâts à cause de sa rapidité de multiplication et du nombre élevé de ses plantes hôtes (Ndiaye, 2009).

Au Sénégal, les pertes de récolte causées par *B. dorsalis* varient entre 30 à 50 % dans les Niayes et plus de 60% en Casamance (Ndiaye *et al.*, 2012). En plus des pertes occasionnées, les exigences de qualité deviennent particulièrement difficiles à respecter sur le marché de l'exportation, puisque l'identification d'un seul fruit piqué dans un lot entraîne sa destruction (Ternoy *et al.*, 2006). *Bactrocera dorsalis* a pris une importance toute particulière car son pic de population coïncide avec la période de maturation des mangues et des agrumes (juillet à août) (Ndiaye *et al.*, 2012). Face à cette situation des stratégies de lutte efficace et durable doivent être trouvées.

*Bactrocera dorsalis* est généralement contrôlée dans les vergers par le recours à la lutte chimique (Hsu *et al.*, 2004). Malgré l'efficacité de cette méthode, elle présente des effets néfastes pour les utilisateurs et pour l'environnement comme la persistance de ces produits dans le sol, l'apparition d'espèces résistantes aux pesticides, leur impact sur la santé humaine et animale et la fréquence d'application (Lavabre, 1992). Cependant pour limiter les risques de contamination de l'homme et de l'environnement, la lutte biologique, notamment l'utilisation de champignons entomopathogènes, serait une alternative intéressante (Ekesi *et al.* 2002). Les études menées par Ekesi *et al.* (2011) ont montré l'efficacité du champignon entomopathogène, *Metarhizium anisopliae* Sorokin (Hypocreales: Clavicipitaceae) contre *B. dorsalis*. Pour veiller à l'utilisation rationnelle de cet entomopathogène, plusieurs modes d'application sont utilisés comme le dispositif d'auto-dissémination qui consiste à utiliser

des pièges imprégnés de spores du champignon entomopathogène et d'attractifs de mâles, qui vont assurer la diffusion du pathogène dans la population du ravageur (Gaugler *et al.*, 2012). Dans cette même logique s'ajoute l'entomovectoring qui consiste à utiliser des mouches stériles produites en masse, de les contaminer artificiellement puis les relâcher dans l'agrosystème cible afin qu'elles diffusent le pathogène dans la population de *B. dorsalis* par phorésie. Il serait important d'identifier une souche de *M. anisopliae* qui pourra servir pour la mise au point d'un programme de lutte biologique par entomovectoring. La comparaison des caractéristiques des différentes souches de *M. anisopliae* et de différents types d'enrobages nous permettra d'avoir une idée précise sur la souche la plus intéressante selon les critères spécifiques liés à l'utilisation en entomovectring.

C'est dans cet objectif que s'inscrit notre étude qui consiste à évaluer la pathogénicité de différentes souches de *M. anisopliae* et de différents types d'enrobages des spores pour lutter contre *B. dorsalis*.

De cet objectif général découlent trois objectifs spécifiques

- Créer un cadre expérimental calibré et répétable par l'intermédiaire d'expérimentations préliminaires portant sur la caractérisation du dispositif de contamination des mouches et des enrobages.
- Mesurer la virulence sur les stades adultes des différentes souches et étudier l'impact de l'enrobage sur la virulence.
- Évaluer la pathogénicité des souches sur les stades larve et pupe.

## CHAPITRE 1 : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

### 1.1. La lutte biologique

La lutte biologique est un concept qui rassemble plusieurs disciplines dont l'écologie, l'entomologie, la phytopathologie, la malherbologie et la microbiologie (Eilenberg *et al.*, 2001). La lutte biologique, précisément par utilisation de micro-organismes entomopathogènes est une alternative très prometteuse pour assurer une protection phytosanitaire performante de par l'ubiquité naturelle des agents microbiologiques dans les écosystèmes, leur grande variété, leur dissémination facile, leur spécificité d'action et aussi leur persistance dans l'environnement (Kouassi, 2001).

#### 1.1.1. Les différents types de luttés biologiques

Il existe trois types de luttés biologiques à savoir : la lutte biologique classique ou par importation, la lutte biologique par conservation et la lutte biologique par augmentation (inoculation et inondation) (Van Lenteren, 2000).

- **La lutte biologique classique ou par importation**, consiste en une introduction intentionnelle d'espèces exotiques pour lutter contre des ravageurs. Cette stratégie est utilisée lorsqu'il s'agit d'un ravageur exotique que les ennemis autochtones n'arrivent pas à contrôler (Eilenberg *et al.*, 2001). C'est le cas de l'espèce invasive *B. dorsalis*, qui est devenue le principal ravageur de mangues en Afrique de l'Ouest après son introduction sur le continent (Vayssières *et al.*, 2014).
- **La lutte biologique par conservation**, consiste à modifier l'environnement ou les pratiques en vue de protéger ou d'augmenter les populations des ennemis naturels d'un ravageur cible afin de réduire sa population (Eilenberg *et al.*, 2001). Van Mele *et al* (2007) et Diamé *et al* (2015) suggèrent des moyens comme l'apport de nourriture pour conserver la fourmi prédatrice généraliste (*Oecophilla. Longinoda*) dans les vergers pour lutter contre les mouches des fruits.
- **La lutte biologique par augmentation**, est une méthode de lutte dans laquelle des ennemis naturels produits en masse sont commercialisés et introduits périodiquement sur des surfaces de cultures pour réduire les populations de ravageurs cibles (Lenteren, 2000). Il existe deux formes de lutte biologique par augmentation : la méthode inondative et les lâchers saisonniers inoculatifs (Lenteren, 2000).

La **méthode inoculative** consiste en la libération d'agents de lutte biologique avec l'objectif qu'ils se multiplieront afin de contrôler le ravageur pendant une période bien

définie, mais pas de manière permanente (Eilenberg *et al.*, 2001). Par exemple, l'utilisation d'ennemis naturels tels que le parasitoïde *Encarsia formosa* (Gahan) (Hymenoptera, Aphelinidae) de la mouche blanche et le prédateur acarien *Phytoseiulus persimilis* (Athias-Henriot) (Arachnida, Mesostigmata, Phytoseiidae) (Lenteren, 2000) se font par cette approche.

La **méthode inondative** consiste en l'utilisation d'organismes vivants comme bio-insecticides en quantité importante afin de réduire considérablement la population de ravageurs cibles de manière ponctuelle (Eilenberg *et al.*, 2001). Comme exemples, on peut citer l'utilisation de *Trichogramma* spp. (Hymenoptera, Trichogrammatidae) contre la pyrale du maïs en Europe (Lenteren, 2000) et l'utilisation de *Metarhizium anisopliae* (Metschn).Sorokin var. *acridum* pour lutter contre les sauterelles dans le sahel (Eilenberg *et al.*, 2001).

A l'échelle d'une zone de production, la lutte autocide (lâchers des mâles stériles) peut être très efficace permettant d'aller jusqu'à l'éradication des populations d'une espèce dans une région donnée (HANNE, 2006).

## **1.2. Les entomopathogènes utilisés en lutte biologique**

Les micro-organismes entomopathogènes utilisés en lutte biologique appartiennent à plusieurs taxons à savoir les virus, les bactéries, les nématodes, les protozoaires et les microchampignons (Kouassi 2001).

### **1.2.1. Les bactéries**

Selon Starnes *et al* (1993), plus d'une centaine de bactéries ont été identifiées comme ayant un potentiel d'utilisation en lutte biologique. Ces bactéries entomopathogènes appartiennent surtout à trois grandes familles qui sont les Bacillaceae, Enterobacteriaceae et Pseudomonaceae (Greathead *et al.*, 1994). À l'heure actuelle, *Bacillus thuringiensis* Berliner et *B. sphaericus* sont les espèces les plus utilisées en lutte contre les ravageurs.

### **1.2.2. Les Virus**

Les virus entomopathogènes se divisent généralement en deux grands groupes distincts, d'une part, ceux possédant des corps d'inclusion paracrystallin et ceux sans corps d'inclusion. On les regroupe en sept familles. Ce sont, les Baculoviridae, Reoviridae, Poxviridae (à corps d'inclusion); les Iridoviridae, Parvoviridae, Picornoviridae et les Rhabdoviridae (sans corps d'inclusion) (Faulkner et Boucias, 1985; Arata *et al.*, 1978). Ces familles renferment la

plupart des 650 espèces de virus entomopathogènes connues (Khachatourians, 1986). Ce sont les Baculoviridae, les Reoviridae (Miller *et al.*, 1983) et les virus entomopox (poxviridae) qui sont les plus utilisés en lutte biologique, car ils sont bénins pour les vertébrés, les corps d'inclusion ne pouvant se développer que chez les insectes (Paynes, 1982).

### **1.2.3. Les champignons**

Parmi les micro-organismes utilisés en lutte biologique, plus de 700 espèces de microchampignons sont entomopathogènes (Starnes *et al.*, 1993) et jouent un rôle important dans la régulation naturelle des populations d'insectes (Wraight et Roberts, 1987; Ferron, 1978). 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 utilisés en lutte biologique proviennent des Deuteromycètes (*Fungi imperfecti*). Les espèces des genres *Beauveria*, *Metharizium*, *Verticillium*, *Erynia*, *Hirsutella*, *Entomophthora* et *Entomophaga* sont les plus utilisées en lutte biologique (Wraight et Roberts, 1987; Goettel, 1992)

Les maladies fongiques chez les insectes sont fréquentes et répandues. Elles déciment souvent les populations d'insectes (Hajek et St leger, 1994).

#### **1.2.3.1. Intérêt et utilisation des champignons entomopathogènes**

Les champignons entomopathogènes sont des agents de lutte très intéressants. (Carruthers et Soper, 1987). Ils peuvent être produits en masse à moindre coût et peuvent être appliqués avec les méthodes conventionnelles (Kouassi, 2001). Leur intérêt agronomique est considérable dans la lutte biologique contre les ravageurs de cultures et ils sont donc l'objet d'études de plus en plus poussées.

Les espèces de *Metarhizium* sont pathogènes d'une large gamme d'arthropodes. En Suisse, des produits commercialisés à base de *Metarhizium anisopliae* sont confectionnés sur des grains d'orges contre les vers blanc du hanneton de la St. Jean (Metapro, *Metarhizium* Schweizer et GranMet GR) et les otiorrhynques sillonnés ou otiorrhynques de la vigne (Bio 1020 et Met52 granular). Dans le monde, des espèces particulières de *Metarhizium* sont utilisées pour lutter contre de nombreux prédateurs des cultures comme : *Adoryphorus couloni* (Coleoptera : Scarabaeidae) en Australie, le criquet (Acrididae) en Afrique (produit commercial sous le nom de "Green muscle"), *Cleonus punctiventris* (Coleoptera : Scarabaeidae) et *Anisoplia austriaca* (Coleoptera : Curculionidae) en Amérique. Certaines

souches sont également exploitées pour lutter contre les moustiques dans les régions à fort taux de paludisme (Lefort, 2018).

### **1.2.3.2. Pathogénicité et virulence des champignons entomopathogènes**

Les termes pathogénicité et virulence sont utilisés dans de nombreuses disciplines scientifiques dont la médecine, l'épidémiologie, l'écologie évolutive, la microbiologie et la pathologie des plantes et des insectes. Les définitions de ces termes varient d'une discipline à l'autre et au sein d'une même discipline. La plupart des pathologistes définissent la pathogénicité comme étant la capacité d'un agent microbien à provoquer une maladie et la virulence est considérée comme la gravité de la manifestation d'une maladie qui ne peut être mesurée que chez les individus infectés (Casadevall et Pirofski, 1999). La pathogénicité peut être considérée comme un terme qualitatif alors que la virulence est une notion quantitative. On peut dire qu'un organisme est pathogène ou non dans un contexte particulier, mais pas "plus pathogène" qu'un autre. Ainsi pour un même pouvoir pathogène, il peut y avoir des souches plus ou moins virulentes (Lacey, 1997).

En écologie, la virulence est mesurée par la diminution de valeur sélective (survie et/ou reproduction) de l'hôte due à l'infection. Des tests biologiques dose-réponse sont effectués pour estimer la DL50 ou la CL50 (dose ou concentration nécessaire pour tuer 50 % des hôtes exposés). Une autre estimation courante des essais biologiques est la TL50 (temps nécessaire pour tuer 50 % des hôtes exposés), qui est une mesure de la virulence (Thomas et Elkinton, 2004).

L'effet des agents pathogènes fongiques sur les insectes hôtes peut varier d'une espèce à l'autre. La pathogénicité de l'inoculum sporal et la spécificité de l'hôte sont deux paramètres importants dans le choix de l'isolat fongique en lutte biologique (Dimbi, 2009).

Ekesi *et al.* (1998) ont montré que les souches *Beauveria bassiana* et *M. anisopliae* ont causé respectivement des mortalités de 29 à 100 % et 54 à 100 % avec des TL50 de 2,7 et 2,4 jours chez le thrips des fleurs de légumineuses, *Megaluruthrips sjostedti*. Espin *et al* (1989) ont observé une mortalité de 69 à 78% chez les adultes de *Ceratitis capitata* atteints de *M. anisopliae*.

### **1.2.3.3. Facteurs affectant l'efficacité des champignons entomopathogènes**

Ces champignons, bien qu'efficaces, ont souvent une activité très dépendante des conditions environnementales notamment climatiques (Ferron *et al.*, 1991). Les principaux facteurs limitant l'efficacité des champignons entomopathogènes sont abiotiques (température,

humidité relative, rayon UV ... ; Sabahi, 2008). Les effets de certains facteurs sur la viabilité des conidies ont été très étudiés comme la température (Doberski, 1981; Stathers *et al.*, 1993) et l'effet du rayonnement solaire sur la rémanence ou l'inactivation de l'inoculum infectieux (Gardner *et al.*, 1977), et l'effet de l'humidité (Fargues, 1972).

#### **1.2.3.4. Modes d'application des champignons entomopathogènes**

Une large gamme de technologies est disponible pour l'application des entomopathogènes, y compris divers systèmes d'irrigation et de pulvérisation (Shapiro-Ilan, 2006). L'entomovectoring peut également être une option innovante intéressante (Hokkanen et Menzler-Hokkanen, 2007).

- **Pulvérisation foliaire et application au sol**

La pulvérisation de spores en solution peut être utilisée comme méthode de lutte directe, en pulvérisant le feuillage ou le sol (pour les insectes du sol ou effectuant une partie de leur cycle dans le sol) afin que les spores pulvérisées entrent en contact avec les insectes, ou bien comme méthode de lutte indirecte, afin que l'entomopathogène colonise la plante et la protège ensuite. Wraight et ses collaborateurs (2016) ont montré l'efficacité des pulvérisations foliaires et florales de champignons entomopathogènes (*Beauveria bassiana* souche GHA, *M. brunneum* souche F52, et *M. anisopliae* s.l. souche ESC-1) contre les thrips dans des conditions d'humidité variables. Les trois champignons ont produit des niveaux similaires de contrôle des thrips dans des conditions d'humidité comparables. Le maintien d'un taux d'humidité relative de 80 % pour environ 25 h pendant les périodes post-pulvérisation a permis de contrôler plus de 70 % des thrips dans le feuillage. Des périodes d'humidité élevée beaucoup plus longues (35 h) ont été nécessaires pour obtenir un contrôle comparable dans les fleurs. Parsa *et al.* (2013) ont testé les pulvérisations foliaires et les arrosages du sol comme méthodes d'inoculation pour introduire *B. bassiana* comme endophyte dans le haricot. Les résultats ont montré que les pulvérisations foliaires et les arrosages du sol ont entraîné une colonisation endophytique par *B. bassiana* dans plus de 80% des plantes traitées. Les pulvérisations à faible ou ultra-faible volume de suspensions de conidies émulsifiables ou huileuses de *B. bassiana* combinées avec d'autres techniques se sont avérées compétitives avec les insecticides chimiques pour la protection annuelle de 0,8 à 1,3 million d'hectares contre les insectes ravageurs des forêts et des fermes en Chine (Feng *et al.*, 1994).

Kaiser *et al* (2020) ont montré l'efficacité de la pulvérisation directe (via une chambre de pulvérisation) d'un mélange de spores de *B. bassiana* et d'huile de colza qui a augmenté la

mortalité des coléoptères du pollen beaucoup plus que ce que l'on attendait de l'effet additif des applications uniques.

- **Entomovectoring**

L'entomovectoring consiste à utiliser des insectes pollinisateurs comme vecteur pour propager une substance utilisée dans la lutte biologique contre les ravageurs et les maladies des plantes. L'utilisation d'insectes pollinisateurs dans le cadre de la lutte biologique contre les insectes nuisibles et les maladies trouve son origine au début des années 90, lorsque les abeilles domestiques étaient utilisées pour répandre des antagonistes de phytopathogènes sur les fleurs à la place des pulvérisations (Peng *et al.*, 1992). Il a toutefois fallu attendre 2007 pour que le terme entomovectoring soit utilisé pour la première fois (Hokkanen et Menzler-Hokkanen, 2007). Le produit utilisé est généralement une poudre contenant un virus, une bactérie ou un champignon, parfois mélangée à des adjuvants en poudre (Smagghe *et al.*, 2012).

Al-Mazra'awi *et al* (2007) ont évalué à l'aide de distributeurs d'inoculum montés sur des ruches, les facteurs affectant l'acquisition de *B. bassiana* par les abeilles mellifères (entomovecteur). Les résultats ont montré que le nombre de conidies portées par les abeilles sortant des distributeurs différait selon le type d'adjuvants utilisé. Les abeilles qui passaient dans la farine de maïs acquéraient plus d'inoculum. Mommaerts *et al* (2012) ont évalué la compatibilité de cinq formulations de poudre (Prestop - Mix, Signum, le kaolin, la farine de blé et la cellulose) avec *Bombus terrestris* utilisées dans une approche entomovectorielle. Les résultats montrent qu'à part le kaolin, les formulations testées peuvent être utilisées sans danger avec *B. terrestris*. Baxter *et al* (2008) ont évalué le potentiel de deux poudres électrostatiques (Entomag et Entostat) en tant que composant d'une méthode d'autodissémination pour le contrôle de *Plodia interpunctella*. Les résultats ont montré qu'un poids supérieur de 49% d'Entostat a été transféré par rapport à Entomag.

### **1.3. La technique d'enrobage appliquée aux entomopathogènes**

L'enrobage est un procédé industriel consistant à appliquer une couche de liquide ou de poudre sur la surface d'un produit de base de forme quelconque afin de lui conférer des propriétés particulières. Il est notamment utilisé dans les secteurs métallurgique, chimique, parachimique, pharmaceutique et agroalimentaire (Thies, 1987). L'application d'une couche liquide sur de très petites particules est appelée encapsulation. L'encapsulation est une technique d'enrobage par des matières grasses végétales à des points de fusions variables. La

technique d'encapsulation permet d'immobiliser le principe actif, de le protéger du milieu extérieur, de contrôler et cibler sa libération ou encore de le structurer. La substance active est libérée lorsque le point de fusion est atteint ou par action enzymatique (Poncelet, 2006).

L'application de la technique d'encapsulation sur les entomopathogènes s'avère intéressante. Dunkle et Shasha (1988) ont montré l'efficacité de *Bacillus thuringiensis* encapsulée dans une matrice d'amidon contre les larves néonates et les larves de deuxième stade de la pyrale du maïs, *Ostrinia nubilalis* (Hiibner). En effet les larves ont ingéré la *B. thuringiensis* encapsulée et digéré la matrice d'amidon ce qui a entraîné la libération dans leurs intestins, des cristaux de *B. thuringiensis* et des spores, qui ont déclenché l'infection.

Alves *et al* (1998) ont évalué l'effet du temps d'exposition au rayonnement solaire sur la germination des conidies de *M. anisopliae* mélangées avec des huiles émulsifiables, de l'huile végétale pure : huile d'arachide et des huiles minérales afin de déterminer si certaines d'entre elles pouvaient améliorer la tolérance des conidies aux ultraviolets. Les résultats ont montré que toutes les formulations n'avaient pas la même efficacité, certaines tolèrent mieux la lumière UV. Une formulation fongique à base d'huile (50% Shellsol T+50% Ondina EL) a été utilisée en Afrique et a également montré son efficacité contre les criquets et les sauterelles (Bateman, 1997).

## **1.4. Les modèles biologiques**

### **1.4.1. *Bactrocera dorsalis***

#### **1.4.1.1. Répartition géographique**

*Bactrocera dorsalis* est une espèce originaire de l'Asie du Sud-Est et est présente en Asie tropicale et en Océanie. Elle a été identifiée pour la première fois en Afrique, plus précisément au Kenya en 2003 (Lux *et al.*, 2003) et a très rapidement envahi l'Afrique subsaharienne de 2004 à 2005 (Drew *et al.*, 2005 ; Vayssières *et al.*, 2005). Actuellement *B. dorsalis* est retrouvée presque partout en Afrique notamment en Afrique de l'Ouest, du Centre, de l'Est et du Sud (De Meyer *et al.*, 2009 ; De Villiers *et al.*, 2016).

#### **1.4.1.2. Position taxonomique de *Bactrocera dorsalis***

La mouche orientale des fruits appartient à la famille des Tephritidae qui compte environ 4000 espèces réparties dans 500 genres (White et Elson-Harris, 1992). C'est l'une des familles de diptères les plus importantes économiquement en raison des dégâts qu'elle provoque dans les cultures (fruits et légumes) et par leurs facilité de multiplication. Sa position systématique est donnée ci-après.

**Phylum** : Arthropoda

**Classe** : Insecta

**Ordre** : Diptera

**Sous ordre** : Cyclorrhapha

**Section** : Acalyptratae

**Famille** : Tephritidae

**Sous famille** : Dacinae

**Tribu** : Dacini

**Genre** : *Bactrocera*

**Espèce** : *Bactrocera dorsalis*

### 1.4.1.3. Description des stades de développement

#### 1.4.1.3.1. Œuf

L'œuf mature fécondé est le résultat final de l'ovogénèse et le début de la vie indépendante. Les œufs sont allongés, légèrement incurvés et de couleur blanc crème (figure 1). Ils mesurent en moyenne 1mm de longueur et 0,2 mm de diamètre. Ils sont déposés dans des loges façonnées par la femelle avant la ponte, à l'aide de son ovipositeur (Malavasi *et al*, 2000).



Figure 1: Œufs de *B. dorsalis*

#### 1.4.1.3.2. Larve

Les larves sont des asticots typiques de diptères qui vivent et se nourrissent dans les fruits (figure 2). La larve de premier stade est la plus difficile à observer dans le fruit ; elle mesure en moyenne 2 mm. Le deuxième stade larvaire mesure 3 mm ; c'est aussi le plus furtif. Le troisième stade larvaire appelé aussi « larve pré-pupale », mesure 8mm. Lorsqu'elle a terminé

son développement, la larve sort du fruit et s'enterre dans le sol à faible profondeur (<5cm) pour réaliser la dernière métamorphose par la pupaison (Malavasi *et al*, 2000).



Figure 2: Larves de *B. dorsalis*

#### 1.4.1.3.3. Pupe

La pupa est un petit tonnelet, elle mesure environ 5 à 8mm et est de couleur jaune à marron (figure 3). La durée du stade pupa varie de 10 à 12 jours en fonction de la température (Malavasi *et al*, 2000).



Figure 3: Pupes de *B. dorsalis*

#### 1.4.1.3.4. Adulte

L'adulte, qui est sensiblement plus grand qu'une mouche domestique, a une longueur de corps d'environ 8,0 mm; l'aile est d'environ 7,3 mm de longueur et est surtout hyaline. La couleur de la mouche est très variable, mais il y a toujours du jaune, du brun sombre avec une prééminence de marques noires sur le thorax. En général, l'abdomen a deux bandes noires horizontales et une bande médiane longitudinale partant de la base du troisième segment vers le sommet de l'abdomen. Ces marquages peuvent former un motif en forme de T. Elle est

aussi facilement identifiable grâce aux deux taches noires présentes sur le bout des antennes (figure 4). L'ovipositeur est proéminent chez la femelle (Weems et Heppner, 2012).



Figure 4: Adultes de *B. dorsalis*

#### 1.4.1.4 Bioécologie

Les stades pré-imaginaux des mouches des fruits sont les œufs, trois stades larvaires et un stade nymphal. La durée de développement de chaque stade varie en fonction de la température. Au stade œuf, la température optimale pour la survie est comprise entre 20 et 30°C alors qu'aux stades larvaires et pupes, elle est de 25°C (Rwomushana *et al.*, 2008). Les stades œufs et larvaires se déroulent dans le fruit alors que la pupaison se passe souvent dans le sol (Ekesi *et al.*, 2006). Les accouplements se déroulent au crépuscule et sont précédés par un phénomène appelé « lek » pendant lequel les males attirent les femelles en libérant des phéromones complexes (Shely et Whittier, 1997).

*B. dorsalis* est une espèce multivoltine et le nombre de générations peut varier entre 3 et 8 en fonction de la géographie (Meats, 1981). Son cycle biologique se fait sans diapause. De la ponte au stade adulte, le cycle dure environ 1 mois. Après émergence, environ 9 jours sont nécessaires pour atteindre la maturité sexuelle chez les adultes (figure 5). Les périodes de développement peuvent être considérablement prolongées en temps frais (Fletcher, 1987).



Figure 5: Cycle biologique de *B. dorsalis* à 25°C (Fletcher, 1987)

#### 1.4.1.5. Plantes hôtes

Les plantes hôtes de mouche des fruits sont celles dont les fruits servent de support de ponte et de développement des larves (Gomina, 2015). *Bactrocera dorsalis* attaque plus de 40 espèces de plantes (Vayssières *et al.*, 2005); qui incluent le manguier (*Manguifera indica*), les agrumes (*Citrus spp*), la banane (*Musa spp*), le papayer (*Carica papaya*), le goyavier (*Psidium guajava*), l'avocatier (*Persea americana*) et des espèces sauvages telles que le marula (*Sclerocarya birrea*), le Karité (*Vitellaria paradoxa*).

#### 1.4.1.6. Méthodes de lutte aux champs contre *B. dorsalis*

##### 1.4.1.6.1. La lutte préventive (prophylactique)

- **L'assainissement du verger**

Les mesures prophylactiques consistent à ramasser les fruits piqués infestés tombés et à les sécher dans des sachets plastiques noirs fermés hermétiquement ou bien à les enterrer assez profondément. Ceci permet de tuer les œufs, les larves et les pupes des mouches qui s'y trouvent (Vayssières *et al.*, 2009).

- **L'ensachage des fruits**

Il consiste à établir une barrière autour des fruits pour empêcher qu'ils ne soient piqués par les mouches. Ils peuvent être ainsi placés dans des sacs en papiers avant qu'ils n'atteignent le

stade pré-maturité où ils sont susceptibles d'être les plus attractifs. Bien que laborieux, il s'agit d'une méthode efficace pour les fruits destinés à l'exportation (Ndiaye & Dabo, 2007).

- **La récolte précoce :**

On peut éviter l'infestation en récoltant les fruits ou les légumes avant qu'ils n'atteignent un stade de maturité propice aux attaques des mouches des fruits (Allwood *et al.*, 2001). Bien que la récolte précoce soit pratiquée pour la mangue, notamment au Kenya et au Sénégal, cette pratique n'est pas efficace sur toutes les variétés car certaines espèces comme la mouche orientale des fruits *B. dorsalis* et la mouche méditerranéenne *C. capitata* sont capables d'infester les mangues vertes immatures de certaines variétés (Ekesi *et al.*, 2009). Cette méthode est pratiquée sur la Kent dans les vergers exports sénégalais et fonctionne tant que l'infestation n'est pas trop importante.

#### **1.4.1.6.2. Lutte biologique**

- **L'utilisation de parasitoïdes**

L'utilisation des parasitoïdes pour la lutte biologique contre les mouches des fruits a toujours suscité énormément d'intérêt, mais les résultats obtenus sur les mouches des fruits tropicaux n'ont malheureusement pas été à la hauteur des espérances. C'est à Hawaï que cette méthode a fait l'objet des recherches les plus approfondies. Ces lâchers ont donné des réductions des populations de mouches méditerranéennes et de mouches orientales atteignant jusqu'à 95% (Allwood *et al.*, 2001). En Afrique, l'une des réussites les plus remarquables de la lutte biologique classique contre les mouches des fruits est attribuée à l'utilisation du parasitoïde d'œufs *Fopius arisanus*, contre *B. dorsalis* (Vargas *et al.*, 2016).

- **L'utilisation de prédateurs**

La fourmi tisserande africaine *Oecophylla longinoda* est utilisée pour le contrôle des mouches des fruits (Mele, *et al.*, 2007). Diame *et al.* (2015) ont montré que *O. longinoda* est efficace pour limiter les infestations de mangues causées par *B. dorsalis*. D'autres prédateurs peuvent jouer un rôle dans le contrôle des mouches tels que les araignées telluriques avec leurs toiles au niveau du sol (Deguine, *et al.*, 2011).

- **Les agents pathogènes**

Les champignons entomopathogènes peuvent être utilisés pour la suppression des mouches des fruits en ciblant l'adulte ou les stades larvaires se déplaçant pour la pupaison. Des essais de terrain, effectués sur deux saisons dans des vergers de manguiers à Nthagaiya, au Kenya, suggèrent que l'application au sol de *M. anisopliae* constitue une stratégie de lutte efficace pour la suppression au champ de *B. dorsalis* sur mangue (Ekesi *et al.*, 2011).

- **Technique de l’Insecte Stérile (TIS)**

La Technique de l’Insecte Stérile (TIS) est une méthode de contrôle du ravageur utilisant des lâchers importants d’insectes stériles pour réduire la fertilité de la population sauvage de la même espèce (FAO, 2005). Les mouches mâles stériles s’accouplent avec les mouches sauvages mais ne génèrent pas de descendants (Juan-Blasco, *et al.*, 2014). L’utilisation de cette méthode exige des installations permettant d’élever, de nourrir et de produire des centaines de millions de mouches par semaine et de contrôler leur aptitude à concurrencer les mouches sauvages, l’équipement approprié pour la stérilisation par irradiation au Cobalt-60 ou au Césium-137. Elle est donc complexe et coûteuse convient mieux aux régions écologiquement ou géographiquement isolées qui ne subiront pas de recolonisation rapide (Allwood *et al.*, 2001).

#### **1.4.1.6.3. Lutte Chimique**

- **Technique d’élimination des mâles**

Dans la lutte contre cette espèce, une forte priorité doit être donnée aux méthodes de lutte les plus spécifiques comme la MAT (Male Annihilation Technique ou technique d’élimination des mâles), qui permet de diminuer fortement les populations de ces derniers, et est souvent associée à des traitements localisés. Pour cette espèce, la MAT est basée sur des diffuseurs de méthyl-eugénol, qui attire fortement les mâles de l’espèce, associés à un insecticide, dans un piège ou un dispositif du type « attract and kill ». Généralement, au moins 10 dispositifs par hectare sont fixés aux branches des arbres au moins deux mois avant la période d’attractivité des fruits (CTA, 2013). Les abeilles, les coccinelles, les micro guêpes et tous les autres insectes ne réagissent pas à cette odeur (Manrakhan, *et al.*, 2009).

- **Les stations d’appâts : traitement par tâche**

Le traitement par tâches, par opposition au traitement généralisé, consiste à traiter le feuillage de l’arbre avec une bouillie comprenant un mélange d’insecticide et un attractif alimentaire. Les mouches sont attirées par l’attractif et ensuite tuées par l’insecticide. L’attractif qui peut être utilisé dans les stations d’appâts peut être spécifique aux mâles (Méthyl-Eugénol, Cuelure...) ou peut être généralisé (mâle et femelle) avec l’utilisation par exemple du GF-120 (Vayssières, *et al.*, 2004). Des études menées au Niger suggèrent que le GF-120 a un effet répulsif sur l’espèce monophage *C. incompleta* (Trypetinae), mais attractif sur les mouches

oligophages/polyphages Dacinae ; certaines d'entre elles, dont *Dacus* spp (Zakari-Moussa *et al.*, 2014).

#### **1.4.2. *Metarhizium anisopliae* ssp:**

##### **1.4.2.1. Origine**

*Metarhizium anisopliae*, anciennement appelé *Entomophthora anisopliae* a été isolé en Ukraine sur la paille de céréale près d'Odessa (Sorokin, 1983). C'est le premier pathogène utilisé délibérément pour le contrôle des insectes ravageurs par le russe Ilya Ilyich Mechnikov Eli Metchnikoff en 1980 (Zimmermann *et al.*, 1995). Ce dernier classa ce champignon au genre *Metarhizium*. Depuis il est connu sous le nom de *Metarhizium anisopliae*.

##### **1.4.2.2. Systématique**

Du point de vue phylogénétique, le genre *Metarhizium*, appartient à la famille des *Clavicipitaceae*. (*Ascomycota*). Sa taxonomie a été passablement revue ces dernières années. Selon Bischoff *et al.*, 2006 , la taxonomie de *M. anisopliae* se présente comme suit :

**Règne** : Fungi,

**Embranchement** : Dikarya,

**Sous-embranchement** : Ascomycota,

**Classe** : Pezizomycotina,

**Ordre** : Hypocreales,

**Famille** : Clavicipitaceae,

**Genre** : *Metarhizium*

**Espèce** : *Metarhizium anisopliae*

##### **1.4.2.3. Description morphologique**

Le genre *Metarhizium* est défini par (i) l'agencement des chaînes porteuses de phialides, (ii) des colonies de conidies cylindriques ou ovotides, sèches et (iii) généralement de couleur verte. Les colonies sont formées d'une agrégation de chaînes conidiennes (Zimmerman, 2007). *Metarhizium anisopliae* apparaît blanc lorsqu'il est jeune et il devient vert foncé après maturation des spores. Ces conidies mesurent 5 à 8 micro mètres (Bischoff *et al.*, 2009).

##### **1.4.2.4. Mode d'infection et d'action**

En général, les champignons entomopathogènes tuent les hôtes qu'ils infectent. Contrairement aux autres micro-organismes, ils sont capables d'infecter les insectes directement par perforation de l'épicuticule, par voies stomatiques ou tout autres orifices naturels (Ferron,

1978). Une fois sur la cuticule de l'insecte, les conidies (spores asexuées) en germination la pénètrent par l'action combinée de la pression mécanique et de la dégradation enzymatique (Feng *et al.*, 1994). Le champignon se multiplie ensuite par bourgeonnement ou par scissiparité, donnant naissance à des blastospores (cellules filles). Celles-ci se diffusent dans tout le système de défense de l'insecte et dans l'hémocoèle, puis se développent en hyphes (filaments courts).

Dans les premiers moments de l'infection, l'insecte montre peu ou pas de symptômes. Il devient moins actif, cesse de se nourrir et perd la locomotion (McCoy *et al.*, 1988). Puis surviennent dans l'ordre la paralysie, le ramollissement et la mort par asphyxie (Lomer et Prior, 1992).

Après la mort de l'insecte, si le taux d'humidité est suffisamment élevé, le champignon émerge à travers la cuticule et sporule. Si les conditions sont défavorables, il peut rester à l'intérieur de l'insecte plusieurs mois et sporule lorsque les conditions redeviennent favorables (Gillespie, 1998).

## CHAPITRE 2 : MATERIEL ET METHODES

### 2.1. Matériel biologique

#### 2.1.1. Le champignon entomopathogène *Metarhizium anisopliae*

Nous avons utilisé quatre souches de *M. anisopliae* en spores libres et différents enrobages qui sont conservés au réfrigérateur pour éviter toute dénaturation du produit.

##### 2.1.1.1. *Metarhizium anisopliae* en spores libres

Il s'agit de :

- trois souches produites par une entreprise française : METARHIZIUM1 (MET1), METARHIZIUM2 (MET2) et une ancienne souche en stock congelée à la DPV (Direction de la Protection des Végétaux) depuis plusieurs années METARHIZIUM3 (MET3).
- une souche fabriquée par Real IPM du Kenya : MET69 OD



Figure 6: Poudre de spores non enrobées

##### 2.1.1.2. L'enrobage des spores

L'enrobage a été testé sur la souche MET3. Quatre types d'enrobages ont été mis au point par l'entreprise Capsulæ (entreprise française) ci-après nommés Enrobage1 (MET3\_ENR1), Enrobage2 (MET3\_ENR2), Enrobage3 (MET3\_ENR3) et Enrobage4 (MET3\_ENR4) (figure 7). Leur composition est confidentielle mais nous pouvons tout de même dire que :

- La teneur théorique en spores dans les microparticules est de 25% p/p quel que soit le lot considéré. Le tableau suivant (tableau 1) montre la distribution granulométrique des enrobages:

Tableau 1 : Distribution granulométrique des enrobages

	D (v, 0,1) $\mu\text{m}$	D (v, 0,5) $\mu\text{m}$	D (v, 0,9) $\mu\text{m}$	Span	D (4,3) $\mu\text{m}$
Spores	4	6	23	3,1	10
Enrobage1	59	91	133	0,8	94
Enrobage2	52	92	157	1,1	100
Enrobage3	55	95	176	1,3	123
Enrobage4	50	90	171	1,3	111

Les enrobages sont composés exclusivement de produits végétaux (seuls ou en mélange) :

- Cire de Carnauba
- Huile de tournesol hydrogénée
- Huile de palme hydrogénée

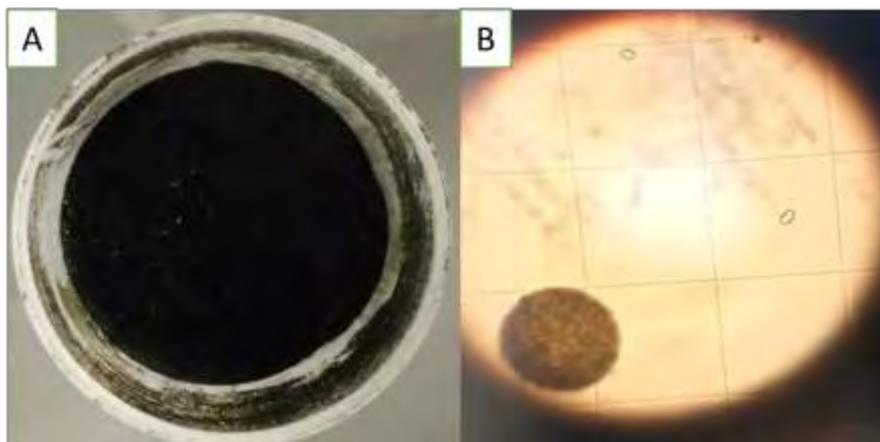


Figure 7: Spores enrobées

**A : Poudre de spores enrobées, B : Capsule d'enrobage sur cellule de Malassez (en bas à gauche) et spore libre à droite.**

### 2.1.2. La mouche des fruits *Bactrocera dorsalis*

Les souches ont été testées sur trois cibles de *B. dorsalis* à savoir des mâles stériles, et des mâles et femelles fertiles locales.

Les mouches fertiles locales sont maintenues en élevage au laboratoire BIOPASS de l'IRD de Bel Air (Dakar, Sénégal). L'élevage s'est déroulé en plusieurs étapes :

Des mangues récoltées au sol dans des vergers de la zone des Niayes, sont incubées dans des récipients contenant du sable où les larves vont se transformer en pupes au bout de 7 jours environ.

Ensuite le sable est tamisé pour récupérer les pupes qui vont être placées dans des cages de dimension (50x50x50) contenant du sucre, de l'extrait de levure et du coton imbibé d'eau. De ces pupes vont émerger des adultes qui atteignent la maturité sexuelle entre 8 et 11 jours.

Des bananes pré-pressées avec une aiguille sont ensuite placées dans les cages pour servir de substrat de ponte. Ces dernières sont récupérées après deux jours et incubées dans le récipient contenant du sable (figure 8).



Figure 8: Élevage de *B. dorsalis*

A : Cage d'élevage, B : Incubation de fruits infestés

Les mouches stériles réceptionnées sous forme de pupes nous viennent de l'Agence Internationale de l'Energie Atomique (AIEA) basée à Vienne en Autriche. Les pupes sont introduites dans une cage d'élevage de dimension (50x50x50) et placées dans les mêmes conditions que les mouches fertiles locales. Elles émergent en 24h pour donner des ailées.

## 2.2. Méthodologie

Les tests ont été effectués en fonction de la formulation de *M. anisopliae*. Ainsi les spores libres ont été comparées entre elles. La souche MET3 (ayant servi pour l'enrobage) a aussi servi de référence pour l'étude des enrobées.

## 2.2.1. Tests Préliminaires

### 2.2.1.1. *Metarhizium anisopliae* en spores libres

#### 2.2.1.1.1. Évaluation du taux de germination des souches

- **Préparation du milieu de culture**

Le Sabouraud Dextrose Agar (SDA) était utilisé comme milieu de culture des champignons. Pour se faire, 32,5 g de poudre de SDA a été mélangée avec 500 ml d'eau distillée et homogénéisé à l'aide d'un agitateur magnétique. Le mélange a été chauffé sur une plaque chauffante jusqu'à dissolution complète de la poudre SDA. Le milieu obtenu a été stérilisé à l'autoclave à une température de 120° C pendant 20 min puis coulé dans les boîtes de Petri sous la hotte pour éviter toute contamination (figure 9).



Figure 9: Étapes de la préparation du milieu de culture

A : Pesage du SDA, B : Homogénéisation du milieu, C : Stérilisation à l'autoclave, D : Milieu stérilisé

- **Préparation de l'inoculât fongique et ensemencement**

L'inoculât est constitué de 0,01 g de poudre de spores sèches, une goutte de Tween 80 et 10 ml d'eau distillée (figure 10). Le Tween 80 facilite la solubilité des conidies dans l'eau. Le mélange a été vortexé pendant 3 min. Un volume de 1ml a été prélevé et ajouté à 9 ml d'eau distillée dans un tube de 10 ml. La dilution obtenue est à un dixième ( $10^{-1}$ ). La même procédure a été répétée une seconde fois afin d'obtenir une dilution à  $10^{-2}$ . Une quantité de 10  $\mu$ l de solution  $10^{-2}$  était prélevé à l'aide d'une pipette pour ensemercer les milieux de culture dans les boîtes de Petri. Ces dernières ont été placées dans un incubateur à la température

optimale de germination du champignon (27° C) pendant 20 h. Ce processus a été répété cinq fois pour chaque souche.



Figure 10: Inoculât fongique

- **Observation de la germination des spores**

Le nombre de spores germées et non germées a été déterminé à l'aide du microscope optique au grossissement x 40. Les spores ont été comptées en déplaçant le champ de vision du microscope de façon à couvrir une large zone de la boîte de Pétri jusqu'à avoir compté 100 spores au total (germées + non germées).

#### **2.2.1.1.2. Évaluation du nombre de spores par gramme de poudre de formulation sèches**

Une solution a été préparée avec 0,01 g de poudre de conidies, une goutte de Tween 80 et 10 ml d'eau distillée. Le tout a été vortexé pendant 3 min pour l'homogénéiser. Une solution diluée au centième ( $10^{-2}$ ) était effectuée en utilisant la technique des dilutions successives. Un échantillon de cette dernière a permis le comptage des spores en cellule de Malassez (quadrillage de 25 rectangles divisés en 20 petits carrés) (figure 11). Le nombre de spores dans chaque rectangle quadrillé a été compté. Ce processus fut répété à cinq reprises pour chaque souche de champignon.

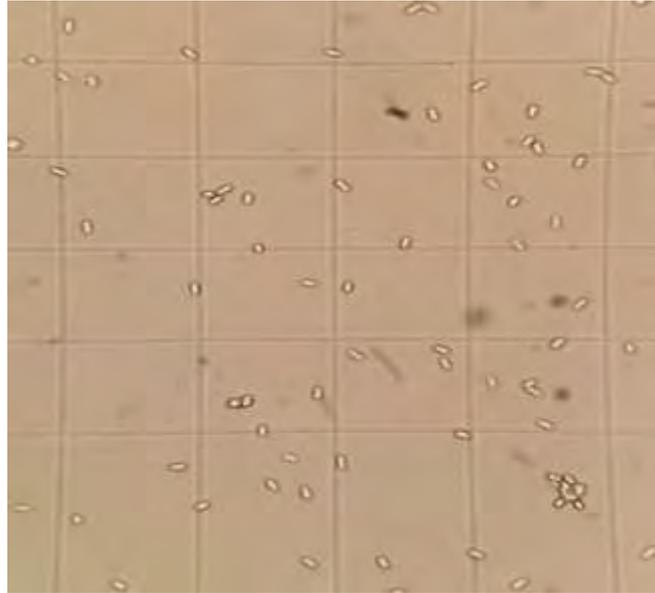


Figure 11: Spores de *Metarhizium anisopliae* sur cellule de Malassez

#### **2.2.1.1.3. Caractérisation de l'impact de la durée de vortexage sur le nombre de spores comptées sur les mouches contaminées**

Afin de standardiser l'étude, les quantités de spores sont exprimées en spores par 100 cm<sup>2</sup> de velours. Dimbi *et al* utilisaient un dispositif de 98 mm\*45 mm pour 0.3 g de spores. Cela représente une surface de velours de 138.5 cm<sup>2</sup> soit 2.1 mg/cm<sup>2</sup>. Nous avons utilisé des dimensions proches : 8 cm\*6 cm soit une surface de 150.72 cm<sup>2</sup> qui doit être inoculée avec 0.32 g de spores pour garder une dose équivalente par centimètre carré.

Le dispositif a été donc contaminé avec 0,32 g de conidies sèche de *M. anisopliae* (souche Met69OD de RealIPM) répartie de manière homogène à la surface du velours (Dimbi *et al.*, 2013). Ensuite 15 mouches ont été introduites dans le tube et exposées aux conidies pendant 3 min. Ces dernières ont été ensuite placées individuellement dans des tubes de 10 ml d'eau distillée puis vortexées selon les 3 modalités suivantes : 1 min, 3 min et 5 min (figure 12). Un échantillon de cette solution a été utilisé pour le comptage en cellule de Malassez pour déterminer le nombre de spores dans les 10 ml de solution, ce qui équivaut au nombre de spores sur la mouche elle-même. Deux séries de contamination (avec deux dispositifs de contamination différents) ont été effectués permettant de contaminer 30 mouches, soit 10 répétitions (=mouches) par modalité.



Figure 12: Vortexage

#### **2.2.1.1.4. Caractérisation de l'impact de la taille du dispositif de contamination sur la charge en spores de la mouche**

La contamination des mouches a été faite à l'aide d'un tube cylindrique en plastique, tapissé de velours et de dimensions variables. Trois dimensions ont été testées : (6,4cm\*3,5cm), (7cm\*5cm) et (8cm\*6cm) (figure 13). Le tube « standard » de (8 cm\*6 cm) a été contaminé avec 0,32 g de conidies sèches de *M. anisopliae* (Dimbi *et al.*, 2013). La même dose par cm<sup>2</sup> de velours (2,1 mg/cm<sup>2</sup>) a été utilisée pour chacune des dimensions de tube soit respectivement 0,15g et 0,23g pour les dimensions de tube (6,4cm\*3,5cm) et (7cm\*5cm). Cinq mouches ont été placées dans le dispositif de contamination pendant 3 min. Les mouches ont été ensuite immergées individuellement dans des tubes contenant 10 ml d'eau distillée et vortexées pendant 3min pour décrocher les spores collectées par la mouche. Un échantillon de cette solution a été utilisé pour le comptage en cellule de Malassez. Le même processus a été répété 2 fois pour chaque taille de tube, soit 10 répétitions (=mouches) pour chaque modalité (=dimension de tube).



Figure 13: Tubes de contamination

#### **2.2.1.1.5. Estimation de la taille des spores pour chaque formulation sèche**

Le calcul a été fait à l'aide de photos de la cellule de Malassez au grossissement x40. Les dimensions des spores ont été rapportées aux dimensions d'un carré de la cellule de Malassez (de dimension connue). Ce rapport nous a permis de déterminer la taille des différentes spores pour chaque formulation sèche.

#### **2.2.1.2. *Metarhizium anisopliae* en spores enrobées**

##### **2.2.1.2.1. Test de dissolution de l'enrobage**

L'examen des spores enrobées en cellule de Malassez a permis de constater la présence de capsules de grosses tailles et de spores non enrobées en solution. Il est donc probable que les capsules d'enrobages contiennent plusieurs spores. Ainsi il était impossible de déterminer le nombre exact de spores par gramme de poudre de formulation puisque le nombre de spores contenu dans une capsule était inconnu. Les capsules étaient également de tailles variables.

Face à ce problème nous avons décidé de faire un test de dissolution des capsules d'enrobage, permettant à la fois de connaître la concentration en spores de la poudre de spores enrobées, mais aussi d'avoir des informations sur la résistance de l'enrobage à l'humidité. Nous avons mélangé 0,01g de poudre de spores en formulation enrobées avec 1ml d'eau distillée. La solution obtenue a été vortexée pendant une durée de 3mn. Un échantillon de cette solution a été utilisé pour le comptage en cellule de Malassez alors que le reste de la solution a été conservé pour la suite du test de dissolution. Ce processus a été répété cinq fois pour chaque formulation. Le comptage du nombre de capsule et de spores non enrobées a été fait tous les 10 jours pendant 30 jours.

#### **2.2.1.2.2. Caractérisation de la taille des capsules d'enrobage par rapport aux spores non enrobées**

Le calcul a été fait à l'aide de photos de la cellule de Malassez au grossissement x40. La démarche adoptée pour déterminer la taille des différentes catégories de capsule est similaire à celle utilisée pour les spores libres.

#### **2.2.1.2.3. Évaluation du taux de germination des spores enrobées**

La préparation de l'inoculât fongique est constitué de 0,01 g de poudre de spores enrobées, une goutte de Tween 80 et 10 ml d'eau distillée. Un volume de 10 µl de la solution obtenue (sans dilution) a été prélevé à l'aide d'une pipette pour ensemercer les milieux de culture dans les boîtes de Petri. La démarche adoptée pour la préparation du milieu de culture est similaire à celle utilisée pour les souches non enrobées. Par contre il est impossible de déterminer le taux moyen de germination car les spores sont contenues dans des capsules agglomérant plusieurs spores. La germination des spores a donc été mesurée en nombre de boîtes présentant du mycélium.

### **2.2.2. Test de virulence**

#### **2.2.2.1. *Metarhizium anisopliae* en spores libres**

Nous avons utilisé notre dispositif de contamination de dimension (8cm x 6cm) représentant une surface de velours de 150,72 cm<sup>2</sup>. Le dispositif a été contaminé respectivement avec 0.32g, 0.15g, 0.25g et 0.24g pour les souches Met69OD, MET1, MET2 et MET3, afin de standardiser la quantité de spores introduite dans le dispositif. Un témoin non contaminé a aussi été conduit.

Pour chaque souche de *M. anisopliae* à tester, 90 mouches ont été contaminées dont 30 mâles stériles (MS), 30 mâles fertiles (MF) et 30 femelles fertiles (FF). Quinze mouches ont été introduites dans le tube et exposées aux conidies pendant une durée de 3 mn. Ensuite les mouches ont été transférées dans des cages pendant une durée de trois heures afin qu'elles aient le temps de faire du toilettage, ce qui ramène le nombre de spores sur la cuticule à un nombre réaliste. Pour la modalité témoin, les mouches ont subi le même protocole avec un dispositif de contamination sans spores.

Dix mouches ont été utilisées pour compter le nombre de spores collectées par les individus après toilettage. Pour cela, les individus ont été mis individuellement dans un tube avec 1ml d'eau distillée et une goutte de Tween 80, puis vortexés pendant 3 mn. Un échantillon de la

solution a été prélevé pour un comptage en cellule de Malassez sous microscope, au grossissement x 40.

Puis, 20 mouches ont été conservées individuellement pendant 15 jours pour le suivi quotidien de la mortalité ( $27 \pm 2^\circ \text{C}$ ). Les mouches ont été placées individuellement dans des boîtes (3cm x 8cm) transparentes et munies d'une grille d'aération. Un mélange d'hydrolysate de levure et de sucre a été déposé à l'intérieur de chaque boîte afin de nourrir la mouche et du coton imbibé d'eau a été déposé sur la grille (figure 14). Les mouches mortes ont été incubées ( $27 \pm 2^\circ \text{C}$ ) sur une éponge humide en boîte de Pétri afin de diagnostiquer la cause de la mort (vérification du développement du champignon).

Un témoin chimique a aussi été effectué avec de la deltaméthrine. La dose recommandée par hectare (0.5L/ha) a été ramenée à la surface de velours du dispositif d'inoculation. Le dispositif d'inoculation était donc pulvérisé avec 0.75 $\mu\text{L}$  de deltaméthrine diluée dans 1.99ml d'eau.

#### **2.2.2.2. *Metarhizium anisopliae* en spores enrobées**

Pour les enrobées le même dispositif de contamination de dimension (8cm x 6cm) a été utilisé. Le dispositif a été contaminé avec 0,24g pour les spores libres de MET3 (*Metarhizium* non-enrobé) et 3,32g pour les spores couvertes de l'enrobage 3 (MET3\_ENR3), afin de standardiser la quantité de spores introduite dans le dispositif. Un témoin non contaminé a aussi été conduit. Seul l'enrobage 3 a été testé car c'est celui qui donnait les meilleurs résultats dans les tests de germination en boîte de Petri.

Pour chaque modalité à tester, 60 mouches ont été contaminées dont 30 mâles fertiles (MF) et 30 femelles fertiles (FF). La démarche adoptée pour la contamination des mouches, la détermination des charges ainsi que le suivi quotidien de mortalité est similaire à celle utilisée pour les souches non enrobées.

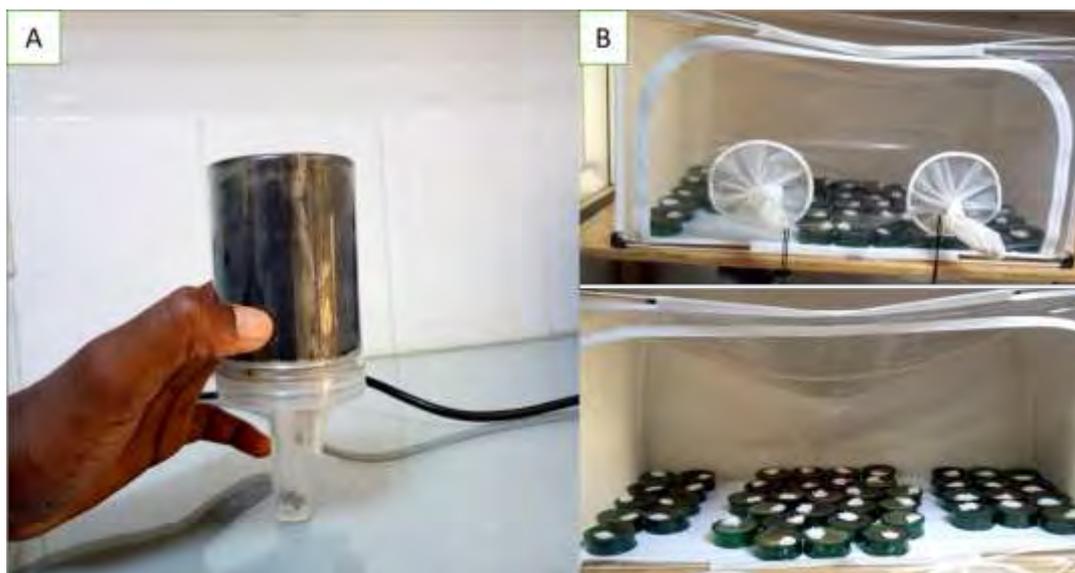


Figure 14: Dispositif du test de virulence

A : Dispositif de contamination, B : cage de suivi des mortalités

### 2.2.3. Dose minimale infectante et dose saturante

Les tests de virulence effectués sur les différentes souches testées ont montré que Met69OD et MET1 étaient les souches les plus prometteuses. Ces dernières ont été utilisées à la dose (D) de 40.084.926 conidies/cm<sup>2</sup> de velours (dose standard de notre protocole) pour contaminer notre tube de dimension (8 cmx6cm), soit respectivement 0.32g et 0.15g de poudre de conidies sèches pour les souches Met69OD et MET1.

Nous avons décidé de déterminer la dose minimale infectante et la dose saturante pour 15 jours de suivi, puisque, la dose D avait provoqué 100% de mortalité au bout de 5 jours maximum. Nous avons testé des doses inférieures à D pour situer notre dose actuelle sur une courbe de survie, (soit D/50 : 801.699 conidies/cm<sup>2</sup> ; D/100 : 400.849 conidies/cm<sup>2</sup> et D/150 : 267.233 conidies/cm<sup>2</sup> de velours). Pour chaque dose (D/50 ; D/100 ; D/150), nous avons contaminé 60 mouches dont 30 mâles fertiles et 30 femelles fertiles. Quinze mouches ont été introduites dans le tube et exposées aux conidies pendant une durée de 3 mn. Une démarche similaire à celle du test de virulence a été utilisée pour le suivi quotidien de mortalité, le diagnostic ainsi que la détermination des charges en spores des mouches après trois heures de toilette. Des témoins non contaminés ont également été suivis pour s'assurer que les conditions expérimentales étaient bonnes.

Ces tests nous ont permis de déterminer pour chaque dose le taux de mortalité en 15 jours.

#### **2.2.4. Pathogénicité sur larves et pupes**

Ce test consiste à évaluer la pathogénicité de la souche MET1 sur les larves L3 et pupes de *B. dorsalis*. Notre dispositif expérimental est inspiré de celui d'Ekesi *et al* (2002).

Nous avons préparé une solution fongique de concentration  $10^8$  conidies/ml, soit 0.0125g de poudre de conidies de MET1 pour 5ml d'eau distillée (+une goutte de Tween 80). Puis en fonction du nombre de répétitions, la solution a été mélangée vigoureusement avec du sable préalablement stérilisé à la dose de 1 ml de solution pour 10 g de sable. Le mélange de sable contaminé a été ensuite introduit dans des boîtes de Pétri (figure 15). Ce dispositif a servi pour la contamination des larves et pupes. Les lots témoins ont été traités avec la même quantité d'eau distillée contenant une goutte de Tween-80.

##### *Pathogénicité sur larves de dernier stade (L3 : stade qui va entrer en pupaison)*

Vingt larves de troisième stades ont été introduites individuellement dans une boîte de Pétri contenant du sable contaminé et maintenues à une température de  $(27 \pm 2^\circ \text{C})$  pendant 7 jours. Des lots témoins ont aussi été conduits. Le sable a été traité avec la même quantité d'eau distillée contenant une goutte de Tween-80. Durant cette période le pourcentage de pupaison a été enregistré. Ensuite, les pupes ont été retirées du sable contaminé et transférées individuellement dans une autre boîte de Pétri contenant du sable non contaminé et placées dans une boîte transparente munie d'une grille d'aération. Un mélange d'hydrolysate de levure et de sucre et un coton imbibé d'eau a été introduit dans la boîte pour servir de nourriture aux adultes après émergence. Le nombre de mouches adultes qui ont émergées a été enregistré quotidiennement pendant 15 jours à partir de la première émergence. Les pupes qui n'ont pas émergé au jour 8 après l'installation dans les boîtes ont été considérées comme mortes (la durée de pupaison à cette température est de 12 jours (Vargas *et al.*, 2000), or cette date correspond à J0+15 jours) et ont été incubées, après rinçage avec de l'alcool 70% puis de l'eau distillée, en boîte de Pétri sur une éponge humide afin de vérifier le développement du champignon (diagnostique). Les mouches adultes qui étaient mortes pendant cette période ont été incubées selon le même protocole.

##### *Pathogénicité sur pupes*

Pour la contamination des pupes, la boîte de Pétri a d'abord été remplie avec du sable contaminé (5ml ;  $10^8$  conidies/ml) jusqu'à une profondeur de 0.4cm. Vingt pupes âgées de 24 heures ont ensuite été placées individuellement sur le sable et recouvertes de 0,4 cm de sable contaminé supplémentaire. La boîte de Pétri a été maintenue à une température de  $(27 \pm 2^\circ \text{C})$

pendant une durée de 7 jours. La démarche adoptée pour le suivi des émergences est similaire à celle décrite ci-dessus. Des lots témoins ont aussi été conduits. Le sable a été traité avec la même quantité d'eau distillée contenant une goutte de Tween-80.

Pour les deux expérimentations, 20 répétitions ont été conduites par modalité en deux séries (2 x 10 répétitions/ modalité).



Figure 15: Dispositif de contamination des larves (L3) et pupes

### 2.2.5. Analyses statistiques

Le tableur Excel a été utilisé pour la saisie des données. Le logiciel R a permis de faire les analyses statistiques et de tracer les graphiques (R Core Team, 2020).

Les données des tests préliminaires ont été analysées avec un modèle linéaire généralisé (GLM) avec une loi de Poisson, adaptée aux données de comptage. Un test post-hoc de Tukey a été effectué pour la comparaison deux à deux des modalités.

Concernant le test de virulence, le modèle de Cox a été utilisé pour l'analyse des données de survie (données tronquées). Une comparaison deux à deux des modalités a été effectuée à l'aide de la fonction `pairwise_survdiff()` du package `Survminer`. La fonction `Lt_probit` ou `Lt_logit` du package `ecotox` a permis de calculer les TL50 des différentes modalités. Le test  $\chi^2$  d'indépendance a permis d'analyser l'effet des doses testées sur la mortalité des adultes. Le même test a été utilisé pour analyser la pathogénicité aux stades larves et pupes.

## CHAPITRE 3 : RESULTATS ET DISCUSSION

### 3.1. Résultats

#### 3.1.1. Tests préliminaires

##### 3.1.1.1. *Metarhizium anisopliae* en spores libres

##### 3.1.1.1.1. Évaluation du taux de germination des souches

En 24h, les souches MET2, MET1 et MET69OD ont germé avec des taux respectifs de 84,6 ( $\pm 1,75$ ) ; 79,4 ( $\pm 1,03$ ) et 71,8 ( $\pm 3,97$ ) % (tableau 2). Le taux de germination de MET2 est plus important mais les filaments paraissent plus courts que ceux de MET1 et de MET69OD, ce qui pourrait indiquer une croissance plus lente du mycélium de cette souche.

Au bout de 48h, les trois souches ont atteint un taux de germination très élevé.

La souche MET3 germe tardivement, au bout de 72h, avec un taux assez élevé de 88,8 ( $\pm 1,39$ ) %. La germination s'effectue de manière brusque.

Tableau 2 : Pourcentage de germination des souches en fonction du temps

Durée d'observation (Heure)	Souches	Pourcentage de germination (%)
24 H	MET2	84,6 ( $\pm 1,75$ )
	MET1	79,4 ( $\pm 1,03$ )
	MET69 OD	71,8 ( $\pm 3,97$ )
	MET3	0
48 H	MET2	91,8 ( $\pm 0,86$ )
	MET1	95,8 ( $\pm 0,73$ )
	MET69 OD	90,2 ( $\pm 1,16$ )
	MET3	0
72 H	MET3	88,8 ( $\pm 1,39$ )

### 3.1.1.1.2. Évaluation du nombre de spores par gramme de poudre de formulation sèches

L'évaluation du nombre de spores par gramme de poudre sèche a montré que la concentration en spores de la poudre dépend de la souche ( $df=3$  ;  $P < 0,001$ ). La concentration en spores de MET1 est statistiquement différente de celle des autres souches ( $P < 0,001$ ). La souche MET1 est plus concentrée en spores suivie respectivement des souches MET3, MET2 et MET69 OD (figure 16).

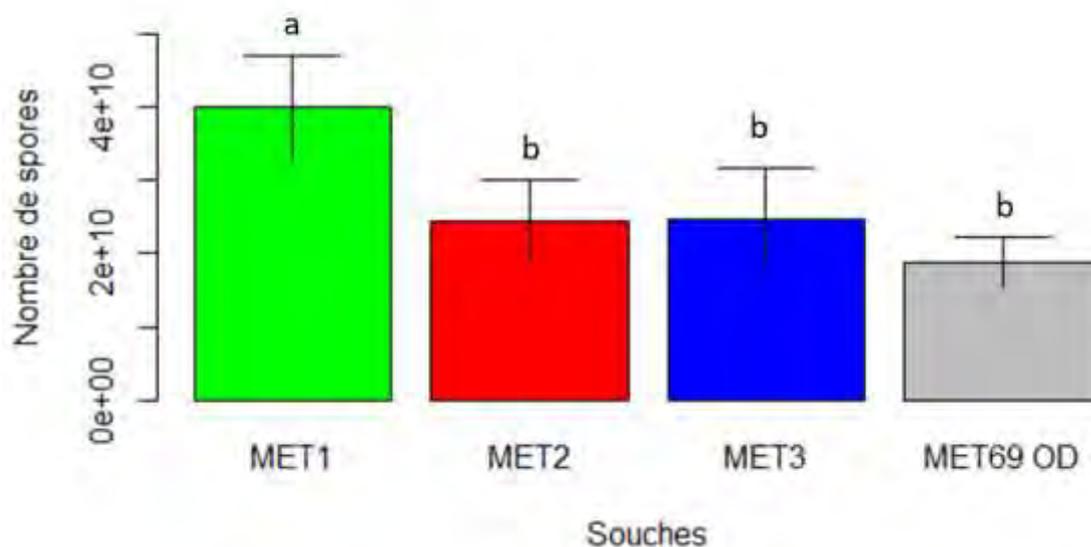


Figure 16: Nombre de spores par gramme de poudre de formulation sèche

### 3.1.1.1.3. Estimation de la taille des spores pour chaque formulation sèche

L'analyse statistique effectuée sur les données montre que la souche a un effet significatif sur la taille des spores ( $df=3$  ;  $P=0,002$ ). Les spores de MET2 sont plus grandes suivies respectivement de MET3, MET69 OD et MET1 (figure 17). La taille des spores de MET1 est statistiquement différente de celle de MET2 ( $P < 0,001$ ) et MET3 ( $P=0,003$ ).

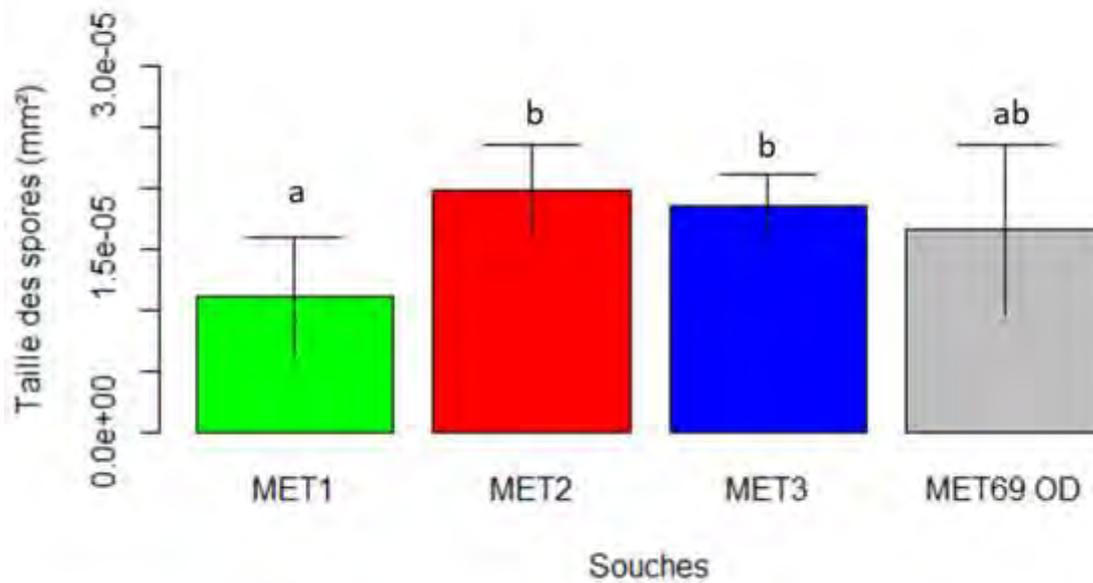


Figure 17: Taille des spores en fonction des souches

#### 3.1.1.1.4. Caractérisation de l'impact de la durée de vortexage des mouches contaminées

La durée de vortexage a eu un effet statistiquement significatif ( $df = 2$  ;  $P < 0,001$ ) sur le nombre de spores collectées par la mouche. Les résultats montrent que le nombre de spores compté est plus élevé lorsqu'on vortexe 3mn (figure 18). On enregistre une nette différence ( $P < 0,001$ ) entre la durée de vortexage 1mn et 3mn. Cependant il n'y a pas de différence significative ( $P = 0,5342$ ) sur le nombre de spores collectées pour les durées de vortexage 3mn et 5mn. La durée de 3mn est retenue pour des tests ultérieurs.

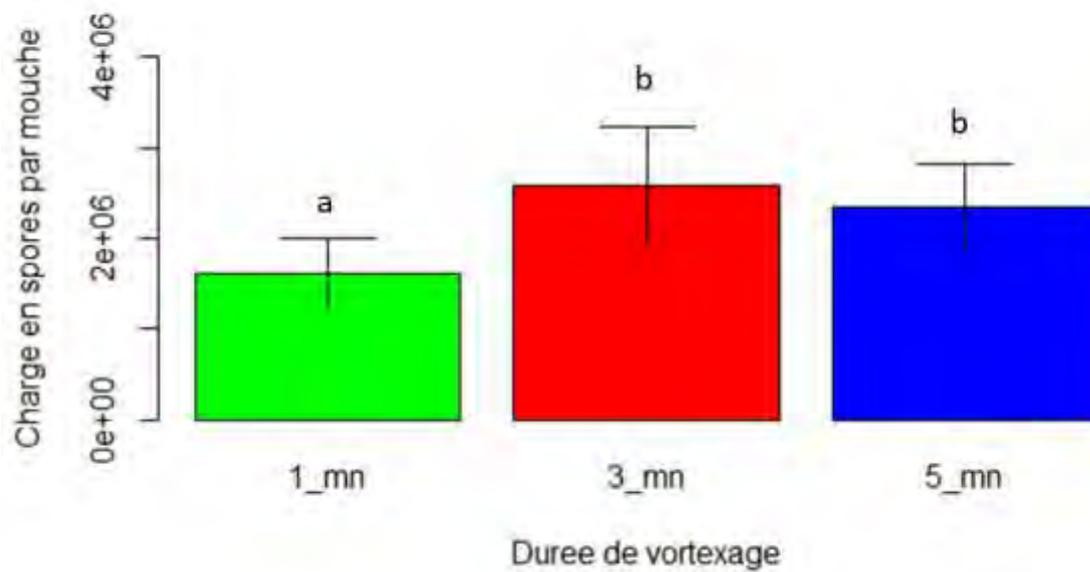


Figure 18: Charge en spores de la mouche en fonction de la durée de vortexage

### 3.1.1.1.5. Caractérisation de l'impact de la taille du dispositif de contamination sur la charge en spores

La charge en spores tend à augmenter très légèrement avec la taille du dispositif de contamination, malgré une quantité de spores par unité de surface équivalente (figure 19). Aucun effet significatif n'a été observé ( $df = 2$  ;  $P=0,521$ ).

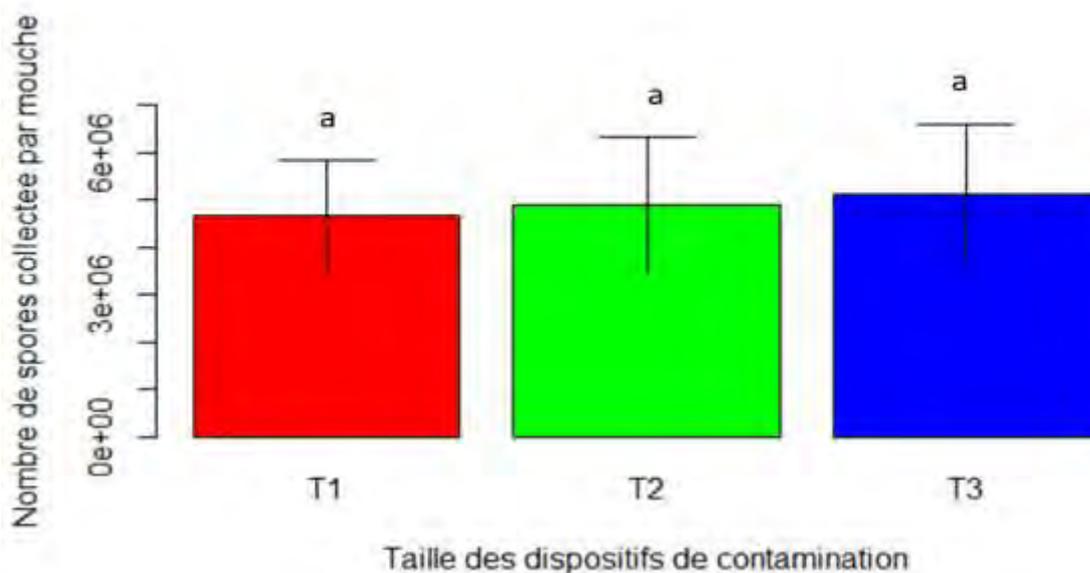


Figure 19: Charge en spores des mouches en fonction de la taille du dispositif de contamination

### 3.1.1.2. *Metarhizium anisopliae* en spores enrobées

#### 3.1.1.2.1. Test de dissolution de l'enrobage

Le nombre de capsules d'enrobage est réduit au cours du temps alors que le nombre de spores a augmenté pour tous les enrobages, montrant une dégradation de la capsule dans l'eau (figure 20). L'observation de la cellule de Malassez au 30<sup>ème</sup> jour a permis de constater des débris en solution.

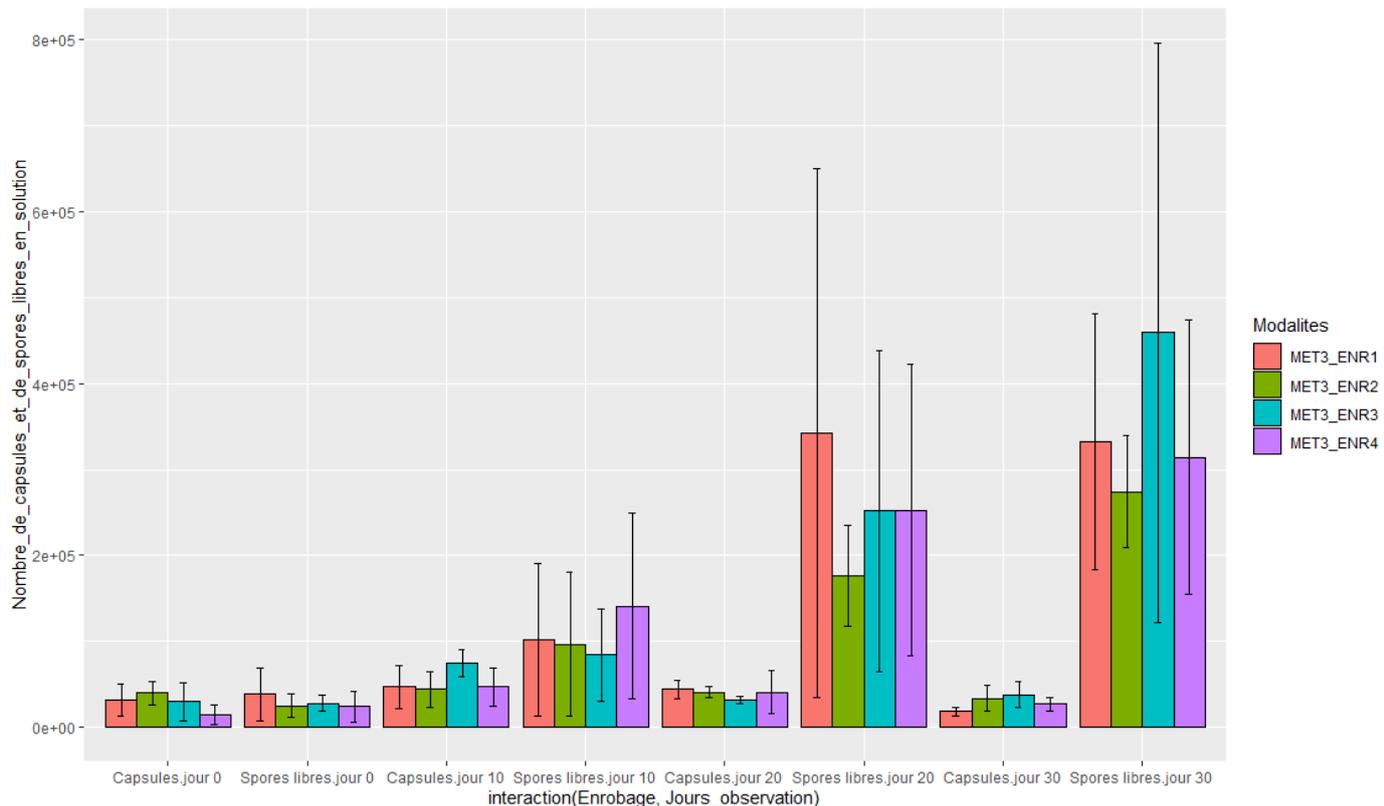


Figure 20: Évolution du nombre de spores et de capsules d'enrobage en solution au cours du temps

#### 3.1.1.2.2. Caractérisation de la taille des capsules d'enrobage par rapport aux spores non enrobées

L'observation en cellule de Malassez des spores enrobées a révélé que la taille des capsules d'enrobage n'était pas homogène. En effet, on a constaté trois catégories de tailles de capsule (grande, moyenne et petite).

- **Calcul de la taille d'une capsule de petite dimension et d'une spore non enrobée**

La cellule de Malassez compte 25 rectangles et chaque rectangle est découpé en 20 petits carrés de dimension 1/20mm de côté.

En appliquant une règle de trois entre les proportions mesurées sur la photo et la taille réelle connue des carrés, on peut calculer la taille réelle d'une capsule et d'une spore. Sur la photo prise (Figure 21) le diamètre de la capsule est de 1,8 cm et le côté du carré de 2cm. Donc le diamètre de la capsule d'enrobage est  $0,05 \times 9/10 = 0,045 \text{ mm}$ .

$$\text{Surface} = \pi \cdot R^2 = 3,14 \cdot (0,0225)^2 = 0,0016 \text{ mm}^2$$

Sur la photo également, une spore non enrobée mesure environ 0,3cm de longueur et 0,1cm de large. Donc la longueur de la spore est :  $0,05 \text{ mm} \cdot (0,3/2) = 0,0075 \text{ mm}$  et la largeur:  $0,05 \text{ mm} \cdot (0,1/2) = 0,0025 \text{ mm}$ . Sa surface est :  $L \cdot l = 0,0075 \cdot 0,0025 = 1,87 \text{ E-}05 \text{ mm}^2$

Donc le rapport **aire capsule/aire spores non enrobée** permet de dire qu'une capsule de petite taille est environ 85 fois plus grosse qu'une spore.

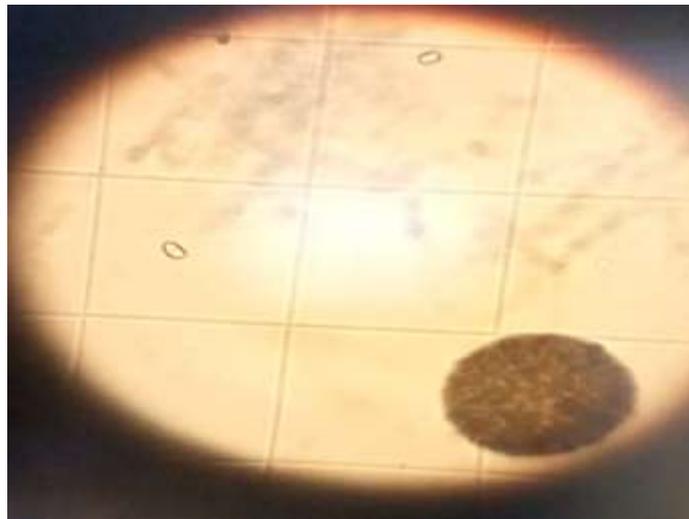


Figure 21: Capsule de petite taille sur Malassez

- **Calcul de la taille d'une capsule moyenne**

La même démarche (décrite ci-dessus) a permis de calculer la taille d'une capsule moyenne :

$$D = 0,05 * 1,7 / 0,9 = 0,094 \text{ mm. Surface} = \pi * R^2 = 3,14 * (0,047)^2 = 0,0069 \text{ mm}^2$$

Une capsule de taille moyenne est environ **369** fois plus grosse qu'une spore.

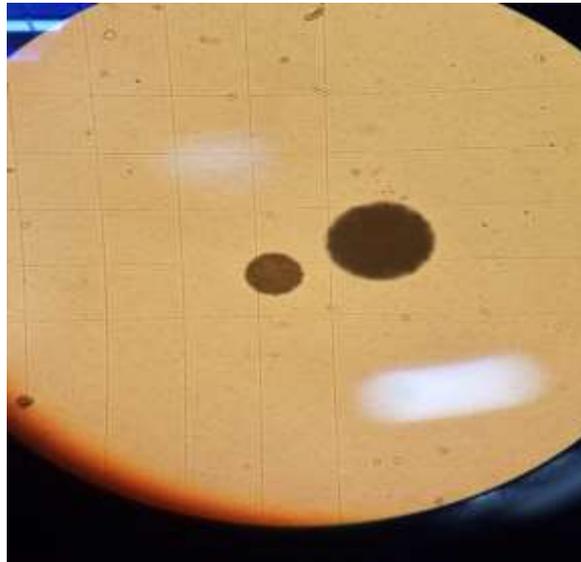


Figure 22: Capsule de taille moyenne sur cellule de Malassez

- **Calcul de la taille d'une grosse capsule**

De la même manière : le diamètre de la grosse capsule d'enrobage est  $0,05 * 2,1 / 0,7 = 0,15$  mm. Surface =  $\pi * R^2 = 3,14 * (0,075)^2 = 0,018 \text{ mm}^2$

Une capsule de grande taille est environ **963** fois plus grosse qu'une spore.

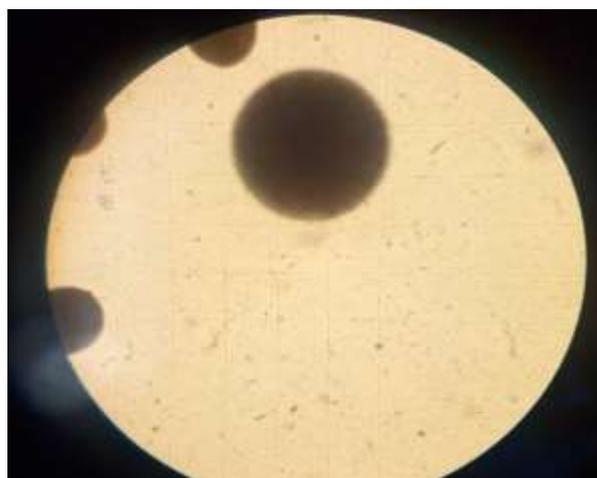


Figure 23: Capsule de grande taille sur Malassez

### 3.1.1.2.3. Évaluation du taux de germination des spores enrobées

La germination dans les boîtes de Petri a été tardive et faible (figure 25). Au deuxième jour d'observation seul MET3\_ENR3 a germé avec 1/5 des boîtes incubées. Cette proportion augmente jusqu'à atteindre 3/5 des boîtes au quatrième jour d'incubation. Le mycélium qui était blanc commence à devenir vert au bout de cinq jours confirmant qu'il s'agit bien de mycélium de *M. anisopliae* (figure 24). La présence d'autres microorganismes non identifiés a été constatée, possiblement des levures.



Figure 24: Évolution du mycélium avec spores enrobées

À partir du huitième jour toutes les boîtes présentent du mycélium. MET3\_ENR4 présente du mycélium au troisième jour dans seulement 1/5 des boîtes inoculées, suivi des souches MET3\_ENR1 et MET3\_ENR2 qui germent plus tardivement, au sixième et huitième jour. Nous pouvons retenir que l'enrobage MET3\_ENR3 germe en premier et c'est la seule souche qui a pu présenter du mycélium sur 100% des boîtes en 10 jours d'observation.

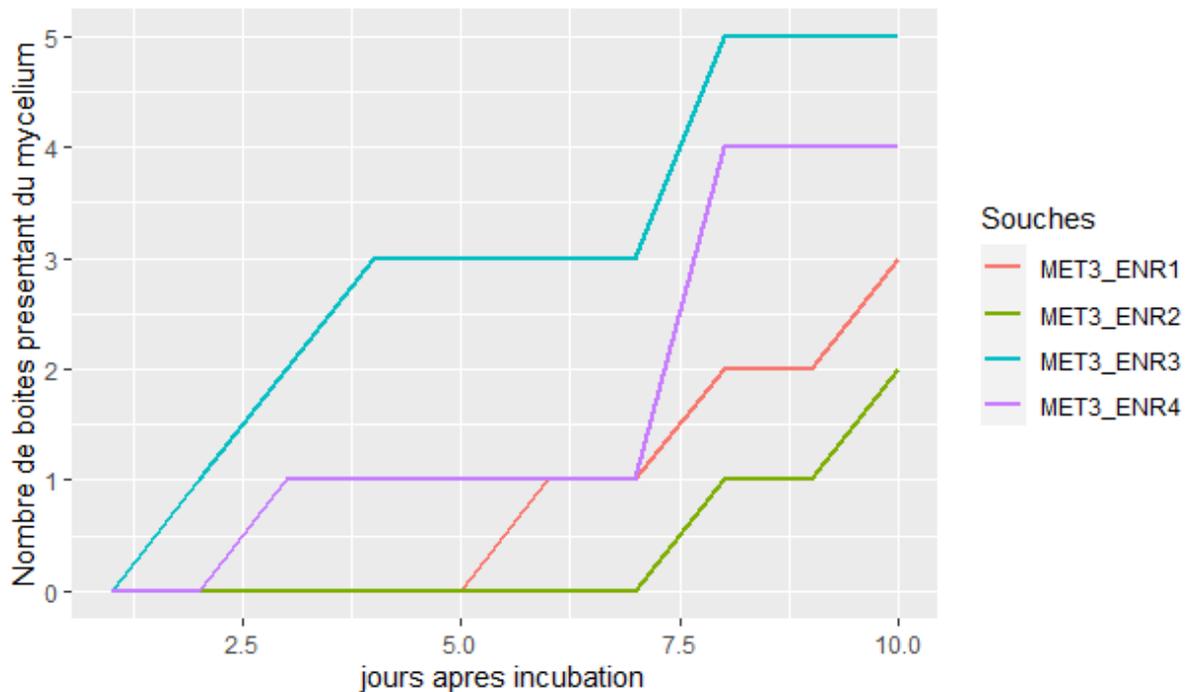


Figure 25: Nombre de boîtes présentant du mycélium par enrobage en fonction du temps

#### 3.1.1.2.4. Évaluation du nombre de spores par gramme de poudre de formulation enrobée

L'analyse statistique effectuée sur les données a montré que l'enrobage n'a pas d'effet significatif sur la concentration en spores de la poudre ( $df = 3$  ;  $P = 0,055$ ). L'enrobage MET3\_ENR3 renferme plus de spores suivi respectivement de MET3\_ENR2, MET3\_ENR4 et MET3\_ENR1 (figure 26).

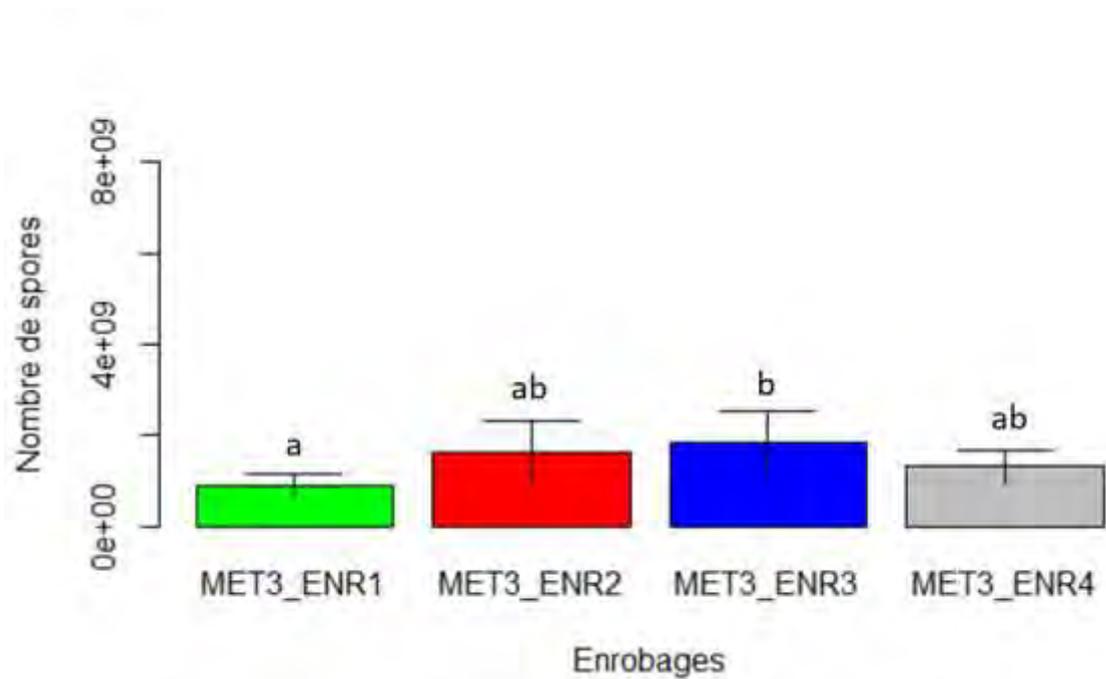


Figure 26: Nombre de spores dans un gramme de formulation enrobée

### 3.1.2. Test de virulence

#### 3.1.2.1. *Metarhizium anisopliae* en spores libres

Toutes les souches ont permis d'atteindre 100% de mortalité pour tous les types de mouches testées (*B. dorsalis* mâle/femelle, fertile/stérile) à des vitesses différentes mais toutes en moins de 7 jours. Le taux de survie élevé des non contaminées (témoin) montre que les conditions expérimentales sont bonnes, au contraire des mouches contaminées, la plupart des mouches étaient vivantes après 15 jours de suivi (figure 27). L'analyse statistique effectuée sur les données montre que la durée de vie des mouches dépend de la souche ( $df = 5$  ;  $P < 0,001$ ) et du type de mouche ( $df=2$  ;  $P < 0,001$ ). L'effet combiné de la souche et du type de mouche n'est pas statistiquement significatif sur la durée de vie des mouches ( $df=9$  ;  $P=0,3531$ ).

Les résultats montrent que la DELTAMETHRINE tue les mouches justes après contamination. La souche MET2 est la plus virulente car elle tue 50% des mouches au bout de 2,49 jours suivie de MET1, MET69 OD et MET3 avec respectivement des durées létales 50 (TL50) de 2,99 jours, 3,67 jours et 6,6 jours.

La tendance globale est la même pour les MF, FF et MS. Cependant, les MS sont beaucoup plus sensibles au pathogène quelle que soit la souche testée et les MF, sous l'effet de la souche MET1, commencent à mourir tardivement au troisième jour après contamination

(figure 27). L'analyse statistique des données montre que, seulement pour La souche MET1, le type de mouche a un effet statistiquement significatif sur la durée de vie ( $df=2$  ;  $P=0,002$ ). La comparaison deux à deux effectuée sur les modalités (type de mouche) montre qu'il y'a une différence statistiquement significative entre la durée de vie des MF et celle des MS ( $P < 0,001$ ). Les MF vivent plus longtemps avec une durée de vie moyenne de 3,1 jours contre 2,3 jours pour les MS.

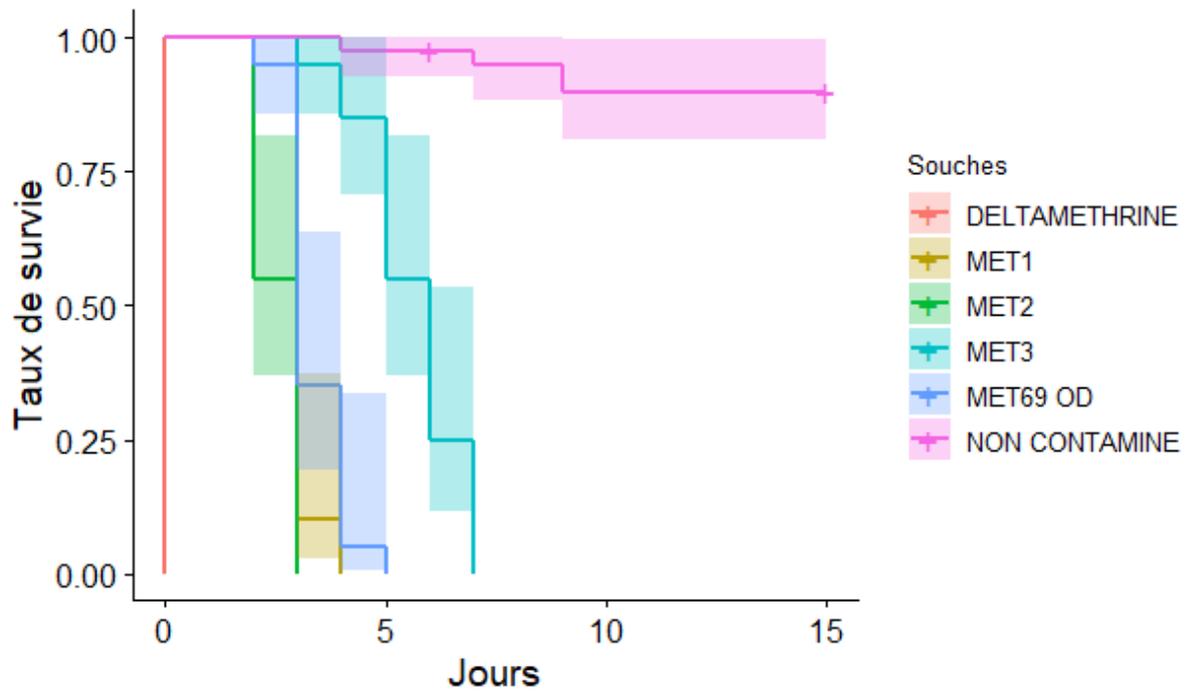


Figure 27: Taux de survie des mâles fertiles de *B. dorsalis* en fonction du temps

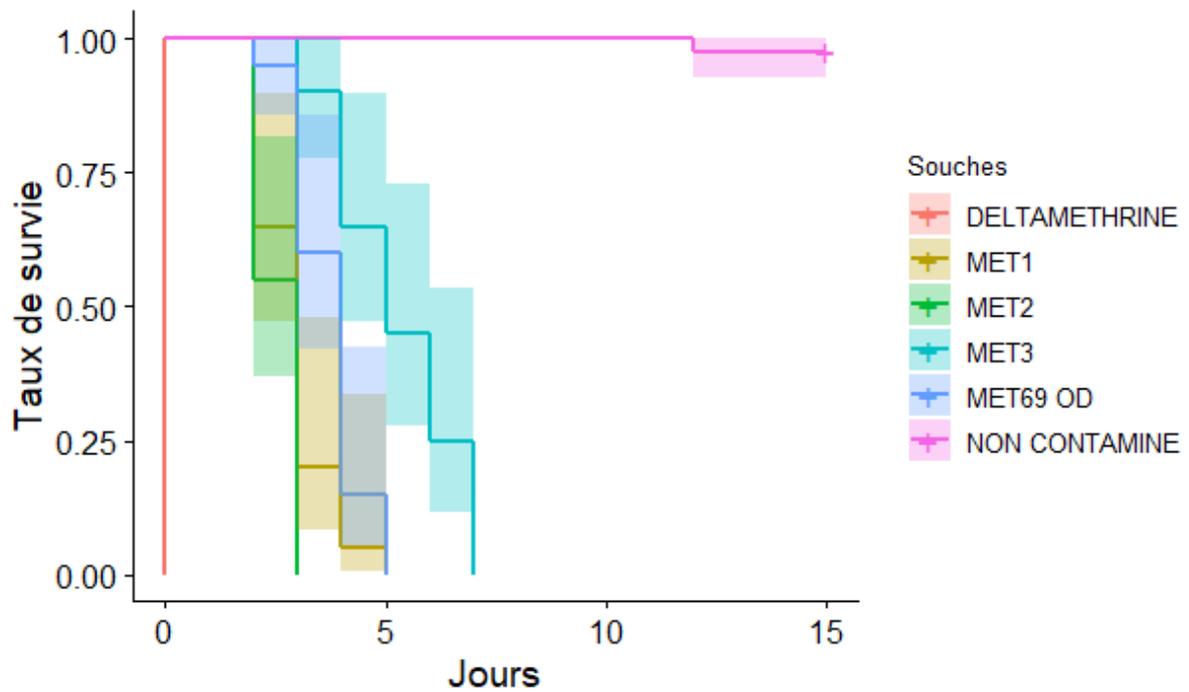


Figure 28: Taux de survie des femelles fertiles de *B. dorsalis* en fonction du temps

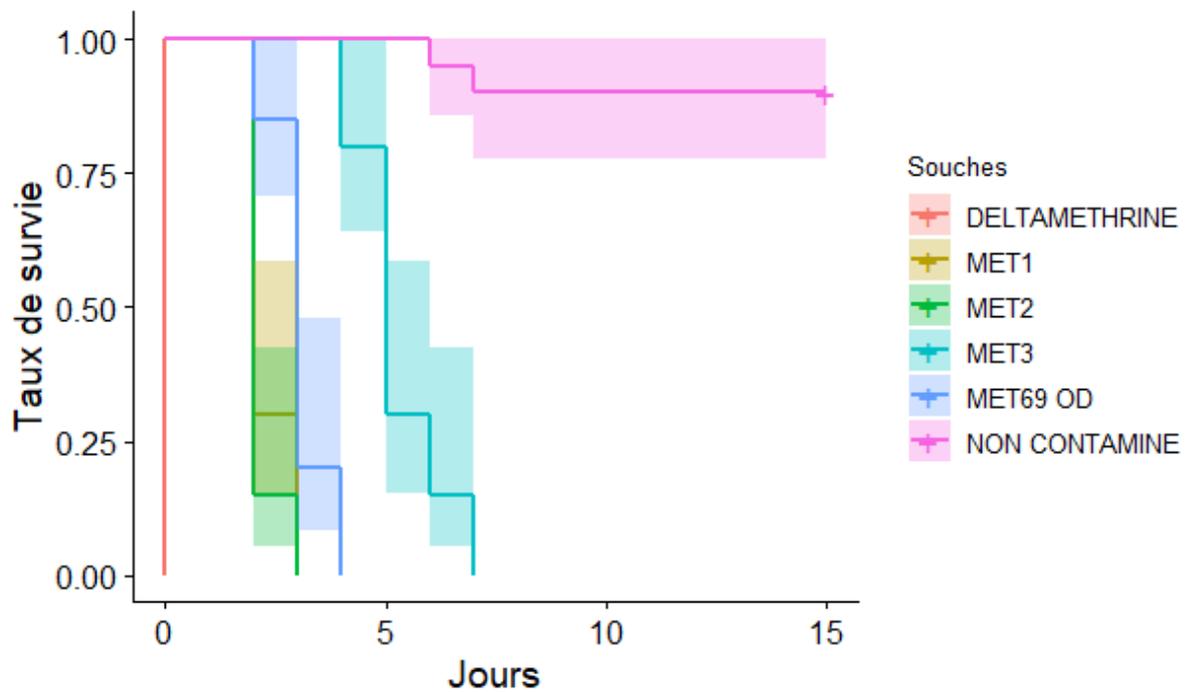


Figure 29: Taux de survie des mâles stériles de *B. dorsalis* en fonction du temps

- **Caractérisation de l'impact des souches sur la charge en spores**

L'analyse statistique des données montre que la souche n'a pas d'effet significatif sur la charge en spores des mouches ( $df=3$  ;  $P=0,067$ ). Le type de mouche n'a pas également d'effet sur la charge ( $df=2$  ;  $P=0,123$ ). Les mouches collectent plus de spores lorsqu'elles sont contaminées avec la souche MET69 OD ( $169333.33 \pm 19119,31$ ) suivi respectivement des souches MET2, MET1 et MET3 (figure 30).

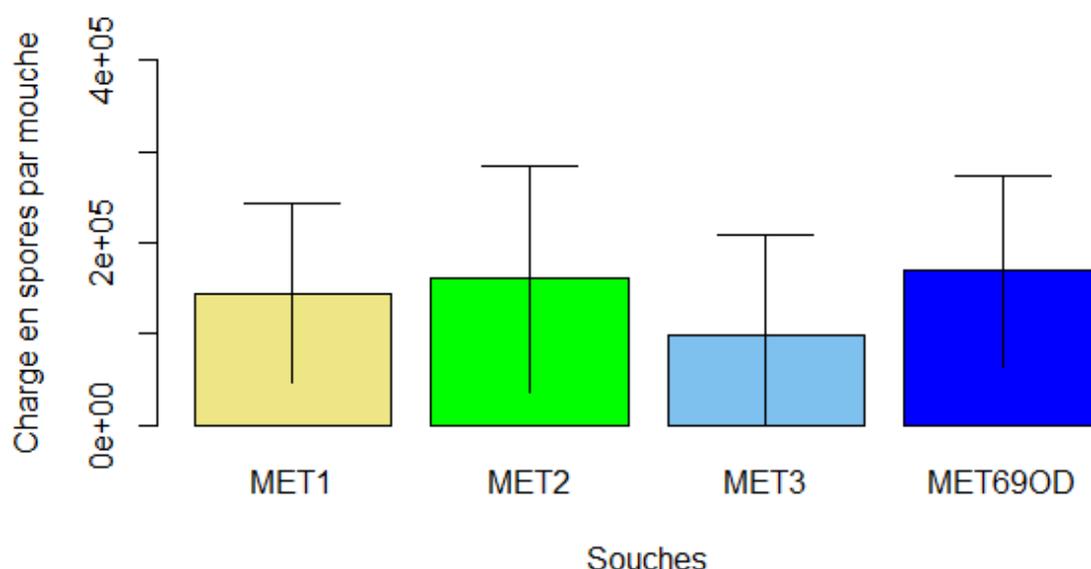


Figure 30: Charge en spores de tous types de mouches confondus en fonction des souches

### 3.1.2.2. *Metarhizium anisopliae* en spores enrobées

Les résultats montrent que plus de 30% des mouches (MF et FF) contaminées avec les spores MET3\_ENR3 ont survécu après 20 jours de contamination, comparée au spores MET3 (la même souche sans enrobage) qui a provoqué 100% de mortalité pour tous les types de mouches testées en moins de 7 jours (figure 31). L'analyse statistique effectuée sur les données montre que la durée de vie des mouches varie significativement selon les modalités ( $df=2$  ;  $P < 0,001$ ). Par contre le sexe des mouches n'a pas d'effet sur la durée de vie ( $df=1$  ;  $P=0,3505$ ). L'effet combiné de la modalité et du sexe des mouches n'a pas d'effet significatif sur la durée de vie des mouches ( $df=2$  ;  $P=0,1679$ ).

Le taux élevé de survie des mouches témoins non contaminées montre que l'expérience s'est déroulée dans de bonnes conditions, malgré une mortalité qui a augmenté à partir du 16ème jour de suivi (figure 31). L'enrobage MET3\_ENR3 a réduit la virulence du champignon

entomopathogène car la poudre de spores enrobées a tué 50% des mouches contaminées assez tardivement : seulement au bout de 17 jours contre 5 jours pour les spores non-enrobées (Figure 31). Sous l'effet des spores enrobées, 40% des mouches mortes n'ont pas présenté du mycélium (mort naturelle) contre seulement 2,5 % avec les spores non-enrobées. Le calcul du TL50 (méthode probit) des spores enrobées a donné une valeur très élevée (322 jours) qui permet de dire qu'il est très peu probable d'atteindre 50% de mortalité causée par les spores enrobées avant la mort naturelle des mouches.

Nous avons également constaté que, sous l'effet des spores de *Metarhizium* enrobées (MET3\_ENR3), plus de 50% des Femelles Fertiles (FF) étaient vivantes après 20 jours de contamination.

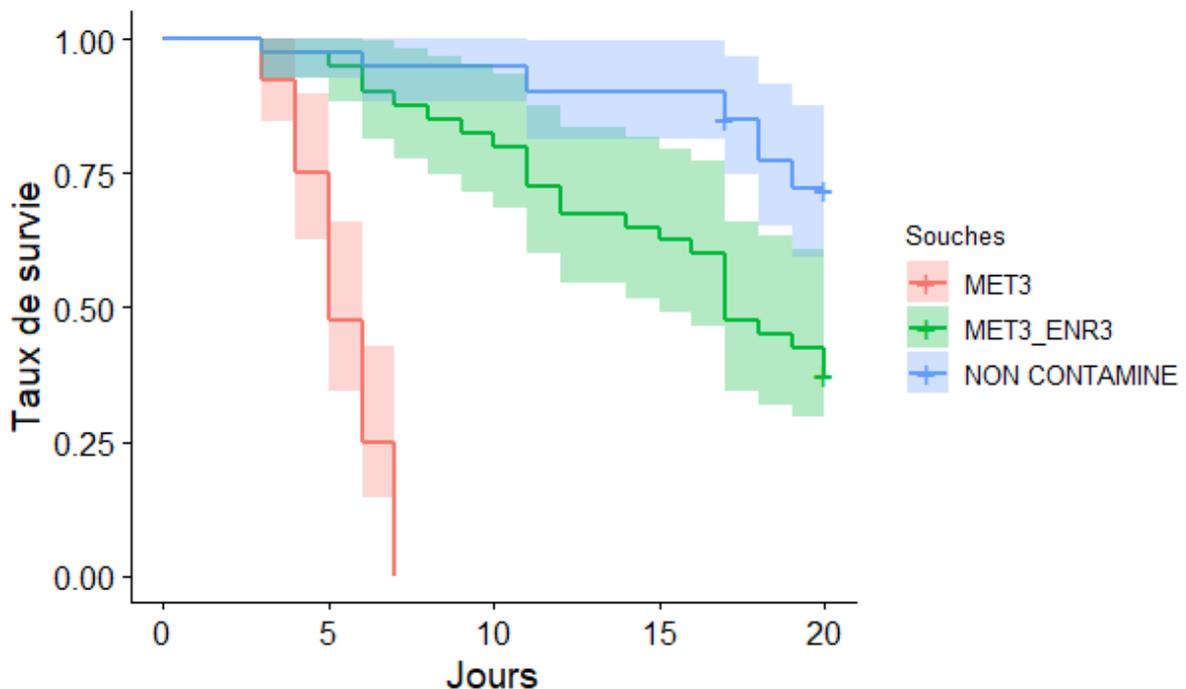


Figure 31: Taux de survie ( $\pm$  intervalle d'erreur) des mâles et femelles fertiles (confondus) de *B. dorsalis* (n=20) en fonction du temps

- **Impact de l'enrobage sur la charge en spores**

L'analyse statistique a montré que la charge en spores par mouche est affectée par l'enrobage (df=1 ;  $P < 0,001$ ). Le type de mouche n'a pas d'effet sur la charge (df=1 ;  $P = 0,989$ ). Les mouches collectent beaucoup plus de spores lorsqu'elles sont contaminées avec les spores non enrobées (MET3) (figure 32).

Précisons que sur toutes les répétitions effectuées dans la modalité contaminée avec les spores enrobées, aucune capsule d'enrobage n'a été observée. Il semble donc que seules les quelques

spores non enrobées, qui étaient présents en mélange avec les capsules, aient joué un rôle dans la contamination des mouches.

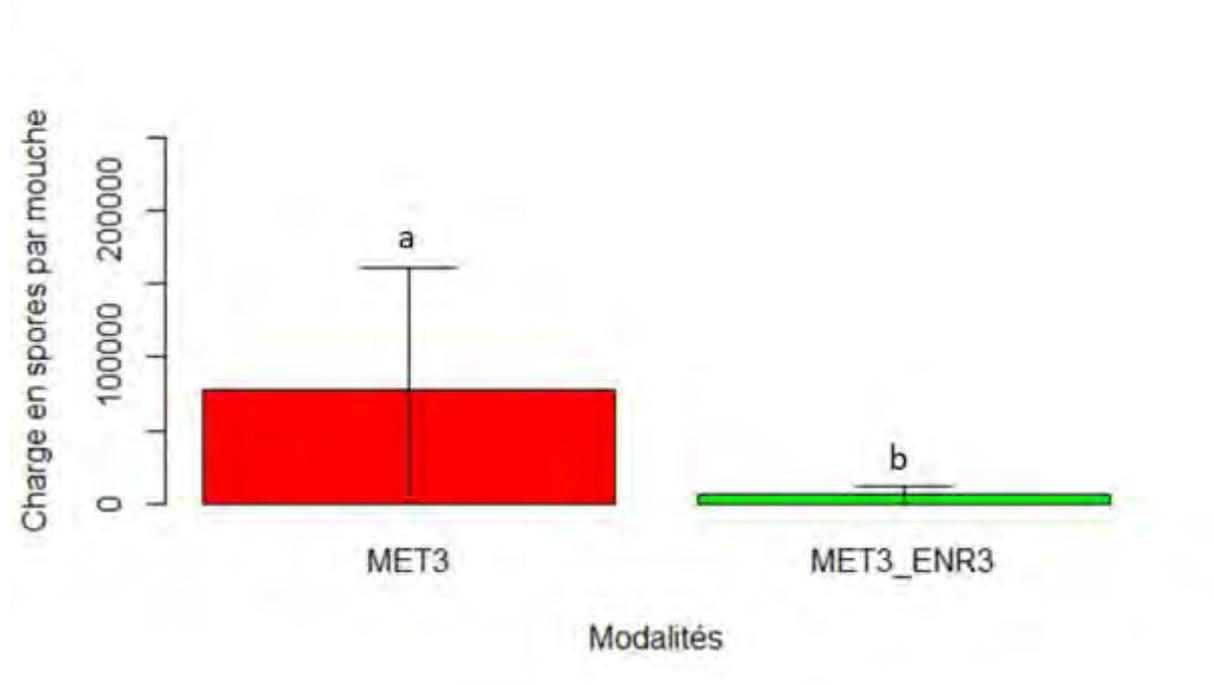


Figure 32: Charge en spores des mouches en fonction des produits

### 3.1.3. Dose minimale infectante et dose saturante

- **Caractérisation de l'impact des doses sur la charge en spores**

L'analyse statistique des données MET1 a montré que la dose a un effet statistiquement significatif sur la charge en spores par mouche ( $df=3$  ;  $P < 0,001$ ). La comparaison deux à deux a également montré que la charge en spores des mouches avec la dose D est significativement plus élevée que celle des mouches avec les doses D/50, D/100 et D/150 ( $P < 0,001$ ). Cependant il n'y a pas de différence significative sur le nombre de spores collectées par mouche pour les doses D/50, D/100 et D/150.

La même tendance a été observée pour le MET69OD

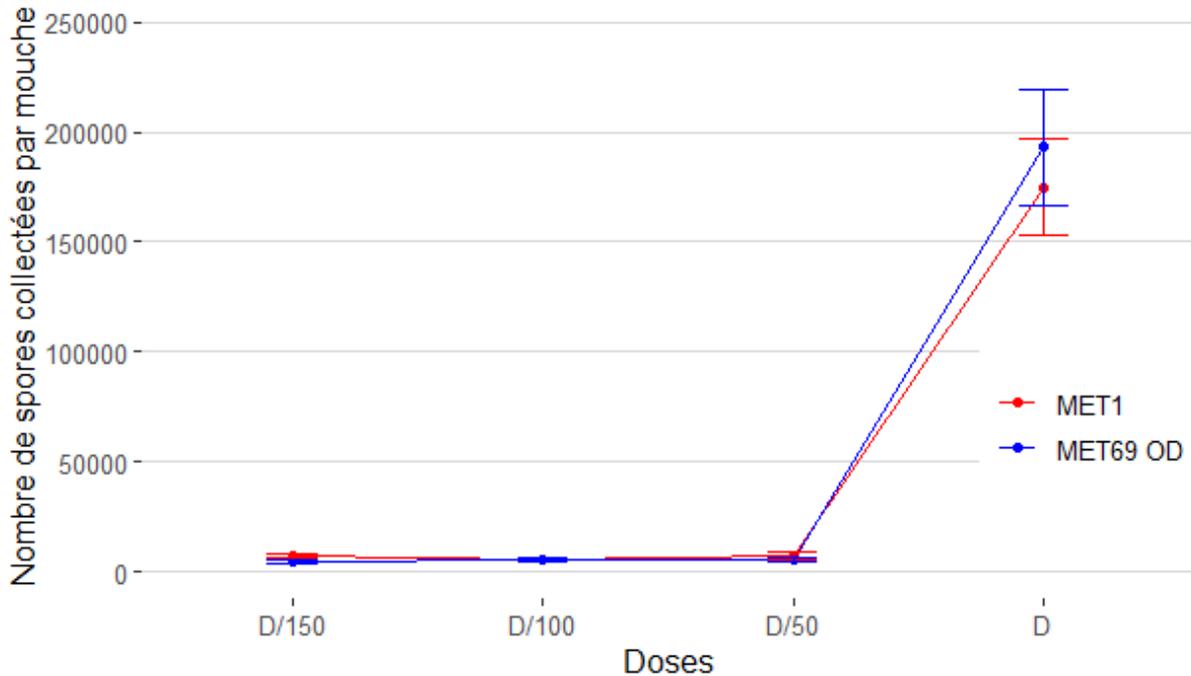


Figure 33: Charge en spores des mouches contaminées avec le MET69 OD et MET1 en fonction des Doses

- **Effet des doses sur la survie des mouches**

L'analyse de la figure 34 a permis de constater que les doses testées (D ; D/50 ; D/100 ; D/150) ont provoqué des mortalités assez importantes avec des pourcentages variant de 88 à 100% et de 80 à 100% respectivement pour le MET1 et le MET69 OD. Pour ce dernier (MET69 OD), La dose D est la plus virulente car elle a tué 50% des mouches au bout de 3.88 jours suivie respectivement de D/50, D/100 et D/150 figure (36). La tendance globalement observée reste la même pour MET1 avec cependant D/100 qui tue plus vite que D/50.

L'analyse statistique des données (Khi2 d'indépendance) montre que la dose a un effet statistiquement significatif sur la mortalité des mouches ( $df = 4$  ;  $P < 0,001$ ). Le calcul des doses létales (méthode probit) a montré des DL50 de  $2,23 \times 10^7$  spores/cm<sup>2</sup> et  $2,21 \times 10^7$  spores/cm<sup>2</sup> respectivement pour les souches MET1 et MET69 OD. Les DL99 ont donné des valeurs très élevées. La dose minimale infectante n'a pas été déterminée puisque toutes les doses testées ont entraîné des morts.

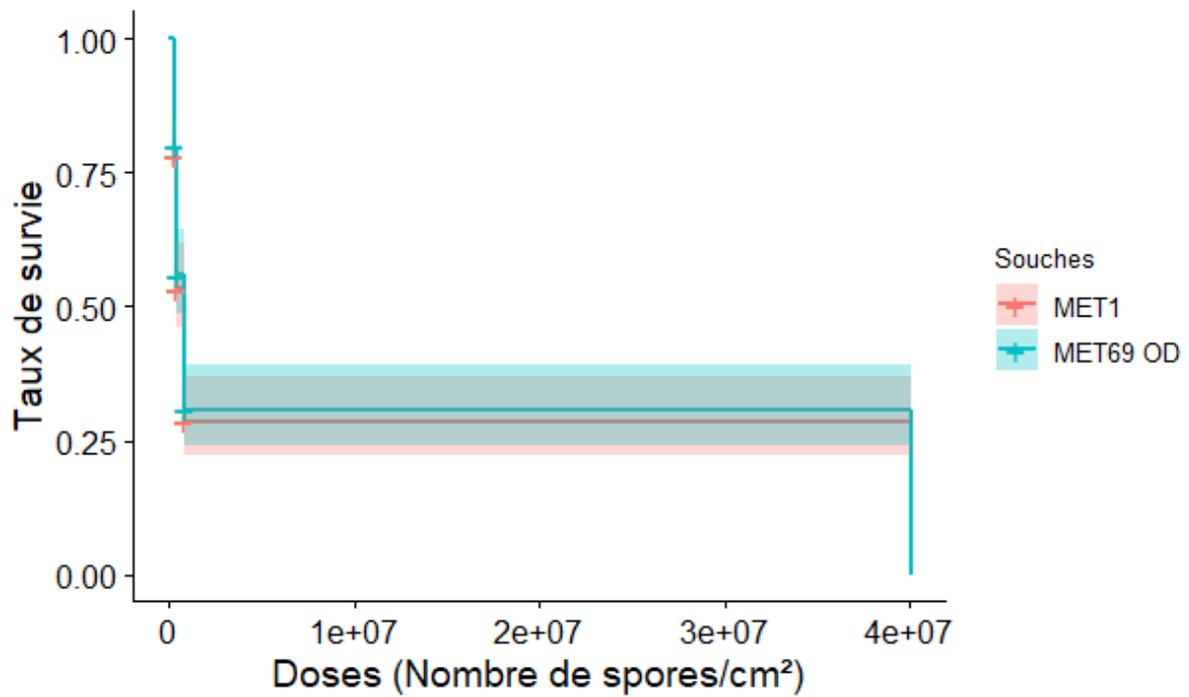


Figure 34: Taux de survie des MF et FF de *B. dorsalis* en fonction des doses pour MET1 et MET69 OD

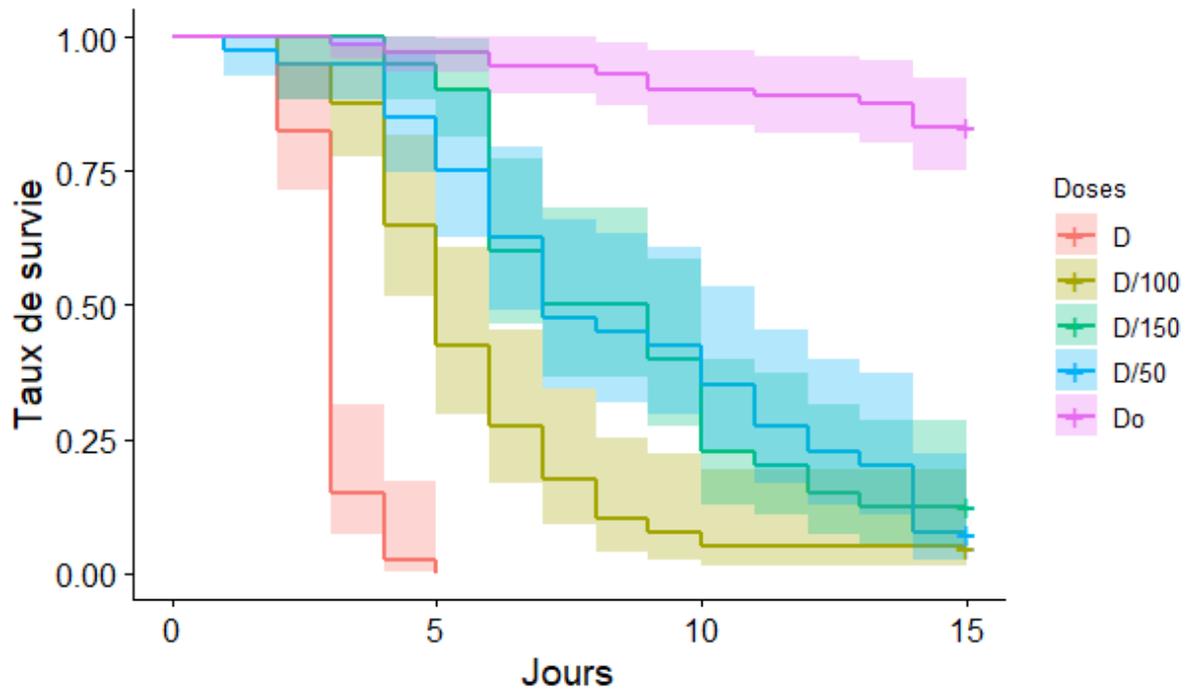


Figure 35: Taux de survie des mouches en fonction de différentes doses de MET1 au cours du temps

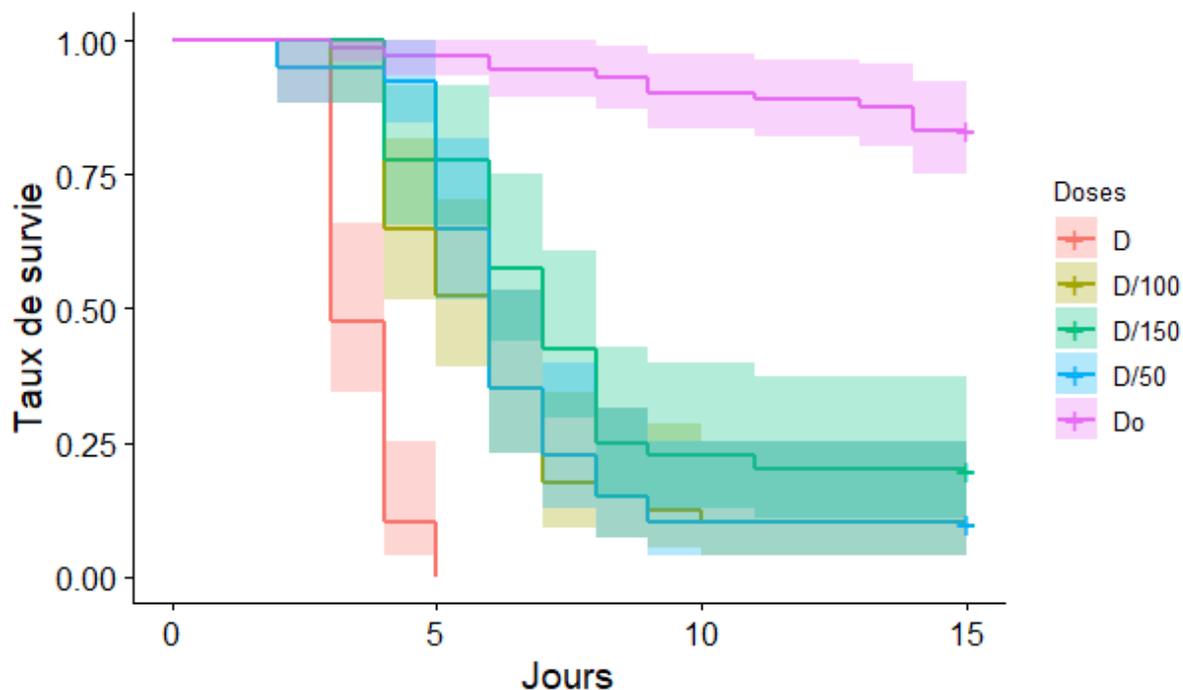


Figure 36: Taux de survie des mouches en fonction de différentes doses de MET69 OD au cours du temps

### 3.1.4. Pathogénicité sur larves et pupes

#### 3.1.4.1. Contact avec du sable contaminé au stade larvaire

Avec la souche MET1, 100% des larves contaminées ont pupé. Le pourcentage de mortalité des pupes a été de 30 ( $\pm 2,29$ ) % dans le sable traité contre 10 ( $\pm 1,5$ )% pour le témoin (figure 37). La mortalité des adultes après l'émergence était de 28,57 ( $\pm 3,23$ ) % chez les contaminées contre 5,56 ( $\pm 1,27$ ) % chez les témoins (figure 38). L'analyse statistique (Khi2 d'indépendance) a montré que la souche MET1 a un effet statistiquement significatif sur la mortalité combinée des pupes et des adultes ( $df = 1$  ;  $P = 0,039$ ). Seulement 33.33 ( $\pm 7,86$ ) % des pupes mortes (non émergées) ont présenté du mycélium lors de l'incubation contre zéro pour cent chez les Témoins. Précisons cependant qu'aucune mouche morte n'a présenté de mycélium.

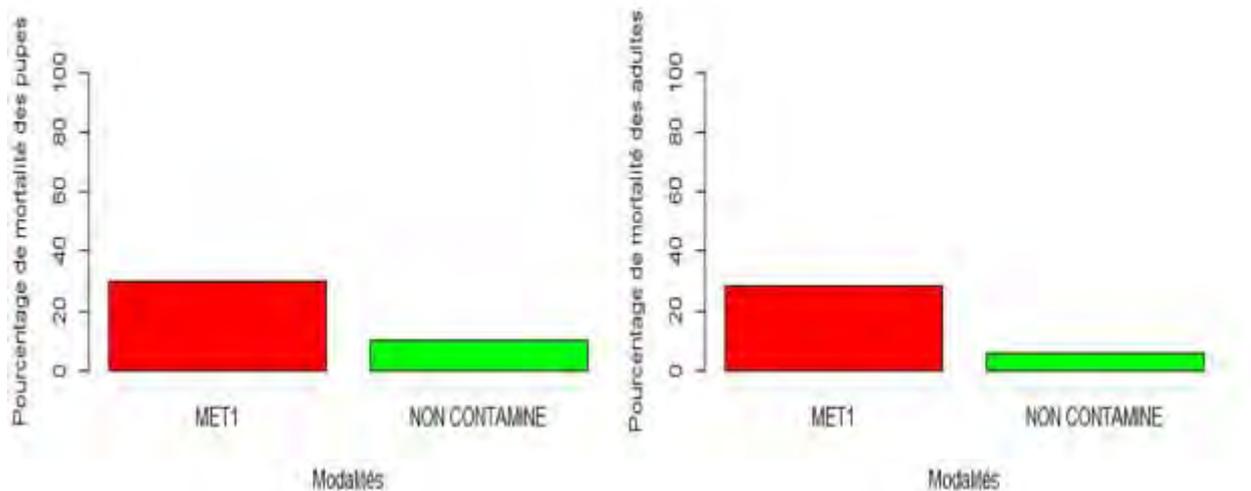


Figure 37: Pourcentage de mortalité des pupes et adultes de *B. dorsalis* (larves L3 placées dans du sable contaminé)

### 3.1.4.2. Contact avec du sable contaminé au stade pupes

La contamination des pupes via le sable contaminé a révélé un taux de mortalité de 20 ( $\pm 2$ ) % et les pupes témoins sont mortes avec un taux de 5 ( $\pm 1$ ) % (figure 39). Le pourcentage de mortalité des mouches adultes était de 12,5 ( $\pm 2,07$ ) % pour les contaminées et 5,26 ( $\pm 1,17$ ) % chez les témoins (figure 40). L'effet de la souche MET1 sur la mortalité combinée des pupes et des adultes est statistiquement non significatif ( $df=1$  ;  $P= 0,214$ ). Toutes les pupes mortes (100%) ont présenté du mycélium. Pourtant les mouches mortes après émergence n'ont pas développé de mycelium.

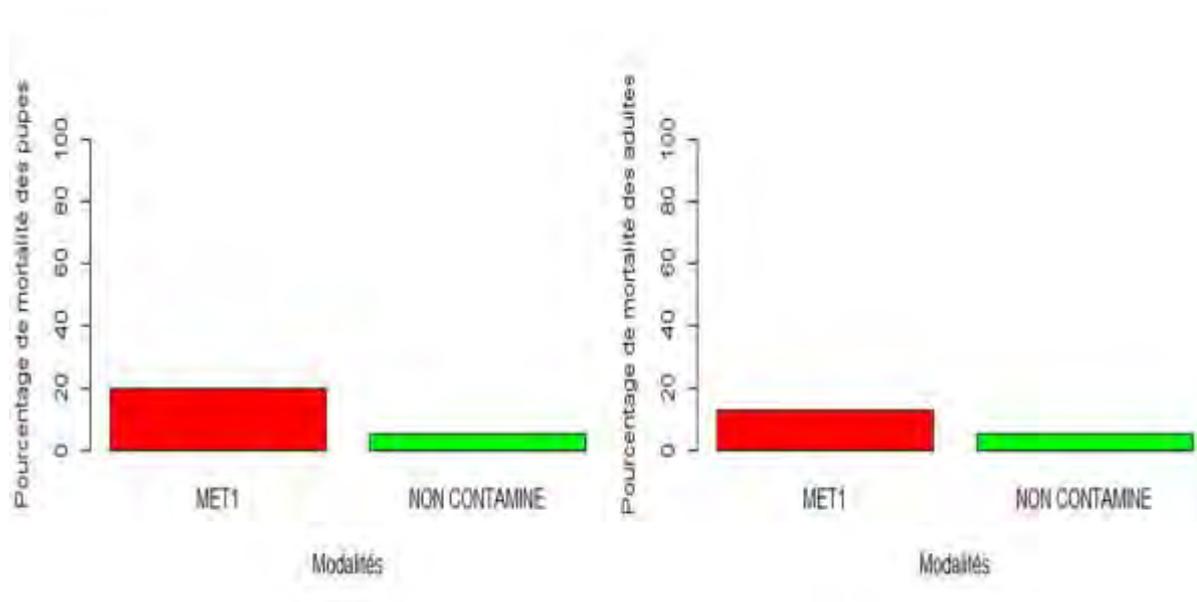


Figure 38: Pourcentage de mortalité des pupes et adultes de *B. dorsalis* (pupes placées dans du sable contaminé)

### 3.2. Discussion

Le succès de l'utilisation des champignons entomopathogènes dépend de la sélection des souches (SOPER et WARD, 1981). Par conséquent, l'identification d'une souche candidate de *M. anisopliae* pour une utilisation par entomovectoring contre *B. dorsalis* a été le principal objectif de cette étude. Des expérimentations préliminaires (portant sur la caractérisation du dispositif de contamination des mouches et des enrobages), des tests de pathogénicité (sur adultes, pupes et larves), ainsi qu'un test de doses, ont été effectués. Dans cette étude l'efficacité des différentes souches de *M. anisopliae* testées sur les adultes de *B. dorsalis* a été prouvée.

Les tests préliminaires ont été effectués dans le but de créer un cadre expérimental calibré et répétable. Pour les souches de *M. anisopliae* en spores libres, MET1 présente des spores visiblement plus petites que les autres souches. La charge en spores des mouches ne varie pas significativement avec la taille du dispositif de contamination. Au contraire, la durée de vortexage importe et doit être d'au moins 3min sans quoi le nombre de spores est mal comptabilisé. Ainsi, les résultats obtenus avec des dispositifs de tailles différentes peuvent donc être comparés, l'essentiel serait donc d'utiliser le même nombre de spores par unité de surface dans le dispositif de contamination, ce qui implique d'évaluer préalablement la concentration en spores des poudres.

Les résultats du test de virulence effectué sur les spores libres permettent de constater que toutes les souches testées étaient pathogènes pour *B. dorsalis* (MF, FF et MS) avec un taux de mortalité de 100% en moins de 7 jours et une DL50 qui varie de 2,49 à 6,6 jours. Ces résultats sont conformes à ceux de Dosso (2018) qui a enregistré 100% de mortalité chez les mâles de *B. dorsalis* contaminés avec du *M. anisopliae* sur une période de 0 à 15 jours.

La poudre de spores enrobées s'est avérée être composée de spores libres et de spores agglomérées dans des capsules, ce qui a compliqué l'estimation du nombre de spores par gramme. Les capsules, faites de matières végétales, se sont dégradées dans l'eau et ont libéré les spores. Cette dégradation nous a permis (i) d'estimer le nombre de spores présentes dans un gramme, et (ii) d'évaluer la possibilité que des spores soient relarguées sur la mouche après contamination. L'arrivée tardive de cette dégradation avec des capsules immergées laisse supposer qu'aucune spore ne sera relarguées au simple contact de l'humidité cuticulaire.

L'enrobage que nous avons testé s'est montré peu prometteur. Le test de virulence effectué avec l'enrobage 3 (MET3\_ENR3) montre que plus de 30% des mouches fertiles ont survécu après 20 jours de contamination. D'après nos observations, cette perte de virulence pourrait s'expliquer par le fait que l'enrobage crée des capsules qui ne s'accrochent pas sur les mouches réduisant le nombre des spores présentes sur la mouche (uniquement les spores libres dans la poudre). Le fait que les capsules ne s'accrochent pas sur la mouche peut-être dû au fait que les matières végétales qui constituent l'enrobage ne soient pas compatibles avec la cuticule de la mouche permettant à cette dernière de s'en débarrasser facilement. Il est également très probable que les capsules soient trop grosses pour s'accrocher sur la mouche, donc des capsules de taille bien inférieure à celle utilisée donneraient peut-être de meilleurs résultats. En effet, Al-Mazra'awi et al (2007) ont montré que le nombre de conidies de *B. bassiana* acquises par les abeilles (utilisées comme entomovecteur) augmentait avec la diminution de la taille des spores et de la teneur en humidité de la cuticule.

Le test de dose a montré des mortalités très importantes même pour la dose la plus faible malgré une nette différence constatée sur la charge en spores des mouches entre la dose D et D/150. Cela pourrait faire penser que la mortalité n'est pas directement liée au nombre de spores qui s'accrochent sur la mouche mais plutôt au contact entre spores et mouches. Il suffirait que la mouche soit en contact avec très peu de spores pour tomber malade même si une grande quantité de spores mettrait moins de temps pour tuer la mouche. On peut aussi

supposer que les mouches se nettoient uniquement lorsqu'elles se sentent gênées par la fixation des spores puisque la charge en spores des mouches est pratiquement la même à partir des doses faibles (D/50, D/100 et D/150). Il existerait probablement un seuil qui déclencherait le comportement de toilettage, ou bien un seuil d'efficacité du toilettage. La charge en spores des mouches contaminées après toilettage avec la dose D variait entre  $10^5$  ( $\pm 20018,09$ ) et  $1,7 \times 10^5$  ( $\pm 19119,31$ ) spores. Lors d'étude sur l'entomovectoring, Dimbi *et al* (2013) ont montré que, lors de l'accouplement, le mâle est capable de transférer  $10^5$  à  $2,5 \times 10^5$  spores à la femelle, ce qui correspond donc à une dose létale. Cependant, nos résultats montrent qu'il est possible de réduire cette dose, d'allonger ainsi la survie des mâles vecteurs, tout en conservant 100% de mortalité.

Le test de pathogénicité sur les larves de *B. dorsalis* montre que la souche MET1 n'a pas empêché la pupaison. Ekesi *et al* (2002) ont enregistré également 100% de pupaison des larves de *Ceratitis capitata* traitée avec du *Metarhizium*, ce qui corrobore nos résultats. MET1 a montré un effet significatif sur la mortalité totale (mortalité des pupes et des adultes), lorsque des larves (L3) sont mises en contact direct avec du sable contaminé. Ces résultats sont également conformes à ceux d'Ekesi *et al* (2002) qui ont montré que le *Metarhizium spp.* (toutes les souches testées) avait un effet statistiquement significatif sur l'émergence et la mortalité des adultes de *Ceratitis Capitata*. Ekesi *et al* (2011) ont montré que l'exposition des larves en voie de pupaison à des échantillons de sol prélevés dans des champs traités avec du *M. anisopliae* a entraîné une mortalité significative des pupes, ce qui est également en phase avec nos résultats. Un nombre assez élevé des pupes mortes ont développé du mycélium. Ceci est d'une importance capitale pour l'atteinte de nos objectifs car chaque pupa morte dans le sol constitue un foyer d'infection, qui servira de source d'inoculum pour infecter d'autres larves et pupes saines. En outre, un niveau élevé de sporulation des pupes dans le sol permet d'augmenter le seuil d'inoculum et les chances de contact entre les conidies et les larves saines, ce qui garantit la transmission de la maladie par les générations de parasites. Cependant, les mouches adultes, mortes après émergence n'ont pas développé de mycélium. Également, Vänninen *et al.* (1999) n'ont pas pu observer de symptômes causés par *M. anisopliae* sur les cadavres de *Delia radicum*. Étant donné qu'une croissance limitée du champignon dans l'hémocoèle de l'insecte ou la toxicose, peut être suffisante pour tuer l'insecte (Vänninen *et al.*, 2001), on peut supposer que *M. anisopliae* est responsable de la mort des adultes même si le mycélium n'est pas observable à l'œil nu. Contrairement aux larves, la contamination des pupes n'a pas montré de significativité. Mar et Lumyong (2012)

ont montré que la mortalité des pupes de *B. dorsalis* dépendait de la dose de *M. flavoviride* testée avec des mortalités qui variaient de 81,44% à 100% respectivement pour les doses  $10^7$  conidies  $\text{ml}^{-1}$  et  $10^8$  conidies  $\text{ml}^{-1}$ , Ce qui laisse supposer qu'une augmentation de la dose de contamination pourrait entraîner une mortalité significative. Une augmentation du nombre de répétitions aurait peut-être pu montrer un effet significatif, mais quoiqu'il en soit très faible.

## CONCLUSION :

En entomovectoring, que ce soit par les mâles stériles ou par auto-contamination, la souche la plus intéressante est celle qui tue le moins vite (dans une certaine limite qui doit encore être testé par la modélisation) mais dans des proportions aussi importantes que les autres souches. Par conséquent, MET69 OD serait plus intéressante pour une utilisation en entomovectoring car elle tue moins vite que les souches MET2 et MET1 tout en atteignant tout de même 100% de mortalité à la dose testés. Les mouches mâles contaminées avec MET69 OD auront le temps de parcourir de plus grandes distances, de s'accoupler plusieurs fois, et diffuseront mieux le pathogène dans les populations de *B. dorsalis*. Parmi les souches de l'entreprise française, MET1 est la souche la plus intéressante. Le test de virulence effectué avec l'enrobage 3 a montré une mortalité trop faible des mouches pour qu'il soit intéressant. Par ailleurs, l'utilisation de la souche MET1 en traitement du sol semble être prometteuse, néanmoins des études plus poussées devront être effectuées pour confirmer cela.

Les prochains travaux de recherche visant à la sélection d'une souche et d'une formulation pour une utilisation en entomovectoring devront se concentrer sur les points suivant :

### 1/ Amélioration des connaissances pour le calibrage de la méthode :

Il est très important de réussir à estimer le nombre de spores minimal pour induire la mortalité et de déterminer les facteurs (effet température, humidité) pouvant affecter l'efficacité de la souche sélectionnée (MET69 OD) afin de l'utiliser d'une manière optimale.

### 2/ Amélioration de la technicité :

La sensibilité des mâles est un facteur limitant majeur de l'efficacité pour de l'entomovectoring. Un enrobage induisant un délai de germination constituerait un bon levier d'amélioration de la méthode. La période de latence optimale pourrait être évaluée par modélisation. Il serait aussi intéressant d'améliorer l'adhérence des capsules d'enrobages sur les mouches (taille, texture, électrostaticité ?).

### 3/ Combinaison de méthodes d'application de l'entomopathogène :

L'augmentation des doses pour le test de pathogénicité sur pupes et larves permettrait d'améliorer l'utilisation via pulvérisation au sol. Si l'efficacité était ainsi amélioré, la combinaison du traitement au sol et l'entomovectoring pourrait être envisagée.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Allwood A.J., Leblanc L., Tora E.V., Bull R. (2001) *Méthodes de lutte contre la mouche des fruits pour les pays et territoires insulaires du Pacifique*.
- Al-Mazra'awi M.S., Kevan P.G., Shipp L. (2007) Development of *Beauveria bassiana* dry formulation for vectoring by honey bees *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) to the flowers of crops for pest control. *Biocontrol Science and Technology*, **17**, 733-741.
- Alves R.T., Bateman R.P., Prior C., Leather S.R. (1998) Effects of simulated solar radiation on conidial germination of *Metarhizium anisopliae* in different formulations. *Crop Protection*, **17**, 675-679.
- Arata A.A., Roberts D.W., Shaddock J.A., Shope R.E. (1978) Public Health Consideration for the Use of Viruses to Control Vectors of Human Diseases. *Viruses and Environment*, 593-594.
- Awuor O.E. (2010) Entomopathogenicity of hyphomycete fungi to fruit fly *Bactrocera invadens* (Diptera: Tephritidae) and their potential for biological control on mango. , 116.
- Bateman R. (1997) Methods of application of microbial pesticide formulations for the control of grasshoppers and locusts. *Memoirs of the Entomological Society of Canada*, **129**, 69-81.
- Baxter I.H., Howard N., Armsworth C.G., Barton L.E.E., Jackson C. (2008) The potential of two electrostatic powders as the basis for an auto-dissemination control method of *Plodia interpunctella* (Hübner). *Journal of Stored Products Research*, 10P.
- Bischoff J.F., Rehner S.A., 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.
- Bischoff J.F., Rehner S.A., Humber R.A. (2009) A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. *Mycologia*, **101**, 512-530.
- Carruthers R.I., Soper R.S. (1987) Fungal diseases. *Epizootiology of Insect Diseases*, 357-416.
- Casadevall A., Pirofski L. (1999) Host-pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. *Infection and Immunity*, **67**, 3703-3713.
- Chouvenc T., Su N.-Y., Robert A. (2009) Susceptibility of seven termite species (Isoptera) to the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Sociobiology*, **54**, 723-748.
- COURTOIS P. (1984) Champignon insecticide. In: *Annales de Gembloux*, pp. 143-150.
- CTA (2013) *Comment lutter contre les mouches des fruits infestant les mangues*.

- De Meyer M., Robertson M.P., Mansell M.W., Ekesi S., Tsuruta K., Mwaiko W., Vayssières J.-F., Peterson A.T. (2009) *Écological niche and potential geographic distribution of the invasive fruit fly Bactrocera invadens (Diptera, Tephritidae).*
- De Villiers M., Hattingh V., Kriticos D.J., Brunel S., Vayssières J.-F., Sinzogan A., Billah M.K., Mohamed S.A., Mwatawala M., Abdelgader H. (2016) *É The potential distribution of Bactrocera dorsalis: considering phenology and irrigation patterns. Bulletin of entomological research, 106, 193-203.*
- Deguine J.P., Duffourc V., Rousse P. (2011) *É gestion agro-écologique des mouches des légumes à la Réunion, en route vers une agriculture écologiquement intensive.*
- Diame L., Grechi I., Rey J.-Y., Sane C.A.B., Diatta P., Vayssières J.-F., Yasmine A., De Bon H., Diarra K. (2015) *É Influence of Oecophylla longinoda Latreille, 1802 (Hymenoptera: Formicidae) on mango infestation by Bactrocera dorsalis (Hendel)(Diptera: Tephritidae) in relation to Senegalese orchard design and management practices. African Entomology, 23, 294-305.*
- Dimbi S., Maniania N.K., Ekesi S. (2009) *É Effect of Metarhizium anisopliae inoculation on the mating behavior of three species of African Tephritid fruit flies, Ceratitis capitata, Ceratitis cosyra and Ceratitis fasciventris. Biological Control, 50, 111-116.*
- Dimbi S., Maniania N., Ekesi S. (2013) *É Horizontal Transmission of Metarhizium anisopliae in Fruit Flies and Effect of Fungal Infection on Egg Laying and Fertility. Insects, 4, 206-216.*
- Dimbi S., Maniania N.K., Lux S.A., Ekesi S., Mueke J.K. (2003) *É Pathogenicity of Metarhizium anisopliae (Metsch.) Sorokin and Beauveria bassiana (Balsamo) Vuillemin, to three adult fruit fly species: Ceratitis capitata (Weidemann), C. rosa var. fasciventris Karsch and C. cosyra (Walker) (Diptera :Tephritidae). Mycopathologia, 156, 375-382.*
- Doberski J.W. (1981) *É Comparative laboratory studies on three fungal pathogens of the elm bark beetle Scolytus scolytus: Effect of temperature and humidity on infection by Beauveria bassiana, Metarhizium anisopliae, and Paecilomyces farinosus. Journal of Invertebrate Pathology, 37, 195-200.*
- Dosso M.F. (2018) *É Étude de la transmission horizontale du champignon entomopathogène Metarhizium anisopliae (Sorokin) (Hypocreales, Clavicipitaceae) dans les populations de mouches des fruits Bactrocera dorsalis (Hendel) (Diptera, Tephritidae) au laboratoire. , 49P.*
- Drew R.A.I., Tsuruta K., White I.M. (2005) *É A new species of pest fruit fly (Diptera:*

- Tephritidae: Dacinae) from Sri Lanka and Africa. *African Entomology*, **13**, 149-154.
- Dunkle R.L., Shasha B.S. (1988) Starch-Encapsulated *Bacillus thuringiensis*: A Potential New Method for Increasing Environmental Stability of Entomopathogens. *Environmental Entomology*, **17**, 120-126.
- Eilenberg J., Hajek A., Lomer C. (2001) Suggestions for unifying the terminology in biological control. , 14P.
- Ekesi S., Billah M.K., Nderitu P.W., Lux S.A., Rwomushana I. (2009) Evidence for Competitive Displacement of *Ceratitis cosyra* by the Invasive Fruit Fly *Bactrocera invadens* (Diptera: Tephritidae) on Mango and Mechanisms Contributing to the Displacement. *Journal of Economic Entomology*, **102**, 981-991.
- Ekesi S., Maniania N.K., Lux S.A. (2002) Mortality in Three African Tephritid Fruit Fly Puparia and Adults Caused by the Entomopathogenic Fungi, *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*. , 13P.
- Ekesi S., Maniania N.K., Mohamed S.A. (2011) Efficacy of soil application of *Metarhizium anisopliae* and the use of GF-120 spinosad bait spray for suppression of *Bactrocera invadens* (Diptera: Tephritidae) in mango orchards. *Biocontrol Science and Technology*, **21**, 299-316.
- Ekesi S., Maniania N.K., Onu I., Löhr B. (1998) Pathogenicity of entomopathogenic fungi (Hyphomycetes) to the legume flower thrips, *Megalurothrips sjostedti* (Trybom)(Thysan., Thripidae). *Journal of Applied Entomology*, **122**, 629-634.
- Ekesi S., Nderitu P.W., Rwomushana I. (2006) Field infestation, life history and demographic parameters of the fruit fly *Bactrocera invadens* (Diptera: Tephritidae) in Africa. *Bulletin of entomological research*, **96**, 379-380.
- Espin G.A.T., Laghi de Suza H.M., Messias C.L., Piedrabuena A.E. (1989) Patogenicidad de *Metarhizium anisopliae* nas diferentes fases de desenvolvimento de *Ceratitis capitata* (Wied.) (Diptera: Tephritidae). *Revista Brasileira de Entomologia*, **33**, 17-23.
- Évaluation des champignons entomopathogènes efficaces pour la nymphe de la mouche des fruits, *Bactrocera* spp. et leur activité antimicrobienne.pdf
- FAO (2005) *Glossary of Phytosanitary terms*. P. P. C. (IPPC) (ed.). ISPM, Rome, Italy.
- Fargues J. (1972) Étude des conditions d'infection des larves de doryphore, *Leptinotarsa decemlineata* say, par *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill.[Fungi imperfecti]. *Entomophaga*, **17**, 319-337.
- Faulkner P., Boucias D.G. (1985) Genetic improvement of insect pathogens: emphasis on the use of baculoviruses. In: *Biology Control in Agriculture Ipm System*, pp. 263-281.

Academic Press.

- Feng M.G., Poprawski T.J., Khachatourians G.G. (1994) Production, Formulation and Application of the Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana* for Insect Control: Current Status. *Biocontrol Science and Technology*, 34P.
- Ferron P. (1978) Biological control of insect pests by entomogenous fungi. *Annual review of entomology*, **23**, 409-442.
- Ferron P., Fargues J., Riba G. (1991) *Fungi as microbial insecticides against pests*. Marcel Dekker, Inc.
- Fletcher B.S. (1987) The Biology of Dacine Fruit Flies. , 32P.
- Gardner W.A., Sutton R.M., Noblet R. (1977) Persistence of *Beauveria bassiana*, *Nomuraea rileyi*, and *Nosema necatrix* on Soybean Foliage. *Environmental Entomology*, **6**, 616-618.
- Gaugler R., Suman D., Wang Y. (2012) An autodissemination station for the transfer of an insect growth regulator to mosquito oviposition sites. *Medical and Veterinary Entomology*, **26**, 37-45.
- Gillespie A.T. (1988) *Use of fungi to control pest of agricultural importance*. Manchester.
- Goettel M.S. (1992) Des champignons comme agents de lutte biologique. *La lutte biologique contre les acridiens, sous la direction de CJ Lomer et C. Prior*, 122-131.
- GOMINA M. (2015) contribution à la connaissance des mouches des fruits (diptera : tephritidae) et de leurs parasitoides au sud du togo. *Agritop*, 190P.
- Greathead D.J., Kooyman C., Launois-Luong M.H., Popov G.B. (1994) *Les ennemis naturels des criquets du Sahel. Collection acridologie opérationnelle no. 8*. CILSS-DFPV/CIRAD-PRIFAS, Niamey, Niger, 87P
- Hajek A.E., St. Leger R.J. (1994) Interactions between fungal pathogens and insect hosts. *Annual review of entomology*, **39**, 293-322.
- HANNE A.M. (2006) *Rapport de stage de formation sur la biologie et méthodologie de lutte contre les mouches de Fruits et Légumes*.50P.
- Hokkanen H., Menzler-Hokkanen I. (2007) Utilisation des abeilles dans la lutte biologique contre les maladies des plantes. *Recherche entomologique*, 62-63.
- Hsu J.-C., Feng H.-T., Wu W.-J. (2004) Resistance and Synergistic Effects of Insecticides in *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae) in Taiwan. *Journal of Economic Entomology*, **97**, 1682-1688.
- Juan-Blasco M., Sabater-Muñoz B., Pla I., Argilés R., Castañera P., Jacas J.A., Ibáñez-Gual M.V., Urbaneja A. (2014) Estimating SIT-driven population reduction in the

- Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*, from sterile mating. *Bulletin of Entomological Research*, **104**, 233-242.
- Kaiser D., Handschinc S., Rohrb R.P., Bacherb S., Grabenwegera G. (2020) Co-formulation of *Beauveria bassiana* with natural substances to control pollen beetles Synergy between fungal spores and colza oil. *Biological Control*, 6.
- Khachatourians G.G. (1986) Production and use of biological pest control agents. *Trends in Biotechnology*, **4**, 120-124.
- Kouassi M. de (2001) Les possibilités de la lutte microbiologique. Emphase sur le champignon entomopathogène *B. bassiana*. *Vertigo-la revue électronique en sciences de l'environnement*, 2P.
- Lacey L.A. (1997) *Manual of techniques in insect pathology*. Academic Press.
- Lavabre E. (1992) *Ravageurs des cultures tropicales*. Paris, France.
- Lefort F. (2018) La lutte microbiologique sera au nombre des alternatives aux pesticides de synthèse, en raison de son innocuité pour l'environnement. , 33P.
- Lomer C., Prior C. (1992) *Lutte biologique contre les criquets et les sauterelles*. CAB International, Wallingford, Royaume-uni.
- Lux S.A., Copeland R.S., White I.M., Manrakhan A., Billah M.K. (2003) A new invasive fruit fly species from the *Bactrocera dorsalis* (Hendel) group detected in East Africa. *International Journal of Tropical Insect Science*, **23**, 355-361.
- MahMoud M.F. (2009) Pathogenicity of three commercial products of entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopilae* and *Lecanicillium lecanii* against adults of olive fly, *Bactrocera oleae* (Gmelin)(Diptera: Tephritidae) in the laboratory. *Plant Protection Science*, **45**, 98-102.
- Malavasi A., Midgarden D., Kellman V. (2000) Status of the cooperative republic of guyana as country free of *Bactrocera carambolea*, *carambolea* fruit fly programme in north of south america georgetown. Guyana.
- Manrakhan A., Grout T., Hattingh V. (2009) Combattre la mouche envahissante africaine *Bactrocera invadens*. *SA Fruit Journal*, **8**, 57-61.
- Mar T.T., Lumyong S. (2012) Evaluation of Effective Entomopathogenic Fungi to Fruit Fly Pupa, *Bactrocera* spp. and Their Antimicrobial Activity. *Contributed Paper*, **39**, 14P.
- McCoy C.W., Samson R.R.A., Boucias D.G. (1988) Entomogenous fungi, Handbook of Natural Pesticides, Vol.V: Microbial Insecticides, Partie A: Entomogeneous Protozoa and fungi,. *CRC Press*, 151-236.
- Mele P.V., Vrolijk J., Vayssières J.P. (2007) Effects of an African Weaver Ant,

- Oecophylla longinoda, in Controlling Mango Fruit Flies (Diptera: Tephritidae) in Benin. *JOURNAL OF ECONOMIC ENTOMOLOGY*, **100**, 7P.
- Miller J.A., Miller E.C. (1983) The metabolic activation and nucleic acid adducts of naturally-occurring carcinogens: Recent results with ethyl carbamate and the spice flavors safrole and estragole. *British Journal of Cancer*, **48**, 1R15.
- Millet R., Joray G., Sonnard R., Hegetschweiler A., Bisenz N., Engel S., Bollier D., Scheidegger L., Favre E., Mercado A., Maret D., Salamin R., Zolling F., Wetta C., Guien A., Chandelier A., Ibrahim R., Marchon L., Outdili H., Schmid M. (2018) Aux pesticides de synthèse, en raison de son innocuité pour l'environnement. , 33P.
- Mommaerts V., Put K., Vandeven J., Smaghe G. (2012) Miniature-dispenser-based bioassay to evaluate the compatibility of powder formulations used in an entomovectoring approach. *Pest Management Science*, **68**, 922R927.
- Ndiaye O. (2009) Plantes hôtes et foyers de réinfestation des mouches des fruits : facteurs phénologiques, morpho physiologiques déterminants sur les infestations de la mangue. , 87P.
- Ndiaye M., Dabo M. (2007) *Guide pratique de lutte contre les mouches des fruits dans les vergers de mangue au Sénégal*.91-98.
- Ndiaye O., Vayssieres J.-F., Yves Rey J., Ndiaye S., Diedhiou P.M., Ba C.T., Diatta P. (2012) Seasonality and range of fruit fly (Diptera: Tephritidae) host plants in orchards in Niayes and the Thiès Plateau (Senegal). *Fruits*, **67**, 311R331.
- Ndoye S. (2011) Les écosystèmes hôtes potentiels de *Bactrocera invadens* (Drew et al)(Dipteria) en saison sèche: le cas des bas fond dans la zone des Niayes du Sénégal. Mémoire de Master. Université Cheikh Anta Diop, Dakar.43P.
- Ousmane Z., Aboubacar K., Correia Za., Kadi H., Abdourahamane T.-B. (2014) Gestion agro-écologique des mouches de fruits de manguier dans la partie Nord de la Guinée-Bissau. *Journal of Applied Biosciences*, **75**, 62-50.
- Parsa S., Ortiz V., Vega F.E. (2013) Establishing Fungal Entomopathogens as Endophytes: Towards Endophytic Biological Control. *Journal of Visualized Experiments*, 50360.
- Payne C.C. (1982) Insect viruses as control agents. *Parasitology*, **84**, 35R77.
- Peng G., Sutton J.C., Kevan P.G. (1992) Effectiveness of Honey Bees for Applying the Biocontrol Agent *Gliocladium Roseum* to Strawberry Flowers to Suppress *Botrytis Cinerea*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, **14**, 117R129.
- Poncelet D. (2006) Microencapsulation: fundamentals, methods and applications. In:

- Surface chemistry in biomedical and environmental science*, pp. 23-34. Springer.
- Rwomushana I., Ekesi S., Ogol C.K.P.O., Gordon I. (2008) Effect of temperature on development and survival of immature stages of *Bactrocera invadens* (Diptera: Tephritidae). *Journal of Applied Entomology*, **132**, 832-839.
- Sabbahi R. (2008) Utilisation du champignon entomopathogène *Beauveria bassiana* dans une stratégie de gestion phytosanitaire des principaux insectes ravageurs des fraisières. Université du Québec Institut national de la recherche scientifique, Québec.
- SHELLY T.E., Whittier T.S. (1997) Lek behavior of insects. In: *THE evolution of mating system in insects and arachnids*, p. 273. JAE C. CHOE Musum of zoology, University of Michigan, USA.
- Smagghe G., Mommaerts V., Hokkanen H., Menzler-Hokkanen I. (2012) Multitrophic Interactions: The Entomovector Technology. In: *Progress in Biological control*
- SOPERR S., WARD M.G. (1981) Production, formulation and application of fungi for insect control. In: *Biological control in crop production*. Beltsville, Maryland.
- Starnes R.L., Liu C.L., Marrone P.G. (1993) History, use, and future of microbial insecticides. *American Entomologist*, **39**, 83-91.
- Stathers T.E., Moore D., Prior C. (1993) The effect of different temperatures on the viability of *Metarhizium flavoviride* conidia stored in vegetable and mineral oils. *Journal of Invertebrate Pathology*, **62**, 111-115.
- Ternoy J., Poublanc C., Diop M., Nugawela P. (2006) *La chaîne de valeurs mangue au Sénégal: analyse et cadre stratégique d'initiatives pour la croissance de la filière, Unité BDS du programme USAID Croissance économique*. Dakar, Sénégal. Sept.
- Thies C. (1987) Microencapsulation. *Encyclopédie POL.Sci.ENG*, **9**, 724-745.
- Thomas S.R., Elkinton J.S. (2004) Pathogenicity and virulence. *Journal of Invertebrate Pathology*, **85**, 146-151.
- Van Lenteren J.C. (2000) Success in biological control of arthropods by augmentation of natural enemies. In: *Biological control: measures of success*, pp. 77-103. Springer.
- Van Mele P., Vayssières J.-F., Van Tellingen E., Vrolijk J. (2007) Effects of an African weaver ant, *Oecophylla longinoda*, in controlling mango fruit flies (Diptera: Tephritidae) in Benin. *Journal of Economic Entomology*, **100**, 695-701.
- Vänninen I., Hokkanen H., Tyni- Juslin J. (1999) Attempts to control cabbage root flies *Delia radicum* L. and *Delia floralis* (Fall.) (Dipt., Anthomyiidae) with

- entomopathogenic fungi: laboratory and greenhouse tests. *Journal of applied entomology*, 123(2), 107-113.
- Vargas R.I., Leblanc L., McKenney M., Mackey B., Harris E.J., Badji K. (2016) Rearing *Fopius arisanus* (Sonan) (Hymenoptera: Braconidae) on Mediterranean Fruit Fly and its Introduction into Senegal against Oriental Fruit Fly (Diptera: Tephritidae). , 10P.
- vayssière J.F., Sinzogan A., Bokonon Ganta A A. (2008) R *The new invasive fruit fly species, Bactrocera invadens* Drew Tsuruta & White. IITA-CIRAD.
- Vayssières J.-F., Goergen G., Lokossou O., Dossa P., Akponon C. (2005) R A new *Bactrocera* species in Benin among mango fruit fly (Diptera: Tephritidae) species. *Fruits*, **60**, 371-377.
- Vayssières J.-F., Sanogo F., Noussourou M. (2004) R Inventaire des espèces de mouches des fruits (Diptera: Tephritidae) inféodées au manguier au Mali et essais de lutte raisonnée. *Fruits*, **59**, 3-16.
- Vayssières J.F., Sinzogan A., Adandonon A. (2009) R *Principales méthodes de lutte intégrée contre les mouches des fruits en Afrique de l'Ouest*. IITA-CIRAD.
- Vayssières J.-F., Sinzogan A., Adandonon A., Rey J.-Y., Dieng E.O., Camara K., Sangaré M., Ouedraogo S., Sidibé A., Keita Y. (2014) R Annual population dynamics of mango fruit flies (Diptera: Tephritidae) in West Africa: socio-economic aspects, host phenology and implications for management. *Fruits*, **69**, 207-222.
- Weems H.V., Heppner J.B., Nation J.L., Fasulo T.R. (2012) R Oriental Fruit Fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel) (Insecta: Diptera: Tephritidae). , 6P.
- White I., Elson-Harris M. (1992) R *Mouches des fruits d'importance économique: leur identification et bionomique*. CBA international, Wallingford.
- Wraight S.P., Roberts D.W. (1987) R Insect control efforts with fungi. *Developments in industrial microbiology*, **28**, 77-87.
- Wraight S.P., Ugine T.A., Ramos M.E., Sanderson J.P. (2016) R Efficacy of spray applications of entomopathogenic fungi against western flower thrips infesting greenhouse impatiens under variable moisture conditions. *Biological Control*, **97**, 31-47.
- Zimmermann G. (2007) R Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Biocontrol Science and Technology*, **17**, 879-920.
- Zimmermann G., Papierok B., Glare T. (1995) R Elias Metschnikoff, Elie Metchnikoff or Ilya Ilich Mechnikov (1845-1916): A Pioneer in Insect Pathology, the First Describer of the Entomopathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae* and How to Translate a

Russian Name. *Biocontrol Science and Technology*, **5**, 527R530.